



HAL
open science

Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle

Liming Zeng

► **To cite this version:**

Liming Zeng. Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle. Biologie moléculaire. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0302 . tel-01443274

HAL Id: tel-01443274

<https://theses.hal.science/tel-01443274>

Submitted on 23 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par Liming ZENG

**Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des
vins : impact sur la qualité sensorielle**

Sous la direction de : Michaël JOURDES

Soutenue le 10 décembre 2015

Membres du jury :

M. TEISSÈDRE, Pierre-Louis
M. ZAMORA, Fernando
M. De FREITAS, Victor
M. DANGLES, Olivier
M. JOURDES, Michaël

Professeur Université de Bordeaux
Professeur Université Rovira i Virgili
Professeur Université de Porto
Professeur Université d'Avignon
MC Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle

Résumé : Les tanins condensés et les pigments polymérisés sont deux grandes familles de macromolécules qui jouent des rôles importants sur la qualité organoleptique du vin rouge. Leurs structures oligo-polymériques ainsi que leurs évolutions durant le vieillissement du vin rouge sont mal connues. L'objectif de cette étude est d'approfondir notre connaissance sur leurs structures et leurs évolutions durant le vieillissement.

Durant ce travail, nous avons caractérisé, pour la première fois dans le règne végétal, une nouvelle sous-famille de tanins condensés nommés : **les tanins condensés couronnes**, qui ont des propriétés spécifiques. Ils sont plus polaires que des tanins condensés de type B. Durant le vieillissement, les concentrations des tanins de type B diminuent alors que celles des tanins couronnes restent plutôt stables. Leurs concentrations sont plus élevées dans les vins issus de cépage Syrah que dans les vins issus de cépage Cabernet Sauvignon et Merlot. Au niveau sensoriel, une forte corrélation entre la concentration des tanins couronnes et l'intensité d'astringence ressentie par les dégustateurs a été montrée. Un premier test d'activité biologique du tétramère couronne montre une activité inhibitrice intéressante de l'agrégation du peptide β -amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer. En même temps, une nouvelle méthode de quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène via un marqueur spécifique en utilisant une détection par fluorescence a été développée.

Concernant les pigments polymérisés avec différents types de liaisons inter-flavonoïdes, leurs mécanismes de dépolymérisation chimique en milieu acide ont été clarifiés et une méthode de quantification sur un système UPLC-Q-TOF a été développée. Les pigments oligo-/polymériques contribuent plus à la couleur du vin vieux que les pigments mono-/dimériques. La concentration des structures oligo-polymériques ayant des liaisons de type A est plus stable que celle des pigments polymérisés par des liaisons de type B ou par le pont éthylidène durant le vieillissement du vin. De plus, durant nos investigations sur les pigments polymérisés, les structures de type A-F(type A)-F(n) et de type F(n)-A-F(type A) ainsi que les formes acétylés d'anthocyane trimère et les formes acétylés des anthocyane dimères liées par pont éthylidène ont été montrées pour la première fois.

Mots clés : Vin rouge, Tanins condensés, Tanins condensés couronnes, Pigments polymérisés, Phloroglucinolyse, Q-TOF

Unité de recherche

Univ Bordeaux, ISVV, EA 4577 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France
INRA, ISVV, USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

Study of macromolecular composition of grape and wine: impact on sensorial quality

Abstract: Condensed tannins and polymeric pigments are two families of macromolecules which play important roles on the organoleptic quality of red wine. Their oligo-polymeric structures and their evolutions during red wine aging are poorly known. The objective of this study is to deepen our knowledge of their structures and their evolutions during red wine aging.

During our work, we characterized, for the first time in plant kingdom, a new family of condensed tannins named: **crown condensed tannins**, which have specific properties. They are more polar than B-type tannins. During red wine aging, the concentration of B-type tannins decreased while the crown tannins remained stable. Their concentrations are higher in Syrah wines than in wines made from Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. From a sensory point of view, a strong correlation between the concentration of crown tannins and the intensity of astringency rated by the tasters was obtained. The first biologic activity assay of the crown tetramer showed an interesting inhibitory activity on aggregation of β -amyloid peptide involved in Alzheimer's disease. At the same time, a new quantification method of ethylidene bridge linked condensed tannins via a specific marker using fluorescence detection has been developed.

Concerning polymeric pigments with different types of inter-flavonoids linkages, their acidic depolymerization mechanisms have been clarified for the first time and a quantification method using a UPLC-Q-TOF system has been developed. Oligo-/polymeric pigments contributed more to the color of old wine than mono-/dimeric pigments. The concentration of the pigmented oligo-polymers with A type linkages is more stable than that of polymeric pigments by B-type linkages or by ethylidene bridge during red wine aging. In addition, during our study of polymeric pigments, A-F(A type)-F(n) and F(n)-A-F(A type) structures as well as the acetylated form of trimeric anthocyanin and acetylated forms of dimeric anthocyanin linked by ethylidene bridge have been shown for the first time.

Keywords: Red wine, Condensed tannins, Crown condensed tannins, Polymeric pigments, Phloroglucinolysis, Q-TOF

Unité de recherche

Univ Bordeaux, ISVV, EA 4577 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France
INRA, ISVV, USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

A ma famille

pour leur présence

pour leur soutien

avec toute mon affection et reconnaissance

REMERCIEMENTS

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement Monsieur le Professeur Pierre-Louis Teissède pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir soutenue et encouragée durant ces trois années. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes plus vifs et particuliers remerciements à Monsieur Jourdes qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup appris et soutenue. Sa patience, sa gentillesse et sa confiance en moi m'ont beaucoup encouragée. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère et profonde reconnaissance.

Monsieur De Freitas et Monsieur Zamora, un sincère merci pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Monsieur Dangles et Monsieur Teissède, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je vous remercie tous de m'avoir fait l'honneur de votre présence dans ce jury de soutenance.

Mes remerciements vont également à l'équipe GESVAB : Monsieur Jean-Michel Mérillon, Tristan, Pierre, Stéphanie, Grégory, Alain, Elodie, Gérard et Eric. Merci pour la gentillesse et la patience que vous avez manifestées à mon égard durant cette thèse. Merci Tristan, d'être resté jusqu'à tard pour l'interprétation des résultats RMN et d'être venu le 24 décembre pour une analyse RMN. Merci Stéphanie, d'avoir partagé tes compétences sur les essais d'activité biologique avec moi. Merci Pierre, pour tous les conseils scientifiques rigoureux. Merci Gérard et Eric, pour vos soutiens généreux.

J'exprime aussi ma gratitude à Mme Martine Mietton-Peuchot pour sa gentillesse et ses conseils scientifiques, et son équipe Rémy, Sami, Robin, Juliette, Sandra, Arnaud et Fabrice pour l'hospitalité dont ils ont fait preuve envers moi.

Marie-Claire, Laurent, Céline et Pascaline, vous m'avez toujours chaleureusement accueillie dans vos laboratoires, merci! Merci Céline, d'avoir partagé ta connaissance sur la masse avec moi.

Sophie, un merci profond pour ton aide précieuse et continue pour les analyses sensorielles depuis mon master et tout au long de ma thèse. Merci, Cécile, Warren, Axel, Blandine, Stéphanie, Alexandre et Zurine pour tous les conseils que vous avez bien voulu me donner. Merci Patrick, Manu, Natalie et Élodie pour votre disponibilité. Merci Géraldine, Hervé, Cécile et Bernard, vos corrections de ce manuscrit ont été déterminantes.

Julie, Anna, Pablo, Père et Alicia, vous êtes arrivés au sein de notre laboratoire en différentes périodes pour vos stages. Je n'oublierai jamais l'aide que vous m'avez apportée et les échanges que nous avons eus durant vos stages. Soyez assurés de toute ma reconnaissance.

Olivier, Cécile, Sandra, Marine, Hervé, Fety, Laurent, Takis, Pascaline et Lemia, merci d'avoir partagé des moments de déjeuner et d'avoir échangé des avis sur de nombreux sujets de la vie avec moi durant ces trois années.

Je remercie tous ceux sans les sourires desquels, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : Kléo, Julien, Isa, Alexandra, Magali, Marine, Yioulie, Takis, Lemia, Reyes, Wen et Juliette. Je vous exprime toute mon amitié et ma reconnaissance pour votre aide et surtout pour votre sens d'humour.

Je voudrais souhaiter la réussite de sa thèse en urbanisme à Yanyan qui termine également cette année. Merci d'avoir partagé des 'soucis et joies de thésards' avec moi durant ces trois années. Mes souhaits vont également à Cindy, Wen, Blandine, Xavier, Vincent, Anna, Marie, Rémy et Julie, bon courage et bonne réussite pour vos thèses.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous les gens que j'ai eu le plaisir de côtoyer.

Mes parents, la famille de ma sœur, Arnaud et sa famille, la famille d'Anne-Marie et Philippe,
je vous remercie infiniment pour vos soutiens.

VALORISATION DES TRAVAUX DES RECHERCHES

I. PUBLICATIONS ISSUES DES TRAVAUX DE THESE ET AUTRES PUBLICATIONS

I.1 Chapitre d'ouvrage

Ky I., Le Floch A., **Zeng L.**, Pechamat L., Jourdes M., Teissedre P.-L., Tannins. In *Encyclopedia of Food and Health*, Caballero, B.; Finglas, P. M.; Toldrá, F., Eds. Academic Press: Oxford, **2016**; pp 247-255.

I.2 Articles scientifiques

Zeng L., Pons P., Richard T., Krisa S., Teissedre P.-L., Jourdes M., Crown procyanidin tetramer A : a new procyanidin with unusual cyclic skeleton. *Org. Lett.* **2016**, (Submitted).

Zeng L., Teissedre P.-L., Jourdes M., Structures of polymeric pigments in red wine and their derived quantification markers revealed by high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Sp.* **2016**, 30,(1) 81-88.

Chira K., **Zeng L.**, Le Floch A., Pechamat L., Jourdes M., Teissedre P.-L., Compositional and sensory characterization of grape proanthocyanidins and oak wood ellagitannin. *Tetrahedron* **2015**, 71, (20), 2999-3006.

Pechamat L., **Zeng L.**, Jourdes M., Ghidossi R., Teissedre P.-L., Occurrence and formation kinetics of pyranomalvidin-procyanidin dimer pigment in merlot red wine: Impact of acidity and oxygen concentrations. *J. Agr. Food Chem.* **2014**, 62, (7), 1701-1705.

II. COMMUNICATIONS AU COURS DE CONGRÈS INTERNATIONAUX

II.1 Présentations Orales

Zeng L., Teissedre P.-L., Jourdes M., Study of polyphenolic pigments in red wine: strategy of quantification via phloroglucinolysis and strategy of new pigments' identification by high resolution mass spectrometry (Q-TOF). **10^e Symposium International d'Œnologie de Bordeaux. 2015**, Bordeaux, France, 29 June-1 July

Zeng L., Richard T., Teissedre P.-L., Jourdes M., Study of polyphenolic compounds in red wine. **38th World Congress of Vine and Wine (OIV congress)**. **2015**, Mainz, German, 05-10 July

Zeng L., Teissedre P.-L., Jourdes M., New quantification method of ethyl-bridges and phloroglucinolysis released products of wine tannins. **Macrowine**. **2014**, Stellenbosch, South Africa, 7-10 September

II.2 Présentations Affichées

Zeng L., Teissedre P.-L., Jourdes M., Purification and characterization of three new condensed tannins oligomers in red wine. **10^e Symposium International d'Œnologie de Bordeaux**. **2015**, Bordeaux, France, 29 June-1 July

Zeng L., Teissedre P.-L., Jourdes M., Identification of polymeric pigments using high resolution mass spectrometry (UPLC-UV-Q-TOF) in Bordeaux red wine. **9th In Vino Analytica Scientia Symposium**. **2015**, Trento, Italy, 14-17 July

Zeng L., Teissedre P.-L., Jourdes M., Quantification and kinetic of evolution of polymeric pigment and ethylidene-bridged tannins during wine aging. **37th World Congress of Vine and Wine (OIV congress)**. **2014**, Mendoza, Argentina, 09-14 November

Pechamat L., **Zeng L.**, Jourdes M., Ghidossi R., Teissedre P.-L., Impact of oxygen and acidity on chemical and sensory properties, and on pyranoanthocyanin kinetics in a Merlot red wine. **37th World Congress of Vine and Wine (OIV congress)**. **2014**, Mendoza, Argentina, 09-14 November

Pechamat L., **Zeng L.**, Jourdes M., Ghidossi R., Teissedre P.-L., Impact of oxygen and acidity on chemical compounds and sensory properties of a Merlot red wine. **Macrowine**. **2014**, **Macrowine**. Stellenbosch, South Africa, 7-10 September

Zeng L., Teissedre P.-L., Jourdes M., Quantification and kinetic of evolution of polymeric pigment during wine aging. **Wine Active Compounds**. **2014**, Beaune, France, 26-28 Mars

Zeng L., Teissedre P.-L., Jourdes M., Identification and quantification of polymeric pigments and ethylidene-bridged tannins in red wine. **8th In Vino Analytica Scientia Symposium**. **2013**, Reims, France, 02-05 July

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Introduction	6
II. Les composés phénoliques du raisin et du vin rouge	7
II.1 Généralités.....	7
II.2 Les non-flavonoïdes.....	7
II.2.1 Les acides phénols	7
II.2.2 Les stilbènes	8
II.2.3 Les tanins hydrolysables (gallotanins et ellagitanins)	9
II.3 Les flavonoïdes.....	11
III. Les tanins condensés ou les proanthocyanidines	13
III.1 La terminologie	13
III.1.1 Le terme «tanin»	13
III.1.2 Le terme «proanthocyanidines»	15
III.2 Les structures, la localisation et les teneurs.....	15
III.3 Les propriétés sensorielles	18
III.3.1 L'astringence	18
III.3.2 L'amertume	21
IV. Les anthocyanes	22
IV.1 Le terme «anthocyane».....	22
IV.2 Les structures, la localisation et les teneurs.....	22
IV.3 L'équilibre des anthocyanes en fonction du pH.....	23
IV.4 L'équilibre des anthocyanes en présence de SO ₂	25
V. La polymérisation des composés polyphénoliques	27
V.1 La condensation directe par liaison inter-flavonoïde de type B	27
V.1.1 Les liaisons inter-flavonoïdes de type B des tanins condensés	27
V.1.2 Les liaisons inter-flavonoïdes de type B entre l'unité de flavanol et l'unité d'anthocyanique	30
V.2 La condensation directe par liaison inter-flavonoïde de type A.....	31

V.2.1	<i>Les liaisons inter-flavonoïdes de type A dans les tanins condensés</i>	31
V.2.2	<i>Les liaisons inter-flavonoïdes de type A entre flavanol et anthocyane</i>	33
V.2.3	<i>Les liaisons inter-flavonoïdes de type A entre deux unités d'anthocyane</i>	33
V.3	La condensation indirecte par pont éthylidène	34
V.4	L'évolution des anthocyanes par cyclo-addition	36
V.5	De nouvelles structures des pigments polymérisés	38
VI.	La caractérisation des structures polymériques	40
VI.1	La spectrométrie de masse haute résolution	40
VI.1.1	<i>Généralités</i>	40
VI.1.2	<i>L'application de la spectrométrie de masse haute résolution à la caractérisation des composés polyphénoliques du vin</i>	40
VI.2	La dépolymérisation des structures polymériques	42
VI.2.1	<i>Le mécanisme de dépolymérisation des tanins condensés</i>	42
VI.2.2	<i>Le degré de polymérisation moyen (DPm)</i>	43
VI.2.3	<i>Le marqueur des tanins condensés liés par pont éthylidène</i>	45
VI.2.4	<i>La dépolymérisation des structures polymériques ayant des liaisons non-dépolymérisables</i>	46
VII.	L'évolution des tanins condensés et des anthocyanes au cours de l'élevage et du vieillissement du vin rouge	48
VII.1	Généralités	48
VII.2	La dégradation des anthocyanes	48
VII.3	La copigmentation.....	49
VII.4	La formation et l'évolution des pyranoanthocyanes	50
VII.5	L'évolution des pigments polymérisés.....	53
VII.6	L'évolution des tanins condensés.....	56
VIII.	Conclusion	58
 CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES		59
I.	Les solvants, les réactifs et des vins	60
II.	Les systèmes U/HPLC couplés aux divers détecteurs (DAD, fluorescence ou MS)	61
II.1	Le système UPLC-DAD-ESI-Q-TOF.....	61
II.2	Le système UPLC-DAD-Fluorescence-ESI-Quadripôle	64
II.3	Le système HPLC (semi-préparative)-DAD	65
III.	Les synthèses et l'hémi-synthèses des composés	66
III.1	Le 2,2'-éthylidènediphloroglucinol (EDP)	66
III.2	Les adduits de type A-F(type A).....	66

III.3	Les adduits de type F-A ⁺	66
III.4	Les tanins condensés couronnes	68
IV.	Le fractionnement des composés phénoliques du vin rouge en phase solide et la purification des tanins couronnes	70
IV.1	Généralités	70
IV.2	Le fractionnement des vins rouges par l'extraction en phase solide C18	70
IV.3	Le fractionnement des vins rouges par l'extraction en phase solide TSK-40S ..	71
IV.4	La purification des tanins condensés couronnes depuis du vin rouge.....	74
V.	La dépolymérisation par la phloroglucinolyse	75
V.1	La solution réactionnelle	75
V.2	Le fractionnement du vin rouge.....	75
V.3	La réaction de phloroglucinolyse.....	75
V.3.1	<i>La dépolymérisation des pigments polymérisés</i>	75
V.3.2	<i>La quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène</i>	76
V.3.3	<i>La dépolymérisation du tétramère et des pentamères couronnes</i>	76
VI.	La caractérisation du tétramère couronne	77
VI.1	La résonance magnétique nucléaire (RMN)	77
VI.2	La modélisation moléculaire.....	77
VI.3	La mesure du pouvoir rotatoire	77
VI.4	L'évaluation des activités neuroprotectrices du tétramère couronne	78
VII.	La spectrophotométrie et la colorimétrie	79
VII.1	La spectrophotométrie	79
VII.1.1	<i>L'indice de polyphénol totaux (IPT) ou I280</i>	79
VII.1.2	<i>Les caractéristiques chromatiques du vin rouge</i>	79
VII.2	La colorimétrie par la méthode de CIE	80
VIII.	L'analyse sensorielle	82
IX.	L'analyse statistique	82
CHAPITRE 3	LES TANINS CONDENSÉS DU VIN ROUGE	83
I.	L'identification des unités de base des tanins condensés du vin rouge	84
I.1	Généralités.....	84
I.2	La (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine	85
I.3	L'(-)-épigallocatechine et la (+)-gallocatechine	86
I.4	L'(-)-épicatéchine-3-O-gallate.....	87
II.	L'identification des tanins de type B par HRMS	89
II.1	Les dimères de type B	89
II.2	Les trimères de type B	91

II.3	Les tétramères de type B	93
II.4	Les pentamères de type B.....	95
III.	L'identification des tanins dimères de type A par HRMS	97
IV.	L'identification des tanins couronnes par HRMS, phloroglucinolyse et RMN..	99
IV.1	La détection et l'identification par HRMS	99
IV.2	La purification.....	104
IV.3	La caractérisation de la structure couronne par RMN et la modélisation moléculaire	108
IV.4	La phloroglucinolyse des oligomères des tanins condensés couronnes	113
IV.5	La caractérisation chromique et le pouvoir rotatoire	115
IV.6	L'évaluation des activités neuroprotectrices du tétramère couronne	116
IV.7	Les structures hypothétiques des autres pentamères	117
IV.8	Le suivi de formation des procyanidines couronnes dans les médias acides ...	118
V.	Le marqueur de quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène...	121
V.1	Rappel	121
V.2	Le marqueur 2,2'-éthylidènediphloroglucinol	122
V.3	La synthèse de 2,2'-éthylidènediphloroglucinol et sa purification	124
V.4	La détection de 2,2'-éthylidènediphloroglucinol par fluorescence	124
VI.	Conclusion	128
CHAPITRE 4 LES PIGMENTS DU VIN ROUGE		129
I.	L'identification des pigments monomériques du vin rouge	130
I.1	Les anthocyanes.....	130
I.2	Les pyranoanthocyanes	131
II.	L'identification des pigments polymérisés du vin rouge et leurs marqueurs	135
II.1	Résumé des pigments polymérisés	135
II.2	La distinction entre les adduits A ⁺ -F et les adduits F-A ⁺	137
II.3	L'identification des adduits A-F incolores (type A, type flavène)	140
II.4	Les condensations directes de type F-A-F(type A) et A-F(type A)-F	143
II.5	La condensation indirecte A ⁺ -pont éthylidène-T.....	146
II.6	La condensation indirecte A-pont éthylidène-A ⁺ et ses dérivés.....	149
II.6.1	<i>A-pont éthylidène-A⁺</i>	149
II.6.2	<i>A-pont éthylidène-A⁺(acétylé) et A(acétylé)-pont éthylidène-A⁺(acétylé)</i> ...	152
II.6.3	<i>A⁺-pont éthylidène-(A-F)(type A)</i>	154
II.7	Les anthocyanes oligomères.....	155
II.7.1	<i>Dimères A-A⁺</i>	155
II.7.2	<i>Trimères A-A-A⁺</i>	157

II.8	Les flavano-pyranoanthocyanes	160
II.8.1	<i>Pyranoanthocyane-flavan-3-ol (monomère)</i>	160
II.8.2	<i>Pyranoanthocyane-flavan-3-ol (dimère)</i>	163
III.	La dépolymérisation des pigments polymérisés	167
IV.	Conclusion	170
CHAPITRE 5 ÉVOLUTION DES TANINS ET DES PIGMENTS AU COURS DU		
VIEILLISSEMENT		172
I.	Généralités	173
II.	Les tanins condensés	175
II.1	L'évolution des tanins condensés de type B	175
II.2	L'évolution des tanins condensés couronnes	178
II.3	L'évolution des dimères de type A	182
II.4	L'évolution des tanins liés par pont éthylidène	182
III.	Les pigments monomériques	185
IV.	Les pigments polymérisés	188
IV.1	Introduction.....	188
IV.2	L'évolution des pigments polymérisés par condensation directe de type B.....	188
IV.3	L'évolution des structures polymériques par condensation directe de type A .	191
IV.4	L'évolution des pigments polymérisés par condensation indirecte	192
IV.5	L'évolution des anthocyanes oligomériques.....	194
IV.6	L'évolution des flavano-pyranoanthocyanes	196
IV.7	Conclusion	198
V.	Les analyses colorimétriques et les analyses sensorielles	199
V.1	L'évolution de la couleur du vin rouge durant le vieillissement	199
V.2	L'évolution de l'aspect gustatif du vin rouge durant le vieillissement.....	203
V.3	Corrélation des résultats sensoriels et chimiques	205
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		210
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		216
ANNEXES		235

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Évolution de qualité organoleptique des vins durant le vieillissement.....	2
Figure 2. Les squelettes des principales sous-familles de composés de la grande famille des flavonoïdes.....	12
Figure 3. Une structure générale des tanins condensés.....	14
Figure 4. Les structures d'acutissimine A et d'acutissimine B.....	14
Figure 5. Les principaux phlorotanins.....	15
Figure 6. Les structures des flavanols monoglycosilés. A : L'(épi)catéchine monoglycosylée ; B : L'(épi)gallocatéchine monoglycosylée ; C : L'épicatéchine gallate monoglycosylée [85].	17
Figure 7. Les structures des différentes formes d'anthocyanes. A ⁺ = cation flavylum ; AO = base quinonique ; AOH = base carbinol.....	24
Figure 8. La variation de la proportion des différentes formes d'anthocyanes en fonction du pH.....	24
Figure 9. Structures des formes incolores de type ASO ₃ H résultant de la réaction entre les anthocyanes et l'ion HSO ₃ ⁻	26
Figure 10. Les liaisons inter-flavonoïdes des tanins condensés de type B (C4-C8/C6).....	27
Figure 11. La voie biosynthèse de la procyanidine chez les plantes.....	28
Figure 12. Démonstration des réactions de polymérisation de type B et de type A. I : La dépolymérisation des tanins condensés ; II : La polymérisation des tanins condensés de type B ; III : La formation de pigment polymérisé de type T-A ⁺ ; IV : La formation des polymères incolores de type A(flavène)-T, de type A-F(type A)-T et de pigment polymérisé de type A ⁺ -T.	29
Figure 13. Les structures de type A identifiées et caractérisées par Jacques <i>et al.</i> en 1973 [96].	31
Figure 14. La structure de type A (C4- C6; C2-O-C5) démontrée par Schilling <i>et al.</i> en 1975 [166].....	32
Figure 15. La formation de liaison inter-flavonoïde de type A par l'oxydation en utilisant un intermédiaire quinonique [170].....	32

Figure 16. Les structures possibles de l'anthocyane trimère et la structure de type A confirmée par RMN [177].	34
Figure 17. Mécanisme des condensations indirectes par pont éthylidène. A : F-pont éthylidène-F ; B : A ⁺ -pont éthylidène-F.	35
Figure 18. Mécanisme de condensation indirecte par pont éthylidène des anthocyanes.	36
Figure 19. La formation de la flavano-pyranoanthocyane.	37
Figure 20. Structures des deux portisines détectées dans du vin de Porto [198].	38
Figure 21. Trois nouvelles structures de pigments polymérisés.	38
Figure 22. Trois nouvelles structures de pigments polymérisés impliquant la participation de l'acétaldéhyde dans leurs formations.	39
Figure 23. Les voies de fragmentations de la (+)-catéchine en mode positif [206].	42
Figure 24. La dépolymérisation des tanins condensés par phloroglucinolyse.	43
Figure 25. La dépolymérisation des tanins condensés liés par pont éthylidène et la formation du marqueur EDP : le degré de polymérisation calculé est la moitié de la valeur réelle.	45
Figure 26. Les mécanismes généraux de dépolymérisation par phloroglucinolyse des tanins condensés ayant une liaison de type A.	46
Figure 27. Les structures de déhydrodicatéchine B et déhydrodicatéchine A [214]. A : Deux isomères de déhydrodicatéchine B ; B : Déhydrodicatéchine A.	47
Figure 28. Le mécanisme de formation de la vitisine A [220, 237].	51
Figure 29. La structure de la vitisine B.	51
Figure 30. Les dimères de pyranoanthocyanes détectés dans du vin de Porto et dans la lie [241].	53
Figure 31. Les réponses en MS des monomères jusqu'aux pentamères en fonction de l'intensité du fragmenteur de Q-TOF.	62
Figure 32. Démonstration de la synthèse des adduits F-A ⁺ .	67
Figure 33. Les différentes fractions de pigments obtenues après le fractionnement de TSK-40S.	72
Figure 34. Représentation de l'espace couleur L*a*b* [263].	81
Figure 35. Le spectre de fragmentation de la (+)-catéchine en mode positif et les voies de fragmentation: la perte d'une molécule d'eau, la fission de Diels-Alder Retro(RDA), la fission hétérocycle (HRF) et la fission induisant la formation de benzofurane (BFF).	85
Figure 36. Le spectre de fragmentation de l'(-)-épigallocatechine en mode positif et les voies de fragmentation ainsi que les structures de ces fragments.	87

Figure 37. Le spectre de fragmentation de l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate en mode positif et les voies de fragmentation ainsi que les structures de ces fragments.....	88
Figure 38. Le spectre de fragmentation d'un dimère de type B (T.R. = 5,457 min) ayant deux unités de base de l'(épi)catéchine en mode positif.....	89
Figure 39. La voie de fragmentation de type fission quinone méthine (QM). A : Dimère (épi)catéchine-(épi)catéchine ; B : Dimère (épi)gallocatéchine-(épi)catéchine.	90
Figure 40. Le spectre de fragmentation d'un dimère de type B (T.R. = 3,245 min) ayant une unité de base de l'(épi)catéchine et une autre unité de base de l'(épi)gallocatéchine en mode négatif.	91
Figure 41. Deux structures des trimères de type B possible. A : Un trimère ayant deux liaisons inter-flavonoïdes C4-C8; B : Un trimère ayant une liaison interflavonoïde C4-C8 et une autre liaison inter-flavonoïde C4-C6.....	92
Figure 42. Le spectre de fragmentation d'un trimère de type B (T.R. = 2,864 min) ayant des unités de base de (épi)catéchine en mode positif.	92
Figure 43. Le spectre de fragmentation d'un tétramère de type B (T.R. = 4,749 min) ayant des unités de base de l'(épi)catéchine en mode positif.....	94
Figure 44. La configuration linéaire (A) et la configuration branchée (B) possible pour un tétramère de type B.....	95
Figure 45. Le spectre de fragmentation d'un pentamère de type B (T.R. = 5,237 min) ayant des unités de base de (épi)catéchine en mode positif.	96
Figure 46. Le spectre de fragmentation d'un dimère de type A (T.R. = 2,921 min) ayant des unités de base de l'(épi)catéchine en mode positif et les voies de fragmentation.....	97
Figure 47. Les chromatogrammes d'un vin de Bordeaux en injection directe sur UPLC-UV-MS. A: UV spectre (280nm); B: Chromatogramme de m/z = 1153,2608 (tétramère); C: Chromatogramme de m/z = 1441,3242 (pentamères); D: Chromatogramme de m/z = 1457,3156 [pentamères (1G)].	99
Figure 48. Les spectres de fragmentation du tétramère. A : Énergie de collision de 15 % ; B : Énergie de collision de 30 %.....	101
Figure 49. Les spectre de fragmentation du pentamère 1. A : Énergie de collision de 25 % ; B : Énergie de collision de 50 %.....	102
Figure 50. Le spectre de fragmentation du pentamère (1G) 1 (T.R. = 2,631 min). A : Énergie de collision de 30 % ; B : Énergie de collision de 60 %.....	103
Figure 51. Les chromatogrammes de la fraction après la colonne TSK sur UPLC-UV-MS. A : Chromatogramme UV à 280nm; B : Chromatogramme de m/z = 1153,2608 (tétramère); C : Chromatogramme de m/z = 1441,3242 (pentamères) ; D : Chromatogramme de m/z = 1439,3086 (pentamères) ; E : Chromatogramme de m/z = 1457,3156 [pentamères (1G)] ; F : Chromatogramme de m/z = 1455,3035 [pentamères (1G)].	105

Figure 52. Les chromatogrammes d'absorption UV (280 nm) sur le système HPLC semi-préparative. A : La fraction issue du fractionnement TSK-40S; B : La fraction pure du tétramère.	107
Figure 53. Contrôle de pureté du tétramère par UPLC-UV-Q-TOF. A : Chromatogramme d'absorption UV (280 nm); B : Chromatogramme d'EIC m/z = 1153,2608.....	108
Figure 54. Le tétramère couronne.	110
Figure 55. Le spectre proton (A) et le spectre HMBC (B) du tétramère.	111
Figure 56. Le spectre ROESY du tétramère.	112
Figure 57. La structure du tétramère modélisée.....	113
Figure 58. Trois structures semi-hypothétiques des deux pentamères couronnes.	115
Figure 59. Spectre d'absorption en UV de tétramère (A), pentamère 1 (B) et pentamère 2 (C).	116
Figure 60. Pourcentage de cellules PC 12 vivantes après traitement.	117
Figure 61. Les structures hypothétiques des pentamères.....	118
Figure 62. Démonstration de la dépolymérisation d'un tanin (DP = 15) contenant un pont éthylidène.....	121
Figure 63. Le chromatogramme d'absorption UV à 280 nm des produits de phloroglucinyse d'un vin rouge.	122
Figure 64. Le 2,2'-éthylidènediphloroglucinol et le 2,2'-méthylidènediphloroglucinol.	123
Figure 65. Une fraction contenant de l'EDP et du MDP synthétisés.	124
Figure 66. L'EDP a une absorption maximale à 240 nm.	125
Figure 67. Les spectres d'émission de l'EDP (A) et de l'EC-phloro (B) avec la longueur d'onde d'excitation à 240 nm.....	126
Figure 68. Les spectres de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside. A : Énergie de collision de 20 %; B : Énergie de collision de 40 %; C : Énergie de collision de 60 %.	131
Figure 69. Les spectres de fragmentation des vitisines A. A : Mv-3- <i>O</i> -glc-acide pyruvique; B : Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-acide pyruvique; C : Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-acide pyruvique.	134
Figure 70. Les spectres de fragmentation des adduits (épi)catéchine-malvidine-3- <i>O</i> -glucoside à 20 % (A) et 40 % (B) d'énergie de collision.	137
Figure 71. Les voies de fragmentation des adduits (épi)catéchine-malvidine-3- <i>O</i> -glucoside.	138

Figure 72. Le spectre et les voies de fragmentation des adduits malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-(épi)catéchine.	139
Figure 73. Les formes incolores des adduits flavano-anthocyane de type A, de type A(flavène)-F et de type F-A(flavène).	140
Figure 74. Les spectres et les schémas de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-(épi)catéchine (type A) (A) et de l'(épi)catéchine-malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-(épi)catéchine (type A) (B).	141
Figure 75. Les structures des trimères pigmentés de F-A-F(type A) et de A-F(type A)-F. ...	144
Figure 76. Les spectres et les schémas de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-(épi)catéchine(type A)-phloroglucinol (A) et de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-(épi)catéchine(type A)-(épi)catéchine (B).	145
Figure 77. Le spectre et les voies de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine.	147
Figure 78. Le spectre et les voies de fragmentation des adduits malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine-phloroglucinol.	147
Figure 79. Le spectre et les voies de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine-(épi)catéchine.	148
Figure 80. Le spectre et les voies de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-pont éthylidène- malvidine-3- <i>O</i> -glucoside.	150
Figure 81. Le spectre de fragmentation de l'ion d'adduit d'eau de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside -pont éthylidène- malvidine-3- <i>O</i> -glucoside.	151
Figure 82. Le spectre de fragmentation de l'ion d'adduit de méthanol de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside -pont éthylidène- malvidine-3- <i>O</i> -glucoside.	151
Figure 83. Le spectre de fragmentation de l'ion bichargé de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-pont éthylidène- malvidine-3- <i>O</i> -glucoside.	152
Figure 84. Le spectre de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside-pont éthylidène-malvidine-3- <i>O</i> -(acétyl)glucoside.	153
Figure 85. Le spectre de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -(acétyl)glucoside-pont éthylidène- malvidine-3- <i>O</i> -(acétyl) glucoside.	154
Figure 86. Le spectre de fragmentation de l'A ⁺ -pont éthylidène-A-F.	155
Figure 87. Le spectre de fragmentation de la malvidine-3- <i>O</i> -glucoside dimérique.	156
Figure 88. Le spectre de fragmentation de la C/EC-A-A ⁺	157
Figure 89. Le spectre de fragmentation de l'anthocyane trimérique.	158
Figure 90. Le spectre de fragmentation de l'anthocyane trimérique ayant une unité avec le glucose acétylé.	159

Figure 91. Les chromatogrammes des ions extraits de 805,1974 et 783,2131 depuis un échantillon de vin rouge (A et B) et deux fractions des TSK-40S (C et D).	160
Figure 92. Le spectre de fragmentation de l'adduit hydrogène (A) et de l'adduit sodium (B) de Mv-C/EC (Type A).....	161
Figure 93. Le spectre de fragmentation de A : Pyranoanthocyane-C/EC; B : Pyranoanthocyane (acétylé)-C/EC; C : Pyranoanthocyane (coumaroylé)-C/EC.	162
Figure 94. Les chromatogrammes des ions extraits depuis la fraction 55 % méthanol issue de la cartouche C18. A1-3 : La méthode UPLC de quantification ; B1-3 : La méthode UPLC de séparation.	163
Figure 95. Le spectre de fragmentation de A : Pyranoanthocyane-C/EC-C/EC; B : Pyranoanthocyane (acétylé)-C/EC-C/EC; C : Pyranoanthocyane (<i>p</i> -coumaroylé)-C/EC-C/EC.	164
Figure 96. Les mécanismes de dépolymérisation des pigments polymérisés.	168
Figure 97. L'évolution des tanins condensés de type B durant le vieillissement du vin rouge (Languedoc Montpeyrroux).	175
Figure 98. L'évolution des tanins condensés de type B durant le vieillissement du vin rouge. A : La série des vins de l'appellation Saint-Émilion ; B : La série des vins de l'appellation Saint-Estèphe.	177
Figure 99. L'évolution des tanins condensés de type B (des monomères aux pentamères) au cours du vieillissement dans les trois séries de vin rouge. (α : pente de régression linéaire).	178
Figure 100. La comparaison des évolutions d'un tanin tétramère de type B et le tétramère couronne durant le vieillissement (Languedoc Montpeyrroux).	179
Figure 101. La comparaison des évolutions des tanins pentamères de type B et les deux isomères de pentamère couronne durant le vieillissement (Languedoc Montpeyrroux).	180
Figure 102. L'évolution du tétramère couronne durant le vieillissement dans les trois séries de vin rouge.	181
Figure 103. L'évolution des tanins dimères de type A durant le vieillissement (Languedoc Montpeyrroux).....	182
Figure 104. L'évolution des tanins liés par pont éthylidène durant le vieillissement dans les trois séries de vin rouge. (α : pente de régression linéaire)	183
Figure 105. L'évolution des anthocyanes et des pyranoanthocyanes durant le vieillissement du vin.	186
Figure 106. L'évolution des différentes pyranoanthocyanes durant le vieillissement du vin. (α : pente de régression linéaire)	187
Figure 107. L'évolution des polymères incolores de type Mv(flavène)-T durant le vieillissement. (α : pente de régression linéaire).....	190

Figure 108. L'évolution des pigments polymérisés de type T-Mv ⁺ durant le vieillissement. (α : pente de régression linéaire)	191
Figure 109. L'évolution des polymères incolores de type T-Mv-F(type A) et de type Mv-F(type A)-T durant le vieillissement du vin. (α : pente de régression linéaire)	192
Figure 110. L'évolution des pigments polymérisés de type Mv ⁺ -pont-éthylidène-T durant le vieillissement du vin.	193
Figure 111. L'évolution des anthocyanes dimériques et des structures de type T-Mv-Mv ⁺ durant le vieillissement. (α : pente de régression linéaire)	195
Figure 112. L'évolution des anthocyanes trimériques durant le vieillissement.	196
Figure 113. L'évolution des flavano-pyranoanthocyanes durant le vieillissement. (α : pente de régression linéaire)	197
Figure 114. L'évolution de l'aspect visuel du vin rouge exprimé dans l'espace couleur représenté par les variables L*a*b*.	200
Figure 115. Les corrélations entre l'âge du vin avec la teinte (A) et la valeur L* de l'espace couleur CIELAB (B).	202
Figure 116. L'évaluation de la teinte et de l'intensité de la couleur des vins rouges par les dégustateurs. A : La teinte; B : L'intensité de la couleur.	203
Figure 117. L'évaluation de l'intensité d'astringence et l'équilibre en bouche des vins rouges par les dégustateurs. A : L'intensité d'astringence; B : L'équilibre en bouche.	204
Figure 118. Cercle de corrélation issu de la régression PLS obtenu à partir des résultats sensoriels et des résultats chimiques ('D.' : Données de dégustation).	209

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les acides phénols du raisin et du vin. A : Les acides benzoïques ; B : Les acides cinnamiques.	8
Tableau 2. Les stilbènes du raisin et du vin.	9
Tableau 3. Les principaux ellagitanins du bois de chêne.	10
Tableau 4. Les structures chimiques des principaux flavan-3-ols du raisin et du vin.	16
Tableau 5. Les structures chimiques des anthocyanes.	23
Tableau 6. Les produits libérés de la phloroglucinolyse des tanins condensés du vin rouge. ...	44
Tableau 7. Les hydroxyphényl-pyranoanthocyanes.	52
Tableau 8. Les effets et les conséquences de la modification d'absorption spectrale.	54
Tableau 9. Les propriétés spectrales des pigments du vin rouge rapportées dans la littérature.	55
Tableau 10. Détails des vins utilisés pour l'analyse verticale.	60
Tableau 11. Les fractionnements du vin rouge sur cartouche C18.	71
Tableau 12. L'ordre d'éluion des pyranoanthocyanes, des anthocyanes et des tanins condensés du vin rouge.	73
Tableau 13. L'application du fractionnement du vin rouge sur TSK-40S.	73
Tableau 14. Les unités de base des tanins condensés du vin rouge.	84
Tableau 15. Les fragments issus de la fragmentation de la (+)-catéchine, identifiés par Q-TOF.	86
Tableau 16. Les fragments issus de la fragmentation d'un trimère de type B.	93
Tableau 17. Les oligomères observés dans le vin rouge.	106
Tableau 18. Les données ^1H , ^{13}C et la corrélation HMBC du tétramère.	109
Tableau 19. Unités libérées après la phloroglucinolyse du tétramère et les deux pentamères.	114

Tableau 20. Le suivi de formation des tanins condensés couronnes dans les milieux acides. (‘-’ : absent ; ‘○’ : observé mais très faible ; ‘+’ : présent ; ‘++’ : le plus concentré ; ‘*’ :non analysé)	120
Tableau 21. La détection d’EDP par fluorescence a une meilleure sensibilité par rapport au détecteur UV.	126
Tableau 22. Les longueurs d’onde d’excitation et d’émission des produits de phloroglucinyse.	127
Tableau 23. Les principales anthocyanes du vin rouge.	130
Tableau 24. Les principales pyranoanthocyanes du vin rouge.	132
Tableau 25. Des pigments polymérisés et leurs marqueurs de quantification identifiés dans du vin rouge.	135
Tableau 26. Les fragments issus de la fragmentation de la pyranoanthocyane-C/EC-C/EC ainsi que la fragmentation de ses dérivés acylés, identifiés par Q-TOF.....	165
Tableau 27. Structures générales de pigments polymérisés et leurs marqueurs de quantification.....	170
Tableau 28. Les anthocyanes et les pyranoanthocyanes quantifiées pour la comparaison. ...	185
Tableau 29. La comparaison des stabilités des concentrations des pigments monomériques, des pigments polymérisés et des polymères incolores durant le vieillissement en bouteille. ...	198
Tableau 30. Les valeurs des paramètres de couleurs au cours du vieillissement du vin.	199
Tableau 31. Les corrélations entre l’âge du vin et les valeurs mesurées de l’aspect couleur du vin ; les corrélations entre l’intensité de la couleur évaluée par les dégustateurs et les valeurs IC et L* ; les corrélations entre la teinte évaluée par les dégustateurs et les valeurs teinte (DO ₄₂₀ /DO ₅₂₀), a*, b*, et ΔE*ab.	201
Tableau 32. Les corrélations entre l’âge du vin et les paramètres gustatifs.	204
Tableau 33. Les corrélations entre l’âge du vin et les composés du vin.	205
Tableau 34. Les corrélations entre l’intensité d’astringence du vin et l’IPT, le tétramère couronne, les pentamères couronnes et les tanins liés par pont éthyliène.	207

ABRÉVIATION

Unités :

nm	Nanomètre
µm	Micromètre
mm	Millimètre
cm	Centimètre
µl	Microlitre
ml	Millilitre
L	Litre
mg	Milligramme
g	Gramme
min	Minute
mM	Millimole par litre
M	Mole par litre
N	Mole H ⁺ par litre
m/z	Ratio masse sur charge
ppm	Parties par million
tr/min	Tours par minute
v	Volume
V	Voltage
MHz	Mega hertz
°C	Degré Celsius

Composés :

F	Flavan-3-ol
T	Tanins condensés
C	(+)-catéchine
EC	(-)-épicatéchine
ECG	(-)-épicatéchine gallate
EGC	(-)-épigallocatechine
C-phloro	(+)-catéchine-phloroglucinol
EC-phloro	(-)-épicatéchine-phloroglucinol
ECG-phloro	(-)-épicatéchine gallate-phloroglucinol
EGC-phloro	(-)-épigallocatechine-phloroglucinol
EDP	2'2-éthylidènediphloroglucinol
A ⁺	Anthocyane sous forme flavylum
A(flavène)	Anthocyane sous forme flavène
Mv	Malvidine
Pt	Pétunidine
Dp	Delphinidine
Pn	Péonidine
Cy	Cyanidine

Solvants et Réactifs :

HCl	Acide chlorhydrique
MeOH	Méthanol
NaBH ₄	Tétrahydruroborate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
phloro	Phloroglucinol
SO ₂	Bisulfite/Dioxyde de soufre
O ₂	Oxygène moléculaire

Instruments et techniques :

SPE	Solide Phase Extraction
HPLC	High-performance liquid chromatography / Chromatographie en phase liquide à haute performance
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography / Chromatographie en phase liquide à ultrahaute performance
C-18	Carbone-18
T.R.	Temps de Rétention
DAD	Diode array detector / Détecteur à barrettes de diodes
UV	Ultraviolet
DO	Densité Optique
MS	Mass spectrometry/ Spectrométrie de masse
Q-tof	Quadrupole-Time of flight/ Quadripôle-Temps de vol
ESI	Electrospray ionization / Ionisation par électrospray
EIC	Extracted Ion Chromatogram / Chromatogramme d'ion extrait
CID	Collision-Induced Dissociation
E.C.	Energie de Collision
BFF	Benzofuran Forming Fission
HFR	Heterocyclic Ring Fission
RDA	Retro-Diels-Alder Fission
QM	Quinone Methide Fission
RMN	Résonance magnétique nucléaire
H	Hydrogène
¹³ C RMN	Spectre carbone RMN
¹ H RMN	Spectre proton RMN
COSY	Correlation spectroscopy / Corrélation proton-proton de spectre RMN
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
DIT	Temps d'intégration

Autres :

DP	Degré de Polymérisation
DP _m	Degré de Polymérisation moyenne
IPT	Indice Polyphénols Totaux

IC
CIE
OIV

Intensité Colorante
Commission Internationale de l'Eclairage
Organisation Internationale des Vins

Note : Pour les abréviations d'origine anglaise, les expressions en anglais et en français sont précisées respectivement et séparées par le symbole '/'.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

De la naissance d'un grand vin rouge de garde jusqu'au moment optimal de sa consommation après un certain nombre d'années de vieillissement en bouteille, les phénomènes liés à l'amélioration de sa qualité organoleptique sont notés par les dégustateurs [1]. L'une des premières modifications notables est le changement de la teinte de rouge-violette vers tuilé-orangé suivie de l'évolution et de l'augmentation de sa complexité aromatique pour former le «bouquet de vieillissement» [2] ainsi qu'un meilleur équilibre en bouche comprenant l'adoucissement de l'acidité, la diminution de la sensation d'astringence, l'amélioration de la qualité tannique de râpeux, rugueux et grossier vers soyeux et velouté. Après avoir atteint son optimum organoleptique pouvant aller de plusieurs mois à quelques années, la qualité organoleptique des vins diminue. Chaque vin rouge a sa propre courbe d'évolution (**Figure 1**).

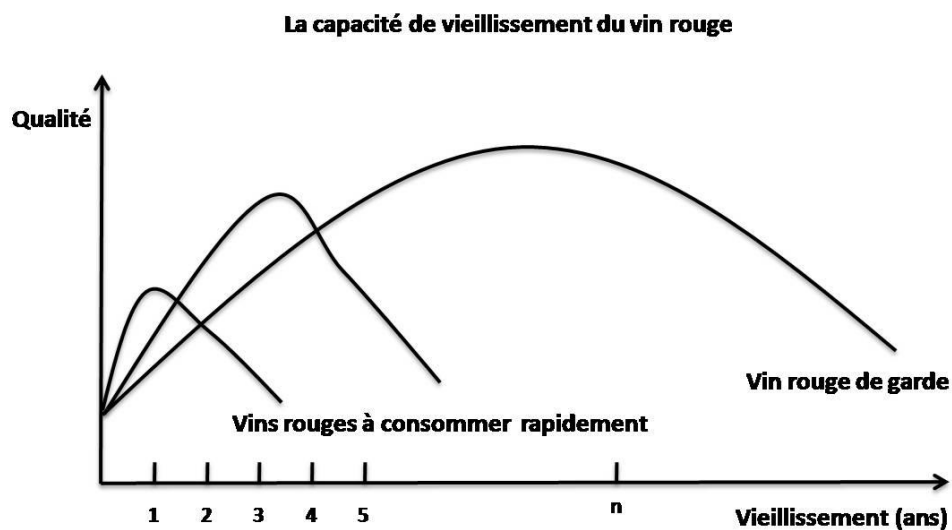


Figure 1. Évolution de qualité organoleptique des vins durant le vieillissement.

Parmi tous ces phénomènes, deux d'entre eux, l'évolution de la couleur et des propriétés gustatives des vins sont directement liés à la présence des composés phénoliques du vin rouge, et plus particulièrement à la présence des tanins condensés et des anthocyanes.

Actuellement, les unités de base des tanins condensés, les tanins condensés dimères et trimères ainsi que les réactions de polymérisation de type B et de type A sont bien connus grâce à de nombreuses études qui ont porté sur leur détection, leur purification, leur synthèse et leur caractérisation ainsi que leurs interactions avec différentes protéines. Néanmoins, la majeure partie des tanins sont sous forme d'oligomères et de polymères [3-5] et les connaissances concernant cette partie de tanins condensés à hauts poids moléculaires est

limitée. De plus, il a été prouvé que ce sont les oligomères et les polymères qui participent principalement à l'astringence des vins alors que les monomères et les dimères sont eux plus amers qu'astringents [6, 7]. Durant le vieillissement, la complexité des tanins condensés issus du raisin continue à augmenter notamment par la formation de nouvelles liaisons inter- et intra-moléculaires et ces tanins condensés sous formes évoluées sont mal connus.

Concernant la couleur des vins rouges et son évolution durant le vieillissement, ce sont les anthocyanes et leurs produits dérivés issus des interactions avec les autres composés du vin qui en sont responsables. Dans le vin, la concentration en anthocyanes est influencée par plusieurs facteurs comme le cépage, le sol, le climat et la méthode de vinification (notamment le temps de macération). Depuis les années 1950, les chercheurs en œnologie ont constamment essayé de comprendre le changement de couleur du vin rouge durant le vieillissement. Les connaissances sur les anthocyanes et sur les nouvelles familles de pigments formés durant l'élevage et le vieillissement s'accroissent grâce à de nombreuses études [8]. Néanmoins, les pigments polymérisés qui participent à la couleur des vins vieux sont encore mal connus [9].

Le manque d'information structurelle et quantitative sur les tanins condensés hauts poids moléculaires et les pigments polymérisés est dû d'un côté à la difficulté de leur purification à cause de la complexité de la matrice vin et au nombre très important de structures possibles, et de l'autre, aux limitations techniques des outils d'analyses de ces macromolécules. Néanmoins, l'importance des macromolécules de tanins condensés et de pigments polymérisés pour les vins rouges est évidente. L'objectif global de cette étude est d'approfondir notre connaissance sur ces composés macromoléculaires.

Le premier objectif du travail est de caractériser de nouvelles structures de tanins condensés et de pigments polymérisés. Et le deuxième objectif est de mieux comprendre l'évolution de la composition macromoléculaire des tanins condensés et des pigments polymérisés du vin rouge durant le vieillissement en utilisant la stratégie de dépolymérisation chimique en condition acide couplée à la chromatographie liquide et à la spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse des milieux réactionnels.

Nous présentons dans ce mémoire une nouvelle sous-classe de tanins condensés : les tanins condensés couronnes jusqu'ici inconnus dans le règne végétal ; une méthode de quantification

des tanins condensés liés par pont éthylidène par détection en fluorescence et une nouvelle méthode de quantification de chacune des familles de pigments polymérisés séparément.

Le **Chapitre 1** synthétise l'étude bibliographique sur les composés phénoliques du vin rouge et présente surtout les tanins condensés et les anthocyanes en détails. Les réactions de polymérisation et des techniques de caractérisation de ces macromolécules sont présentées. Les évolutions et les transformations des composés polyphénoliques durant le vieillissement du vin rouge sont également discutées.

Le **Chapitre 2** présente les matériels, les techniques, les instruments et les méthodes utilisés durant cette étude.

Le **Chapitre 3** et le **Chapitre 4** présentent la première partie de résultats concernant les identifications des tanins condensés et des pigments polymérisés ainsi que leurs marqueurs de quantification libérés durant la phloroglucinolyse. Les identifications ont été principalement réalisées avec la spectrométrie de masse haute résolution. Dans le **Chapitre 3**, la purification et la caractérisation structurale des tanins couronnes par RMN sont également rapportées.

Enfin, dans le **Chapitre 5**, les cinétiques d'évolution des tanins condensés et des familles de pigments polymérisés durant le vieillissement en bouteille de trois séries de vin rouge sont présentées ainsi que leurs corrélations avec les résultats sensoriels.

CHAPITRE 1

Étude bibliographique

I. Introduction

Une macromolécule est une très grande molécule, qui possède une masse moléculaire relativement élevée. La notion de macromolécule («macro» signifie ‘géant’ en grec) a été introduite en 1920 par le célèbre chimiste allemand Hermann Staudinger [10, 11]. Une macromolécule est généralement formée d’unités chimiques similaires assemblées par des liaisons covalentes et peut également être décrite comme une molécule polymère. Les réactions conduisant à la formation de telle molécule ont été appelés «polymérisation» par Hermann Staudinger.

Les composés macromoléculaires du vin rouge comprennent les protéines, les polysaccharides, les tanins condensés et les pigments polymérisés. Parmi eux, les tanins condensés et les pigments polymérisés sont les sujets de nombreuses études. Du fait de leur complexité structurelle, des défis concernant leur caractérisation, leurs méthodes de quantification et la compréhension des phénomènes sensoriels qui leur sont liés restent à être relevés.

Ce chapitre d’étude bibliographique présente les principaux composés phénoliques des vins rouges en se focalisant plus en détail sur les tanins condensés et les anthocyanes. Leurs structures, leurs origines et leurs impacts sensoriels seront notamment discutés. Les différentes réactions de polymérisation qui interviennent sur ces molécules durant la vinification, l’élevage et le vieillissement des vins seront présentées ainsi que la stratégie de caractérisation de ces structures polymériques. Des réactions et des observations rapportées au cours du vieillissement du vin rouge seront également discutées afin de mieux comprendre l’évolution de la couleur et des propriétés gustatives des vins rouges.

II. Les composés phénoliques du raisin et du vin rouge

II.1 Généralités

Les composés phénoliques du raisin et du vin rouge jouent un rôle important en œnologie [5, 12-17]. Ces composés sont parmi les principaux facteurs de la qualité des vins rouges grâce à leurs contributions à la couleur du vin [18, 19], aux caractéristiques sensorielles telles que l'amertume et l'astringence [20, 21], aux réactions d'oxydation [22, 23], aux interactions avec les protéines [24-27] et à l'évolution qualitative des vins au cours de leur vieillissement [7, 28-30]. Dans les vins rouges, la perception de l'astringence a été principalement attribuée aux proanthocyanidines, aussi appelées les tanins condensés. Ils sont impliqués dans les processus de copigmentation avec les anthocyanes et la formation de nouveaux pigments par réaction chimique, qui contribuent à la définition, à la stabilité et à l'évolution de la couleur des vins rouges [31].

De nombreuses études [32, 33] ont montré des effets positifs liés à la santé humaine des composés phénoliques extraits des pellicules, des pépins du raisin, mais également des sous-produits de vinification tels que les marcs. Outre leurs propriétés antioxydantes [34-36], les composés phénoliques présentent également des activités anti-inflammatoire [37, 38], anti-cancérogène [39] et neuroprotectrice [40, 41]. De plus, des effets sur l'amélioration du système cardiovasculaire [42, 43] et la diminution de l'hypertension [44], un effet positif sur la santé buccale [45, 46], et une diminution du temps de cicatrisation des plaies [47] ont été montrés. Ces effets bénéfiques sur la santé humaine sont généralement associés aux tanins condensés, aux anthocyanes et aux stilbènes [48].

Les composés phénoliques du vin rouge sont divisés en deux grandes classes : les non-flavonoïdes et les flavonoïdes.

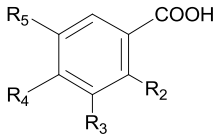
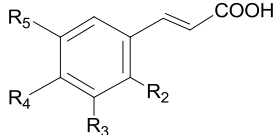
II.2 Les non-flavonoïdes

II.2.1 Les acides phénols

Le raisin et le vin contiennent deux groupes d'acides phénols : les acides benzoïques (C6-C1) et les acides cinnamiques (C6-C3). Leur concentration dans le vin rouge est de l'ordre de 100

à 200 mg/L, elle est de 10 à 20 mg/L dans le vin blanc [49]. Sept acides benzoïques et plusieurs acides cinnamiques sont présents dans le vin et se distinguent par la substitution de leur noyau benzénique (**Tableau 1**). Les acides benzoïques présents dans le raisin sont principalement sous forme de combinaisons hétérosidiques. Les acides cinnamiques sont majoritairement présents sous forme estérifiée, essentiellement avec l'acide tartrique.

Tableau 1. Les acides phénols du raisin et du vin. A : Les acides benzoïques ; B : Les acides cinnamiques.

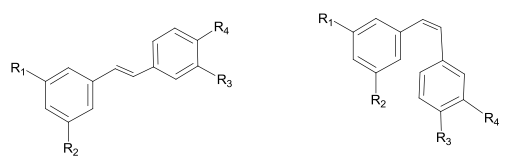
A	Acide Benzoïque	R₂	R₃	R₄	R₅
 <p data-bbox="284 949 515 978">Acide benzoïque</p>	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
	Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
	Acide vanilique	H	OCH ₃	OH	H
	Acide gallique	H	OH	OH	OH
	Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Acide salicylique	OH	H	H	H
	Acide gentisique	OH	H	H	OH
B	Acide Cinnamique	R₂	R₃	R₄	R₅
 <p data-bbox="284 1442 536 1471">Acide cinnamique</p>	Acide <i>p</i> -coumarique	H	H	OH	H
	Acide caféique	H	OH	OH	H
	Acide férulique	H	OCH ₃	OH	H
	Acide sinapique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

II.2.2 Les stilbènes

Les stilbènes possèdent deux cycles benzéniques reliés généralement par une chaîne éthane ou éventuellement éthylène. Ils sont présents dans les sarments de la vigne, dans le raisin, dans le vin et dans le bois de chêne [50]. De par leurs propriétés protectrices comme leur rôle antimicrobien [51], les stilbènes sont principalement localisés dans la pellicule de la baie de raisin et sont extraits durant la vinification en rouge. Ils sont également présents dans les feuilles de vignes. Les stilbènes majoritaires retrouvés dans le vin rouge sont le resvératrol et

son homologue glycosylé, le picéide, ainsi que l'astringine [52-54] (**Tableau 2**). Des dimères et oligomères de stilbènes ont également été isolés et détectés dans le vin. Le stilbène le plus polymérisé actuellement isolé à partir de sarment de vigne est un hexamère nommé «viniphénol A» [55].

Tableau 2. Les stilbènes du raisin et du vin.

Stilbène		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
 <p>Forme <i>Trans</i> Forme <i>Cis</i></p>	Resvératrol	OH	OH	H	OH
	Picéide	<i>O</i> -Glc	OH	H	OH
	Astringine	<i>O</i> -Glc	OH	OH	OH

De manière générale, les teneurs en stilbènes, que ce soit dans les baies ou les vins rouges, sont très faibles. La somme des cinq principaux stilbènes est d'environ 30,5 mg/L [53].

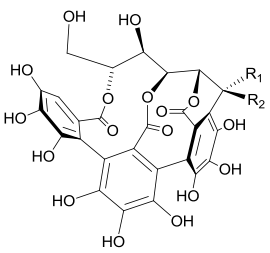
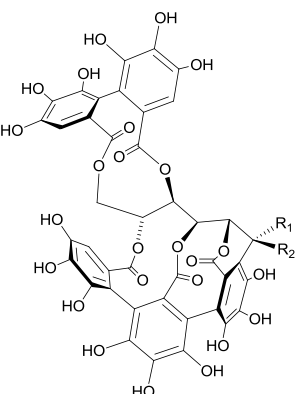
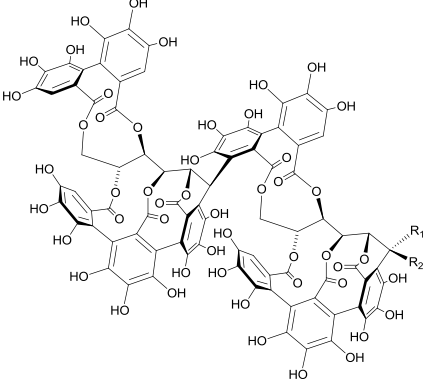
Des effets positifs du resvératrol sur la santé humaine ont été mis en évidence par des travaux de recherche scientifique comme des effets vasodilatateurs [56] et des effets contre l'athérosclérose [57]. Des impacts positifs contre l'obésité [56] et contre la formation des plaques amyloïdiques impliquées dans des maladies neuro-dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer [41, 58] ont également été montrés par le resvératrol.

II.2.3 Les tanins hydrolysables (gallotanins et ellagitanins)

Produits par une grande variété de plantes et d'arbres, les tanins hydrolysables doivent leur nom à leur capacité à libérer soit de l'acide gallique (gallotanin), soit de l'acide ellagique (ellagitanins) en milieu acide. Ces composés sont présents dans les chênes servant à la fabrication des douelles et des barriques, à savoir, le chêne pédonculé (*Quercus robur*), le chêne sessile ou rouvre (*Quercus petraea*), ainsi que le chêne blanc d'Amérique (*Quercus alba*) [59]. Lors de l'élevage du vin en barrique, le contact entre le bois et le vin se caractérise par la dissolution des principaux extractibles constitutifs du bois et notamment par l'extraction des ellagitanins. Parmi les ellagitanins extraits, la vescalagine et la castalagine [60] sont majoritaires puisqu'elles représentent à elles seules près de 50 % des ellagitanins extraits

du bois de chêne. La vescalagine et la castalagine ont pour structure une chaîne glucose ouverte estérifiée en position 4 et 6 par une unité hexahydroxydiphényle (HHDP) et en position 2, 3 et 5 par une unité nonahydroxyterphényle (NHTP) avec une liaison C-glycosidique entre le carbone du glucose et la position 2 de l'unité trihydroxyphényle (**Tableau 3**). L'hydrolyse partielle de la vescalagine et de la castalagine, avec perte de l'acide hexahydroxydiphénique, conduit à la vescaline et à la castaline. Six autres ellagitanins C-glycosidiques sont connus dans le bois de chêne : la grandinine et les roburines A-E qui sont des monomères glycosilés, des dimères et des dimères glycosilés [61, 62].

Tableau 3. Les principaux ellagitanins du bois de chêne.

Ellagitanins	R ₁	R ₂	
 <p>The structure shows a glucose molecule with a C-glycosidic bond at C2 to a trihydroxyphenyl unit. The glucose is also esterified at C4 and C6 with a hexahydroxydiphényl (HHDP) unit. R₁ and R₂ are indicated at C1 and C3 of the glucose ring.</p>	Vescaline	H	OH
	Castaline	OH	H
 <p>The structures show a glucose molecule with a C-glycosidic bond at C2 to a nonahydroxyterphenyl (NHTP) unit. The glucose is also esterified at C4 and C6 with a hexahydroxydiphényl (HHDP) unit. R₁ and R₂ are indicated at C1 and C3 of the glucose ring.</p>	Vescalagine	H	OH
	Castalagine	OH	H
	Grandinine	OH	Lyxose
	Roburine E	OH	Xylose
 <p>The structures show a glucose molecule with a C-glycosidic bond at C2 to a nonahydroxyterphenyl (NHTP) unit. The glucose is also esterified at C4 and C6 with a hexahydroxydiphényl (HHDP) unit. R₁ and R₂ are indicated at C1 and C3 of the glucose ring.</p>	Roburine A	H	OH
	Roburine B	OH	H
	Roburine C	OH	Lyxose
	Roburine D	OH	Xylose

En ce qui concerne les propriétés gustatives des ellagitanins, une seule équipe de recherche a estimé les seuils d'amertume et d'astringence des ellagitanins du bois de chêne dans l'eau à pH 4,5 en utilisant le test de demi-langue [63]. Le test de demi-langue consiste à placer une goutte de la solution contenant le composé étudié sur un côté de la langue alors que de l'eau pure est appliquée sur l'autre côté de la langue comme témoin. Ensuite, les dégustateurs doivent bouger leur langue contre le palais pendant 15 secondes afin d'identifier s'il y a une différence de sensation entre les deux côtés de la langue. L'une des limitations majeures du test de demi-langue d'un point de vue œnologique est l'absence de contact entre les ellagitanins et l'ensemble de la cavité buccale puisque l'astringence peut se ressentir sur des surfaces dépourvues de capteurs gustatifs [64]. De plus, l'utilisation d'une solution sans éthanol et à pH 4,5 sont des conditions très éloignées de celles du vin. Bien que les conditions expérimentales de cette étude présentent certaines limites, elle a montré que la vescalagine et la castalagine dans ces conditions sont des composés très fortement astringents et très peu amers, alors que les roburines A-D sont des composés moins astringents que la vescalagine mais deux fois plus amers. Enfin, les monomères glycosylés (grandinine et roburine E) sont 5 fois plus astringents que la vescalagine et 3 fois plus amers.

Récemment, au sein de notre laboratoire, une fraction purifiée contenant les huit principaux ellagitanins (93,4 % de pureté) du bois de chêne a été obtenue et il a été démontré que les ellagitanins sont plus doux que les tanins condensés [65].

II.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une grande famille de métabolites secondaires regroupant un très grand nombre de composés avec une grande variété de structures. La structure de base est constituée d'un squelette carboné en C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane qui se divise en plusieurs sous-familles dont les principales sont : les flavonols, les flavones, les flavanonols, les flavanones, les flavanols et les anthocyanidines (**Figure 2**). La classification de ces familles s'organise autour du degré d'oxydation du cycle pyranique C et de la substitution des carbones C3 et C4 de cet hétérocycle.

Les flavonoïdes représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Ils forment une sous-classe des polyphénols. Avec plus de 6000 composés décrits dans les

plantes, ces métabolites secondaires possèdent de nombreux rôles dans le règne végétal qui s'étendent de la pigmentation servant à attirer les insectes pollinisateurs, à la protection de la plante contre les ultraviolets, ou aux défenses contre les attaques de pathogènes et des insectes ravageurs.

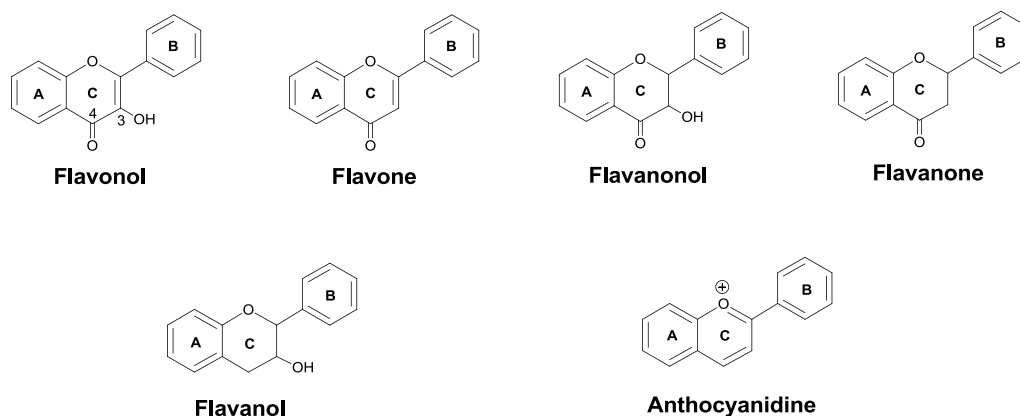


Figure 2. Les squelettes des principales sous-familles de composés de la grande famille des flavonoïdes.

Les flavonols, les flavones, les flavanonols et les flavanones sont des pigments jaunes plus ou moins intenses dans le raisin alors que les anthocyanidines sous forme glycoside (les anthocyanes) sont les pigments rouges/bleus du raisin. La famille des flavan-3-ols constitue, quant à elle, les unités de base des tanins condensés du raisin. La famille des anthocyanes et la famille des tanins condensés sont présentées en détail en **Partie III** et **Partie IV** de ce chapitre.

III. Les tanins condensés ou les proanthocyanidines

III.1 La terminologie

III.1.1 Le terme «tanin»

Le terme «tanin» dérive du mot «tan», un mot celte désignant le chêne, qui se réfère à l'utilisation de tanins du bois de chêne dans le tannage des peaux d'animaux en cuir. Le tannage des peaux consiste à traiter des peaux fraîches avec des extraits végétaux ou des métaux qui jouent le même rôle : en complexant le collagène de la peau, ils conduisent à sa précipitation, rendant les peaux imputrescibles.

A partir de 1945, des nouveaux thèmes de recherches apparaissent qui ne sont plus reliés exclusivement au tannage du cuir [66], principalement avec les travaux de Bate-Smith [67-70], qui définit les tanins comme des polyphénols solubles capables de précipiter les protéines. Par extension, aujourd'hui, le terme «tanin» est appliqué à une large famille de composés polyphénoliques contenant plusieurs fonctions hydroxyle et formant des complexes avec les protéines.

Une étape importante de la classification des tanins est franchie en 1920 lorsque Freudenberg [71] les sépare en deux grandes classes, hydrolysables et non hydrolysables. Aujourd'hui, il existe quatre grandes catégories de tanins [72, 73] : les tanins hydrolysables qui regroupent les ellagitanins et les gallotanins, les tanins condensés, les tanins complexes et les phlorotanins. Les trois premières sortes sont connues et intensivement étudiées alors que les premiers travaux de recherche concernant les phlorotanins ne sont parus qu'en 1977 [74].

Généralement, les tanins condensés (**Figure 3**) sont des molécules issues de la polymérisation des flavan-3-ols, sous-classe des flavonoïdes. Les monomères de flavan-3-ol ne sont donc pas des tanins au sens strict du terme. Pour certains auteurs, les oligostilbénoides constituent également une classe de tanins condensés [75]. Dans cette thèse, le terme de tanins condensés se réfère uniquement aux composés issus de la condensation des unités flavan-3-ols (dimères, oligomères et polymères).

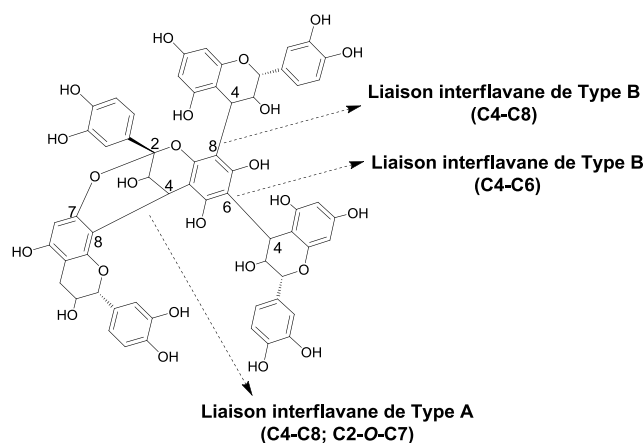


Figure 3. Une structure générale des tanins condensés.

Les tanins complexes sont des tanins hydrolysables (gallotanins ou ellagitanins) reliés à une unité flavonoïde par une liaison C-glycosidique. Les tanins complexes peuvent se former dans le vin élevé en barrique lorsque les flavonoïdes entrent en contact avec les ellagitanins libérés par le bois. L'acutissimine A et B (**Figure 4**) sont les plus connus des tanins complexes dans le vin [76].

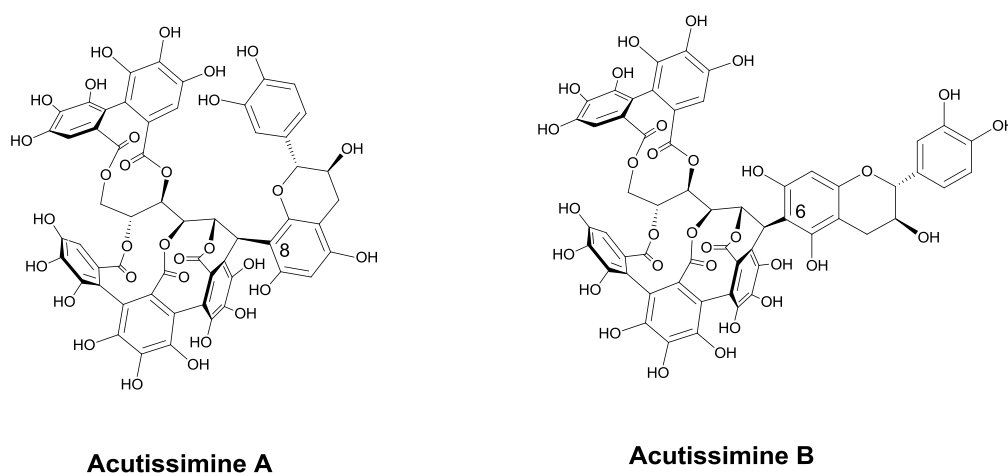


Figure 4. Les structures d'acutissimine A et d'acutissimine B.

Les phlorotanins (**Figure 5**) sont des oligomères ou polymères d'unités dérivées du phloroglucinol dont la différenciation s'effectue sur la base de la nature des liaisons inter-monomériques et des profils de substitution de ces derniers [77]. Ces tanins sont uniquement présents dans les plantes aquatiques.

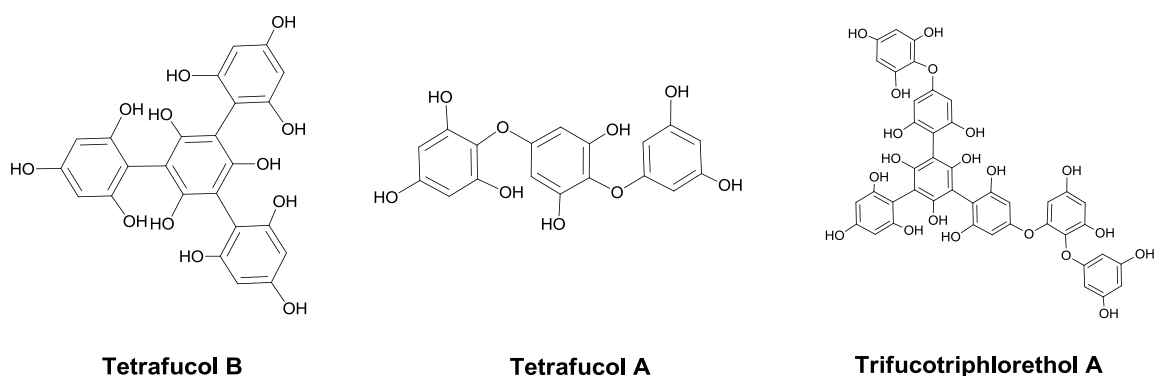


Figure 5. Les principaux phlorotannins.

III.1.2 Le terme «proanthocyanidines»

Les tanins condensés sont des composés non hydrolysables mais lorsqu'ils sont traités à chaud en milieu acide, ils peuvent être dépolymérisés. Cette dépolymérisation chimique en milieu acide suivie d'une auto-oxydation génère des anthocyanidines, d'où le fait qu'ils soient également nommés «proanthocyanidines» [78]. Ils sont habituellement dénommés d'après l'anthocyanidine qui est libérée : les procyanidines et les prodelphinidines. La méthode de quantification des proanthocyanidines développée par Bate-Smith [79] est basée sur cette propriété.

Néanmoins, les tanins condensés ainsi que d'autres composés polyphénoliques (par exemple : polyhydroxyflavan-3,4-diols) des plantes qui libèrent des anthocyanidines une fois traités à chaud en milieu acide, ont été longtemps appelés les leucoanthocyanes dans la littérature [67, 80, 81]. En 1960, Freudenberg [82] a souligné que cela était un nom inexact. Geissman et Dittmar [83] ont suggéré que le terme «proanthocyanidine» était préférable, cela n'implique aucune structure explicite et ne porte que sur le fait que ces composés donnent des anthocyanidines par traitement avec des acides.

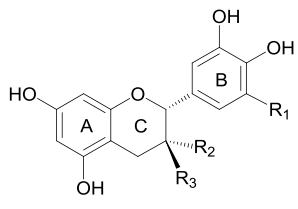
III.2 Les structures, la localisation et les teneurs

Les tanins condensés sont des dimères, oligomères ou polymères d'unité flavan-3-ol qui sont hydroxylés en position 3. La variation structurelle des tanins condensés est due aux

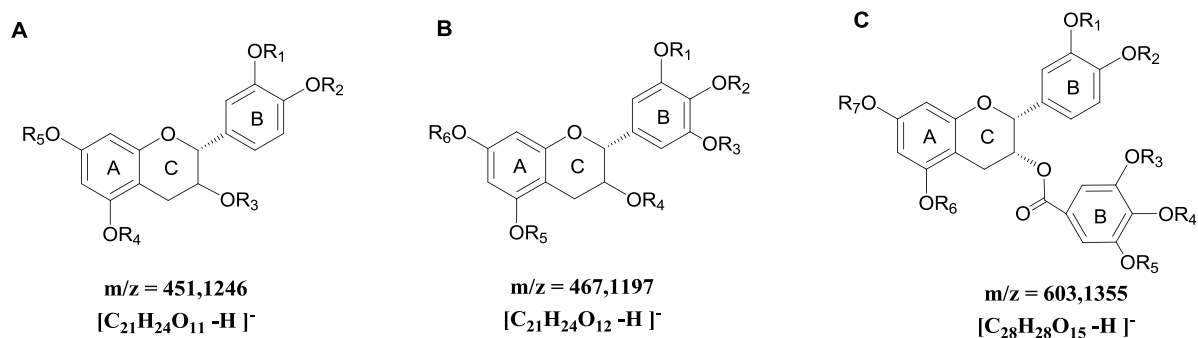
différentes sous-unités, aux positions, orientations et types des liaisons inter-flavonoïdes et aux modifications avec des substituants non-flavonoïdes.

Les cinq principaux monomères de base des tanins condensés du raisin sont : la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine, la (+)-gallocatéchine, l'(-)-épigallocatéchine et l'(-)-épicatéchine-3-*O*-gallate (**Tableau 4**). La (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine se différencient de par la configuration du carbone asymétrique en position C3. Le groupement hydroxyle de la (+)-catéchine ayant une orientation β (vers l'avant) alors que celui de l'(-)-épicatéchine est orienté en α (vers l'arrière). L'(épi)catéchine et l'(épi)gallocatéchine se distinguent selon le degré d'hydroxylation du cycle B. Le groupement hydroxyle en position 3 du cycle C peut également être estérifié par l'acide gallique, ce qui forme l'(-)-épicatéchine-3-*O*-gallate. L'(-)-épigallocatechine-3-*O*-gallate a été également décelée dans la pellicule du raisin de Cabernet Sauvignon mais en très faible quantité [84].

Tableau 4. Les structures chimiques des principaux flavan-3-ols du raisin et du vin.

Flavan-3-ols		R ₁	R ₂	R ₃
 <p>Flavan-3-ols</p>	(+)-Catéchine	H	H	OH
	(-)-Epicatéchine	H	OH	H
	(+)-Gallocatéchine	OH	H	OH
	(-)-Epigallocatéchine	OH	OH	H
	(-)-Epicatéchine-3- <i>O</i> -gallate	H	- <i>O</i> -acide gallique	H

Par ailleurs, des flavan-3-ols monoglucosidiques dérivant de la (+)-catéchine, de l'(-)-épicatéchine, de l'(-)-épigallocatéchine et de l'(-)-épicatéchine-3-*O*-gallate ont également été détectés dans le pépin du raisin et dans du vin rouge en faible quantité et caractérisés par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) [85]. Néanmoins, avec uniquement l'HRMS, la position de glucose n'a pas pu être déterminée (**Figure 6**). En effet, des études récentes ont montré l'existence de catéchine glycoside dans de nombreuses plantes telles que le sainfoin [86-88] et la liqueur de cacao [89]. Leurs synthèses enzymatiques [90] et chimiques [91] ont également été réalisées par différentes équipes.



R1-R7 : les positions possibles du glucose.

Figure 6. Les structures des flavanols monoglycosylés. A : L'(épi)catéchine monoglycosylée ; B : L'(épi)gallocatéchine monoglycosylée ; C : L'épicatechine gallate monoglycosylée [85].

Dans les structures oligomériques et polymériques des tanins condensés, les unités flavan-3-ols monomériques sont reliées entre elles par deux types de liaisons inter-flavanoïdes : les liaisons de type B [92-94] et parfois des liaisons de type A [95, 96]. Les liaisons inter-flavanoïdes de type B se font entre le carbone C4 de l'unité supérieure et les carbones C8 ou C6 de l'unité inférieure. Les proanthocyanidines de type A ont une liaison éther en plus par rapport au type B qui peut se faire entre le carbone C2 du cycle C de l'unité supérieure et la fonction hydroxyle portée par le carbone C7 ou C5 du cycle A de l'unité inférieure (**Figure 3**).

Dans la grappe de raisin, les tanins condensés sont localisés principalement dans les rafles, les pépins et les pellicules. Dans les pellicules, les tanins sont principalement retrouvés dans les couches hypodermiques des cellules intérieures [84, 97]. Ils se trouvent sous forme libre dans les vacuoles qui augmentent de taille au fur et à mesure que l'on se rapproche de la surface de la pellicule. Ils peuvent aussi être liés aux polysaccharides des parois cellulaires ou liés avec les protéines constitutives de la face interne des membranes vacuolaires [98]. Dans les pépins, les tanins sont présents dans les cellules à parois minces dites 'parenchyme' souple du pépin entre la cuticule et le tégument dur (les couches intérieures lignifiées) [97, 99, 100].

Les tanins de la pellicule diffèrent des tanins du pépin de façon importante. Tout d'abord, le degré de polymérisation moyen (DPM) des tanins de la pellicule est beaucoup plus grand que celui des tanins du pépin. Il peut aller jusqu'à 18 unités dans une fraction issue de pépins et avoisine les 30 unités dans un extrait de pellicule [101, 102]. Ensuite, les tanins contenant des

sous-unités d'épigallocatechine sont uniquement présents dans la pellicule [101, 102]. De plus, les tanins du pépin ont généralement une plus grande proportion de sous-unités épicatechine-3-*O*-gallate alors que l'épicatechine-3-*O*-gallate est généralement absente dans les tanins de la pellicule [103]. La différence dans ces sous-unités a été utilisée pour estimer les proportions relatives des tanins de la pellicule et des tanins du pépin dans les vins [104].

Les tanins condensés sont extraits pendant la fermentation alcoolique et la macération post-fermentaire. Leur teneur est comprise entre 1 et 4 g/L dans du vin rouge et dépend du cépage et surtout des conditions de vinification. Dans le cas des vins blancs secs, elle est comprise entre 100 et 300 mg/L [105]. Dans le vin rouge, les tanins les plus polymérisés détectés en spectrométrie de masse sont des nonamères [106].

III.3 Les propriétés sensorielles

III.3.1 L'astringence

“Issue du latin *astringere* (serrer, constiper), l'astringence se manifeste par une sensation de sécheresse, de dureté, de rugosité, et de manque de lubrification. Dans les vins, elle découle directement de la présence des **tanins** qui réagissant avec les protéines buccales et la salive. ”

-Emile PEYNAUD [1]

La sensation d'astringence est définie par l'American Society for Testing and Material comme étant «l'ensemble des sensations de rétrécissement, d'étirement ou de plissement de l'épithélium buccal» [107]. Cette sensation est un élément extrêmement important lors de la dégustation d'un vin rouge puisque comme l'indiquait Emile Peynaud [1], « l'harmonie, l'équilibre et l'élégance de l'astringence est le signe des grands vins rouges ». L'astringence en excès dans le vin porte atteinte à son équilibre et à sa qualité, lorsqu'au contraire, un vin manquant d'astringence semble plat, fade et sans intérêt.

La sensation complexe d'astringence peut être engendrée par des différentes classes de composés, dont des sels de cations métalliques multivalents (en particulier les sels d'aluminium), des agents déshydratants (tels que l'éthanol et l'acétone), des acides organiques

et minéraux et les tanins [108]. Les oligomères et polymères des tanins condensés sont considérés comme les principaux responsables de l'astringence des vins rouges. Cependant, il a également été démontré que la présence des acides phénoliques, des flavonols ainsi que le ratio *trans/cis* des acides aconitiques peuvent contribuer à l'astringence des vins [109].

Le mécanisme physiologique et physicochimique exact de l'astringence n'est pas totalement connu à ce jour, mais des preuves psychophysiques soutiennent le fait que l'astringence n'est pas un goût. Premièrement, la relation entre l'intensité de la perception et la concentration en tanins monomères et polymères est linéaire dans une large gamme de concentrations, ce qui n'est pas le cas pour tous les autres goûts étudiés à ce jour [110]. Deuxièmement, à l'inverse des goûts, dont la perception diminue suite à des ingestions répétées [111], la sensation d'astringence s'accroît dans les mêmes conditions [112]. Troisièmement, la suppression mutuelle est une propriété fondamentale entre tous les goûts que l'astringence ne possède pas [113]. De plus, l'astringence peut se ressentir sur des surfaces dépourvues de récepteurs gustatifs, comme la surface en dessous des lèvres à l'intérieur de la bouche [64].

En effet, la sensation d'astringence est le résultat d'une série de réactions physiologiques et d'interactions physicochimiques complexes. Grâce aux nombreuses études qui ont contribué à la compréhension de l'astringence, les mécanismes impliqués dans la sensation d'astringence qui se produisent simultanément dans la cavité buccale ont pu être clarifiés :

1. Premièrement, des complexes tanins-protéines salivaires solubles se forment qui, en augmentant de taille, conduisent à la formation d'agrégats tanins-protéines salivaires insolubles engendrant ainsi la sensation de granularité buccale. Des associations hydrophobiques et des liaisons hydrogènes sont impliquées dans la formation de ces complexes [64, 114, 115].
2. Le film salivaire mobile est une couche de revêtement de salive présent sur toutes les surfaces buccales avec une épaisseur de 70 à 100 μm [116]. L'interaction des tanins avec ce film provoque une perturbation de la couche salivaire lubrifiante, conduisant au frottement dans la cavité buccale. La lubrification salivaire est ainsi réduite.
3. Sous la couche de film salivaire se trouve une muqueuse protectrice. Sur celle-ci se forme également une pellicule de protéine salivaire liée directement à l'épithélium buccal.

Cette pellicule salivaire peut également être perturbée par des agrégats tanin-protéine conduisant à une diminution de la lubrification [117].

4. La perturbation de la couche salivaire mobile et de la pellicule protéique conduit à l'exposition de la muqueuse buccale permettant aux agrégats tanin-protéine d'interagir directement avec le tissu buccal [117-119], très probablement par le biais des récepteurs. Il est également possible que les tanins libres interagissent seuls et directement avec les récepteurs ou la muqueuse [120].

5. Les autres récepteurs comme les nocicepteurs, les mécanorécepteurs sur la langue ou les innervations nerveuses peuvent être impliqués dans la sensation complexe d'astringence [121].

Le mécanisme de la sensation d'astringence s'accompagnant de la précipitation des protéines salivaires, donc une réduction de la lubrification salivaire et une augmentation des frictions en bouche est toujours le sujet de nombreuses controverses et reste encore à éclaircir. Néanmoins, la formation des agrégats tanins-protéine salivaire reste l'étape essentielle du développement de la sensation d'astringence.

L'astringence d'un vin est influencée par de nombreux facteurs, notamment la structure et la quantité des tanins dans le vin [122]. Le terme 'qualité des tanins' dans un vin rouge est déterminé par la sensation d'astringence maximum en bouche, la durée totale et le temps nécessaire pour arriver à l'intensité maximale [123], ainsi que l'extension de la sécheresse et de la rugosité [124]. Ces paramètres dépendent de la structure des tanins [120] et de la composition de la matrice du vin. De nombreuses études ont été menées sur l'influence des tanins sur la qualité de la perception d'astringence, notamment en ce qui concerne la concentration des tanins [125], le degré de polymérisation [7, 126], le pourcentage de galloylation [127] et de prodelphinidine [128]. La matrice quant à elle, est la résultante de l'acidité [6, 129], de la concentration en éthanol [130] et de la présence de macromolécules comme les polysaccharides. Fontoin *et al.* [6] a démontré que la sensation d'astringence des tanins oligomères dérivés des pépins de raisin diminuait avec une augmentation du pH et du pourcentage d'éthanol. Noble [131] considère que ce phénomène est dû à l'éthanol qui est un récepteur de liaisons hydrogènes. L'étude de Demiglio et Pickering [130] a montré qu'en

absence d'éthanol, le vin est plus astringent alors que le pH influence plutôt la viscosité et la douceur.

Comme tous les autres attributs sensoriels, la perception d'astringence diffère selon les individus à cause de la variation de la composition de la salive, du débit salivaire et du pH par exemple [132].

III.3.2 L'amertume

Le goût de l'amertume dans le vin est principalement déclenché par les flavan-3-ols et leurs produits de condensation [133], même s'il a été montré que certains flavonols [134], acides hydroxycinnamiques et dérivés de l'acide benzoïque [135] pouvaient également y contribuer.

De plus, il est généralement considéré que l'amertume d'un vin rouge est plutôt provoquée par les tanins de faibles poids moléculaires [110, 136]. Pendant la maturation de la baie de raisin, une diminution des tanins de faibles poids moléculaires est observée, ce qui peut fournir une explication structurelle de l'amélioration de la qualité sensorielle des tanins au cours de la maturation du fruit [137].

L'amertume est l'une des cinq saveurs élémentaires, à l'instar du sucré, du salé, de l'acidité et de l'umami. Elle est perçue par les papilles gustatives présentes dans les bourgeons du goût sur la langue. Chaque bourgeon du goût se compose d'environ 50-100 cellules réceptrices du goût et est innervé par de multiples fibres gustatives qui transmettent les signaux nerveux au cerveau [138]. Les cellules des récepteurs du goût amer sont principalement situées à l'arrière de la langue près de la gorge. Chez les humains, chaque cellule réceptrice du goût amer contient environ 25 récepteurs (type G) amers couplés aux protéines codées par une famille de gènes TAS2Rs. Récemment, il a été mis en évidence que les différents composés phénoliques activaient des combinaisons uniques avec TAS2Rs : l'(-)-épicatéchine stimulait trois récepteurs (TAS2R4, TAS2R5 et TAS2R39) tandis que la pentagalloylglucose activait deux récepteurs (TAS2R5 et TAS2R39). Un seul récepteur a répondu à la malvidine-3-*O*-glucoside et au procyanidine trimère C2 (cat-cat-cat), le récepteur TAS2R7 et le récepteur TAS2R5 respectivement [139].

IV. Les anthocyanes

IV.1 Le terme «anthocyane»

Le terme anthocyane, dérivé des mots grecs : fleur et bleu (anthos = fleur, kianos = bleu), a été inventé par Marquart en 1835 pour désigner les pigments bleus des fleurs. Il a été noté plus tard qu'en plus de la couleur bleue, les anthocyanes sont également responsables des couleurs pourpre, violet, magenta, et de presque toutes les teintes de rouges apparaissant sur les fleurs, les fruits, les feuilles, les tiges et les racines. Les anthocyanes font partie de la famille des flavonoïdes et absorbent la lumière dans le visible. Les anthocyanes et leurs dérivés sont une des familles de pigments les plus importantes des raisins noirs et donc du vin rouge.

IV.2 Les structures, la localisation et les teneurs

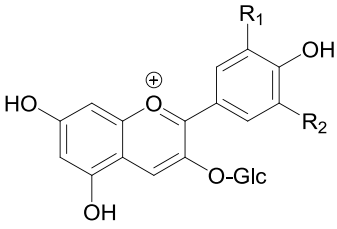
La molécule d'anthocyane contient un noyau flavylium, possédant un oxygène chargé positivement. Compte tenu de l'existence des doubles liaisons conjuguées, la charge est de fait délocalisée sur l'ensemble du cycle qui est stabilisé par résonance [140]. Les anthocyanes se différencient, d'une part, par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, et d'autre part par la nature des oses liés à la molécule. L'anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. Sous forme hétérosidique (anthocyanes), ces molécules sont beaucoup plus stables que sous leur forme aglycone (anthocyanidines).

Cinq anthocyanidines sont distinguées dans le raisin et le vin par des substituants différents en positions R_1 et R_2 (**Tableau 5**). Plusieurs groupes de dérivés sont possibles en fonction de la nature du glucose en position 3 : glucose, glucose acétylé, glucose *p*-coumaroylé, glucose cafféoylé. De nouvelles anthocyanes acylées avec des acides organiques inhabituels, comme de l'acide lactique et de l'acide férulique ont également été identifiées à l'état de traces dans certains vins rouges [141].

Au sein de la baie de raisin, les anthocyanes sont co-localisées avec les tanins dans les cellules hypodermiques à paroi épaisse de la pellicule [97, 142]. Dans certains cépages dits «teinturiers», elles sont également présentes dans la pulpe. Elles sont extraites pendant la fermentation alcoolique et les macérations pré- et post-fermentaires. La malvidine-3-*O*-

glucoside est l'anthocyane majoritaire du raisin (70-90 %). Les concentrations des anthocyanes varient entre 350 et 1100 mg/L dans les vins rouges issus du raisin du genre *Vitis vinifera*.

Tableau 5. Les structures chimiques des anthocyanes.

 <p style="text-align: center;">Anthocyane</p>	Anthocyane	R₁	R₂
	Malvidine-3- <i>O</i> -glucoside	OCH ₃	OCH ₃
	Péonidine-3- <i>O</i> -glucoside	OCH ₃	H
	Delphinidine-3- <i>O</i> -glucoside	OH	OH
	Pétunidine-3- <i>O</i> -glucoside	OCH ₃	OH
	Cyanidine-3- <i>O</i> -glucoside	OH	H

IV.3 L'équilibre des anthocyanes en fonction du pH

La couleur d'une solution d'anthocyanes est pH dépendante. La forme flavylium, de couleur rouge, bien que possédant un déficit électronique, est stable en milieu acide et se transforme, lorsque le pH augmente, soit en base carbinol (incolore), en chalcone (jaune) ou en base quinonique (bleu) (**Figure 7**).

Dans la zone de pH du vin, entre 3,2 et 4,5, les quatre formes d'anthocyane co-existent (**Figure 8**), mais les formes prédominantes des anthocyanes sont les formes incolores AOH, elles représentent entre 40 et 60 % de la totalité des anthocyanes. La forme flavylium A⁺ rouge représente entre 4 et 35 % des anthocyanes sur ce même intervalle de pH. Les formes AO, représentent également une faible part entre 8 et 15 % des anthocyanes totales. A pH 4, les formes chalcones présentent le chromophore majoritaire, bien que faiblement colorées [143].

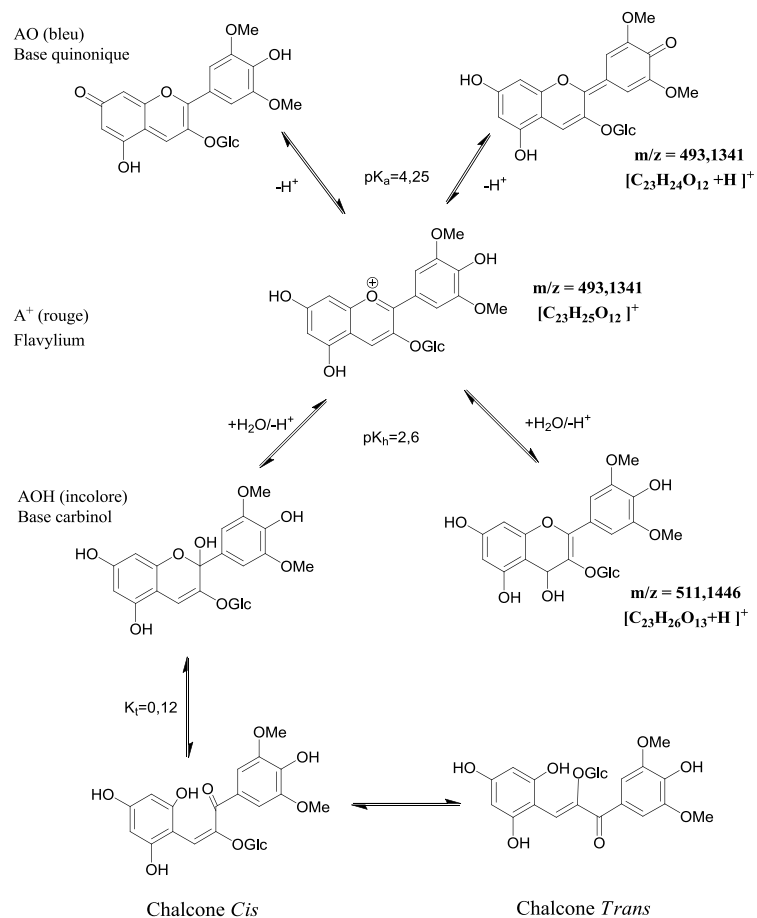


Figure 7. Les structures des différentes formes d'anthocyanes. A^+ = cation flavylium ; AO = base quinonique ; AOH = base carbinol.

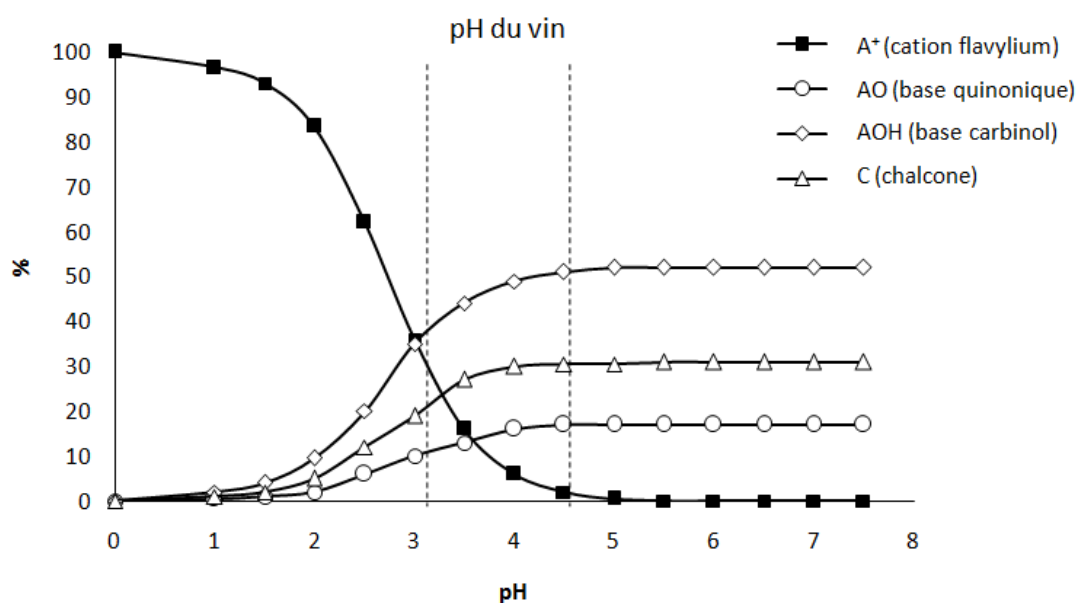
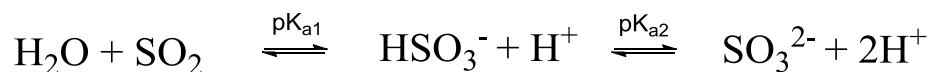


Figure 8. La variation de la proportion des différentes formes d'anthocyanes en fonction du pH.

L'origine de la couleur de la forme flavylium A⁺ rouge et de la forme AO bleu des anthocyanes se trouve au niveau de leurs structures. Une énergie ayant la bonne longueur d'onde/fréquence peut promouvoir un électron d'une orbitale pleine vers une orbitale vide, on obtient ainsi un spectre UV-visible. Si la longueur d'onde de la lumière absorbée rentre dans la zone visible, ce composé est coloré. Généralement, plus un composé est conjugué, plus étroite est la quantité d'énergie nécessaire pour la transition, et donc plus grande est la longueur d'onde de la lumière qu'il peut absorber. La spectroscopie UV-visible peut nous informer sur les conjugaisons présentes dans une molécule. Avec moins de huit doubles liaisons conjuguées, le composé n'absorbe que dans l'UV. Avec plus de huit doubles liaisons conjuguées, l'absorption glisse dans le visible [144].

IV.4 L'équilibre des anthocyanes en présence de SO₂

En présence de dioxyde de soufre (SO₂), les solutions d'anthocyanes libres sont fortement décolorables. En milieu aqueux, le SO₂ se combine avec l'eau pour produire de l'acide sulfureux, qui s'équilibre selon l'équation suivante [145] :



L'équilibre de la solution dépend principalement du pH du milieu mais également de la température et de la teneur en éthanol. A pH 3,5, 96,3 % de l'acide sulfureux (SO₂+H₂O) se trouvent sous la forme d'anion hydrogénosulfite (HSO₃⁻) [146]. L'ion HSO₃⁻ peut réagir avec le cation flavylium de l'anthocyane, principalement sur le carbone C4, même si théoriquement cela est aussi sur le carbone C2, conduisant à la formation de composés incolores de type ASO₃H [147] (**Figure 9**). Cette substitution empêcherait, de plus, la condensation des anthocyanes avec d'autres molécules. L'effet décolorant du SO₂ sur les anthocyanes combinées et polymérisées est moindre voire inexistant [148].

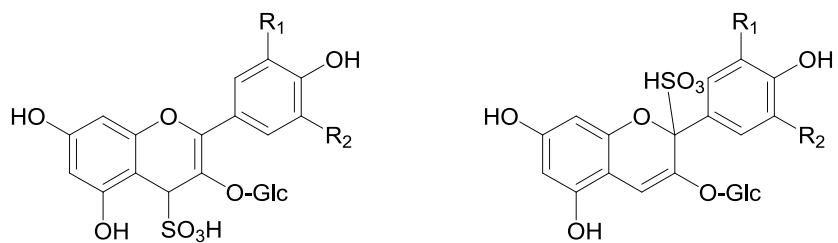


Figure 9. Structures des formes incolores de type ASO₃H résultant de la réaction entre les anthocyanes et l'ion HSO₃⁻.

V. La polymérisation des composés polyphénoliques

V.1 La condensation directe par liaison inter-flavonoïde de type B

V.1.1 Les liaisons inter-flavonoïdes de type B des tanins condensés

Une étape importante de la recherche sur des liaisons inter-flavonoïdes des tanins est franchie en 1965 lorsque un proanthocyanidine dimère ayant une liaison carbone-carbone de type B a été identifié dans la noix de kola et le noyau d'avocat [83, 149]. La **Figure 10** montre les deux types de liaison inter-flavonoïde de type B possibles entre le carbone C4 et les carbones C8 ou C6.

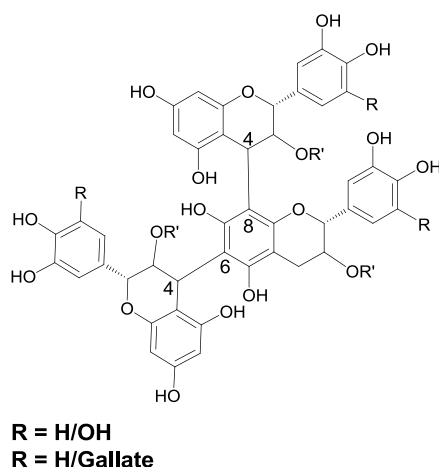


Figure 10. Les liaisons inter-flavonoïdes des tanins condensés de type B (C4-C8/C6).

Le processus biochimique de l'étape de polymérisation des flavan-3-ols est considéré comme l'une des dernières frontières importantes à franchir, et reste très spéculatif jusqu'à aujourd'hui [150]. Parmi les différentes hypothèses, il est globalement admis que l'un des intermédiaires clés est une structure avec un carbocation sur le carbone C4. Ce carbocation pouvant être obtenu suivant plusieurs voies. L'une des voies possibles conduisant à cet intermédiaire est l'oxydation de flavanol en *o*-quinone ou d'anthocyanidine en quinone methide par une polyphénol oxydase (PPO) [150] ; Ces dérivés d'oxydation subissent un réarrangement intra-moléculaire conduisant à la formation du carbocation [151]. Le carbocation intermédiaire ainsi formé est supposé s'échapper du site actif de la réductase et subir l'attaque nucléophile des flavan-3-ols déjà biosynthétisés (principalement par le carbone

C8, mais également par le carbone C6) pour donner un procyanidine dimère [152]. Ensuite, des réactions analogues des dimères avec un nouveau carbocation forment des oligomères et enfin des polymères dont les structures sont principalement linéaires [153].

Il a également été confirmé que le flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines) est converti en 2,3-*trans*-flavan-3-ol [i.e. (+)-catéchine] par l'enzyme leucoanthocyanidine réductase (LAR) [154], alors que l'(-)-épicatéchine provient de la réduction de l'anthocyanidine par l'enzyme anthocyanidine réductase (ANR) [155]. Les monomères ainsi biosynthétisés sont considérés comme des 'unités initiatrices' de la condensation (**Figure 11**).

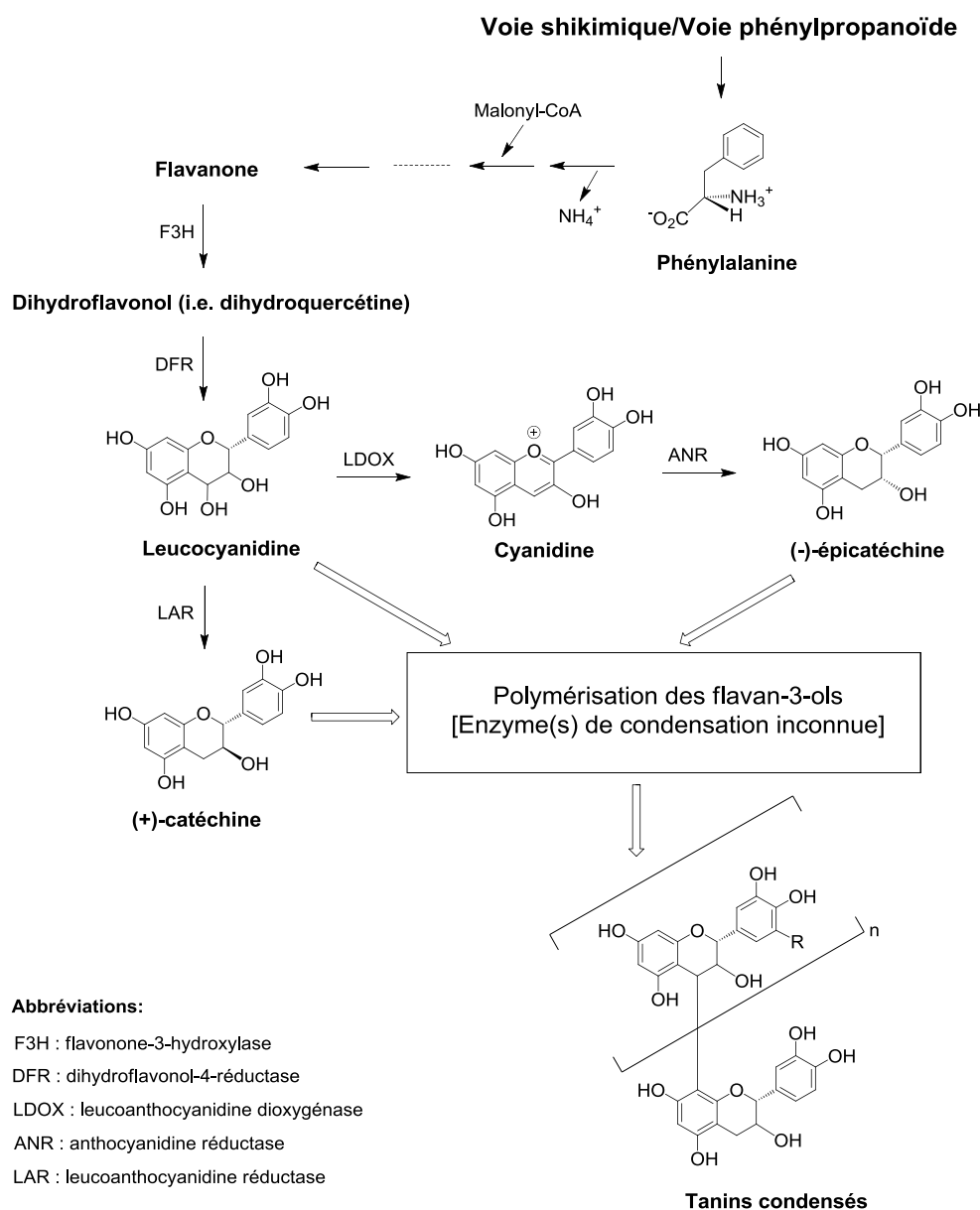


Figure 11. La voie biosynthèse de la procyanidine chez les plantes.

En revanche, la formation de procyanidines B1 et B2 a été observée lorsqu'une fraction de procyanidines polymères de sorgho a été ajoutée à des vins blancs ou rouges en présence de la (+)-catéchine ou l'(-)-épicatéchine [152]. Ce qui prouve que la polymérisation et la dépolymérisation réversibles des proanthocyanidines sont possibles dans les conditions du vin (pH de 3,2-4,5).

En effet, en condition acide, la liaison de type B C4-C8/C6 est coupée en libérant l'unité inférieure sous forme intacte et l'unité supérieure avec un carbocation localisé sur le carbone C4. Le carbocation ainsi formé peut subir l'attaque nucléophile des carbones C8 ou C6 d'une autre unité de flavanol ou de proanthocyanidine en formant à nouveau des proanthocyanidines. Comme montré à la **Figure 12 Voie I** et la **Figure 12 Voie II**, si la partie inférieure libérée a une taille inférieure à la proanthocyanidine qui vient s'ajouter au carbocation ($n_3 > n_2$), le degré de polymérisation du composé augmente et il diminue en cas contraire.

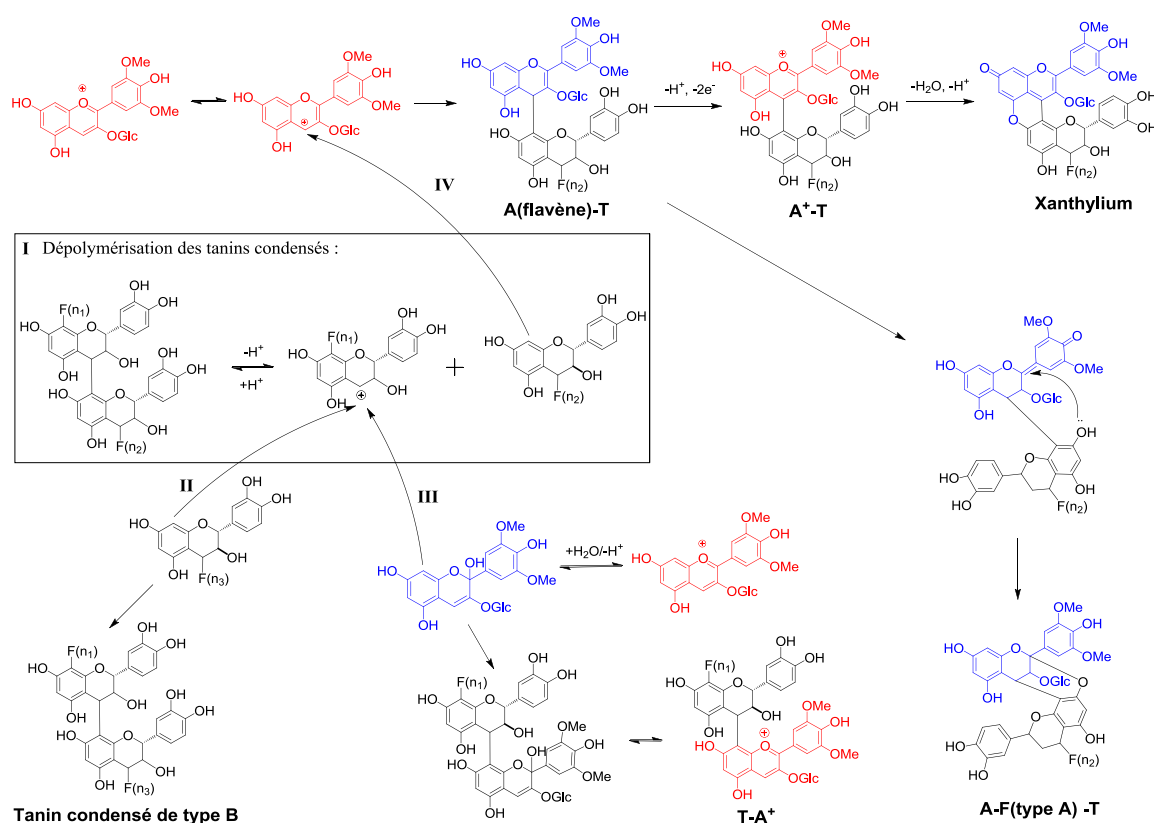


Figure 12. Démonstration des réactions de polymérisation de type B et de type A. I : La dépolymérisation des tanins condensés ; II : La polymérisation des tanins condensés de type B ; III : La formation de pigment polymérisé de type T-A⁺ ; IV : La formation des polymères incolores de type A(flavène)-T, de type A-F(type A)-T et de pigment polymérisé de type A⁺-T.

Cette polymérisation n'est pas sans limite, puisque avec l'augmentation de la polymérisation, les proanthocyanidines deviennent plus difficiles à dissoudre dans les milieux alcooliques et aqueux. Il a été suggéré que les proanthocyanidines qui peuvent être solubilisées peuvent avoir des poids moléculaires allant jusqu'à 7000 Da correspondant à l'accumulation de près de 20 unités de flavan-3-ol dans la chaîne polymérique [156], au-delà, la précipitation est observée.

V.1.2 Les liaisons inter-flavonoïdes de type B entre l'unité de flavanol et l'unité d'anthocyanique

Durant la vinification, les tanins condensés et les anthocyanes des baies de raisin sont extraits et coexistent par la suite dans la bouteille pendant le vieillissement qui peut atteindre jusqu'à 50 ans pour certains très grands vins rouges de garde. Les réactions entre les tanins condensés et les anthocyanes conduisent à la stabilisation de la couleur et à la modification de l'astringence des vins rouges [120]. Dans le mécanisme de réaction conduisant à la formation de produits de condensations directes entre une unité d'anthocyane et les tanins condensés, l'unité d'anthocyane peut réagir comme l'agent nucléophile ou comme l'agent électrophile.

D'un côté, l'anthocyane sous sa forme hydratée (AOH) peut réagir comme agent nucléophile par l'intermédiaire de ses carbones C8 ou C6 avec le carbocation en position C4 issu du clivage en milieu acide des proanthocyanidines dans le vin (**Figure 12 Voie III**). D'une telle attaque nucléophile résulte la formation d'une liaison inter-unité de type B conduisant à la formation de pigments polymérisés avec l'anthocyane comme unité terminale sous sa forme flavylum (A^+) : pigment de type $[T-A^+]$ [157-159]. Selon plusieurs auteurs [160], la polymérisation ne peut plus continuer car la molécule d'anthocyane est l'unité terminale de la chaîne de réaction et elle ne peut que très difficilement être liée par ses carbones C8 ou C6.

De l'autre, les anthocyanes sous leur forme flavylum présentent également un fort caractère électrophile en position C4. Ce carbone C4 peut subir l'attaque nucléophile des carbones C8 ou C6 d'une unité flavan-3-ol ou de l'unité supérieure des proanthocyanidines (**Figure 12 Voie IV**). Cette attaque nucléophile conduit à la formation des polymères incolores avec l'anthocyane sous forme flavène comme unité supérieure : dérivés de type $[A(\text{flavène})-T]$ [158], qui peuvent être oxydés conduisant ainsi à la formation soit des pigments polymérisés

de type $[A^+-T]$ ou la formation des polymères incolores ayant une liaison de type A : $[A-F$ (type A)] [161]. Les pigments polymérisés de type $[A^+-T]$ peuvent ensuite subir des réarrangements oxydatifs conduisant à la formation des xanthyliums [162, 163].

V.2 La condensation directe par liaison inter-flavonoïde de type A

V.2.1 Les liaisons inter-flavonoïdes de type A dans les tanins condensés

Deux dimères de proanthocyanidine ayant une liaison de type A ont été isolés pour la première fois dans les baies de canneberges (*Vaccinium vitisidaea*) en 1965 [149], et plus tard à partir de marronniers (*Aesculus hippocastanum*) [164] et de kola (*Cola accuminata*) [165]. Cette classe possède la liaison de type B C4-C8/C6 et une liaison éther supplémentaire entre l'oxygène porté par les carbones C5 ou C7 de l'unité inférieure et le carbone C2 de l'unité supérieure.

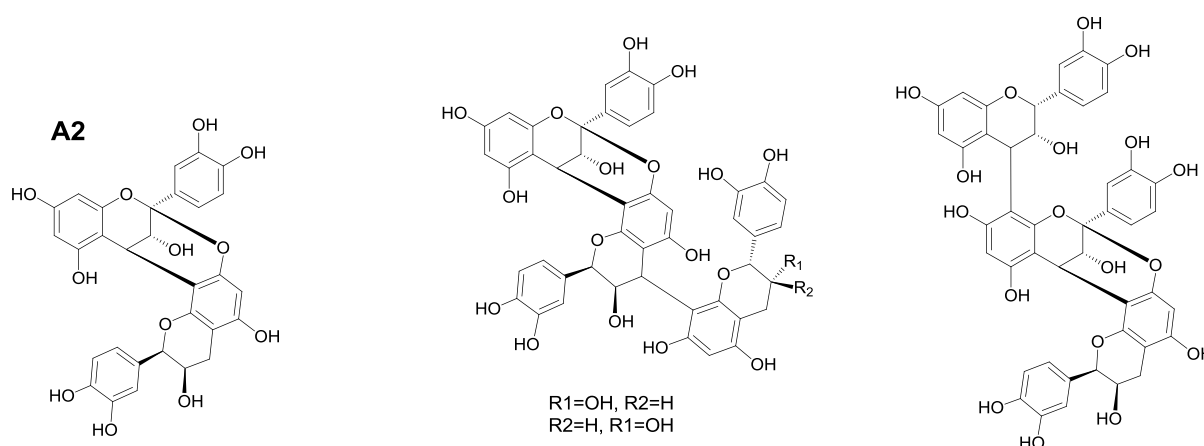


Figure 13. Les structures de type A identifiées et caractérisées par Jacques *et al.* en 1973 [96].

Cette liaison inter-flavonoïde doublement liée (C4-C8; C2-O-C7) a finalement été prouvée en 1973 en utilisant la spectroscopie RMN ^{13}C [96]. Dans la même étude, trois trimères dérivés de procyanidine A2, isolés dans le marronnier (*Aesculus hippocastanum*) et dans la canneberge de montagne (*Vaccinium vitisidaea*) ont également été signalés (**Figure 13**). Plus tard en 1975, une autre structure doublement liée (C4-C6; C2-O-C5) a également été rapportée [166] (**Figure 14**). Depuis, une cinquantaine de proanthocyanidines de type A ont été trouvées et caractérisées dans les plantes, y compris des dimères, trimères, tétramères et pentamères [167].

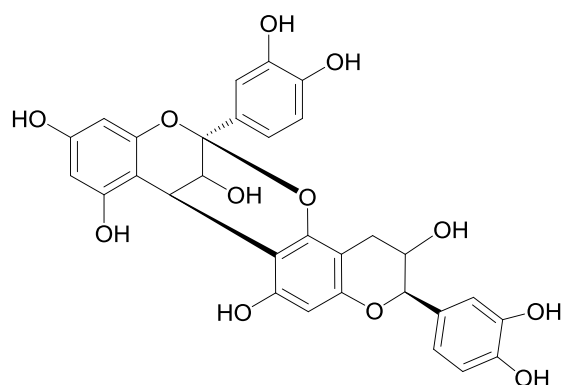


Figure 14. La structure de type A (C4- C6; C2-O-C5) démontrée par Schilling *et al.* en 1975 [166].

Même si l'identification du dimère A2 dans le vin rouge n'a été réalisée qu'en se basant sur une étude de coélution avec la procyanidine A2 isolée à partir de marronnier en HPLC-UV [168, 169], ce résultat était très fiable puisqu'il a également été confirmé par ajout dosé lors d'un fractionnement sur une colonne de TSK-40S.

La formation de liaison de type A à partir de liaison de type B par l'oxydation a été prouvée [170]. Cette oxydation peut se faire par des radicaux libres ou des enzymes conduisant à la formation d'une quinone sur le cycle B qui permettra l'attaque nucléophile de l'oxygène porté par les carbones C7 ou C5 de l'unité inférieure (**Figure 15**).

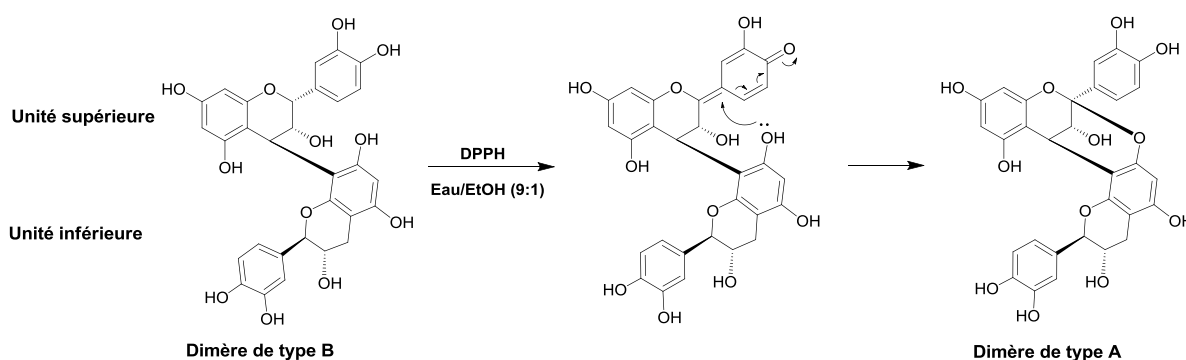


Figure 15. La formation de liaison inter-flavonoïde de type A par l'oxydation en utilisant un intermédiaire quinonique [170].

En comparant leurs caractéristiques avec celles des procyanidines de type B, les procyanidines de type A sont moins solubles et donnent un rendement plus élevé de cyanidine lors de l'hydrolyse en condition acide et à chaud [171]; elles ont une capacité anti-oxydante plus élevée dans les tissus ou les systèmes lipidiques mais moins en milieu aqueux que les procyanidines de type B [172]; elles sont plus stables vis-à-vis des modifications de pH et de température que les procyanidines de type B [173].

Les procyanidines trimères avec une liaison inter-flavonoïde de type A et une autre de type B sont nommés les procyanidines de type D [105].

V.2.2 Les liaisons inter-flavonoïdes de type A entre flavanol et anthocyane

Comme montré à la **Figure 12 Voie IV** et présenté dans la section **V.1.2** de ce chapitre, les liaisons inter-flavonoïdes de type A peuvent également être formées entre une unité de flavanol et une unité d'anthocayne. Plusieurs études [174] ont montré l'impossibilité de distinction entre des adduits A(flavène)-F, des adduits F-A(flavène) et des adduits A-F(type A) en MS/MS et certaines attributions des fragments structurels restent vagues et controversées [175]. Les auteurs ont proposé d'utiliser une stratégie de dépolymérisation chimique pour faire la distinction [158]. Les adduits A(flavène)-F se dépolymérisent en condition acide et chaude alors que les adduits de type A résistent à la dépolymérisation chimique.

V.2.3 Les liaisons inter-flavonoïdes de type A entre deux unités d'anthocyane

La présence de dimère et trimère d'anthocyane a, dans un premier temps, été identifiée dans la pellicule de raisin en 2004 [176] et puis dans le vin rouge [159, 175]. Cependant, ces études ne se basant que sur des techniques de spectrométrie de masse, le type de liaison inter-flavonoïde (type A ou type B avec les unités anthocyanique sous forme flavène) n'a pas pu être clairement établi (**Figure 16**). Ce n'est qu'en 2013, qu'une anthocyane trimérique a été purifiée et analysée par RMN pour la première fois permettant la caractérisation complète de ce composé trimérique [177]. Il s'avère que la structure trimérique comprend une unité de malvidine-3-*O*-glucoside comme unité terminale en forme flavylum reliée à deux unités en forme flavane comme unités d'extension comportant donc deux liaisons de type A (C4-C8 et C7-*O*-C2).

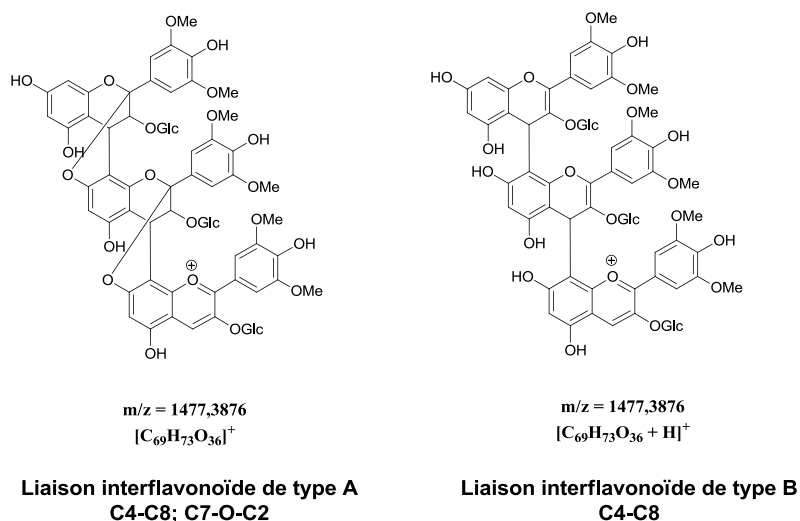


Figure 16. Les structures possibles de l'anthocyane trimère et la structure de type A confirmée par RMN [177].

V.3 La condensation indirecte par pont éthylidène

En plus des condensations directes, des condensations indirectes par l'intermédiaire d'aldéhydes entre les unités de flavanol ou avec les unités d'anthocyanes ont été également observées dans le vin rouge [178]. Parmi tous les intermédiaires, l'acétaldéhyde est le plus important. Dans le vin, l'acétaldéhyde est l'un des métabolites de la levure générés pendant la fermentation [179, 180], mais il peut également être formé par l'oxydation de l'éthanol [181]. Cette condensation, catalysée par l'acidité du milieu, implique la formation d'un carbocation sur l'acétaldéhyde qui subit une attaque nucléophile des carbones C8 ou C6 d'une unité de flavan-3-ol pour conduire à la formation d'un intermédiaire présentant un alcool benzylique. Cet alcool peut être déshydraté pour générer un cation benzylique qui peut de nouveau subir l'attaque nucléophile d'une nouvelle unité flavan-3-ol ou d'une anthocyane (sous sa forme hydratée AOH) pour conduire à la formation d'un pont dit « éthylidène » entre les deux unités (flavanol-pont éthylidène-flavanol ou flavanol-pont éthylidène-anthocyane) (**Figure 17**) [182-185]. Une fois formé, le dimère flavanol-pont éthylidène-flavanol peut subir un réarrangement oxydatif pour générer des structures de type xanthylum [186, 187]. Il a été montré que les produits résultant de cette condensation ont un impact sur le goût, la couleur et la stabilité colloïdale des vins [188, 189].

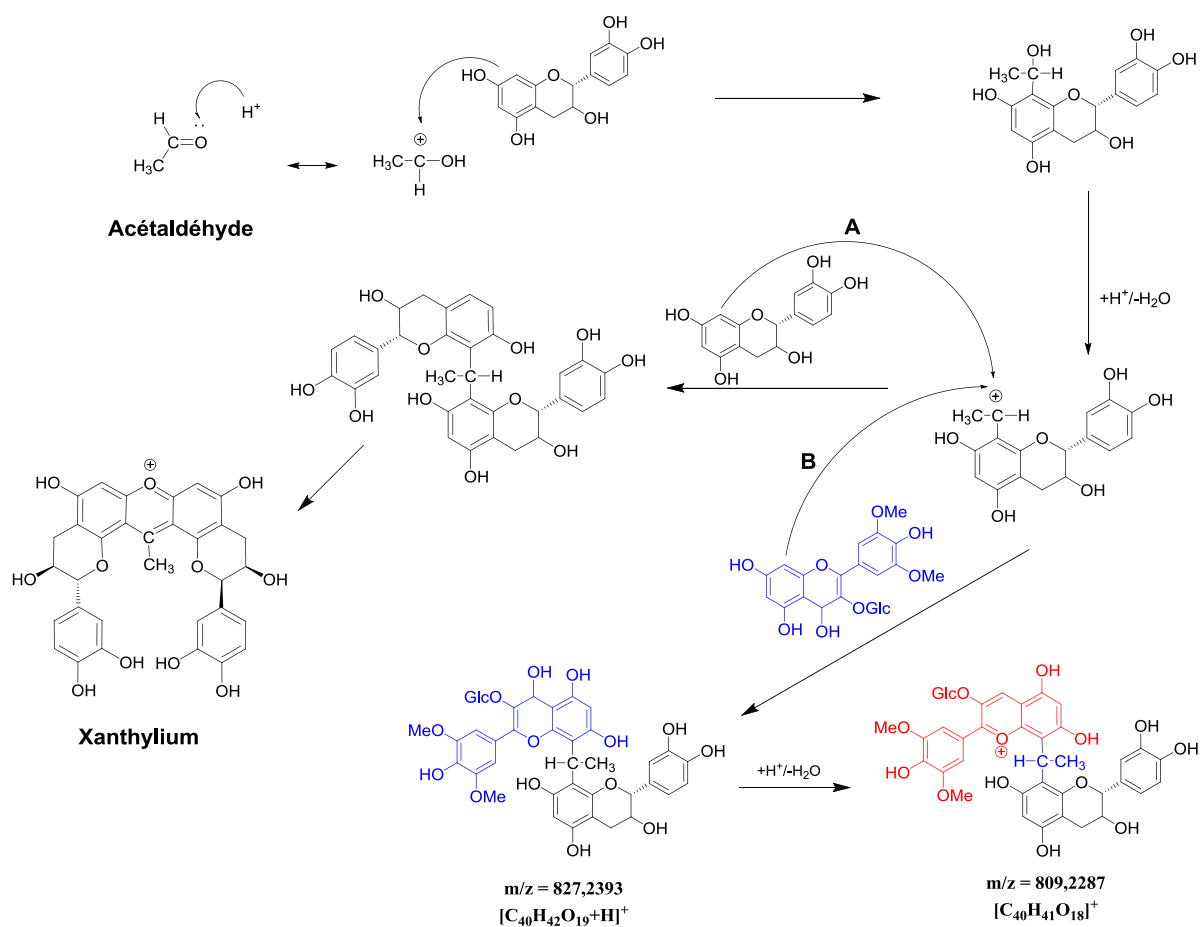


Figure 17. Mécanisme des condensations indirectes par pont éthylidène. A : F-pont éthylidène-F ; B : A⁺-pont éthylidène-F.

Le pont éthylidène peut également lier deux unités d'anthocyanes en se basant sur le même mécanisme (**Figure 18**). Le composé Mv (C8)-pont éthylidène-(C8) Mv⁺ a été synthétisé et caractérisé par UV, MS et RMN par Atanasova *et al.* en 2002 [190]. Trois formes en fonction du pH ont été détectées pour ce composé : l'ion bichargé $m/z = 506,1419$ contient deux anthocyanes en forme flavylum, l'ion monochargé $m/z = 1011,2765$ contient une anthocyane en forme flavylum et une autre sous forme quinonique et l'ion monochargé $m/z = 1029,2870$ contient une anthocyane sous forme hydratée et une autre sous forme flavylum.

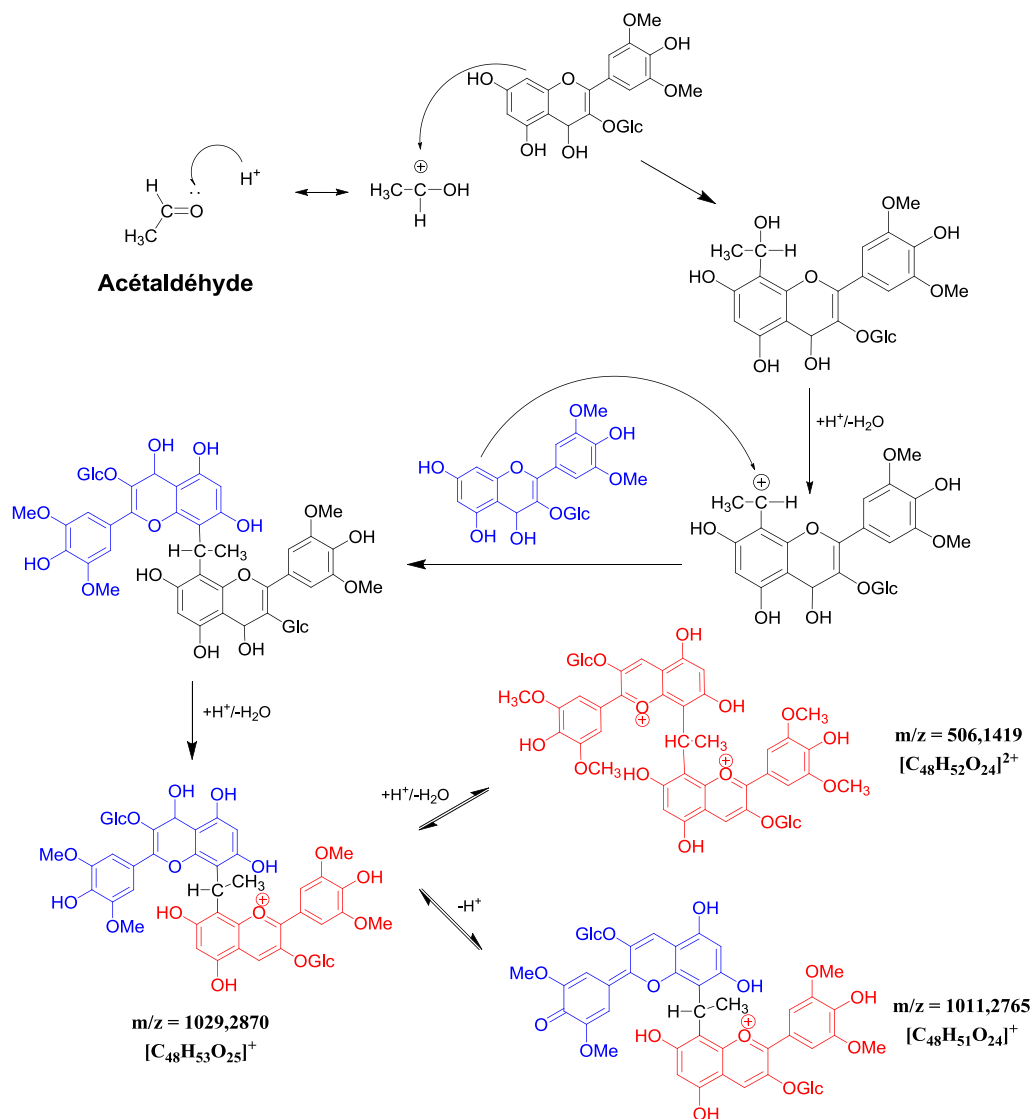


Figure 18. Mécanisme de condensation indirecte par pont éthylidène des anthocyanes.

V.4 L'évolution des anthocyanes par cyclo-addition

En présence d'acétaldéhyde, en plus des condensations indirectes par pont éthylidène, un autre mécanisme d'évolution par cyclo-addition impliquant l'acétaldéhyde est possible [191, 192]. Cette nouvelle famille de pigments polymérisés est formée par réaction de cycloaddition entre les vinylflavanols et les anthocyanes conduisant à la formation d'un nouveau hétérocycle oxygéné (**Figure 19**) [193]. Des vinylflavanols impliqués dans la formation de ces composés proviendraient de la dépolymérisation en milieu acide des ponts éthylidènes entre flavanols. Une fois formé, le 8-vinylflavanol réagit comme un agent nucléophile qui

attaque préférentiellement le carbone C4 du cycle pyrane du cation flavylum. L'intermédiaire ainsi formé va conduire au flavano-pyranoanthocyane par cyclisation intra-moléculaire [193].

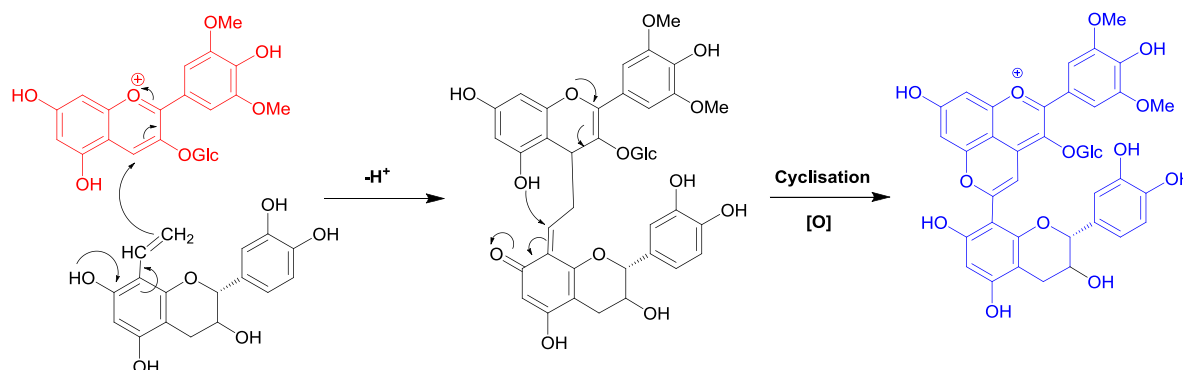
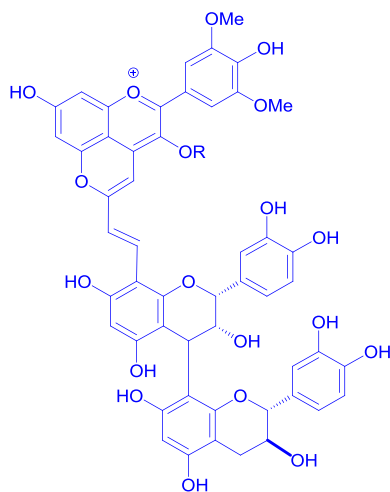


Figure 19. La formation de la flavano-pyranoanthocyane.

Les pigments de cette famille, tels que les produits d'addition de malvidine-3-*O*-glucoside et vinylcatéchine, vinylépicatechine et vinylprocyanidine B2, ont d'abord été détectés et identifiés dans des solutions modèles [192]. Plus tard, les flavano-pyranoanthocyanes composés d'une part de malvidine-3-*O*-glucoside ainsi que de ses dérivés acylés, et d'autre part des dérivés vinyliques de (+)-catéchine, d'(-)-épicatechine et de procyanidines oligomères allant jusqu'aux tétramères ont été détectés dans du marc de Syrah Australien [194]. Finalement, les structures des six flavano-pyranoanthocyanes isolées du vin de Porto ont été clarifiées par Mateus *et al.* [195, 196] par RMN. Récemment, l'effet positif de l'acidité et de l'oxygène sur la formation de ces pigments pendant l'élevage des vins rouges a été montré par Pechamat *et al.* [197].

En 2003, une autre classe de pigments bleus dénommée les portisines dérivés des pyranoanthocyanes a été montrée dans du vin de Porto [198]. En utilisant la RMN, les auteurs ont réussi à attribuer l'unité flavanol supérieure comme étant l'(-)-épicatechine sans pouvoir identifier l'unité inférieure. Puisque les procyanidines dimères B1-B4 ayant des liaisons inter-flavonoïdes de type C4-C8 sont les plus abondants dans les raisins et les vins, les auteurs considèrent que les dimères impliqués dans ces structures sont les dimères B1 ou B2 (**Figure 20**).



R = Glucose / Glucose coumaroylé

Figure 20. Structures des deux portisines détectées dans du vin de Porto [198].

V.5 De nouvelles structures des pigments polymérisés

A ce jour, de plus en plus de structures de pigments polymérisés sont découvertes en solution modèle, leur nombre et leur diversité structurale ne cessent d'augmenter. Néanmoins, pour un grand nombre de ces structures, leur formation et leur présence dans le vin rouge restent à confirmer. En 2008, des structures issues de la réaction entre la malvidine-3-*O*-glucoside et la 8-vinylcatéchine ont été proposées (**Figure 21A et B**) [199]. En 2012, une structure contenant un pont éthyldène et une liaison de type A a été synthétisée en milieu modèle de vin en présence d'acétaldéhyde (**Figure 21C**) [200].

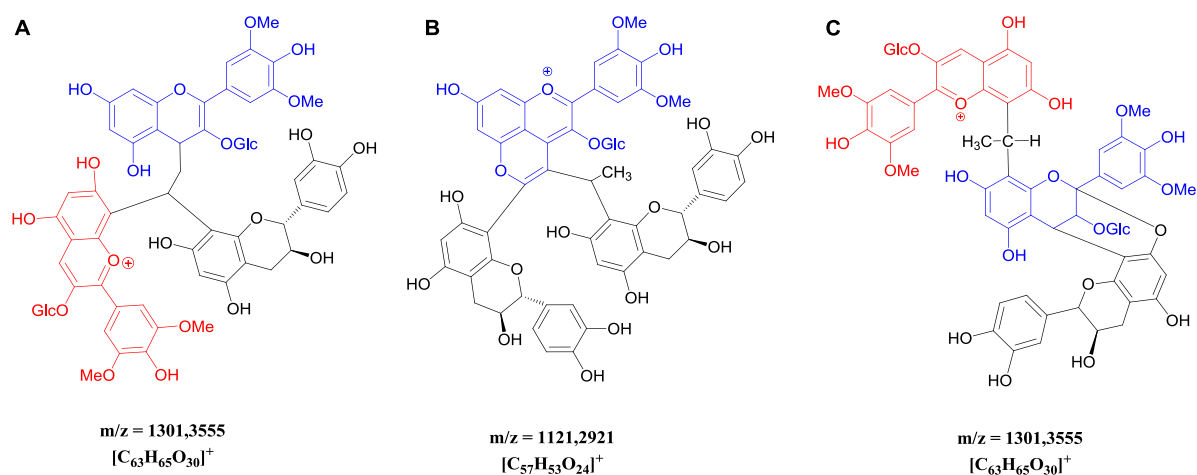


Figure 21. Trois nouvelles structures de pigments polymérisés.

En 2014, une structure contenant un dimère de malvidine-3-*O*-glucoside lié par pont éthylidène à une troisième unité de malvidine-3-*O*-glucoside a été identifiée ainsi qu'une autre structure polymérisée avec une unité de pyranoanthocyane (**Figure 22A et B**) [31]. Une structure de pigment polymérisé avec deux unités de flavanols liées par deux ponts éthylidènes à une unité d'anthocyane a également été identifiée et caractérisée en solution modèle du vin (**Figure 22C**) [183].

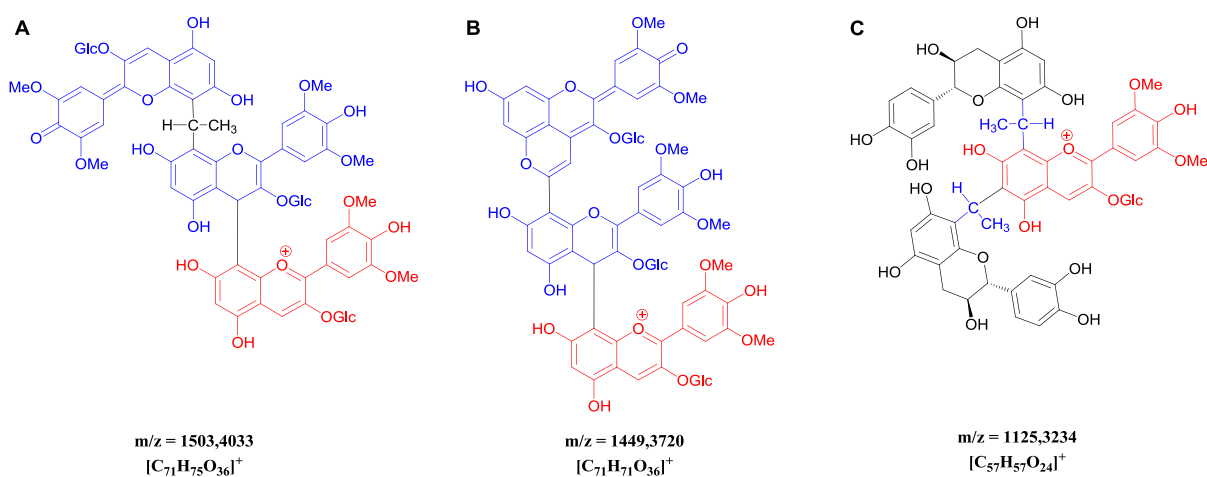


Figure 22. Trois nouvelles structures de pigments polymérisés impliquant la participation de l'acétaldéhyde dans leurs formations.

VI. La caractérisation des structures polymériques

VI.1 La spectrométrie de masse haute résolution

VI.1.1 Généralités

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des composés ou entités d'intérêt par mesure de leur rapport masse/charge (m/z) et ainsi d'obtenir leurs poids moléculaires. Le spectromètre de masse, initialement conçu par le Britannique Joseph John Thomson en 1921 [201, 202], contient une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions selon leurs rapports m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal.

Jusqu'à récemment, les scientifiques ne disposaient que de spectromètres de masse à faible résolution, généralement de conception de type QqQ (Q : quadrupôle) ou de type QIT (Quadrupole Ion Trap), et parfois d'instruments de moyenne résolution de type TOF (Time of Flight) ou QqTOF (un quadrupôle couplé à une TOF). Les spectromètres de masse à haute résolution, en particulier les instruments de type FTICR-MS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), étaient seulement disponibles dans des laboratoires spécialisés. Cette situation a radicalement changé au cours des dernières années avec l'apparition des spectromètres de masse hybrides à haute résolution (Orbitrap, Q-TOF, QIT-TOF) qui sont maintenant largement utilisés dans de nombreux laboratoires cliniques, biologiques et environnementaux. Cette démocratisation de l'utilisation des spectromètres à haute résolution est en partie due à la baisse de leurs prix mais également au fait que la conception des instruments et des logiciels de pilotage a été améliorée, facilitant leur utilisation.

VI.1.2 L'application de la spectrométrie de masse haute résolution à la caractérisation des composés polyphénoliques du vin

Le premier avantage de la spectrométrie de masse haute résolution est sa précision élevée permettant d'établir les formules brutes des composés. Il est souvent considéré que la précision de la mesure de la masse de 1 ppm est suffisante pour déterminer la formule élémentaire d'une petite molécule inconnue en utilisant un instrument correctement calibré

[203], même s'il a également été montré de façon convaincante qu'une telle précision n'est pas suffisante pour exclure tous les candidats possibles ayant des formules brutes complexes (C, H, N, S, O, P, et éventuellement F, Cl, Br et Si) [204]. L'utilisation de modèles d'abondance isotopique comme une autre contrainte peut supprimer plus de 95 % de candidats dans ces cas [204].

Des composés polyphénoliques du vin contiennent généralement uniquement les éléments C, H, et O et de masses pouvant atteindre quelques milliers de daltons. Leurs formules brutes ne peuvent pas être complètement établies avec une précision de mesure de quelques ppm. Dans ce cas, le procédé peut être étendu à des mesures de masse précises de différences en m/z pour des ions monochargés entre les pics d'isotopes plus lourds et le pic de mono-isotopique (e.g. $\Delta = 1,00616$ Da pour $^1\text{H}/^2\text{H}$, $\Delta = 1,00336$ Da pour $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) [205] ainsi que des différences en m/z pour des ions isotopiques bichargés (e.g. $\Delta = 0,50308$ Da pour $2^1\text{H}/2^2\text{H}$) et trichargés (e.g. $\Delta = 0,33539$ Da pour $3^1\text{H}/3^2\text{H}$). En outre, les ions pseudo-moléculaires peuvent être facilement attribués à partir de la différence de masse exacte entre les molécules protonées en mode positif et déprotonées en mode négatif (mode positif $[\text{M}+\text{H}]^+$ et mode négatif $[\text{M}-\text{H}]^-$; $\Delta = 2,01455$ Da) et les espèces avec l'addition ($\Delta = 21,98194$ Da entre $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$) [205].

Enfin, l'utilisation de la MS^n permet le calcul des formules élémentaires de pertes neutres consécutives en commençant par l'ion pseudo-moléculaire vers la dernière génération d'ions fragments afin de proposer précisément une voie de fragmentation des ions et de confirmer leurs structures. Par exemple, les quatre voies de fragmentation du squelette carboné de l'unité flavan-3-ol en mode positif sont notamment clairement établies dans la littérature comprenant : la fission Rétro-Diels-Alder (RDA) entraîne une perte de 152 Da ; la fission de l'hétérocycle (HRF) conduit à un fragment $m/z = 165$ en perdant une unité de phloroglucinol (-126 Da), la fission en formant un benzofurane (BFF) au niveau de l'hétérocycle C en générant un fragment $m/z = 123$ Da. La perte d'une molécule d'eau (-18 Da) peut être observée parmi les fragmentations successives [206] (**Figure 23**). Ces voies de fragmentation peuvent également être observées pour les structures oligo- et polymériques des tanins condensés.

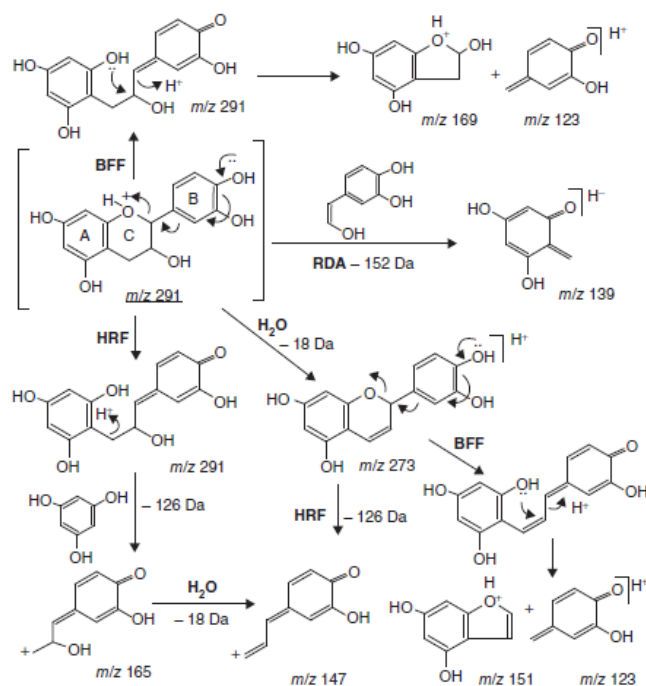


Figure 23. Les voies de fragmentations de la (+)-catéchine en mode positif [206].

Lorsque des composés d'intérêt sont connus, le temps de rétention, la masse exacte et le spectre MS/MS peuvent être comparés par rapport à une base de données. La confirmation de leur assignation peut également être effectuée par co-élution avec des produits commercialisés. Finalement, un composé inconnu dans une matrice complexe peut être purifié et sa structure caractérisée sans ambiguïté par RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle.

VI.2 La dépolymérisation des structures polymériques

VI.2.1 Le mécanisme de dépolymérisation des tanins condensés

La stratégie de dépolymérisation des proanthocyanidines par catalyse acide est souvent utilisée pour les quantifier (dosage des tanins totaux par la méthode de Bate Smith) [207, 208], pour obtenir des informations sur leurs compositions monomériques et pour calculer leur degré de polymérisation moyen (DPM). En conditions acides, les liaisons interflavonoides (C4-C8 ; C4-C6) des proanthocyanidines sont coupées en libérant les sous-unités terminales en flavan-3-ol monomères et les sous-unités d'extension sous forme de flavan-3-ol avec un carbocation au niveau de carbone C4. Une fois formé, ce carbocation peut soit être oxydé

pour former une anthocyanidine (dosage de Bate-Smith) soit être piégé par un agent nucléophile pour générer un adduit analysable (**Figure 24**).

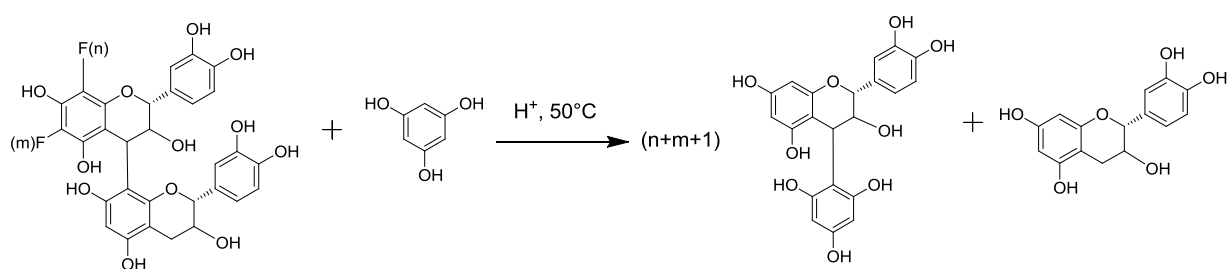


Figure 24. La dépolymérisation des tanins condensés par phloroglucinolyse.

Selon l'agent nucléophile utilisé dans la réaction, il y a la thiololyse (agent nucléophile : toluène- α -thiol) [209], la thioglycolyse (agent nucléophile : acide thioglycolique) [210], la phloroglucinolyse (agent nucléophile : phloroglucinol) [211] et la pyrogallolyse (agent nucléophile : pyrogallol) [212]. Dans notre étude, la phloroglucinolyse a été choisie puisque le phloroglucinol est inodore et inoffensif.

VI.2.2 Le degré de polymérisation moyen (DPm)

Après la phloroglucinolyse des tanins condensés, les unités terminales libérées sont : la (+)-catéchine (C), l'(-)-épicatéchine (EC) et l'(-)-épicatéchine galloylée (ECG) et l'(-)-épigallocatechine (EGC). Les unités d'extension libérées sous la forme d'adduit de phloroglucinol sont les adduits : l'(+)-catéchine-phloroglucinol (C-P) 1 et 2, l'(-)-épicatéchine-phloroglucinol (EC-P), l'(-)-épicatéchine-(galloylée)-phloroglucinol (ECG-P) et l'(-)-épigallocatechine-phloroglucinol (EGC-P) (**Tableau 6**).

Grâce aux coefficients d'absorption molaires spécifiques de chaque produit libéré au cours de la réaction, les concentrations peuvent être calculées et exprimées en mol/L. Le dosage des produits dérivés de la phloroglucinolyse par HPLC avec une colonne en phase inverse permet le calcul du DPm, du pourcentage de prodelphinidines (% P) et du pourcentage de galloylation (% G).

Tableau 6. Les produits libérés de la phloroglucinolyse des tanins condensés du vin rouge.

Composé	Formule Brute	m/z calculé [M+H] ⁺	m/z calculé [M-H] ⁻
(-)-épigallocatechine	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	307,0812	305,0667
(-) –épigallocatechine-phloro	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	431,0973	429,0827
(+)-catéchine-phloro	C ₂₁ H ₁₈ O ₉	415,1024	413,0878
(-)-épicatéchine-phloro	C ₂₁ H ₁₈ O ₉	415,1024	413,0878
(+)-catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291,0863	289,0717
(-)-épicatéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291,0863	289,0717
(-)-épicatéchine gallate-phloro	C ₂₈ H ₂₂ O ₁₃	567,1133	565,0988
(-)-épicatéchine gallate	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	443,0973	441,0827
EDP	C ₁₄ H ₁₄ O ₆	279,0863	277,0718

Le DPm est égal au nombre d'unités totales divisé par le nombre d'unités terminales :

$$DPm = \frac{\sum U.T. + \sum U.E.}{\sum U.T.}$$

U.T. = Unité Terminale ; U.E. = Unité d'Extension

Le pourcentage de prodelphinidines est basé sur la quantité molaire d'EGC incorporée dans les structures de tanins condensés :

$$P\% = \frac{\sum U.T. (EGC) + \sum U.E. (EGC - P)}{\sum U.T. + \sum U.E.}$$

De façon identique, le pourcentage de galloylation est basé sur la quantité molaire d'ECG incorporée dans les structures de tanins condensés :

$$G\% = \frac{\sum U.T. (ECG) + \sum U.E. (ECG - P)}{\sum U.T. + \sum U.E.}$$

VI.2.3 Le marqueur des tanins condensés liés par pont éthylidène

Malgré l'avantage de la phloroglucinolyse pour calculer le DPM et pour fournir des informations sur la composition monomérique des tanins condensés, il est largement reconnu que cette technique est adaptée uniquement pour analyser les tanins condensés natifs des plantes mais pas pour analyser les tanins condensés sous formes évoluées ou oxydées. Effectivement, l'oxydation induit d'une part, la formation des liaisons résistantes aux conditions de phloroglucinolyse comme les liaisons inter-flavonoïdes de type A [213], ou des liaisons entre cycle B (intra- ou inter-moléculaire), et d'autre part, la formation des tanins condensés liés par pont éthylidène.

Par exemple, la **Figure 25** montre la dépolymérisation d'un tanin lié par un pont éthylidène au milieu de la chaîne. Le degré de polymérisation réel du composé est $(n+m+2)$, alors que le degré de polymérisation calculé en se basant sur la méthode de calcul de phloroglucinolyse classique est $(n+m+2)/2$, qui est donc la moitié de la valeur réelle.

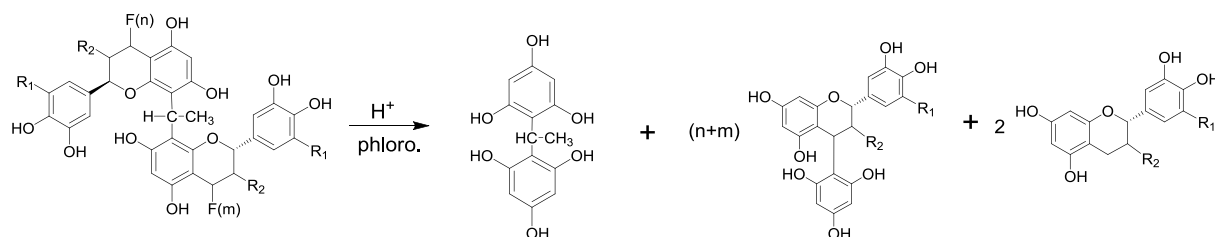


Figure 25. La dépolymérisation des tanins condensés liés par pont éthylidène et la formation du marqueur EDP : le degré de polymérisation calculé est la moitié de la valeur réelle.

En 2007, afin de quantifier les ponts éthylidènes intercalés dans la structure polymérique des tanins condensés, Drinkine *et al.* [178] ont identifié un marqueur qui est constitué par deux unités de phloroglucinol liées par un pont éthylidène nommé 2'2-éthylidènediphloroglucinol (EDP) (**Figure 25**). La première étape consiste au clivage d'une des liaisons du pont éthylidène en condition acide, libérant une unité flavan-3-ol, suivie par une attaque nucléophile du phloroglucinol, conduisant à un produit d'addition phloroglucinol-éthylidène-flavan-3-ol. La seconde étape consiste au clivage en milieu acide de la deuxième liaison du pont éthylidène, libérant la deuxième unité de flavan-3-ol, suivie de l'addition de phloroglucinol, conduisant à la formation EDP. Quand la réaction est complète, l'EDP est le

seul produit issu de la phloroglucinolyse des tanins condensés liés par pont éthylidène avec les produits classiquement libérés lors de la dépolymérisation chimique des vins.

VI.2.4 La dépolymérisation des structures polymériques ayant des liaisons non-dépolymérisables

La présence des liaisons inter-flavonoïdes non-dépolymérisables dans la structure polymérique est une autre source d'erreur pour le calcul du DPM. En général, trois types de liaisons inter-flavonoïdes non-dépolymérisables ont été rapportés : les liaisons de type A, les liaisons de type oxydatif conduisant à la formation de liaison entre cycle B et les liaisons impliquant une unité anthocyanique.

Les liaisons inter-flavonoïdes de type A sont généralement décrites comme résistantes aux conditions de dépolymérisation acide. La libération de dimère A2 et de son adduit phloroglucinol d'une fraction de tanins ayant des liaisons inter-flavonoïdes de type A après la réaction de phloroglucinolyse a été montrée par Foo *et al.* [213] (**Figure 26**).

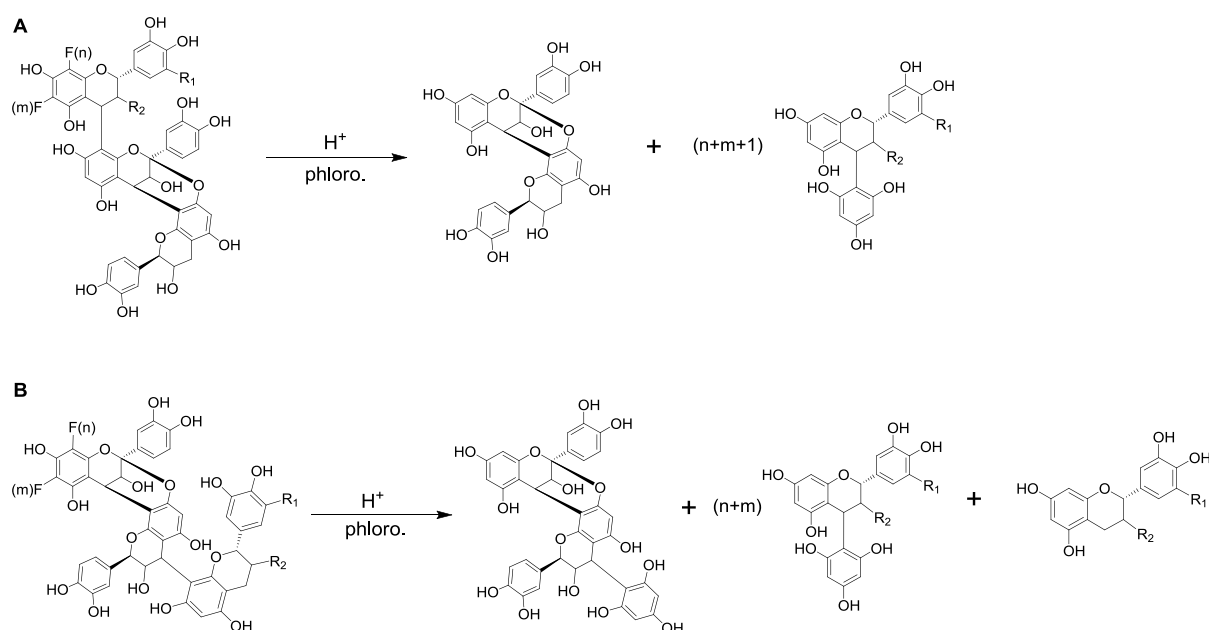


Figure 26. Les mécanismes généraux de dépolymérisation par phloroglucinolyse des tanins condensés ayant une liaison de type A.

Lorsqu'un dimère A2 se situe en unité terminale de la chaîne polymérique, aucun flavanol monomère ne sera libéré après la phloroglucinolyse (**Figure 26A**). Ainsi, le DPM d'une

fraction contenant cette structure sera surestimé par cette méthode. Au contraire, quand un dimère A2 se trouve en unité supérieure, un seul adduit A2-phloroglucinol est libéré après la phloroglucinolyse au lieu d'avoir deux unités d'adduit flavanol-phloroglucinol libérées (**Figure 26B**). Dans ce cas, le DPm d'une fraction contenant cette structure sera sous-estimé par la méthode de phloroglucinolyse.

Le second type de liaison inter-flavonoïde non-dépolymérisable comprend toutes les liaisons intermoléculaires dérivant d'un mécanisme oxydatif chimique ou enzymatique qui pour beaucoup d'entre elles présentent une liaison carbone-carbone entre les cycles B de deux unités flavanol. Les produits issus de l'oxydation des tanins condensés sont divers et parmi eux les structures de type déhydrodicatéchine B [214, 215] et déhydrodicatéchine A [216] ont été montrées (**Figure 27**). Leur présence dans la fraction polymérique fausse également le calcul du DPm comme discuté précédemment pour les liaisons de type A [210].

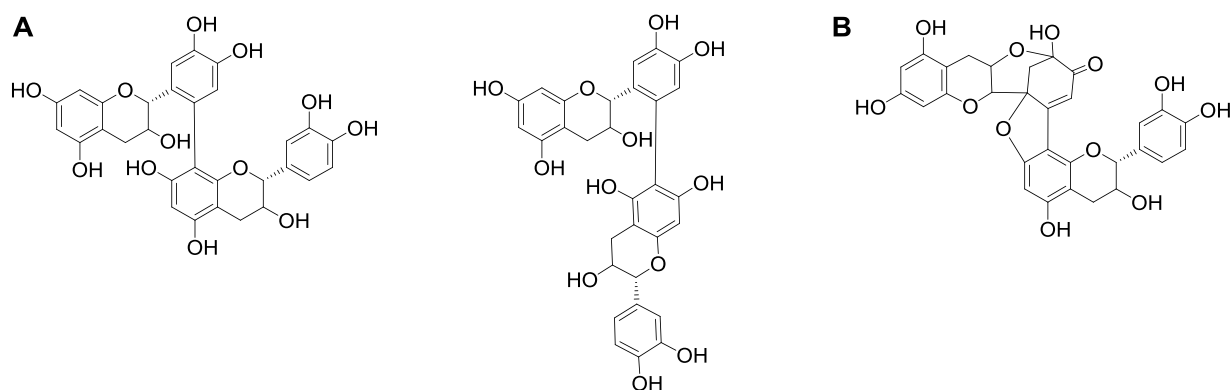


Figure 27. Les structures de déhydrodicatéchine B et déhydrodicatéchine A [214]. A : Deux isomères de déhydrodicatéchine B ; B : Déhydrodicatéchine A.

Concernant les pigments polymérisés, la résistance des adduits de type F-A⁺, F-A (type A) et A⁺-pont éthylidène-F dans les conditions de thiolysse a également été montrée dans la littérature [157, 160, 217].

VII. L'évolution des tanins condensés et des anthocyanes au cours de l'élevage et du vieillissement du vin rouge

VII.1 Généralités

Une diminution de la teneur en anthocyanes est observée à partir de la fermentation alcoolique et tout au long de l'élevage et du vieillissement en bouteille [218]. L'évolution de la couleur de vin rouge sur cette période passant de pourpre-violet pour des vins jeunes à tuilé-orangé pour les vins âgés est partiellement attribuée à des phénomènes de copigmentation et à une formation progressive de nouveaux pigments stables impliquant les anthocyanes. Cet aspect de la couleur du vin rouge a fasciné les scientifiques du vin depuis plus d'un siècle [137].

Les transformations des anthocyanes pendant l'élevage et le vieillissement du vin dépendent de l'oxydation, de la température et des conditions d'éclairage. Habituellement, des conditions oxydatives ménagées favorisent les réactions de condensation, tandis qu'une forte oxydation induit des réactions de décomposition; l'élévation de température accélère les deux types de réaction; alors que la lumière, par des mécanismes de photo-dégradation, contribue à la dégradation et la disparition des anthocyanes et donc de la couleur [219].

La dégradation des anthocyanes, la formation et l'évolution des pyranoanthocyanes, la formation et l'évolution des pigments polymérisés ainsi que l'évolution des tanins condensés au cours du vieillissement sont discutées dans la suite de ce chapitre.

VII.2 La dégradation des anthocyanes

Un facteur intrinsèque affectant particulièrement la couleur du vin avec le temps est la réactivité et l'instabilité structurelle des anthocyanes en solution [220]. Au cours du vieillissement du vin rouge, l'observation directe de la dégradation des anthocyanes est quasi impossible due à la composition complexe du vin.

Néanmoins, en solution modèle, il a été montré que la lumière, une température élevée ainsi que la présence d'oxygène favorisent la dégradation des anthocyanes au cours du temps [221-224]. Il a été montré que le principal facteur responsable de la dégradation des anthocyanes

était la température de stockage avec comme première étape de cette dégradation une rupture de la liaison *O*-glucosidique, entraînant un déplacement de l'équilibre vers la forme chalcone, suivi d'une rupture de la chaîne carbonée de la chalcone avec formation d'acides benzoïques et des benzaldéhydes par réarrangements en milieu acide. Les acides benzoïques formés dépendent des anthocyanes qui sont à leur origine. Dans le cas de la malvidine-3-*O*-glucoside, le produit formé est l'acide syringique [225].

Des réactions d'oxydation peuvent aussi engendrer la dégradation des anthocyanes. En 2007, Lopes *et al.* [226] ont montré que la malvidine-3-*O*-glucoside en solution modèle, en présence d'oxygène et de fer, se dégradait en formant de l'acide syringique et l'anthocyanone A résultant de l'ouverture et du clivage du cycle pyrane.

VII.3 La copigmentation

La copigmentation est un phénomène en solution dans laquelle les anthocyanes sous forme cation flavylum (A^+) et/ou sous forme de base quinonique (AO) et autres composés non colorés organiques forment des associations moléculaires ou des complexes par des liaisons non-covalentes de type interactions de Van der Waals et hydrophobes permettant l'établissement d'un *stacking* π - π , conduisant généralement à l'effet hyperchrome (une intensification de l'absorption), et à l'effet bathochrome (déplacement de la longueur d'onde d'absorbance maximale vers des longueurs d'onde plus élevées) [227]. La copigmentation déplace également les équilibres entre les différentes formes des anthocyanes vers les formes impliquées dans la copigmentation (A^+ et AO). Le phénomène de copigmentation est principalement influencé par la concentration du pigment et des copigments, les configurations et les structures des copigments, le rapport pigment/copigment et des facteurs du milieu comme le pH, la température et la force ionique.

Plusieurs familles de composés non colorés présentes dans le vin peuvent être des copigments tels que des composés phénoliques, des alcaloïdes, des acides aminés et des nucléotides. Les copigments les plus étudiés sont les acides phénols (acide caféique et férulique) [18, 228], l'acide chlorogénique [229], les flavonols [229], les tanins hydrolysables, les purines et les pyrimidines [230]. Parmi les flavanols, l'(-)-épicatéchine est le copigment le plus efficace [230, 231] pour former des complexes et la présence d'un groupe gallique semble augmenter son efficacité [232]. Pour les tanins condensés, c'est la conformation du copigment qui

influence la copigmentation plutôt que le degré de polymérisation [232]. Les anthocyanes peuvent également former entre elles de tels complexes par auto-association [229].

La copigmentation n'a pas été prise en compte dans les mesures traditionnelles de la couleur du vin, ni dans la relation entre la couleur et l'analyse des pigments jusqu'à récemment [229]. Certains auteurs prétendent que les mécanismes de copigmentation peuvent jouer un rôle important dans la couleur des vins jeunes [233].

VII.4 La formation et l'évolution des pyranoanthocyanes

Lors de l'élevage et du vieillissement du vin rouge, les anthocyanes initialement responsables de la couleur des vins sont remplacées, progressivement et de manière irréversible, par des pigments plus stables. Comme mentionné précédemment, les pyranoanthocyanes font partie de ces nouveaux pigments avec les pigments polymérisés.

En 1985, Bakker et Timberlake [234] ont révélé un certain nombre de pics non identifiés, et éluant peu après la malvidine-3-*O*-glucoside durant les analyses des pigments rouges d'un vin de Porto par HPLC. La résistance à la décoloration par le dioxyde de soufre d'une de ces prétendues anthocyanes a été observée par cette étude. Plus tard, en 1997, Bakkers *et al.* [235] ont caractérisé la structure de la vitisine A comme ayant un second cycle pyrane par rapport aux anthocyanes natives du raisin en combinant la spectrométrie de masse et les spectres de RMN. En plus de leur résistance partielle ou totale à la décoloration par SO₂, ces nouveaux pigments expriment plus de couleur à pH 7 que la malvidine-3-*O*-glucoside et leurs longueurs d'onde d'absorption maximales (λ_{max}) diminuent également par rapport aux anthocyanes conduisant à un fort effet hypsochrome (le changement de couleur du rouge vers l'orangé) [236].

Fulcrand *et al.* [220] ont par la suite révisé la structure de la vitisine A à l'aide des techniques de spectrométrie de masse (Ionisateur : electrospray) et de RMN mono- et bi-dimensionnelle (¹H, NOE, HSQC et HMBC) et prouvé que la formation de la vitisine A résultait de la cyclo-addition de l'acide pyruvique sur la malvidine-3-*O*-glucoside (**Figure 28**).

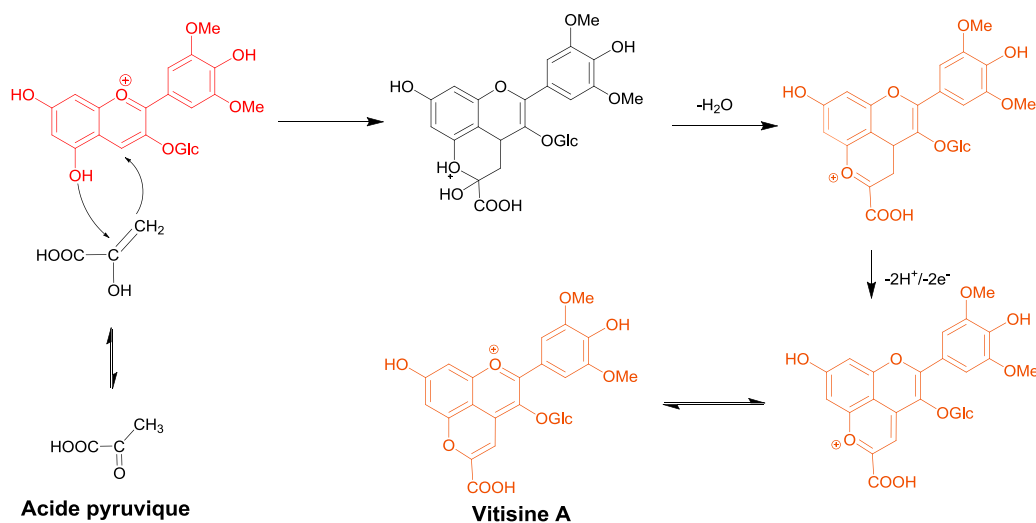


Figure 28. Le mécanisme de formation de la vitisine A [220, 237].

En plus de l'acide pyruvique, les cyclo-additions avec le carbone C4 et l'oxygène porté par le carbone C5 de l'anthocyane (glycosilé ou glycosilé et acylé) avec l'acétaldéhyde ainsi que des acides hydroxycinnamiques du vin rouge, comme l'acide *p*-coumarique (vinylphénols), l'acide caféique (vinylcatéchols) ou encore l'acide férulique (vinylgâïacol), ont été également montrées par plusieurs études. Ces réactions génèrent les pyranoanthocyanes de type vitisine B [194] (**Figure 29**) et de type hydroxyphényl-pyranoanthocyanes [238-240] (**Tableau 7**). La malvidine-3-*O*-glc-4-vinylcatéchol est également appelée pinotine A puisqu'elle a d'abord été détectée dans un vin rouge obtenu à partir du cépage Sud-Africain Pinotage [240]. Pour rappel, l'acide pyruvique et l'acétaldéhyde sont des métabolites de la levure et l'acétaldéhyde peut aussi provenir de l'oxydation de l'éthanol.

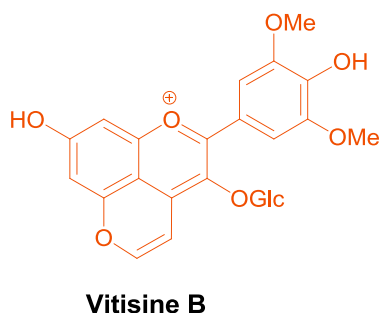
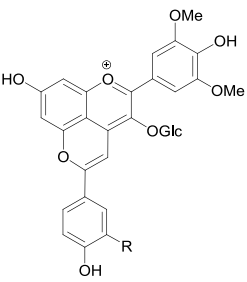


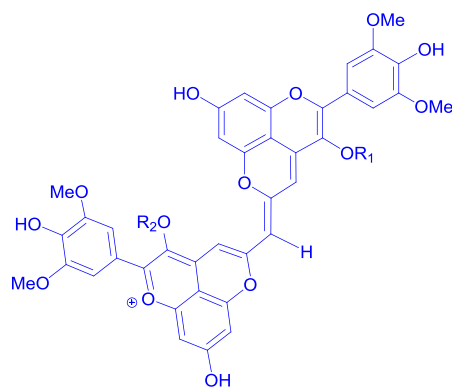
Figure 29. La structure de la vitisine B.

Tableau 7. Les hydroxyphényl-pyranoanthocyanes.

Hydroxyphényl-pyranoanthocyane	R
	Malvidine-3- <i>O</i> -glc-4-vinylcatechol (Pinotine A) OH
	Malvidine-3- <i>O</i> -glc-4-vinylphénol H
	Malvidine-3- <i>O</i> -glc-4-vinylguaïacol OCH ₃

Asenstorfer *et al.* [237] ont montré que la plus grande vitesse de formation de la vitisine A a lieu pendant la fermentation alcoolique. En effet, l'acide pyruvique est présent en grande quantité au cours de cette période. Ils ont également observé que dans les vins qui ont subi une fermentation malolactique, la formation de vitisine A était limitée puisque les bactéries malolactiques consomment de l'acide pyruvique. A la fin d'une période de maturation de 12 mois dans des bouteilles étanches à l'air, la concentration de la vitisine A diminue dans les vins sans fermentation malolactique, même si de la malvidin-3-*O*-glucoside et de l'acide pyruvique étaient encore présents. Les pyranoanthocyanes présentent des propriétés de couleur tout à fait différentes par rapport aux anthocyanes natives, qui rappellent celles présentes dans des vins vieux. Alcalde-Eon *et al.* [141] ont montré une augmentation du pourcentage des pyranoanthocyanes dans un vin rouge au cours de la période d'élevage et de vieillissement en bouteille pendant 23 mois. Leurs évolutions au cours du vieillissement du vin rouge à plus long terme, par exemple 20 ans, restent à clarifier.

Enfin, un dimère de pyranoanthocyane de couleur turquoise a été montré récemment par Oliveira *et al.* [241] dans du vin de Porto (**Figure 30**).



R₁ = Glucose / Glucose coumaroylé

R₂ = Glucose / Glucose coumaroylé

Figure 30. Les dimères de pyranoanthocyanes détectés dans du vin de Porto et dans la lie [241].

VII.5 L'évolution des pigments polymérisés

Au cours du vieillissement du vin rouge, comme rapporté par Somers, les anthocyanes sont progressivement remplacés par des pigments polymérisés plus stables [9, 242] qui sont plus résistants à la décoloration par les sulfites, à l'acidité élevée [243] et la couleur du vin rouge se transforme lentement du violet-rouge à la teinte orange-brique.

Depuis 1960, les scientifiques ont tenté d'étudier les caractéristiques de ces pigments nouvellement formés et de proposer les structures correspondantes par leur séparation et purification à partir du vin rouge ainsi que par leurs synthèses ou héli-synthèses en solutions modèles du vin. Avec le développement des techniques d'analyse et de caractérisation structurale (HRMS et RMN), les structures de différents types de pigments dérivés des anthocyanes ont été révélées dont des oligomères d'anthocyanes, des produits de condensations directes de type B [T-A⁺ ou A⁺-T] [157, 244], mais aussi de type A [A-T] [161, 217], des produits de condensations indirectes par pont éthylidène, des sels xanthylum [186] et des pyranoanthocyanes.

La formation des pigments polymérisés conduit à la modification des propriétés physicochimiques des composés, parmi lesquelles, la modification de leur maximum d'absorption dans le visible est l'une des plus importantes. Le **Tableau 8** montre les effets et

les conséquences de cette modification, y compris l'hypsochrome et le bathochrome qui correspondent aux modifications de la longueur d'onde d'absorption maximale, ainsi que l'hyperchrome et l'hypochrome qui correspondent à l'augmentation ou la diminution de l'intensité d'absorption.

Tableau 8. Les effets et les conséquences de la modification d'absorption spectrale.

Effet	Conséquence
Hypsochrome	λ_{\max} diminue
Bathochrome	λ_{\max} augmente
Hyperchrome	Absorption augmente
Hypochrome	Absorption diminue

La modification spectrale d'un pigment polymérisé est souvent rapportée en même temps que sa caractérisation structurale. Le **Tableau 9** montre les propriétés spectrales des pigments polymérisés du vin rouge rapportées dans la littérature.

Premièrement, les condensations directes entre deux ou trois unités d'anthocyanes et les condensations directes ou indirectes entre anthocyanes et flavanols entraînent un effet bathochrome : une augmentation de longueur d'onde d'absorption maximale dans le visible fournissant une teinte bleu-violette au vin. Deuxièmement, les pyranoanthocyanes et les flavano-pyranoanthocyanes montrent des effets hypsochromiques par rapport aux anthocyanes dont elles sont issues conduisant à une diminution de longueur d'onde d'absorption maximale dans le visible, cela produit un changement de l'aspect vers la couleur tuilé-orangé du vin. En revanche, la deuxième génération des flavano-pyranoanthocyanes, les portisines, ont une longueur d'onde d'absorption maximale dans le visible à 575 nm (effet bathochrome) et par conséquent, participent à la composante bleue de la couleur des vins. De plus, certains dérivés issus des condensations directes entre anthocyanes et flavanols introduisent une décoloration des pigments comme les dérivés A(flavène)-F et A-F(type A). Pour finir, les structures de type xanthylum présentent une absorption maximale entre 440-460 nm induisant une couleur jaune-orangé à ces composés et peuvent être impliquées dans l'évolution de la couleur des vins.

Tableau 9. Les propriétés spectrales des pigments du vin rouge rapportées dans la littérature.

Famille de pigment	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	Couleur
Anthocyane [245]	515-530	Rouge-pourpre
Anthocyane acétylée [245]	514-530	Rouge-pourpre
Anthocyane <i>p</i> -coumaroylée [245]	521-531	Rouge-pourpre
Anthocyane trimère [177]	542-547	Pourpre-bleu
A ⁺ -F		Instable
A(flavène)-F [174]		Incolore
A-F(type A) [217]		Incolore
F-A ⁺ [246]	530	Rouge-pourpre
A ⁺ -pont éthylidène-F(n) [192]	545	Pourpre-bleu
A-pont éthylidène-A ⁺ [190]	528	Rouge-pourpre
Type Vitisine A [236]	503-516	Orangé-rouge
Type Vitisine B [236]	490-497	Orangé
Type Pinotine (vinyl-phénol) [8, 247]	499-516	Orangé-rouge
Pyranoanthocyane-monomère [195]	501,503	Orangé
Pyranoanthocyane-dimère [195]	512	Orangé-rouge
Portisine [198]	575	Bleu
Xanthylum [186]	440-460	Jaune-Orangé

En plus des modifications spectrales des pigments polymérisés, l'augmentation de leurs résistances à la décoloration causée par la présence de bisulfite ou par l'augmentation de pH a été observée. Une solution aqueuse d'anthocyanes montre une forte diminution de son absorbance à 520 nm lorsque le pH augmente de 1 à 5 [243], tandis que l'absorbance due à des pigments polymérisés est plus stable dans cette même gamme de pH. De plus, la couleur rouge des anthocyanes monomères est blanchie par l'ion hydrogénosulfite, tandis que les pigments polymérisés absorbent à 520 nm même en présence d'une concentration modérée d'hydrogénosulfite.

La formation et l'évolution des pigments polymérisés ont fait l'objet de nombreuses études [29]. Eglinton *et al.* [248] ont observé que les pigments polymérisés commencent leur

formation au début de la vie d'un vin : soit dès la fermentation alcoolique, et que les métabolites de levure solubles sont activement impliqués dans la réaction de condensation des anthocyanes avec des tanins comme présenté précédemment. Dans l'étude d'Alcalde-Eon *et al.* [141], une augmentation légère de la concentration des produits de condensation directe des flavanols avec les anthocyanes (F-A⁺) a été observée au cours de l'élevage en fût de chêne jusqu'à 14 mois suivie par une diminution. En revanche, des produits de condensation indirecte des flavanols et anthocyanes (F-pont éthylidène-A⁺) atteignent leurs concentrations maximales dans les premiers mois d'élevage en barrique et diminuent par la suite.

Toutefois, comme indiqué par Kennedy [137], le plus grand défi pour les scientifiques en œnologie est la caractérisation de la large gamme de poids moléculaire parfois très élevé des pigments présents dans le vin rouge [158]. De plus, en raison des nombreuses possibilités de compositions, de la grande diversité de liaisons possibles, et de leurs concentrations relativement faibles pour la plupart des espèces polymériques, les cinétiques de formation et d'évolution de ces familles de pigments dérivés des anthocyanes au cours de l'élevage et du vieillissement sont encore mal connues.

VII.6 L'évolution des tanins condensés

La diminution de l'astringence agressive des vins jeunes avec l'âge du vin est notée par les dégustateurs [28]. Ce phénomène est lié à la modification de concentration des composés phénoliques dans le vin et à la modification structurelle des tanins condensés du vin rouge. A l'écoulage, la concentration des composés phénoliques de raisin est maximale et diminue par la suite au cours de l'élevage et du vieillissement [242]. Néanmoins, McRae *et al.* [29] ont montré que l'astringence n'était pas forcément liée à l'âge ou à la concentration en tanins dans les vins Australiens. Leur observation indique que l'astringence plus faible et plus agréable des vins rouges plus âgés n'est pas directement liée à une plus faible concentration des tanins solubles du vin mais, potentiellement, est une conséquence de changements dans la structure tannique.

Des études concernant l'évolution des tanins au cours du vieillissement des vins rouges par dépolymérisation chimique (phloroglucinolyse) ont également été réalisées [7, 28, 29]. Les résultats de ces études sont cohérents entre eux et montrent une diminution de DP_m calculé par cette méthode au cours du vieillissement du vin rouge. Néanmoins, comme décrite dans la

section **VI.2** de ce chapitre, une diminution de DPm calculé par la phloroglucinolyse peut uniquement être liée à la diminution des tanins condensés de type B et non à une diminution de la taille réelle des chaînes polymériques de tanins.

Vu que la concentration en tanins n'a pas diminué avec l'âge du vin mais que la concentration des tanins condensés de type B diminue, la formation de nouvelles structures tanniques au cours de l'élevage et du vieillissement sont normalement attendues. Ces nouvelles structures dérivant probablement de la formation des tanins liés par pont éthylidène, du changement de taille et de conformation des tanins et de la formation des pigments polymérisés.

Premièrement, la quantification des tanins liés par pont éthylidène en utilisant le marqueur EDP dans trois séries de vins rouges de Bordeaux (millésimes entre 1981 et 2004) a été réalisée par Drinkine *et al.* [187]. Le résultat a montré qu'il n'y avait pas de corrélations statistiques entre l'âge du vin et la quantité de ponts éthylidènes incorporés dans les tanins condensés du vin.

Deuxièmement, une étude sensorielle antérieure en utilisant des tanins issus de pellicule de raisin et de pomme a montré que les tanins de plus grande taille génèrent une augmentation d'astringence. En effet, une différence significative a été observée entre un DPm de 10 et un DPm de 3 [249]. En 2012, McRae *et al.* [29] ont montré que les tanins d'un vin plus âgé sont généralement légèrement plus polymérisés que les tanins de vins plus jeunes. Dans cette étude la taille des tanins a été mesurée par chromatographie de perméation de gel sans indication de valeur précise concernant la variation de DPm. Ces résultats indiquent que la diminution de l'astringence au cours du vieillissement du vin rouge est plutôt liée aux évolutions des structures tanniques qu'aux tailles des tanins puisque la variation de taille des tanins entre un vin jeune et un vin vieux n'est pas significative.

Au cours de la vinification, de l'élevage et du vieillissement du vin rouge, l'oxydation des tanins du raisin change la forme de ces tanins passant de structures étendues et linéaires aux structures plus compactes et arrondies grâce à la formation des liaisons inter- et intramoléculaires [250]. Ces changements structurels peuvent restreindre le nombre de sites disponibles pour l'interaction avec les protéines salivaires et donc réduire l'astringence du vin. Par ailleurs, la formation des pigments polymérisés peut également intervenir sur la taille [120] et la conformation des tanins du vin rouge, qui influence par la suite l'astringence perçue.

L'impact sensoriel et la conformation spatiale d'une grande partie de ces pigments polymérisés sont encore aujourd'hui mal connus.

VIII. Conclusion

En conclusion pour ce chapitre d'étude bibliographique, les deux grands défis dans la recherche sur les composés polyphénoliques du vin rouge sont la caractérisation structurale des composés de hauts poids moléculaires, comprenant les tanins condensés et des pigments polymérisés et le développement des méthodes de quantification de ces composés afin de clarifier leurs impacts sur les propriétés organoleptiques des vins ainsi que leurs cinétiques de formation au cours de l'élevage et du vieillissement des vins rouges.

Aujourd'hui, le nombre des nouvelles structures polyphénoliques identifiées ne fait qu'augmenter [31, 167], et beaucoup d'autres structures polyphénoliques de type tanins condensés ou pigments polymérisés restent encore à découvrir. Parmi tous les outils d'identification, la spectrométrie de masse haute résolution prend de plus en plus d'importance grâce au développement des techniques de séparation UPLC, à sa précision et à sa facilité d'utilisation. Avec la spectrométrie de masse basse résolution, la fragmentation MS^n ($n > 2$) est exigée pour l'identification de certains composés alors que cette étape peut être simplifiée à MS^2 avec la HRMS. Cette technique est utilisée tout au long de cette thèse afin de clarifier les ambiguïtés concernant l'identification structurale des pigments polymérisés du vin rouge et d'identifier de nouvelles structures polymériques du vin rouge.

Jusqu'à ce jour, les méthodes de quantification de pigments polymérisés dans le vin rouge sont généralement basées sur leur précipitation avec de la gélatine, leur résistance à la décoloration par les ions hydrogénosulfite, et leur résistance au pH élevé [251], ou l'intégration d'un massif non défini en fin de chromatogramme d'élution par chromatographie en phase liquide à 520 nm [252-254]. Les techniques de séparation par l'extraction solide (Sephadex LH20)-liquide, l'extraction liquide-liquide et l'ultrafiltration membranaire centrifuge ont été développées [254]. Toutefois, ces méthodes ne sont pas adaptées à la quantification précise de chaque famille de pigments polymérisés. L'un des objectifs de cette thèse est de développer une méthode de quantification des pigments polymérisés de chaque famille grâce à une stratégie de dépolymérisation chimique en milieu acide.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

I. Les solvants, les réactifs et des vins

L'eau déionisée a été purifiée avec un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, États Unis). Le méthanol (grade analytique et HPLC), l'éthanol (grade HPLC), l'acide formique, l'acide acétique, l'acide hydrochlorique et l'acétaldéhyde ont été achetés chez Prolabo-VWR (Fontenay-sous-Bois, France). L'eau (Optimal® LC/MS), le méthanol (Optimal® LC/MS), l'acétonitrile (Optimal® LC/MS) et l'acide formique (Optimal® LC/MS) ont été achetés chez Fisher Scientific (Geel, Belgique) et utilisés pour les analyses en UPLC-UV couplé au spectromètre de masse haute résolution Q-TOF.

La (+)-catéchine (> 98 %), l'(-)-épicatéchine (> 98 %), l'(-)-épigallocatechine (> 98 %), la (-)-épicatéchine-3-O-gallate (> 99 %), la (+)-taxifoline (> 97 %), l'L-acide tartrique (> 99,5 %), l'hydroxide de sodium (> 98 %), le tetrahydroborate de sodium (> 96 %) et l'acétate de sodium (> 99 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'acide L-ascorbique a été acheté chez Prolabo-VWR (Fontenay-sous-Bois, France). L'œnin chlorure (> 97 %) et le phloroglucinol (> 98 %) ont été achetés auprès d'Extrasynthese (Z.I Lyon Nord, France).

Les trois séries de vins utilisées provenant de l'appellation Languedoc Montpeyroux de Languedoc-Roussillon, Saint-Émilion et Saint-Estèphe de Bordeaux ont été obtenus directement auprès du domaine (**Tableau 10**).

Tableau 10. Détails des vins utilisés pour l'analyse verticale.

Appellation	Cépage	Age (ans)	Millésime
Languedoc-Roussillon Languedoc Montpeyroux	Syrah (100 %).	3-23	2011 ; 2010 ; 2009 ; 2008 ; 2007 ; 2006 ; 2003 ; 2002 ; 2001 ; 2000 ; 1999 ; 1998 ; 1997 ; 1994 ; 1993 ; 1992 ; 1991.
Bordeaux-Rive Droite Saint-Émilion	Cabernet franc (35 %) ; Cabernet sauvignon (35 %) ; Merlot (30 %).	2-19	2012 ; 2008 ; 2005 ; 2003 ; 2001 ; 1998 ; 1996 ; 1995.
Bordeaux-Médoc Saint-Estèphe	Cabernet sauvignon (63 %) ; Merlot (23 %) ; Cabernet franc (10 %) ; Petit verdot (4 %).	9-19	2005 ; 2004 ; 2003 ; 2001 ; 1998 ; 1997 ; 1996 ; 1995.

II. Les systèmes U/HPLC couplés aux divers détecteurs (DAD, fluorescence ou MS)

II.1 Le système UPLC-DAD-ESI-Q-TOF

Le système UPLC-DAD-ESI-Q-TOF utilisé était un système de chromatographie liquide Agilent 1290 Infinity composé d'une pompe binaire (1290 Infinity), d'un compartiment à colonne à thermostat (1290 Infinity Thermostatted Column Compartment), d'un injecteur d'échantillon (1290 Infinity Autosampler) et d'un détecteur à barrette de diodes (1290 Infinity Diode-Array Detector) qui était couplé à un spectromètre de masse ESI-Q-TOF (Agilent 6530 Accurate Mass).

La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne Eclipse Plus C-18 (2,1 x 100 mm, 1,8 μ m, Agilent, France). Les solvants utilisés sur ce système étaient les suivants: de l'eau acidifiée avec de l'acide formique à 0,1 % pour solvant A et du méthanol acidifié avec de l'acide formique à 0,1 % pour solvant B avec un débit de 0,3 ml/min. Le gradient pour l'analyse du vin rouge et des fractions dépolymérisées après phloroglucinyse était le suivant: 6 % de solvant B pendant 0,5 min; de 6 % à 95 % de solvant B en 13,5 min; 95 % de solvant B pendant 4 min et la colonne d'UPLC a été équilibrée selon les conditions initiales pendant 3 min. La méthode utilisée pour l'analyse des oligomères de tanins condensés couronnes utilisait la même colonne Eclipse Plus C-18 avec un débit de 0,3 ml/min, et le gradient suivant : 4 % de solvant B pendant 10 min; de 4 à 95 % de solvant B en 4 min; 95 % de solvant B pendant 4 min et la colonne a été équilibrée aux conditions initiales pendant 3 min.

Les longueurs d'ondes UV-visibles de détection utilisées étaient 280, 460 et 520 nm. L'acquisition des spectres d'absorption d'UV des tanins condensés couronnes a été réalisée en balayage d'une gamme de longueur d'onde de 190 nm à 600 nm. La résolution des longueurs d'onde utilisée était 2 nm.

Les conditions du spectromètre de masse ESI-Q-TOF étaient les suivantes : pour l'ionisateur en mode positif la température et le débit de gaz était de 300 °C et de 9 L/min respectivement; la température et le débit de gaz de gainage étaient de 350 °C et de 11 L/min respectivement et la tension capillaire était de 4000 V. Le fragmenteur a toujours été fixé à 200 V pour les méthodes de quantification, et l'énergie de collision utilisée pour les analyses en MS² variait

de 5 à 60 % selon les composés. Les données obtenues ont été traitées par le logiciel MassHunter Qualitative Analysis pour l'identification des composés.

Une optimisation du fragmenteur a été réalisée pour trouver l'intensité optimum qui était le bon compromis pour la détection des monomères jusqu'aux pentamères. Comme illustré ci-dessous par la **Figure 31**, l'intensité de fragmenteur optimal augmente avec la taille du composé. A 150 V, la réponse pour les monomères arrive à sa maximale alors que pour des pentamères, il faut une intensité de 400 V. Puisque les marqueurs de quantification des pigments polymérisés ont souvent une taille de dimension dimérique, le fragmenteur a toujours été fixé à 200 V qui est l'intensité optimale pour les dimères et trimères. En revanche, durant l'identification des pentamères de type B, une intensité de fragmenteur à 250 V a été utilisée.

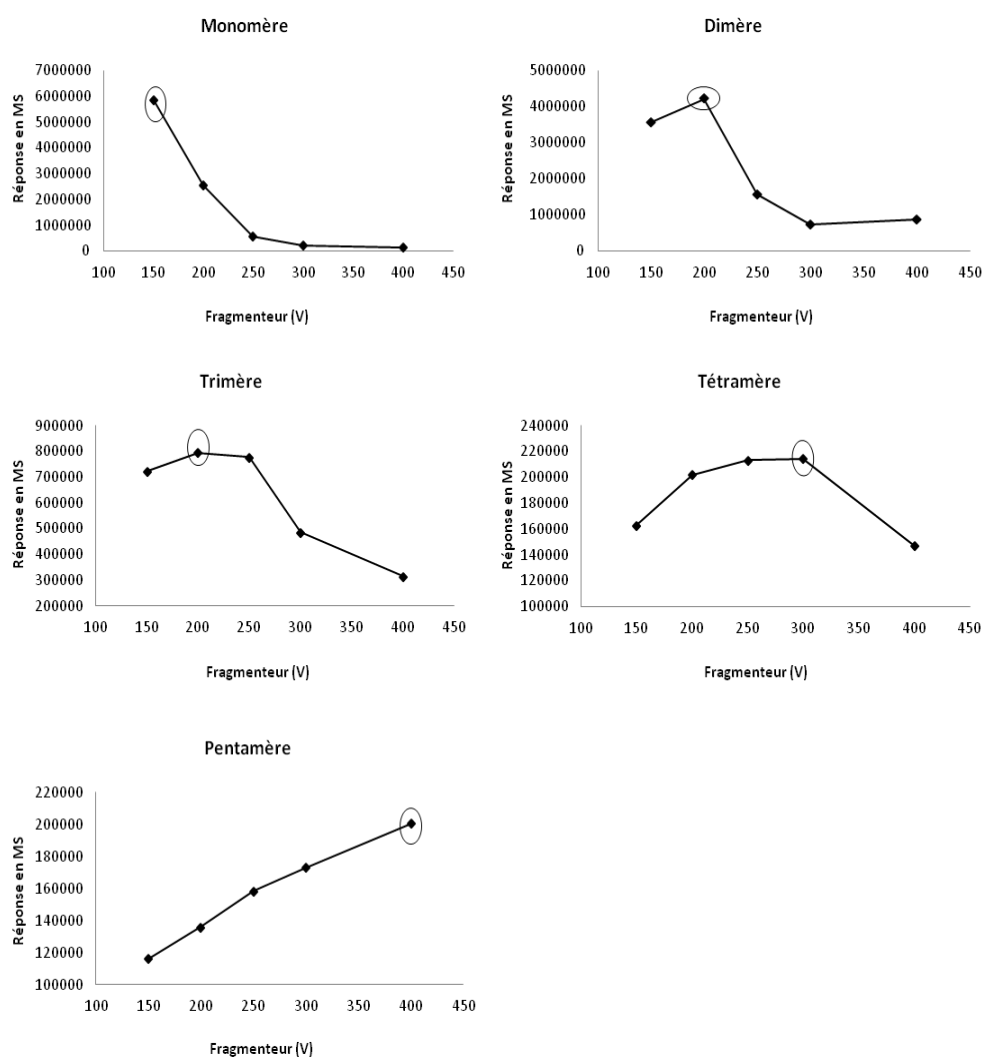


Figure 31. Les réponses en MS des monomères jusqu'aux pentamères en fonction de l'intensité du fragmenteur de Q-TOF.

Les méthodes de quantification des pigments polymérisés et les tanins condensés de type B, de type A et de type couronne ont été établies sur ce système en utilisant les séparations chromatiques par la colonne Eclipse Plus C-18 et le détecteur MS Q-TOF. Le volume d'injection pour toutes les courbes de calibration et pour tous les échantillons était fixé à 1 µl. Afin de contrôler la sensibilité de l'analyse, une solution aqueuse contenant 80 mg/L de (+)-catéchine a été injectée tous les quinze échantillons. Les résultats de quantifications ont été traités à l'aide du logiciel MassHunter Quantitative Analysis.

Les concentrations des tanins condensés sont exprimées en équivalent de (+)-catéchine (mg/L) à l'aide de la courbe de calibration linéaire de la (+)-catéchine (0,156 – 80,000 mg/L). Deux répétitions ont été effectuées pour établir cette courbe de calibration. La concentration est représentée par 'x' et la réponse de masse est représentée par 'y', la courbe de calibration linéaire de la (+)-catéchine obtenue est la suivante :

$$y = 101894,93 * x + 250513,94$$
$$R^2 = 0,975$$

Le tétramère couronne pur a été utilisé pour sa quantification. La concentration est représentée par 'x' et la réponse de masse est représentée par 'y', la courbe de calibration linéaire obtenue est la suivante :

$$y = 1826,18 * x - 683,65$$
$$R^2 = 0,997$$

Les concentrations des pigments monomériques et polymérisés sont exprimées en équivalent de malvidine-3-O-glucoside (mg/L). A cause des concentrations variées des pigments, deux courbes de calibration de l'œnin chlorure ont été établies pour deux zones de concentrations. Pour la zone de basses concentrations entre 0,013 et 3,125 mg/L, la courbe de calibration linéaire est la suivante :

$$y = 3031846,39 * x - 147627,73$$
$$R^2 = 0,994$$

Pour la zone de hautes concentrations entre 3,125 et 100,000 mg/L, la courbe de calibration linéaire est la suivante :

$$y = 2541786,28 * x + 10912819,04$$
$$R^2 = 0,987$$

II.2 Le système UPLC-DAD-Fluorescence-ESI-Quadripôle

Le système Thermo Scientific Accela UPLC-DAD-fluorescence-ESI-MS (Quadripôle) était composé d'une pompe quaternaire (Accela 600 Pump, 920175), d'un compartiment à colonne avec l'injecteur d'échantillon (Accela Autosampler, 750466) et d'un détecteur à barrette de diodes (PDA Detector, 930079) qui était couplé soit à un spectromètre de masse ESI-Quadripôle (Accela MSQ Plus, MSQ 20808) soit à un détecteur fluorescence de haute-sensibilité de Thermo Scientific (Dionex UltiMate 3000 FLD-3000). Ces différents modules étaient contrôlés par le logiciel Xcalibur et le logiciel Chromeleon. Ce système a été utilisé pour quantifier les ponts éthylidènes.

La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne Xterra RP18 (4,6 x 100 mm, 3,5 µm, Waters, France). Les solvants utilisés étaient les suivants: de l'eau acidifiée avec de l'acide acétique à 1 % pour solvant A et du méthanol pour solvant B avec un débit de 1 ml/min. Le gradient pour l'analyse des ponts éthylidènes était le suivant: 5 % de solvant B pendant 25 min; de 5 % à 20 % de solvant B en 20 min; de 20 % à 24 % de solvant B en 24 min; de 24 % à 32 % de solvant B en 1 min; de 32 % à 100 % de solvant B en 2 min 90 % de solvant B pendant 5 min et la colonne a été équilibrée aux conditions initiales pendant 10 min avant chaque injection.

La longueur d'onde UV de détection utilisée était 280 nm sur ce système. L'acquisition du spectre d'absorption d'UV d'EDP a été réalisée en balayage d'une gamme de longueurs d'ondes de 200 nm à 600 nm.

Le détecteur fluorescence de haute-sensibilité était un Dionex UltiMate 3000 FLD-3000 de Thermo Scientific contrôlé par le logiciel Chromeleon. En premier lieu, les paramètres de balayage en 3D ont été fixés comme les suivants: la longueur d'onde d'excitation à 240 nm et les longueurs d'ondes d'émission de 260 à 650 nm. 315 nm s'étant avéré être la longueur

d'onde d'émission optimale, par conséquent, la quantification par fluorescence a été effectuée en mode 2D avec 240 nm comme longueur d'onde d'excitation et 315 nm comme longueur d'onde d'émission.

Un spectromètre de masse MSQ Plus a été utilisé pour identifier et assigner les composés. Ces analyses ont été effectuées en mode négatif avec une température de source de 450 °C, une tension de capillaire de 4 kV et une tension de cône de 60 V.

II.3 Le système HPLC (semi-préparative)-DAD

L'HPLC semi-préparative a été effectuée sur un système Agilent comprenant une pompe quaternaire (1260 Infinity), un compartiment à colonne thermostaté (1290 Infinity), un injecteur d'échantillon (1260 Standard Autosampler) et un détecteur à barrette de diodes (1260 DAD VL+), le système était contrôlé par le logiciel LC Open Lab. Un second injecteur manuel externe de 500 µl a été ajouté au système. La colonne semi-préparative était une colonne ProntoSil (250 x 8 mm, 5 µm, Metrohm, France). Les solvants utilisés pour la purification des tanins condensés couronnes étaient les suivants: de l'eau acidifiée avec de la TFA à 0,025 % pour solvant A et du méthanol acidifié avec de la TFA à 0,025 % pour solvant B. Le débit était 2,5 ml/min et la longueur d'onde de détection était de 280 nm. Le gradient utilisé était le suivant: 0 % de B pendant 5 min, de 0 à 4 % de B en 30 min, de 4 à 96 % de B en 2 min, 96 % de B pendant 5 min. La colonne a été re-équilibrée aux conditions initiales pendant 5 min après chaque injection. Le volume d'injection était contrôlé entre 200-300 µl.

III. Les synthèses et les héli-synthèses des composés

III.1 Le 2,2'-éthylidènediphloroglucinol (EDP)

Le protocole a été adapté de celui de Drinkine *et al.* [178]. 500 mg de phloroglucinol ont été dissous dans 10 ml de méthanol acidifié à 0,1 N HCl, et 75 µl d'acétaldéhyde ont été ajoutés au goutte à goutte. Après 2 heures à température ambiante, 50 ml de d'acétate de sodium aqueux (40 mM) ont été ajoutés pour arrêter la réaction. L'EDP synthétisé a été purifié sur une cartouche de C18 (10 g) qui a été préalablement conditionnée avec du méthanol et lavée avec de l'eau. Après que l'échantillon (10 ml) soit déposé, la séquence d'élution était la suivante : 75 ml de méthanol/eau (20:80, v/v), 50 ml de méthanol/eau (40:60, v/v) et 50 ml de méthanol. Les solvants d'élution ont été acidifiés avec de l'acide formique à 0,05 %. La fraction éluée avec 40 % de méthanol contenant l'EDP a été évaporée à 25 °C après addition de 50 ml d'eau jusqu'à environ 10 ml ce qui correspond à l'évaporation complète du méthanol sans que la fraction soit évaporée à sec. Cette fraction a été congelée et lyophilisée pour donner une poudre blanche. La pureté de ce produit a été déterminée à 60 % sur le système UPLC-DAD-Fluorescence-ESI-Quadripôle par l'absorption UV à 280 nm.

La synthèse du 2,2'-méthylidènediphloroglucinol a été également effectuée en utilisant le même mode opératoire mais en remplaçant l'acétaldéhyde par le formaldéhyde.

III.2 Les adduits de type A-F(type A)

La synthèse des adduits de type A-F(type A) a été réalisée avec un protocole adapté de Rémy *et al.* [217]. L'incubation d'une solution éthanolique de 4 ml contenant 2 mg d'œnin chlorure et 1,3 mg de (+)-catéchine ou d'(-)-épicatéchine à 40 °C pendant 2 semaines a été réalisée. La formation des adduits a été suivie en utilisant le système UPLC-DAD-ESI-Q-TOF.

III.3 Les adduits de type F-A⁺

La synthèse des adduits de type F-A⁺ a été réalisée avec un protocole adapté de Salas *et al.* [157]. Le mécanisme de synthèse est montré par la **Figure 32**. Le ratio des produits utilisés était malvidine-3-*O*-glucoside : taxifoline : NaBH₄ (3 :1 :2).

2,8 mg d'œnin chloride ont été dissous dans une solution aqueuse à pH 5 et équilibrés pendant une nuit à 4 °C pour assurer un bon équilibre entre les anthocyanes sous forme flavylum et les anthocyanes sous forme hydratée, puis lyophilisés. La malvidine-3-*O*-glucoside sous forme hydratée ainsi obtenue a été dissoute dans 2 ml d'éthanol, puis 2,4 mg de taxifoline et 3,63 mg de NaBH₄ ont été séparément dissous dans 15 ml et 18,75 ml d'éthanol respectivement.

1 ml de la solution de malvidine-3-*O*-glucoside et 3 ml de la solution de taxifoline ont été mélangés. A ce mélange, 625 µl de la solution NaBH₄ ont été ajoutés au goutte à goutte sous azote et avec agitation [255]. Ce mélange a été laissé à température ambiante pendant 10 minutes, puis de nouveau, 1 ml de la solution de malvidine-3-*O*-glucoside a été rajouté dans le milieu de réaction. Finalement, 1,3 ml d'acide acétique ont été ajoutés pour obtenir un pH à 3,5 afin de générer du carbocation à partir du flavan-3,4-diol sous condition acide pour conduire à la formation du dimère F-A⁺. Le mélange a été laissé à température ambiante pendant une heure sous azote, et la formation des adduits a été suivie jusqu'à 6 heures par UPLC-DAD-ESI-Q-TOF.

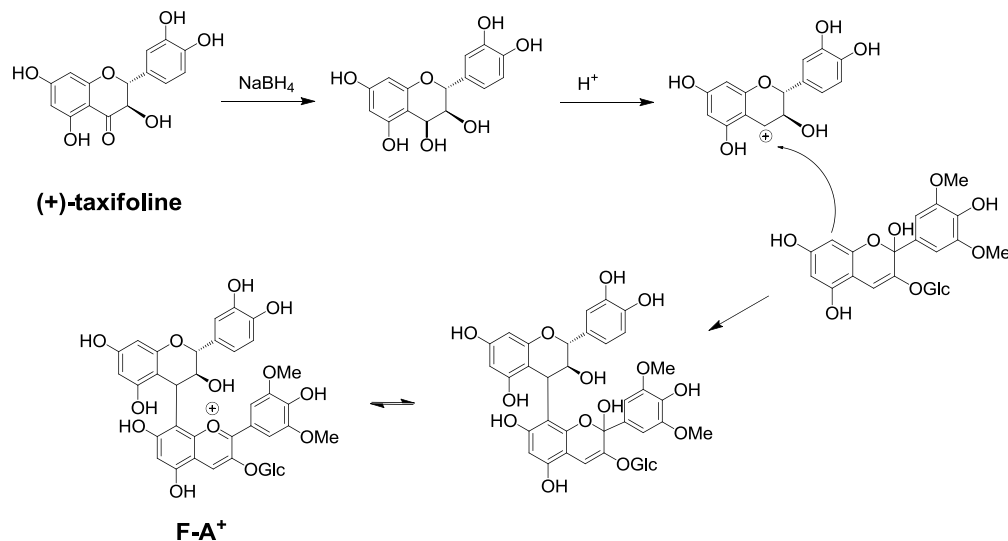


Figure 32. Démonstration de la synthèse des adduits F-A⁺.

III.4 Les tanins condensés couronnes

Des hémi-synthèses qualitatives des tanins condensés couronnes ont été réalisées dans trois milieux différents. Le premier milieu était la solution modèle de vin soit une solution hydro-alcoolique avec 12 % d'éthanol et une concentration de 5 g/L d'acide L-tartrique ayant le pH ajusté à 3,5 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium. Les deux autres milieux sont des solutions aqueuses avec 5 g/L d'acide L-tartrique à pH 2,6 et avec 0.1 M HCl à pH 1,0 respectivement.

Les trois fractions de tanins utilisées proviennent du pépin et de la pellicule des raisins du millésime 2010. Des extractions et des fractionnements ont été préalablement effectués afin d'obtenir des fractions qui contiennent uniquement des tanins de type B. Le protocole d'extraction et de fractionnement est décrit ci-dessous :

Les pépins et les pellicules sont séparés manuellement des raisins, puis lyophilisés pendant 2 jours. Une fois déshydratés, les pépins et les pellicules ont été broyés à l'aide d'un mortier. Les solvants organiques tels que l'éthanol, le méthanol ou encore l'acétone en combinaison avec de l'eau ont été utilisés pour extraire les composés phénoliques : une portion de 6 g de la poudre obtenue a été extraite en utilisant 55 ml d'acétone/eau (70:30, v/v) pendant 4 h et 55 ml de méthanol/eau (60:40, v/v) pendant 2,5 h. Après centrifugation, le surnageant a été évaporé pour éliminer les solvants organiques, le résidu a été dissous dans de l'eau puis lyophilisé afin d'obtenir un extrait brut de tanins de pépins et de pellicule.

Le fractionnement a été effectué par deux extractions liquide-liquide consécutives. La première extraction a été effectuée avec du chloroforme afin d'éliminer les lipides, les chlorophylles et autres composés indésirables. L'extrait a été solubilisé dans 250 ml d'eau/éthanol (95:5, v/v) et extrait trois fois avec du chloroforme (250 ml). La phase aqueuse ainsi obtenue a été soumise à une seconde extraction effectuée avec trois fois 250 ml d'acétate d'éthyle (phase organique) afin de séparer les monomères et les oligomères regroupés dans la phase organique et les polymères qui, eux, restent dans la phase aqueuse [4]. Ensuite, les deux fractions ont été évaporées sous pression réduite, dissoutes dans l'eau, congelées et lyophilisées pour donner une poudre brun clair.

Les fractions de tanins oligomériques et polymériques obtenues à partir de pépin de raisin et la fraction polymérique obtenue à partir de pellicule ont été séparément dissoutes à une concentration de 1 g/L dans les trois milieux avec différents pH décrits ci-dessus. L'évolution de chaque milieu a été suivie en utilisant le système UPLC-ESI-Q-TOF pendant 10 semaines.

IV. Le fractionnement des composés phénoliques du vin rouge en phase solide et la purification des tanins couronnes

IV.1 Généralités

L'extraction en phase solide (solid-phase extraction, ou SPE) est un procédé d'extraction au cours duquel des composés en solution ou en suspension dans une phase liquide sont séparés des autres éléments du mélange par absorption sélective sur une phase solide en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Plusieurs adsorbants sont disponibles pour le fractionnement du vin rouge, comme C18, TSK, XAD, LH-20 ou PVPP, etc. Durant cette étude, les adsorbants C18 et TSK ont été utilisés.

IV.2 Le fractionnement des vins rouges par l'extraction en phase solide C18

La cartouche C18 (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France) est remplie du même type de gel que la colonne UPLC soit un gel C18 phase inverse. C'est-à-dire que la cartouche C18 et les colonnes UPLC C18 partagent le même principe de séparation mais bien évidemment, pas la même sensibilité qui dépend de la taille des billes, de la longueur, de la pression, de la température et du gradient d'élution. L'avantage de la cartouche C18 est sa capacité de séparation d'une quantité d'échantillon relativement élevée. Jusqu'à 15 ml de vin rouge peuvent être déposés sur une cartouche pour un fractionnement grossier. Cela permet d'obtenir rapidement une fraction enrichie en composé cible. Durant cette étude, cette technique a été utilisée comme une première étape de fractionnement du vin rouge pour obtenir une fraction enrichie des tanins condensés couronnes ou des pigments. Des éluions successives en utilisant des solutions aqueuses contenant différents pourcentages de méthanol ont été effectuées afin d'obtenir des fractions enrichies des composés d'intérêt. Les fractionnements sont listés dans le **Tableau 11**.

Tableau 11. Les fractionnements du vin rouge sur cartouche C18.

Chapitre	Section	Fractionnement	Application
Chapitre 2	IV.4	5 % méthanol (150 ml)*; 100 % méthanol (100 ml).	La purification des tanins condensés couronnes.
Chapitre 2	V.2	100 % méthanol (50 ml)*.	L'obtention d'une fraction polyphénolique du vin rouge.
Chapitre 4	II.6	35 % méthanol (100 ml); 55 % méthanol (50 ml)*; 100 % méthanol (50 ml).	L'enrichissement d'une fraction contenant les pigments A-pont éthylidène-A ⁺ ainsi que leurs dérivés acylés.
Chapitre 4	II.8.2	35 % méthanol (100 ml); 55 % méthanol (50 ml)*; 100 % méthanol (50 ml).	L'enrichissement d'une fraction contenant les pigments pyranoanthocyane-F-F ainsi que leurs dérivés acylés.

* : La fraction contenant les composés d'intérêt.

IV.3 Le fractionnement des vins rouges par l'extraction en phase solide TSK-40S

Le gel TSK est utilisé à l'origine pour la séparation des protéines en se basant sur le principe de chromatographie d'exclusion stérique. C'est-à-dire que les composés de grande taille sortent avant les composés de petite taille en raison de leur parcours plus court à l'intérieur du gel. Cependant, dans le cas des tanins, les polymères sont mieux retenus que les oligomères et les monomères ce qui est à l'opposé du principe de chromatographie d'exclusion stérique. Il a été montré que la séparation des composés flavonoïdes sur ce type de gel est basée sur leurs affinités avec le gel qui augmentent avec leurs tailles [256, 257]. Par conséquent, le degré de polymérisation plus élevé signifie plus d'affinité avec le gel et donc, plus de difficultés pour les éluer [255].

Le fractionnement d'un vin rouge a été effectué sur une colonne de 30 cm remplie de gel TSK-40S (d : 1 cm, h : 30 cm) (Tosoh, Tokyo, Japon) et le solvant d'élution utilisé était le méthanol. Des fractions sont collectées toutes les heures, évaporées, re-dissoutes dans 800 µl méthanol et analysées par le système UPLC-DAD-Q-TOF. Comme montré sur la **Figure 33**, des fractions avec différentes teintes et différentes intensités de couleurs ont été obtenues. Le premier vial à gauche est la fraction de deuxième heure qui a une couleur orange fluo contenant principalement des pyranoanthocyanes monomériques. L'ordre de sortie des différentes familles des composés phénoliques sur ce type de gel a été ainsi établi : pyranoanthocyane > anthocyane > flavanol > tanins condensés (du plus petit au plus grand)

(Tableau 12). Même si la vitisine A et la malvidine-3-*O*-glucoside sont toutes les deux sorties pendant la deuxième heure, les dérivés de pyranoanthocyane ont moins d'affinité que les dérivés d'anthocyane avec ce type de gel. Par ailleurs, bien que la séparation des tanins condensés soit cohérente avec les études précédentes, les pentamères ont moins d'affinité avec ce type de gel que les tétramères.

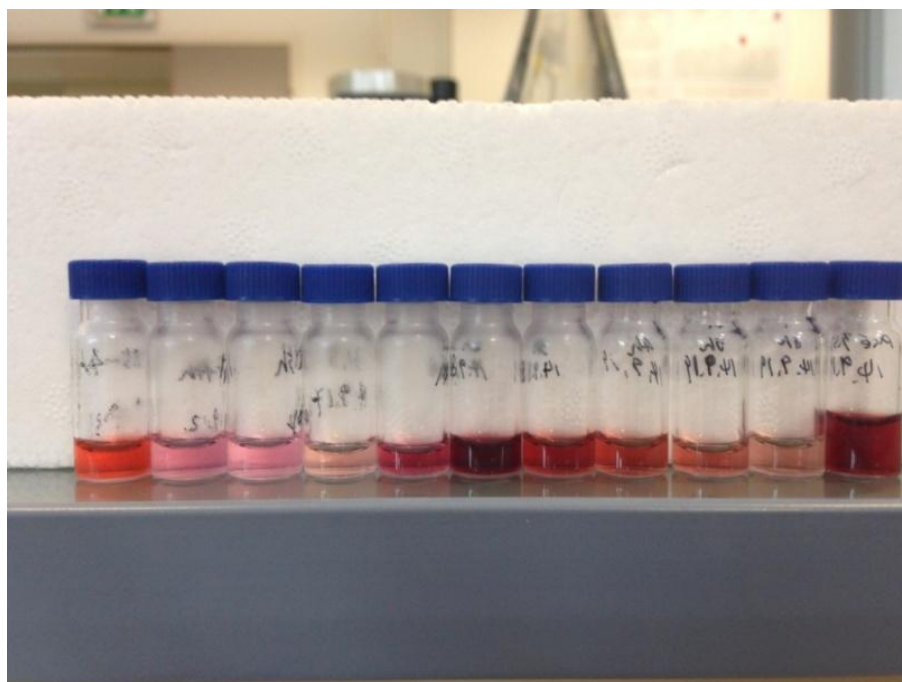


Figure 33. Les différentes fractions de pigments obtenues après le fractionnement de TSK-40S.

Tableau 12. L'ordre d'élution des pyranoanthocyanes, des anthocyanes et des tanins condensés du vin rouge.

Fr.	Pyranoanthocyane			Anthocyane			Tanins condensés				
	Vitisine A	Pyrano-F	Pyrano-F-F	Mv-3-O-glc	A-F	A-F-F	Dp1	Dp2	Dp3	Dp4	Dp5
1											
2	▲	▲		▲			▲				
3			▲		▲		▲	▲			
4						▲		▲			
5								▲	▲		
6									▲		
12											▲
13										▲	
14										▲	
15										▲	

Avec ce fractionnement, la matrice du vin rouge originellement très complexe est simplifiée. Cette technique a été utilisée tout au long de cette thèse, d'un côté pour fournir les informations supplémentaires afin de distinguer les différentes familles de composés phénoliques, surtout les différentes familles de pigments polymérisés du vin rouge, et de l'autre, pour purifier les tanins condensés couronnes avant l'étape d'HPLC-semi-préparative. Les applications sont listées dans le **Tableau 13**.

Tableau 13. L'application du fractionnement du vin rouge sur TSK-40S.

Chapitre	Section	Application
Chapitre 2	IV.4	La purification des tanins condensés couronnes.
Chapitre 3	III	L'identification des tanins condensés dimères de type A.
Chapitre 4	I.2	L'identification des pyranoanthocyanes de faibles concentrations.
Chapitre 4	II.8.1	La distinction des deux adduits sodium (+Na ⁺) des isomères d'adduit anthocyane-flavan-3-ol de type A et deux isomères de pyranoanthocyane-F.
Chapitre 4	II.8.2	La distinction des deux adduits sodium (+Na ⁺) des isomères d'adduit anthocyane-F-F de type A et deux isomères de pyranoanthocyane-F-F.

IV.4 La purification des tanins condensés couronnes depuis du vin rouge

15 ml de vin ont été évaporés à sec et dissous dans 15 ml d'eau acidifiée à 0,1 % d'acide formique. Une colonne C-18 (d : 3 cm, h : 4.5 cm) (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France) a été activée avec 50 ml de méthanol et lavée avec 100 ml d'eau pour éliminer le méthanol. 15 ml d'échantillon dissous dans de l'eau ont été déposés sur la colonne. Les éluions successives étaient les suivantes: 150 ml du mélange méthanol/eau (5/95, v/v) pour récupérer le tétramère et les deux pentamères couronnes, suivie de 100 ml de méthanol pour laver la colonne et 100 ml d'eau pour rééquilibrer la colonne. Tous les solvants utilisés étaient acidifiés à 0,1 % d'acide formique. La fraction contenant le tétramère et les deux pentamères couronnes a été évaporée à sec, et re-solubilisée dans du méthanol.

Cette solution a été centrifugée pendant 3 minutes à 4500 tr/min et le précipité a été re-solubilisé dans du méthanol et centrifugé une autre fois dans les mêmes conditions. Le surnageant contenant le tétramère et les deux pentamères a été à nouveau évaporé et re-solubilisé dans 1 ml d'eau acidifiée à 0,1 % d'acide formique.

Cette solution a été ensuite déposée sur une colonne remplie de gel Toyopearl TSK HW40S (d : 1 cm, h : 37,5 cm) (Tosoh, Tokyo, Japon) et éluee avec du méthanol à un débit de 0,8 ml/min. La fraction éluee entre 15 h et 16,5 h contenait principalement les deux pentamères couronnes et la fraction éluee entre 16,5 h et 22 h contenait principalement le tétramère couronne. Les deux fractions ont été évaporées séparément et re-solubilisées dans 300 µl d'eau acidifiée à 0,1 % d'acide formique pour être purifiées par HPLC-semi-préparative (**Chapitre 2 II.2**).

Les fractions de semi-préparative ont été évaporées à sec, re-solubilisées dans l'eau, congelées et lyophilisées pour conduire à l'obtention d'une poudre blanche.

V. La dépolymérisation par la phloroglucinolyse

V.1 La solution réactionnelle

Réactif de phloroglucinolyse : 50 g/L phloroglucinol, 10 g/L acide ascorbique en solution dans du méthanol acidifié à 0,1 M HCl.

Solution d'acétate de sodium : 40 mM d'acétate de sodium dans de l'eau distillée.

V.2 Le fractionnement du vin rouge

Afin de récupérer une fraction polyphénolique des vins rouges et de concentrer les échantillons, un fractionnement du vin rouge sur une cartouche C-18 (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France) a été effectué avant la phloroglucinolyse. 2,5 ml de vin ont été concentrés sous pression réduite jusqu'à sec afin de retirer l'éthanol. 10 ml d'eau distillée ont été ensuite ajoutés. Une étape de fractionnement sur une cartouche C-18 a été ensuite réalisée. Après l'activation de cartouche avec du méthanol (50 ml) et le conditionnement de cartouche avec de l'eau distillée (50 ml), 10 ml d'échantillon ont été déposés en tête de la colonne. Après un lavage à l'eau (50 ml), l'élution a été réalisée avec 50 ml de méthanol pour obtenir une fraction polyphénolique. La fraction éluée par le méthanol a été évaporée à sec sous pression réduite puis reprise dans 1 ml de méthanol. L'échantillon est ainsi concentré 2,5 fois par rapport au vin de départ. Cette fraction polyphénolique a été conservée à 4 °C. Cette préparation de vin rouge a été utilisée pour l'analyse des pigments polymérisés et la quantification d'EDP par fluorescence.

V.3 La réaction de phloroglucinolyse

V.3.1 La dépolymérisation des pigments polymérisés

Pour le témoin, 200 µl de la fraction polyphénolique du vin rouge (**Chapitre 2 V.2**) ont été placés dans un vial de 2 ml auxquels 200 µl de méthanol acidifiés à 2 % d'acide formique ont été ajoutés conduisant à une fraction polyphénolique acidifiée à 1 % d'acide formique qui avait un pH proche de 1. A ce pH, 95 % des anthocyanes se présentent sous la forme flavylum.

Pour la dépolymérisation, 200 µl de la fraction polyphénolique du vin rouge (**Chapitre 2 V.2**) ont été placés dans un vial de 2 ml auxquels 200 µl du réactif de phloroglucinolyse ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été chauffé à 50 °C pendant 20 min et a été analysé aussitôt par UPLC-DAD-ESI-Q-TOF. Une fois injecté, 1 ml de solution aqueuse d'acétate de sodium a été ajouté pour arrêter la réaction et le vial a été conservé à 4 °C.

V.3.2 La quantification des tanins condensés liés par pont éthyldène

200 µl de la fraction polyphénolique du vin rouge (**Chapitre 2 V.2**) ont été placés dans un vial de 2 ml auxquels 200 µl du réactif de phloroglucinolyse ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été chauffé à 50 °C pendant 20 min. 1 ml de solution aqueuse d'acétate de sodium a été ajouté pour arrêter la réaction. Cette solution a été analysée par UPLC-DAD-Fluorescence-ESI-Quadripôle.

V.3.3 La dépolymérisation du tétramère et des pentamères couronnes

Trois fractions distinctes contenant le tétramère et les deux pentamères purs issues de HPLC-semi-préparative ont été dissoutes dans 200 µl de méthanol et analysées par UPLC-DAD-ESI-Q-TOF. Ensuite, 200 µl du réactif de phloroglucinolyse ont été ajoutés, chauffés à 50°C pendant 20 min et analysés par UPLC-DAD-ESI-Q-TOF. 1 ml de solution aqueuse d'acétate de sodium a été ajouté pour arrêter la réaction. Cette fraction a été également analysée par le système UPLC-DAD-ESI-Q-TOF. Les produits dérivés de phloroglucinolyse ont été identifiés et assignés par MS/MS.

VI. La caractérisation du tétramère couronne

VI.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La structure du tétramère couronne pur a été caractérisée par 1D RMN (^1H , ^{13}C), et 2D RMN (COSY, HSQC, HMBC et ROESY) dans du méthanol-*d*₄. Les spectres ont été enregistrés sur un AC 600 MHz Avance III Bruker spectromètre (Wissembourg, France). Les déplacements chimiques sont exprimés en δ (ppm) relatifs au solvant utilisé comme référence interne (MeOH-*d*₄ : δ 3,31 ppm pour la RMN ^1H et δ 49,0 ppm pour la RMN ^{13}C). Les constantes de couplages (J) sont exprimées en Hz.

VI.2 La modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire a été menée sur un poste de travail Silicon Graphics O2 en utilisant le logiciel de simulation moléculaire incorporé (Accelrys, San Diego, USA). Le recuit simulé et la minimisation de l'énergie ont été réalisés avec Discover et NMR-Refine en utilisant le modèle de champs de force avec la valence cohérente (Consistent-valence force field : CVFF). Les distances inter-proton ont été obtenues à partir d'expériences ROESY. La détermination quantitative des intensités des tâches de corrélation a été calculée avec Sparky. Les contraintes de distance NOE ont été estimées en utilisant une relation du modèle Braun [258]. Le protocole de calcul de simulation de recuit implique 14 étapes comme décrit dans un précédent travail réalisé par Richard *et al.* [259]. La contrainte de distance a été maintenue à 30 Kcal/mol/Å².

VI.3 La mesure du pouvoir rotatoire

La rotation optique est l'angle par lequel le plan de la polarisation est tourné quand la lumière polarisée traverse un échantillon. La valeur de rotation optique obtenue est une valeur corrigée pour tenir compte de la température obtenue après la soustraction de la valeur blanche.

$$\alpha^{20} = \frac{\alpha^t}{1 + k(t - 20)}$$

Le pouvoir rotatoire du tétramère couronne a été enregistré sur un polarimètre Jasco P-2000. Le solvant utilisé était de l'eau pure. La source lumineuse était lampe à vapeur de sodium. La longueur d'onde est placée à 589 nm pour ce modèle Jasco P-2000. Le temps d'intégration (D.I.T) était de 10 secondes. La concentration de l'échantillon utilisée était de 2 mmol/L dans l'eau pure. Le logiciel utilisé était Spectra Manager.

VI.4 L'évaluation des activités neuroprotectrices du tétramère couronne

L'inhibition de l'agrégation du peptide β -amyloïde (β A) est l'une des voies possibles permettant de prévenir la maladie d'Alzheimer, puisqu'elle est à l'origine des dépôts fibrillaires responsables de la neurodégénérescence liée à la maladie d'Alzheimer. Les propriétés inhibitrices du tétramère couronne sur l'agrégation du peptide β -amyloïde ont été estimées suivant la méthode déjà utilisée sur les composés phénoliques de la vigne notamment les stilbènes [55].

Les cellules PC12, établies à partir d'un phéochromocytome de rat, ont été obtenues auprès d'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Les cellules PC12 ont été maintenues dans du DMEM-Glutamax supplémenté avec 100 IU/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine, 15 % de sérum de cheval inactivé par la chaleur, et 2,5 % de sérum bovin fœtal à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5 % de CO₂.

Les cellules ont été sous-cultivées dans des plaques de culture à 96 puits (30 \times 10³ cellules / puits) pendant 24 h et ensuite traitées avec du β A (25-35) en l'absence ou en présence de différentes concentrations de tétramère (5, 10, 20 et 30 μ M) dans un milieu de culture sans sérum. La concentration finale du β A était 4 μ M.

Après 24 h d'incubation, la viabilité des cellules a été déterminée par l'essai de la réduction du MTT. Les cellules PC12 ont été incubées dans 0,5 mg/ml de MTT dans le DMEM-Glutamax à 37 °C pendant 3 h. Les cristaux sombres de formazan bleu formés dans des cellules intactes ont été solubilisés avec du DMSO pendant 0,5 h. L'absorbance a été mesurée à 595 nm avec un lecteur de microplaques (Dynex, USA). Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du MTT par rapport à l'absorbance des cellules de contrôle à 100 %. Toutes les données représentent la moyenne de trois essais. L'expérimentation a été répétée trois fois.

VII. La spectrophotométrie et la colorimétrie

VII.1 La spectrophotométrie

Le spectrophotomètre utilisé est un Jasco V630 à double faisceau, possédant une lampe deutérium pour les longueurs d'onde comprises entre 190 et 350 nm, ainsi qu'une lampe halogène dont la gamme de longueurs d'onde varie de 330 à 1100 nm. Le logiciel utilisé était Spectra Manager (v. 2.09.01). Cet appareil a été utilisé pour la mesure des indices ci-dessous à partir de la série de 17 vins rouges de Languedoc Montpeyroux.

VII.1.1 L'indice de polyphénol totaux (IPT) ou I280

Le vin rouge est dilué 100 fois et la densité optique mesurée à 280 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique dans une cuve perméable aux UV (quartz). Le résultat est exprimé par un indice $I = DO \times dilution$. Pour chaque échantillon, la mesure a été effectuée trois fois, la moyenne et l'écart-type sont ainsi calculés.

VII.1.2 Les caractéristiques chromatiques du vin rouge

Les spectres des vins rouges présentent un maximum d'absorption à 520 nm (caractéristique de la couleur rouge) et un minimum vers 420 nm (caractéristique de la couleur jaune), et une absorption non négligeable mais faible à 620 nm (caractéristique du mauve). Pour caractériser la couleur du vin, il a été défini des coefficients faisant intervenir les densités optiques à ces trois longueurs d'onde. La densité optique à 420, 520 et 620 nm du vin rouge sous 1 mm de parcours optique a été mesurée par rapport à l'eau distillée. Différents calculs permettent l'obtention d'indices chromatiques, à savoir l'intensité colorante (IC) et la teinte (T).

L'intensité colorante représente l'importance de la couleur. Elle est déterminée par la formule suivante [143] :

$$IC = 10 \times (d_{420} + d_{520} + d_{620})$$

La teinte correspond à la proportion de couleur jaune par rapport à la couleur rouge. Une augmentation de teinte indique une évolution vers l'orange pour un vin rouge. Elle est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$T = d_{420} / d_{520}$$

Pour chaque longueur, la mesure pour un échantillon a été effectuée trois fois, la moyenne et l'écart-type sont ainsi calculés.

VII.2 La colorimétrie par la méthode de CIE

Les espaces couleurs sont des méthodes qui permettent d'exprimer la couleur d'un objet ou d'une source lumineuse au moyen d'une notation spécifique, telle que des chiffres. Les deux méthodes les plus connues sont l'espace couleur Yxy (XYZ), développée en 1931, qui s'appuie sur les valeurs tristimulus XYZ définies par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), et l'espace couleur L*a*b*, conçu en 1976 de façon à réduire l'un des principaux problèmes de l'espace couleur Yxy, à savoir que des distances égales sur le diagramme de chromacité x, y ne représentent pas des différences égales des couleurs perçues.

L'espace couleur L*a*b* (appelé aussi CIELAB) est actuellement l'un des plus utilisés pour mesurer et caractériser la couleur des objets se basant sur l'absorption de tout le spectre visible. En effet, cet espace de couleur permet quant à lui, de caractériser plus fidèlement les écarts entre les couleurs perçues par la vision humaine. Les relations non-linéaires pour L*, a* et b* ont pour but d'imiter la réponse logarithmique de l'œil (dans l'espace L*a*b* l'œil détecte 1 point de variation de a* ou b* pour 5 points de L*). La composante L* est la clarté variée de 0 (noir) à 100 (blanc), alors que la composante a* représente une gamme de 600 niveaux sur un axe allant du rouge (+299 valeur positive) au vert (-300 valeur négative) en passant par le gris (0), et que la composante b* représente également une gamme de 600 niveaux sur un axe allant du jaune (+299 valeur positive) au bleu (-300 valeur négative) en passant par le gris (0) au centre. La mesure s'effectue par balayage entre 380 et 770 nm avec des intervalles de 1, 5 ou 10 nm [260, 261]. Cette méthode a été adoptée par l'Organisation Internationale des Vins (OIV) en 2009 [262].

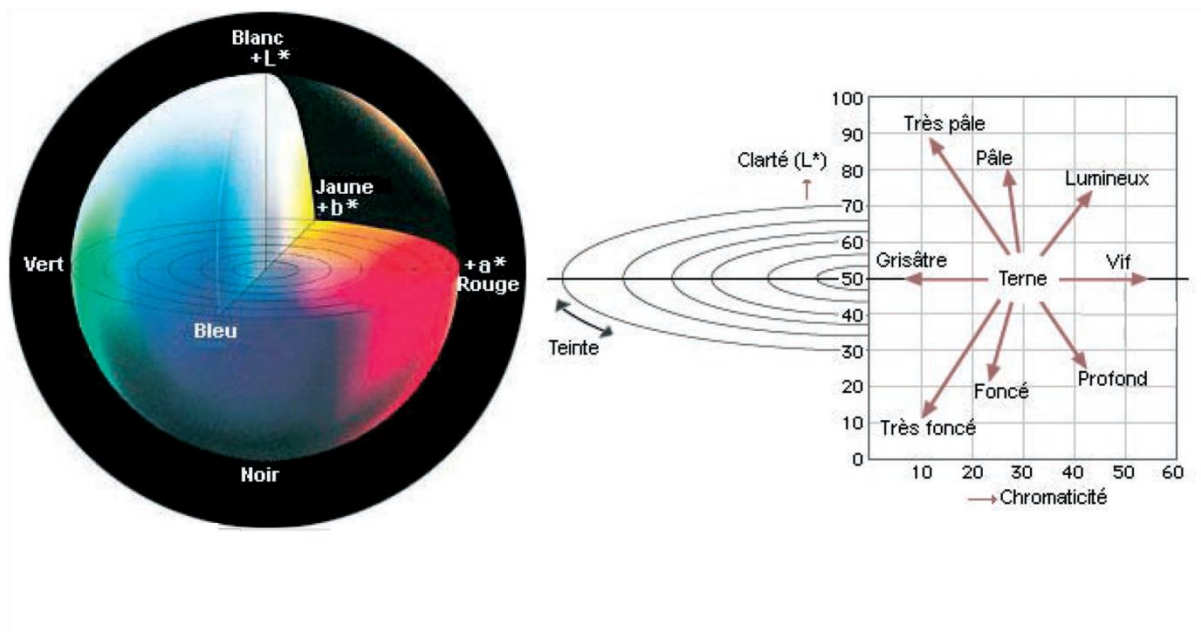


Figure 34. Représentation de l'espace couleur L*a*b* [263].

Plus concrètement, les valeurs obtenues permettent de représenter la couleur du vin selon un modèle à trois axes orthogonaux, qui comprennent la clarté L* et deux coordonnées de chromaticité a* et b* (**Figure 34**). Les valeurs a* et b* indiquent la direction des couleurs : +a* vers le rouge, -a* vers le vert, +b* vers le jaune, et -b* vers le bleu. Les valeurs obtenues pour les vins rouges se trouvent dans la zone [+a*, +b*].

Les couleurs de deux vins peuvent être comparées dans l'espace couleur L*a*b. L'écart de couleur est exprimé par une seule valeur numérique, ΔE^*_{ab} , qui indique de combien et non pas comment ces deux couleurs sont différentes. ΔE^*_{ab} est défini par l'équation suivante :

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

L'appareil utilisé était un Konica Minolta CM-5 spectrophotomètre équipé d'une source lumineuse D65 et contrôlé par le logiciel SpectraMagic NX. L'appareil a été calibré en transparent (0 %) et noir (100 %) avant chaque utilisation. 10 ml de vin rouge ont été versés dans une cuve avec 1 cm de parcours optique. Les valeurs L*, a* et b* ont été mesurées deux fois pour chaque échantillon, la moyenne et l'écart-type sont ainsi calculés.

VIII. L'analyse sensorielle

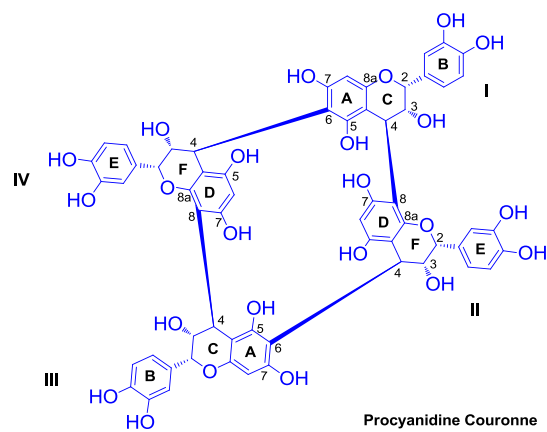
Une dégustation verticale sur la série de 16 vins rouges de Languedoc Montpeyroux s'est déroulée avec 20 dégustateurs professionnels (12 femmes et 8 hommes). Les millésimes ont été confondus : 16 numéros ont été attribués aux 16 vins (**Annexe 1**) et ils ont été présentés en ordre aléatoire pour chaque poste pour chaque dégustateur. Il a été demandé aux dégustateurs de juger l'aspect visuel et l'aspect gustatif du vin. L'aspect visuel contient la teinte et l'intensité de la couleur. L'aspect gustatif comprend l'intensité d'astringence, la qualité tannique, l'amertume, l'acidité et l'équilibre en bouche. Des échelles continues ont été proposées et les dégustateurs ont indiqué l'intensité du paramètre correspondant à l'aide d'une croix. Un exemple de la fiche de dégustation est donné par l'**Annexe 2**. La distance entre le point 0 et la croix est ainsi mesurée en mm et les moyennes et les écarts-types pour tous les paramètres sont ainsi calculés.

IX. L'analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec XLSTAT. Les tests de Pearson avec le niveau de significativité limité à 5 % ont été réalisés afin d'obtenir les coefficients de corrélations et les niveaux de significativité entre l'âge du vin et les composés identifiés, des paramètres sensoriels et colorimétriques ; entre l'intensité de l'astringence et l'IPT, les tanins couronnes et l'EDP. La régression des moindres carrés partiels (PLS : Partial Least Squares regression) a été réalisée afin de corrélérer les résultats sensoriels et les résultats chimiques.

CHAPITRE 3

Les tanins condensés du vin rouge



I. L'identification des unités de base des tanins condensés du vin rouge

I.1 Généralités

Dans le raisin (*Vitis vinifera*) et dans le vin, il est possible d'isoler et de fractionner les flavan-3-ols suivants : la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine, l'(-)-épigallocatechine, la (+)-gallocatechine et l'(-)-épicatéchine-3-*O*-gallate. Les tanins condensés sont des flavan-3-ols polymériques. La (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine constituent la plupart des unités d'extension dans les tanins de raisin, l'(-)-épicatéchine étant généralement la plus abondante des deux. En forme monomérique, la (+)-catéchine est la plus abondante dans le vin rouge de Bordeaux.

Afin de mieux comprendre les modes de fragmentation des oligomères et des polymères de tanins condensés avec notre spectromètre de masse haute résolution (Q-TOF), les modes de fragmentation des unités de base ont été d'abord ré-établis. Le **Tableau 14** montre les unités de base des tanins condensés identifiées dans un vin rouge de Bordeaux (**Chapitre 2 I.1**).

Tableau 14. Les unités de base des tanins condensés du vin rouge.

Composé	T.R.	Formule brut	m/z calculé [M+H] ⁺	m/z mesuré [M+H] ⁺	Diff (ppm)	Origine
(+)-catéchine	5,101	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291,0863	291,0867	1,37	Vin
(-)-épicatéchine	6,216	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291,0863	291,0867	1,37	Vin
(-)-épigallocatechine	3,645	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	307,0812	307,0816	1,30	Vin
(+)-gallocatechine	5,034	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	307,0812	307,0828	5,21	Vin
(-)-épicatéchine-3- <i>O</i> -gallate	5,948	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	443,0973	443,0944	-6,54	Libéré*

*Libéré : Libéré après la dépolymérisation

La (+)-catéchine-3-*O*-gallate (C₂₂H₁₈O₁₀, [M+H]⁺ = 443,0973), l'(-)-épigallocatechine-3-*O*-gallate (C₂₂H₁₈O₁₁, [M+H]⁺ = 459,0922) et la (+)-gallocatechine-3-*O*-gallate (C₂₂H₁₈O₁₁, [M+H]⁺ = 459,0922) n'ont pas été détectées dans les vins analysés.

I.2 La (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine

Dans le vin rouge, deux isomères ayant une formule brute de $C_{15}H_{14}O_6$ sont distinguées: la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine. Le mode de fragmentation MS/MS de l'(épi)catéchine est clairement décrit dans la littérature permettant leur identification [206]. La fission de Diels-Alder Retro (RDA), la fission d'hétérocycle (HRF) et la fission induisant la formation de benzofurane (BFF) sont généralement observées et les fragments ainsi générés sont utilisés pour leur identification. La **Figure 35** montre le spectre de fragmentation issu de la (+)-catéchine en mode positif obtenu avec notre système Q-TOF en utilisant une énergie de collision (Collision-Induced Dissociation : CID) de 10 %. Les trois voies de fragmentation classiques de la (+)-catéchine ont été observées : la fission de RDA du cycle C engendre un fragment à $m/z = 139,0387$ Da (perte de 152,0473 Da, $-C_8H_8O_3$); la fission d'hétérocycle libère l'unité phloroglucinol (perte de 126,0317 Da, $-C_6H_6O_3$) du cycle A en générant un fragment à $m/z = 165,0540$ Da et la fission induisant la formation de benzofurane sur cycle A et C donne un fragment à $m/z = 123,0438$ Da (perte de 168,0423 Da, $-C_8H_8O_4$).

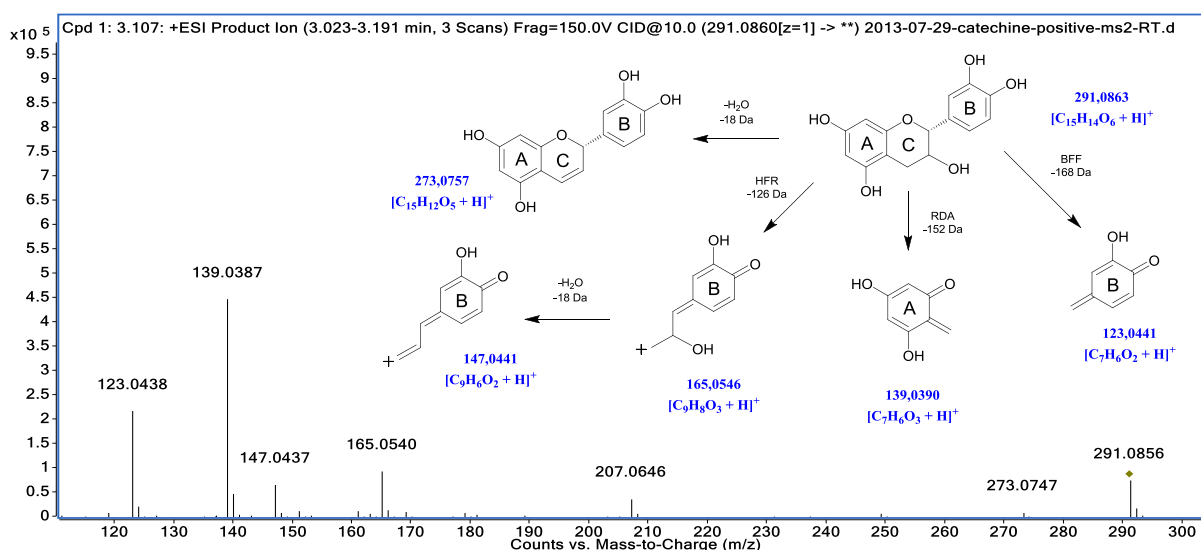


Figure 35. Le spectre de fragmentation de la (+)-catéchine en mode positif et les voies de fragmentation: la perte d'une molécule d'eau, la fission de Diels-Alder Retro(RDA), la fission hétérocycle (HRF) et la fission induisant la formation de benzofurane (BFF).

Le système Q-TOF haute-résolution permet non seulement de séparer deux ions de m/z très proches, mais sa précision élevée permet de proposer les formules brutes pour les ions pseudo-moléculaires et les fragments obtenus. Les fragments issus de la fragmentation de la (+)-catéchine, leurs formules brutes respectives, leurs différences avec les m/z calculés en ppm sont montrés par le **Tableau 15**. Par exemple, le fragment $m/z = 273,0747$

($[C_{15}H_{12}O_5+H]^+ = 273,0757$, diff : -3,66 ppm) issu de la (+)-catéchine correspond à la perte d'une unité d'eau. Parmi tous les fragments de la (+)-catéchine, le fragment $m/z = 207,0646$ ($[C_{11}H_{11}O_4+H]^+ = 207,0652$, diff : -2,90 ppm) correspond à une perte d'unité $C_4H_4O_2$ pour lequel le mécanisme de formation n'est pas encore établi. Le même spectre de fragmentation et les mêmes voies de fragmentation ont également été obtenus pour l'(-)-épicatéchine.

Tableau 15. Les fragments issus de la fragmentation de la (+)-catéchine, identifiés par Q-TOF.

m/z mesuré	Formule [M+H] ⁺	m/z calculé [M+H] ⁺	Diff (ppm)	Masse perdue calculée	Formule perdue
291,0856	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	291,0863	-2,40	Ion pseudo-moléculaire	
273,0747	C ₁₅ H ₁₃ O ₅	273,0757	-3,66	18,0106	H ₂ O
207,0646	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207,0652	-2,90	84,0211	C ₄ H ₄ O ₂
165,0540	C ₉ H ₉ O ₃	165,0546	-3,64	126,0317	C ₆ H ₆ O ₃
147,0437	C ₉ H ₇ O ₂	147,0441	-2,72	144,0423	C ₆ H ₈ O ₄
139,0387	C ₇ H ₇ O ₃	139,0390	-2,16	152,0473	C ₈ H ₈ O ₃
123,0438	C ₇ H ₇ O ₂	123,0441	-2,44	168,0423	C ₈ H ₈ O ₄

I.3 L'(-)-épigallocatechine et la (+)-gallocatechine

Lorsque l'ion $[M+H]^+ = 307,0812$ correspondant à l'(épi)gallocatechine est extrait de l'échantillon de vin analysé, quatre pics sont distingués. L'analyse en MS/MS de ces quatre pics a permis d'éliminer deux d'entre eux, puisqu'ils présentaient des fragments qui ne sont pas cohérents avec le squelette carboné d'un flavan-3-ol. Et les deux autres sont des (épi)gallocatechines. De plus, en comparant le temps de rétention de ces deux pics avec le produit standard commercial, le composé à 3,653 min a été attribué à l'(-)-épigallocatechine et l'autre composé à 5,032 min a été attribué à la (+)-gallocatechine.

Le spectre de fragmentation de l'(-)-épigallocatechine avec une énergie de collision à 5 % est montré à la **Figure 36**. La fragmentation montre les mêmes voies que la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine avec la présence de la fission RDA, HRF, BFF et la perte de la fonction hydroxyle en position 3. Issu de la fragmentation HFR, le fragment $m/z = 181,0491$ Da ($[C_9H_8O_4+H]^+ = 181,0495$, diff : -2,21 ppm) a été observé avec une perte d'unité

phloroglucinol. Ce fragment présente 16 Da (perte d'un atome d'oxygène) de plus que le fragment correspondant issu de la fragmentation HFR de l'(épi)catéchine à $m/z = 165,0540$ Da ($[C_9H_8O_3+H]^+ = 165,0545$, diff : -3,64 ppm). Cette différence prouve que la fonction hydroxyle de plus se trouve sur le cycle B du composé qui confirme le squelette de l'(épi)gallocatéchine. Le fragment très intense observé à $m/z = 139,0387$ Da ($[C_7H_6O_3+H]^+ = 139,0390$, diff : -2,16 ppm) a en fait deux origines, soit il dérive d'une fragmentation de type RDA du cycle B du squelette flavan-3-ol, soit il résulte d'une fragmentation BFF.

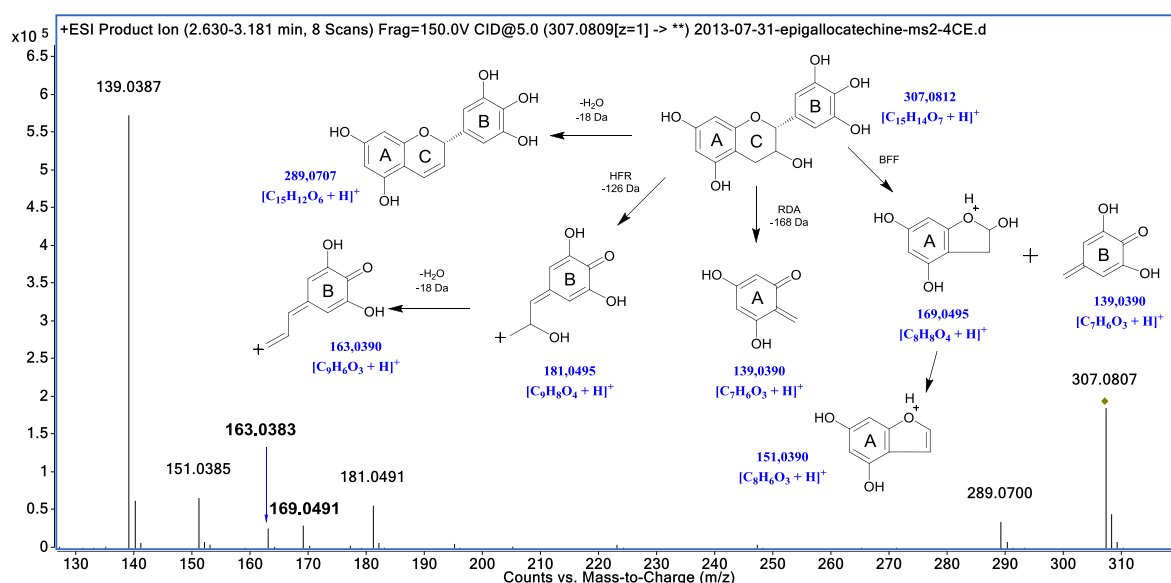


Figure 36. Le spectre de fragmentation de l'(-)-épigallocatechine en mode positif et les voies de fragmentation ainsi que les structures de ces fragments.

I.4 L'(-)-épicatéchine-3-O-gallate

Lorsque l'ion $[M+H]^+ = 443,0973$ qui correspond à l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate est extrait de l'échantillon, quatre pics ayant des temps de rétention très courts et des intensités très faibles sont distingués. Ces quatre ions qui ont été fragmentés n'ont pas des fragments correspondant à la structure de l'(épi)catéchine-3-O-gallate.

En revanche, après la phloroglucinolyse, un ion détecté à 443,0944 ($[C_{22}H_{18}O_{10}+H]^+ = 443,0973$, diff : -6,54 ppm) à temps de rétention à 5,95 min apparaissait. Les fragments obtenus en MS/MS ainsi que la comparaison avec un standard commercial de ce composé confirment son identité : l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate. Cette observation indique que l'(-)-

épicatechine-3-*O*-gallate est incorporée dans les structures oligomériques et polymériques des tanins comme l'unité terminale.

La **Figure 37** montre le spectre de fragmentation issu de l'(-)-épicatechine-3-*O*-gallate en mode positif en utilisant une énergie de collision de 10 % sur le système Q-TOF. Les fragments issus des fragmentations RDA, HRF et BFF ont été observés. Le fragment observé à 291,0862 ($[C_{15}H_{14}O_6+H]^+$ = 291,0863, diff : -0,34 ppm) a perdu une unité de $C_7H_4O_4$ (Masse exacte : 152,0110 Da) qui correspond à la perte de l'acide gallique. Cette perte de l'acide gallique est très proche de la perte de cycle B (perte de 152,0473Da, $-C_8H_8O_3$) de l'(épi)catéchine issue de la fragmentation RDA, mais elle a pu être distinguée grâce à la haute-résolution de Q-TOF. De plus, un fragment issu de la fragmentation HFR et un autre fragment issu de la fission RDA pour le squelette flavan-3-ol-gallate ont été observés respectivement à 317,0634 ($[C_{16}H_{12}O_7+H]^+$ = 317,0656, diff : -6,94 ppm) et à 139,0385 ($[C_7H_6O_3+H]^+$ = 139,0390, diff : -3,60 ppm) ce qui prouve le positionnement de l'acide gallique sur l'oxygène porté par le carbone C3.

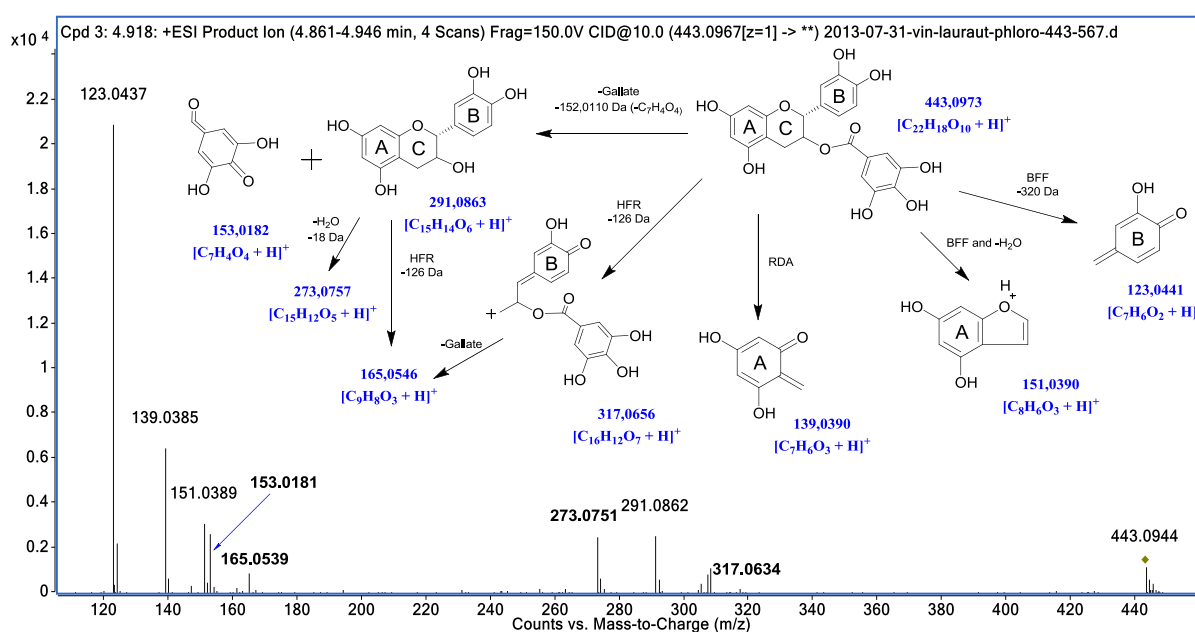


Figure 37. Le spectre de fragmentation de l'(-)-épicatechine-3-*O*-gallate en mode positif et les voies de fragmentation ainsi que les structures de ces fragments.

II. L'identification des tanins de type B par HRMS

II.1 Les dimères de type B

Huit dimères de type B avec comme unité de base soit de la (+)-catéchine soit de l'(-)-épicatéchine ($[C_{30}H_{26}O_{12}+H]^+ = 579,1497$) ont été détectés dans le vin analysé (**Annexe 3**). Leurs assignations ont été confirmées par MS/MS. La liaison interflavonoïde entre les deux unités peut être entre les carbones C4-C8 ou C4-C6 des deux unités flavan-3-ol. Le spectre de fragmentation de l'un des huit dimères (T.R. = 5,457 min) est montré à la **Figure 38**.

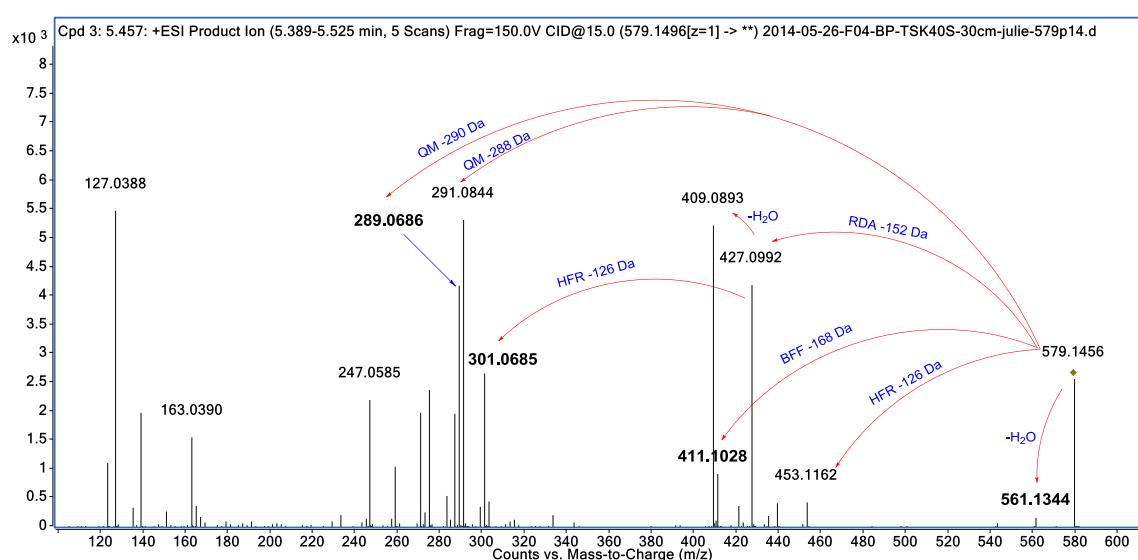
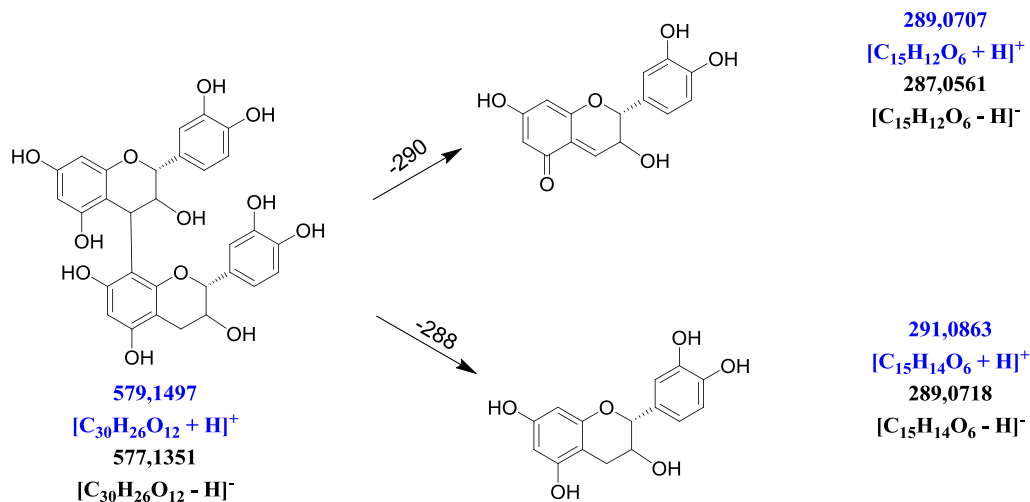


Figure 38. Le spectre de fragmentation d'un dimère de type B (T.R. = 5,457 min) ayant deux unités de base de l'(épi)catéchine en mode positif.

Comme montré à la **Figure 38**, à part les fragments issus des voies de fragmentation de type RDA, BFF, HFR et la perte d'eau spécifique au squelette carboné de l'unité flavan-3-ol, un autre type de fragmentation lié à la liaison covalente entre les deux unités flavan-3-ol, la fission quinone méthine (QM), a été également observé. Dans le cas des procyanidines ayant comme unité de base des (épi)catéchines, le clivage de la liaison inter-flavonoïde (C4-C8/C6) donne lieu à la formation de deux nouveaux types d'ions fragments. L'unité supérieure est alors libérée sous la forme quinone conjugué induisant une perte de 290,0790 Da ($-C_{15}H_{14}O_6$) alors que le fragment de l'unité inférieure est simplement l'unité flavan-3-ol protonée induisant une perte de 288,0634 Da ($-C_{15}H_{12}O_6$) [206, 264]. Ainsi, la perte de 290 Da ou 288 Da peut indiquer si le fragment obtenu est situé à l'unité supérieure ou à l'unité inférieure

(Figure 39A). Ces pertes ont été observées pour le dimère à la base des (épi)catéchines en mode positif ainsi qu'en mode négatif. Il est ici très intéressant de noter que comme lors de la dépolymérisation chimique en milieu acide, l'unité terminale est libérée de manière inchangée (unité flavan-3-ol).

A. Dimère (épi)catéchine-(épi)catéchine



B. Dimère (épi)gallocatéchine-(épi)catéchine

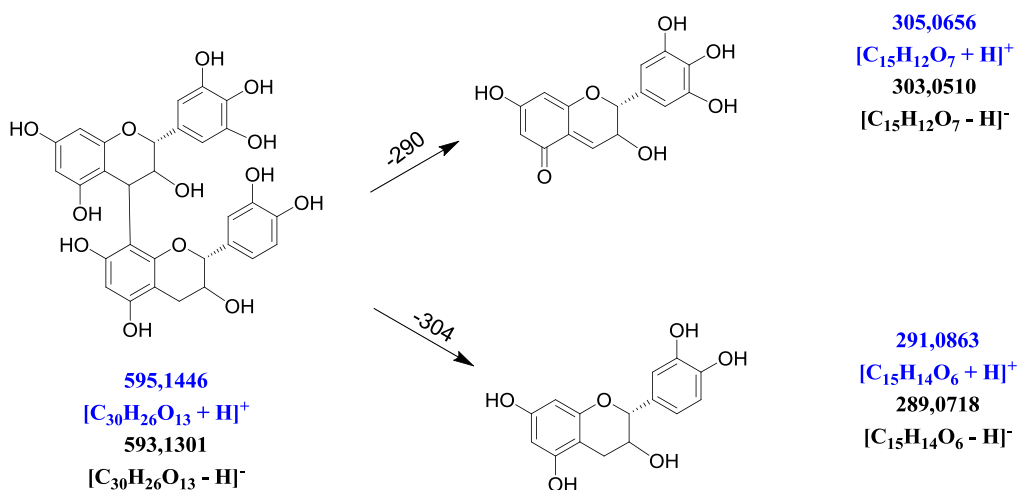


Figure 39. La voie de fragmentation de type fission quinone méthine (QM). A : Dimère (épi)catéchine-(épi)catéchine ; B : Dimère (épi)gallocatéchine-(épi)catéchine.

Lorsque les deux unités flavanols impliquées dans le dimère sont différentes, la perte de 290 Da ou 288 Da peut indiquer la position de l'unité (épi)catéchine en unité supérieure ou en unité inférieure (Figure 39B). Par exemple, un dimère composé d'une unité de

l'(épi)catéchine et d'une autre unité de l'(épi)gallocatéchine a été fragmenté, son spectre de fragmentation a été obtenu en mode négatif en utilisant une énergie de collision de 15 % (**Figure 40**). Deux fragments issus de la fission QM ont été observés ayant des pertes de 290 Da et 304 Da. La perte de 290 Da indique que l'unité (épi)catéchine se trouve en unité inférieure et la perte de 304 Da prouve que l'unité (épi)gallocatéchine se situe en unité supérieure. Cette fission pour le dimère (épi)gallocatéchine-(épi)catéchine est montré à la **Figure 39B**.

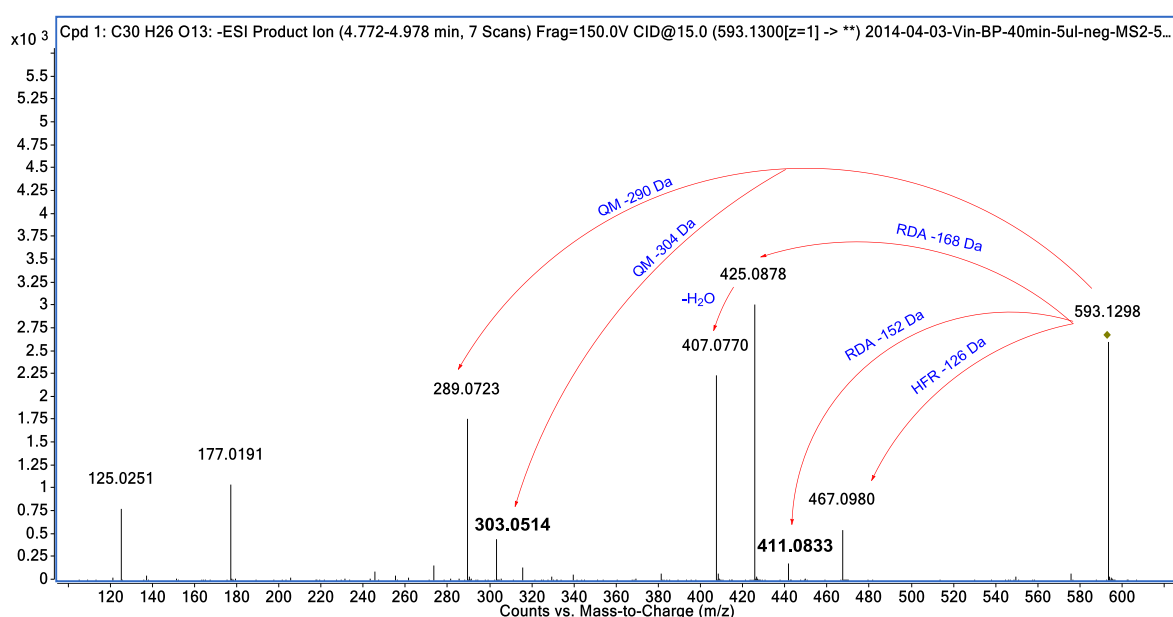


Figure 40. Le spectre de fragmentation d'un dimère de type B (T.R. = 3,245 min) ayant une unité de base de l'(épi)catéchine et une autre unité de base de l'(épi)gallocatéchine en mode négatif.

Par ailleurs, cette règle peut également être appliquée aux composés résultant de la polymérisation entre des flavanols et des anthocyanes afin de localiser les unités supérieures et les unités inférieures. Cette application sera présentée en **Chapitre 4 II.2** concernant l'identification des pigments polymérisés.

II.2 Les trimères de type B

Lorsque l'ion $[C_{45}H_{38}O_{18}+H]^+ = 867,2131$ correspondant à des structures ayant trois unités flavanol et ayant comme unité de base, soit de la (+)-catéchine soit de l'(-)-épicatéchine est recherché, sept trimères de type B ont été détectés dans le vin analysé (**Annexe 4**). Les

trimères contiennent deux liaisons inter-flavonoïdes qui peuvent être deux liaisons de type C4-C8 (**Figure 41A**), ou deux liaisons de type C4-C6, ou encore une combinaison de type C4-C8 et C4-C6 (**Figure 41B**). En théorie, le nombre d'isomères augmente avec l'augmentation de la taille des tanins, alors qu'en réalité, certains isomères ne peuvent pas être formés à cause de l'encombrement stérique. Parmi les tanins condensés, c'est la liaison inter-flavonoïde de type C4-C8 qui domine.

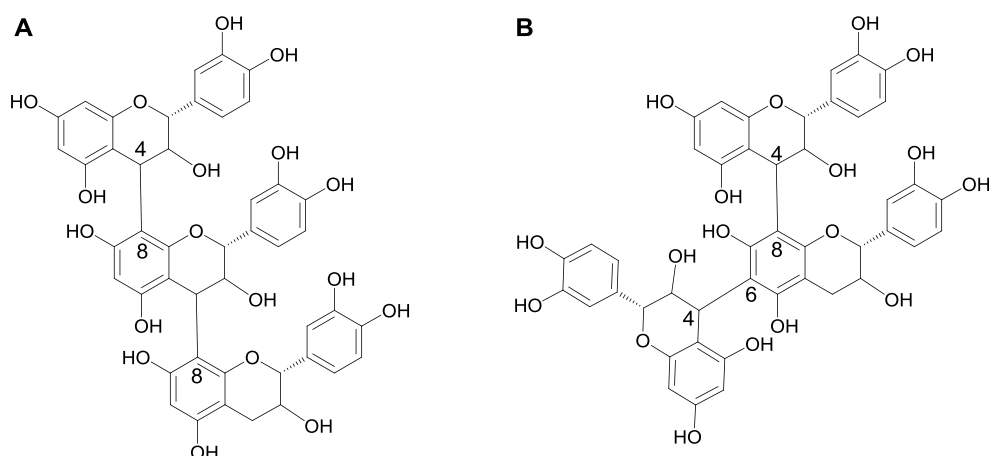


Figure 41. Deux structures des trimères de type B possible. A : Un trimère ayant deux liaisons inter-flavonoïdes C4-C8; B : Un trimère ayant une liaison interflavonoïde C4-C8 et une autre liaison inter-flavonoïde C4-C6.

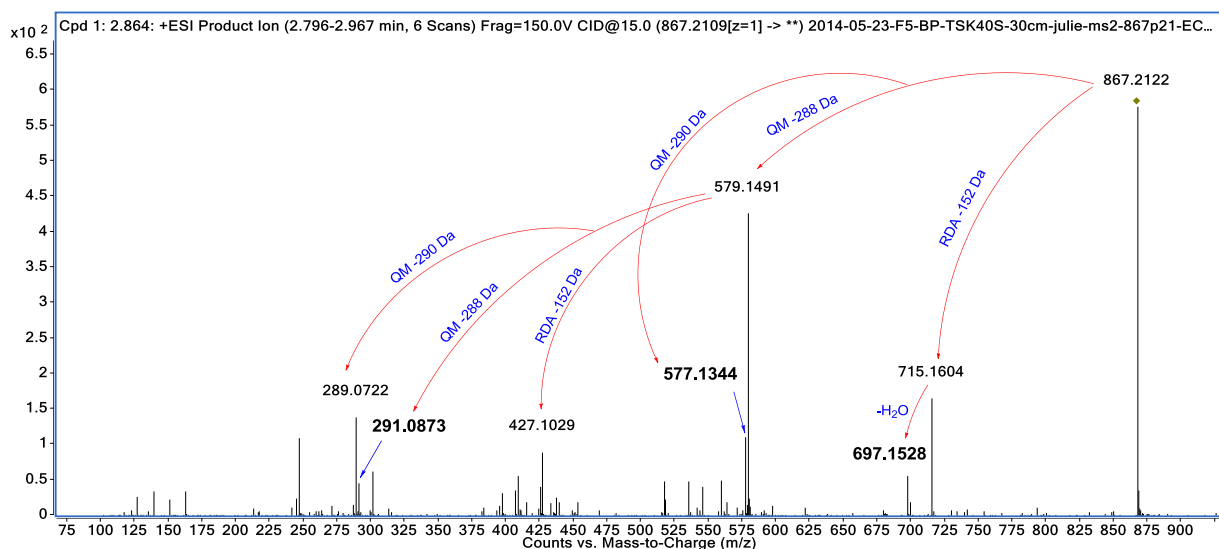


Figure 42. Le spectre de fragmentation d'un trimère de type B (T.R. = 2,864 min) ayant des unités de base de (épi)catéchine en mode positif.

Les squelettes des sept trimères détectés ont été confirmés par la MS/MS. Le spectre de fragmentation de l'un des trimères (T.R. = 2,864 min) obtenu en mode positif en utilisant une énergie de collision de 15 % est montré à la **Figure 42**. Les fragments majoritaires sont issus de la fission RDA et de la fission QM. La fission RDA de l'ion pseudo-moléculaire (perte de 152,0473Da, -C₈H₈O₃) génère le fragment à m/z = 715,1604 ([C₃₇H₃₀O₁₅+H]⁺ = 715,1657, diff : 7,41 ppm) ; la fission RDA de l'ion fils à m/z = 579,1491 (perte de 152,0473Da, -C₈H₈O₃) génère un fragment à m/z = 427,1029 ([C₂₂H₁₈O₉+H]⁺ = 427,1024, diff : -1,17 ppm). De façon similaire à la description pour les dimères de type B, deux types de fragments issus de la fission QM ont été observés pour des trimères ayant une perte de 288 Da (perte de l'unité supérieure) ou 290 Da (perte de l'unité terminale). Les fissions successives des deux liaisons inter-flavonoïdes (fission QM) donnent deux fragments dimériques (m/z = 579,1491 et m/z = 577, 1344) et deux fragments monomériques (m/z = 291,0873 et m/z = 289,0722). Leurs masses exactes et leurs différences en ppm avec les valeurs calculées sont montrées dans le **Tableau 16**.

Tableau 16. Les fragments issus de la fragmentation d'un trimère de type B.

m/z mesuré	Formule [M+H] ⁺	m/z calculé [M+H] ⁺	Diff (ppm)	Masse perdue calculée	Formule perdue
867,2122	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	867,2131	1,04	Ion pseudo-moléculaire	
715,1604	C ₃₇ H ₃₁ O ₁₅	715,1657	7,41	152,0473	C ₈ H ₈ O ₃
697,1528	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₄	697,1552	-3,44	170,0579	C ₈ H ₁₀ O ₄
579,1491	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂	579,1497	1,04	288,0634	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
577,1344	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577,1341	-0,52	290,0790	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
427,1029	C ₂₂ H ₁₉ O ₉	427,1024	-1,17	440,1107	C ₂₃ H ₂₀ O ₉
291,0873	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	291,0863	-3,44	576,1268	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂
289,0722	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289,0707	-5,19	578,1424	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂

II.3 Les tétramères de type B

Comme précédemment, lorsque l'ion [C₆₀H₅₀O₂₄+H]⁺ = 1155,2765 correspondant aux structures ayant quatre unités flavanol et ayant les unités de base soit de la (+)-catéchine, soit de l'(-)-épicatéchine est recherché dans le vin analysé, sept pics ont été détectés (**Annexe 5**).

Leurs structures de tanins condensés tétramères de type B ont été confirmées par la MS/MS. Le spectre de fragmentation d'un d'entre eux ayant le T.R. à 4,749 min est montré à la **Figure 43**.

Les tétramères étant des composés relativement volumineux, une énergie de collision plus élevée à 30 % a été utilisée. En mode positif, en utilisant une énergie de collision à 30 %, les fragments majoritaires obtenus d'un tétramère de type B sont issus de la fission QM. Les fissions successives des trois liaisons inter-flavonoïdes (fission QM) donnent deux fragments trimériques ($m/z = 867,2127$ et $m/z = 865,1998$), deux fragments dimériques ($m/z = 579,1481$ et $m/z = 577,1329$) et deux fragments monomériques ($m/z = 291,0832$ et $m/z = 289,0686$).

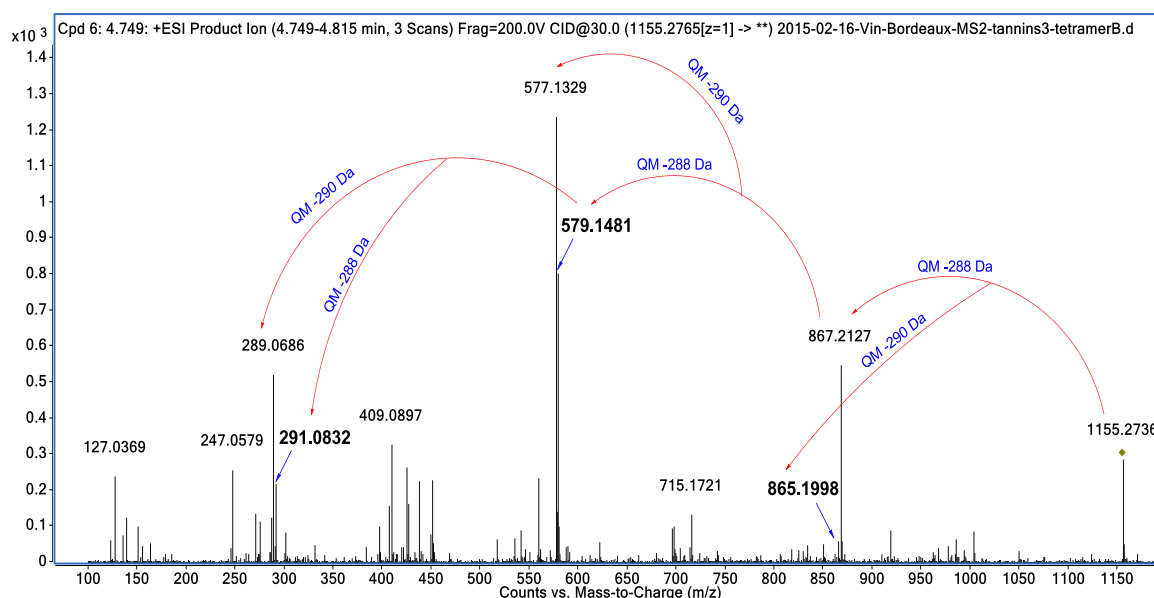


Figure 43. Le spectre de fragmentation d'un tétramère de type B (T.R. = 4,749 min) ayant des unités de base de l'(épi)catéchine en mode positif.

Pour former un tétramère de type B, trois liaisons inter-flavonoïdes de type B sont nécessaires. En fonction de la combinaison des liaisons inter-flavonoïdes de type C4-C8 et de type C4-C6, la configuration linéaire (**Figure 44A**) et la configuration branchée (**Figure 44B**) sont possibles. L'identification de ces composés par MS ne permet pas de différencier les composés linéaires et les structures plus branchées.

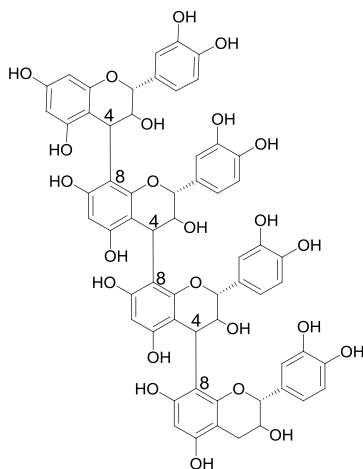
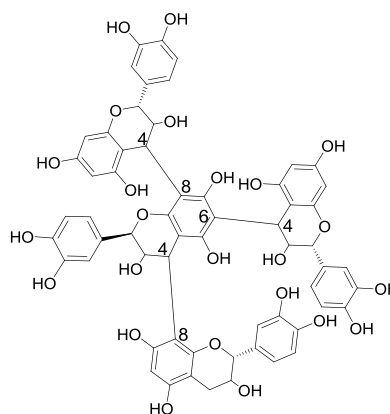
A. Tétramère linéaire**B. Tétramère branché**

Figure 44. La configuration linéaire (A) et la configuration branchée (B) possible pour un tétramère de type B.

II.4 Les pentamères de type B

Comme précédemment, lorsque l'ion $[C_{75}H_{62}O_{30}+H]^+ = 1443,3399$ correspondant à des structures ayant cinq unités flavanol et ayant les unités de base soit de la (+)-catéchine, soit de l'(-)-épicatéchine est recherché dans le vin analysé, des signaux correspondant aux pentamères de type B ont été détectés (**Annexe 6**).

Comme décrit dans le **Chapitre 2 II.1**, afin d'obtenir une meilleure réponse pour ces pentamères, le fragmentor a été paramétré à 250 V et le volume d'injection a été augmenté à 2 μ l. Les analyses MS/MS ont été réalisées sous ces mêmes conditions. Le spectre de fragmentation de l'un des pentamères de type B (T.R. = 5,237 min) obtenu en mode positif en utilisant une énergie de collision à 30 % est montré à la **Figure 45**. De manière similaire avec les tétramères de type B, les fragments majoritaires observés proviennent des fissions QM. Les fissions successives des quatre liaisons inter-flavonoïdes donnent deux fragments tétramériques ($m/z = 1155,2737$ et $m/z = 1153,2488$), deux fragments trimériques ($m/z = 867,2121$ et $m/z = 865,1982$), deux fragments dimériques ($m/z = 579,1491$ et $m/z = 577, 1330$) et deux fragments monomériques ($m/z = 291,0841$ et $m/z = 289,0695$).

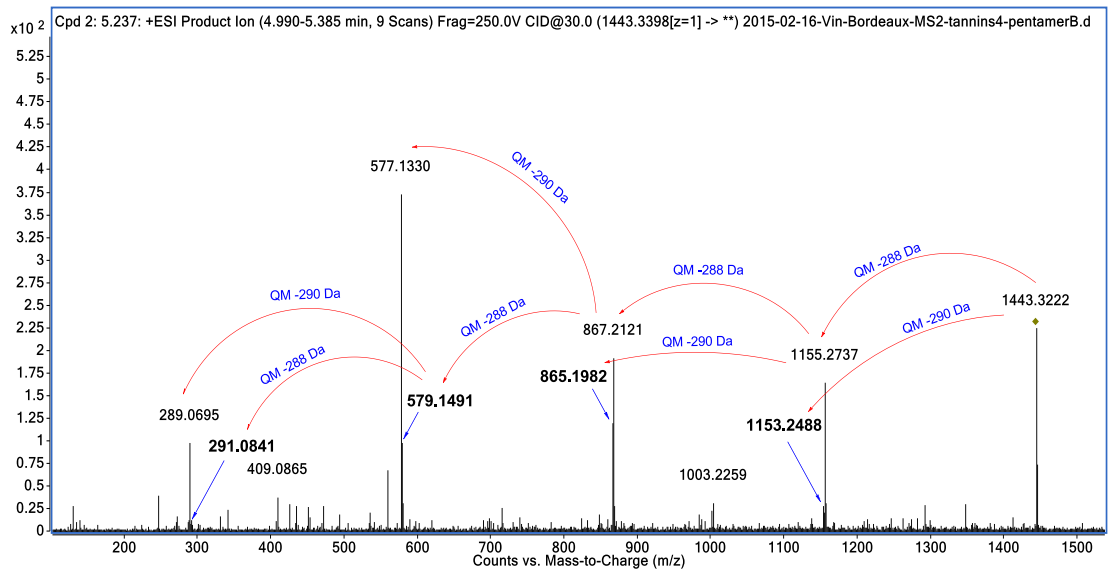


Figure 45. Le spectre de fragmentation d'un pentamère de type B (T.R. = 5,237 min) ayant des unités de base de (épi)catéchine en mode positif.

III. L'identification des tanins dimères de type A par HRMS

Deux dimères de type A ayant comme unité de base de l'(épi)catéchine ($[C_{30}H_{24}O_{12}+H]^+ = 577,1341$) ont été détectés (**Annexe 7**). Comme montré à l'**Annexe 7**, les deux dimères de type A sont confondus avec beaucoup d'autres pics inconnus dans le vin analysé du à ses faibles concentrations et à la complexité de la matrice de vin. Un pré-fractionnement est donc nécessaire pour leur identification. Comme décrit dans le **Chapitre 2 IV.3**, le comportement d'éluion d'un composé de tanins condensés sur la colonne de TSK-40S peut fournir des informations sur sa taille. Grâce au fractionnement sur la colonne de TSK-40S, les deux composés élués à 2,921 min et 3,844 min en UPLC ont pu être concentrés dans la fraction 3, ce qui a permis leur analyse en MS/MS.

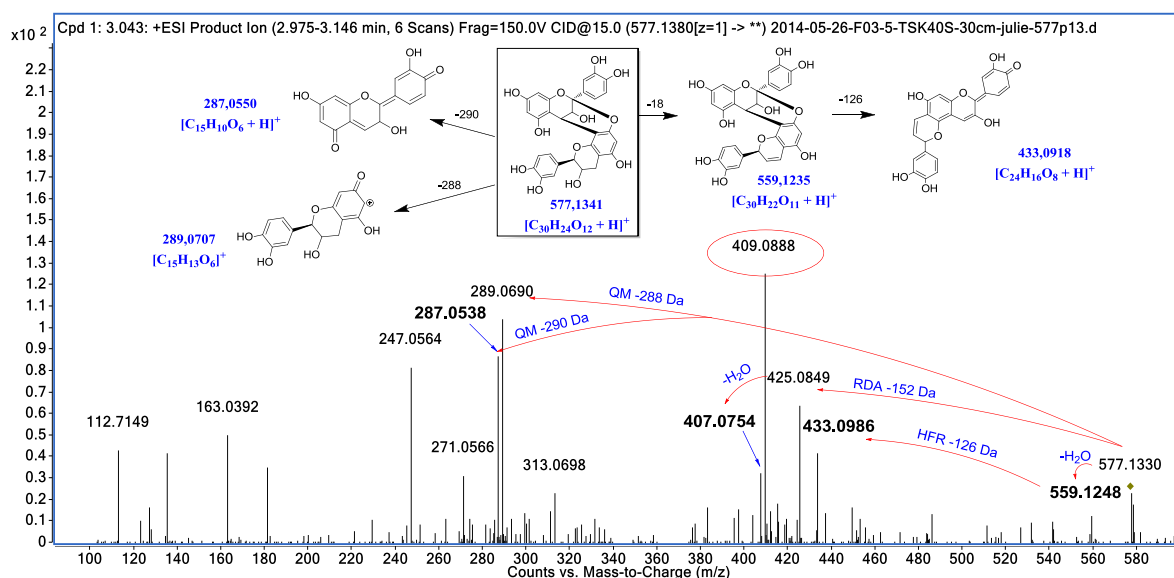


Figure 46. Le spectre de fragmentation d'un dimère de type A (T.R. = 2,921 min) ayant des unités de base de l'(épi)catéchine en mode positif et les voies de fragmentation.

Les deux composés élués à 2,921 min et 3,844 min sont ensuite fragmentés sur le système Q-TOF. Le spectre de fragmentation de l'un des deux dimères de type A (T.R. = 2,921 min) obtenu en mode positif en utilisant l'énergie de collision de 15 % est montré à la **Figure 46**. Des fragments issus de la perte d'eau ($m/z = 559,1248$; $[C_{30}H_{22}O_{11}+H]^+ = 559,1235$, diff : -2,33 ppm), des fissions RDA ($m/z = 425,0849$; $[C_{22}H_{16}O_9+H]^+ = 425,0867$, diff : -4,23 ppm), HFR ($m/z = 433,0986$; $[C_{24}H_{16}O_8+H]^+ = 433,0918$, diff : 15,70 ppm), ainsi que la fission QM ont été observés confirmant la liaison de type A. Par rapport aux dimères de type B, les

fragments $m/z = 289,0690$ ($[C_{15}H_{12}O_6+H]^+ = 289,0707$, diff : -5,88 ppm) et $m/z = 287,0538$ ($[C_{15}H_{10}O_6+H]^+ = 287,0550$, diff : -4,18 ppm) issus de la fission QM des dimères de type A ont 2 Da de moins. Parmi tous les fragments observés, le fragment $m/z = 409,0888$ ($[C_{22}H_{16}O_8+H]^+ = 409,0918$, diff : -7,33 ppm) correspondant à une perte d'unité $C_8H_8O_4$ qui est une perte d'unité correspondant à deux fois la formule perdue ($C_4H_4O_2$) non-expliquée de la (+)-catéchine. Il peut y avoir un lien entre ces deux fragments.

Ainsi, malgré la faible intensité des signaux des deux dimères de type A et la matrice complexe du vin rouge, leurs structures ont pu être confirmées en combinant le fractionnement sur TSK-40S et l'analyse en MS/MS.

IV. L'identification des tanins couronnes par HRMS, phloroglucinolyse et RMN

IV.1 La détection et l'identification par HRMS

L'analyse de plusieurs vins rouges par le système UPLC-MS-UV (Q-TOF) avec le gradient d'analyse de vin (**Chapitre 2 II.1**) a montré en début de chromatogramme plusieurs ions en mode positif avec des m/z à 1153,2615, 1441,3200 et 1457,3175 (**Figure 47**). Ces trois masses correspondent, respectivement, aux formules brutes de $C_{60}H_{48}O_{24}$ ($[M+H]^+ = 1153,2608$; diff : 0,61 ppm), $C_{75}H_{60}O_{30}$ ($[M+H]^+ = 1441,3242$; diff : -2,78 ppm) et $C_{75}H_{60}O_{31}$ ($[M+H]^+ = 1457,3191$; diff : -1,10 ppm).

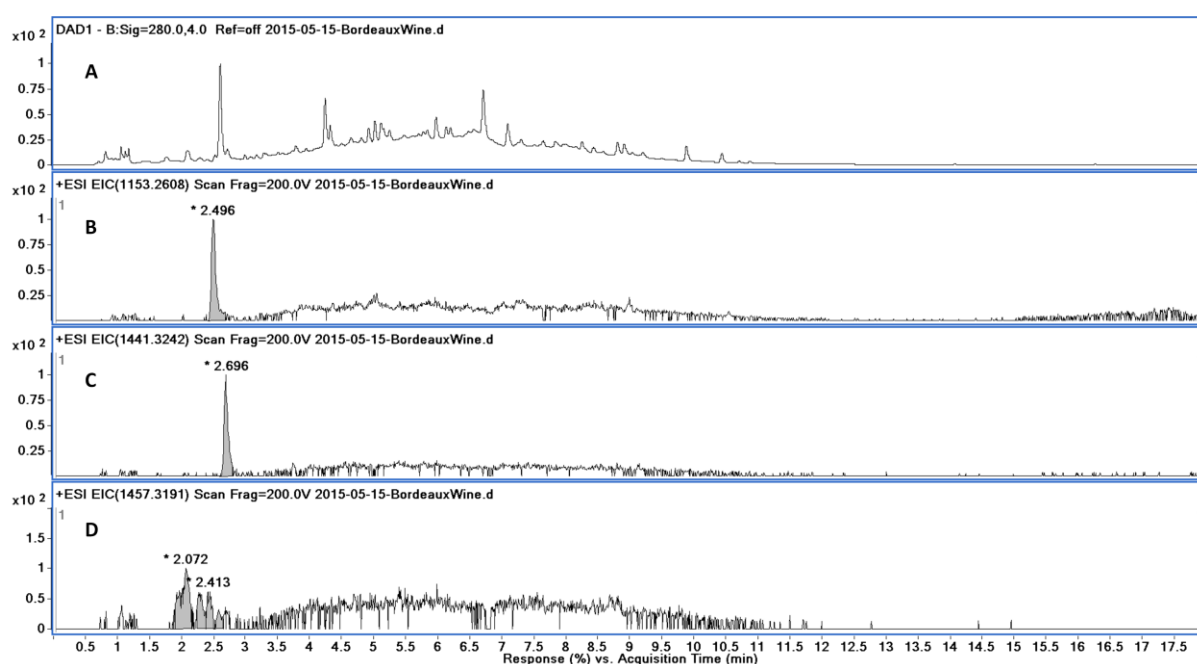


Figure 47. Les chromatogrammes d'un vin de Bordeaux en injection directe sur UPLC-UV-MS. A: UV spectre (280nm); B: Chromatogramme de $m/z = 1153,2608$ (tétramère); C: Chromatogramme de $m/z = 1441,3242$ (pentamères); D: Chromatogramme de $m/z = 1457,3156$ [pentamères (1G)].

Les formules proposées pourraient correspondre à des oligomères de tanins condensés auxquels il manquerait deux hydrogènes et présenteraient donc une liaison carbone-carbone ou carbone-oxygène supplémentaire. Cela nous a conduit à formuler l'hypothèse que ces tanins oligomères pourraient présenter soit une liaison inter-flavonoïde de type A et les autres liaisons seraient alors de type B ; soit aurait une liaison carbone-carbone intramoléculaire reliant deux cycles B entre eux dérivant d'un mécanisme oxydatif. L'ion à $m/z = 1153,2615$ pourrait donc être un tétramère ($C_{60}H_{48}O_{24}$) avec 4 unités de base de type (épi)catéchine et avec une liaison de type A; l'ion à $m/z 1441,3200$ serait un pentamère ($C_{75}H_{60}O_{30}$) avec 5

unités de base de type (épi)catéchine avec une liaison de type A et des ions à m/z 1457,3175 seraient des pentamères ($C_{75}H_{60}O_{31}$) ayant 4 unités de base de l'(épi) catéchine plus une unité d'(épi)gallocatéchine avec une liaison de type A.

Ces tanins oligomères se distinguent des autres tanins condensés de type B par leur temps de rétention court sur une colonne en phase inverse C18. Cette propriété indique leurs polarités élevées. Les tétramères et pentamères de type B classiques étant élués de la colonne entre environ 4,5 et 8 minutes, alors que ces composés ont été élués dans les premières minutes du gradient (de 2,5 à 3 minutes). De plus, une résistance partielle à la dépolymérisation chimique dans les conditions de phloroglucinolyse a également été observée car 30 % de ces molécules n'ont pas été dépolymérisées durant la phloroglucinolyse d'un vin ce qui est difficilement explicable si ces composés sont des oligomères ayant uniquement une liaison de type A. Ces particularités ont fortement attiré notre attention et des investigations plus poussées ont été réalisées.

Des analyses en MS/MS par la HRMS Q-TOF ont ensuite été réalisées pour confirmer leur identité de proanthocyanidine. La **Figure 48** montre les deux spectres de fragmentation en mode positif du tétramère en utilisant les énergies de collision à 15 % et à 30 %. Comme décrit précédemment, les modes de fragmentation des proanthocyanidines sont clairement établis et permettent l'identification des unités monomériques et des liaisons inter-flavonoïdes (type B ou type A) [206]. Le spectre MS/MS obtenu pour le tétramère montre des fragments avec une perte de 152,0473 Da, ($-C_8H_8O_3$, fragments à $m/z = 1001,2118$ et à $m/z = 713,1492$) et une perte de 126,0304 Da, ($-C_6H_6O_3$, fragment à $m/z = 451,1013$), qui résultent de la fission RDA et HRF respectivement. En outre, quatre ions avec une différence de 288 Da ($m/z = 1153,2608$, $m/z = 865,1963$, $m/z = 577,1334$ et $m/z = 289,0697$) ont été observés issus des fissions successives de QM. Curieusement, les trois fragments issus de la fission QM ont une perte d'unité de 288 Da en commun, cela indique que les pertes observées sont des unités supérieures et aucune perte d'unité terminale (-290 Da) n'a été observée. Par ailleurs, aucun fragment spécifique lié à la liaison inter-flavonoïde de type A ($m/z = 433,10$) ni aux liaisons carbone-carbone entre cycle B n'a été observé.

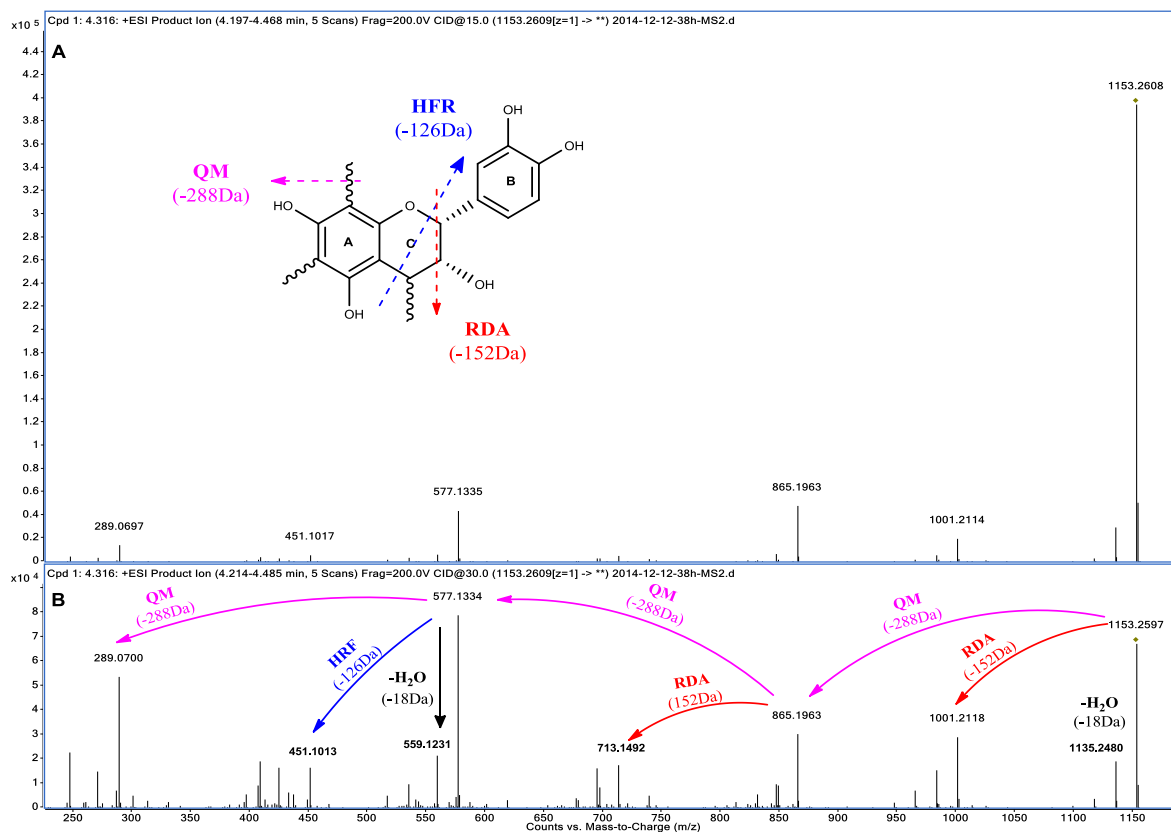


Figure 48. Les spectres de fragmentation du tétramère. A : Énergie de collision de 15 % ; B : Énergie de collision de 30 %.

Les mêmes modes de fragmentations ont été également observés pour le pentamère ($C_{75}H_{60}O_{30}$) ayant 5 unités de base de l'(épi)catéchine (**Figure 49**). Les énergies de collision utilisées étaient 25 % et 50 %. De façon similaire, les fragments issus de la perte d'eau, la fission RDA, HRF et la fission QM ont été observés. De plus, pour la fission QM, des fragments avec des pertes successives de 288 Da ont été observés, alors qu'aucun fragment avec une perte de 290 Da n'a été observé. Dans ce cas également, aucun fragment caractéristique de liaison de type A ou de liaison oxydative intra-moléculaire n'a été observé.

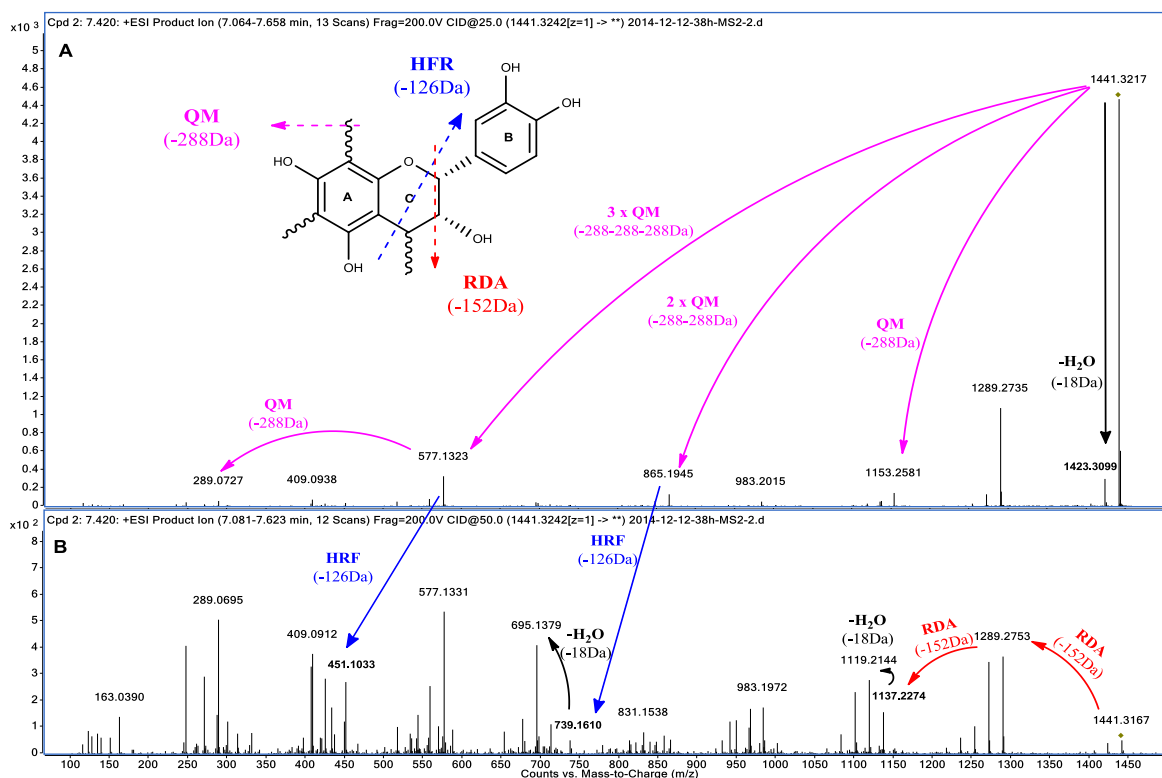


Figure 49. Les spectre de fragmentation du pentamère 1. A : Énergie de collision de 25 % ; B : Énergie de collision de 50 %.

Par rapport aux pentamères ($C_{75}H_{60}O_{31}$) ayant 4 unités de base de type (épi)catéchine plus une unité de type (épi)gallocatéchine, le spectre de fragmentation de l'un de ces pentamères (T.R. = 2,831 min) a été obtenu en mode positif en utilisant des énergies de collision à 30 % et à 60 % (Figure 50).

La fission QM a été observée pour une perte d'unité (épi)catéchine (-288 Da), mais également pour une perte d'unité (épi)gallocatéchine (-306 Da), alors que les fragments correspondant à une perte de 290 Da ou une perte de 304 Da n'ont pas été observés. Ce qui indique que l'unité (épi)catéchine perdue était l'unité supérieure et que l'unité (épi)gallocatéchine perdue serait une unité terminale. En revanche, le fragment $m/z = 865,1934$ correspondant aux pertes consécutives de -288 Da et -304 Da a été observé, ce qui indique que dans ce cas-là, l'unité (épi) gallocatéchine ne serait pas une unité terminale.

Vu qu'il n'y a qu'une seule unité de l'(épi)gallocatéchine dans ce composé, ces résultats sont contradictoires. En effet, l'unité de l'(épi)gallocatéchine ne peut pas être à la fois une unité supérieure et une unité terminale.

Une analyse plus fine des modes de fragmentation des flavan-3-ols a montré qu'il y avait une autre possibilité concernant l'origine du fragment résultant d'une perte de 306 Da ($-C_{15}H_{14}O_7$). Ce fragment résultant d'une perte de 306 Da ($-C_{15}H_{14}O_7$) pouvant s'expliquer par la somme d'une perte successive de 138 Da ($-C_7H_6O_3$) de cycle B de l'unité (épi)gallocatéchine issue de la fission BFF et d'une perte de 168 Da ($-C_8H_8O_4$) de cycle A et C de l'unité (épi)catéchine issue de la fission BFF. Ainsi, la perte de 306 Da ($-C_{15}H_{14}O_7$) ne résulte pas de l'élimination de l'(épi)gallocatéchine en tant qu'unité terminale mais de cette fragmentation successive. En conclusion, pour ce composé également, aucune unité terminale n'a pu être identifiée formellement.

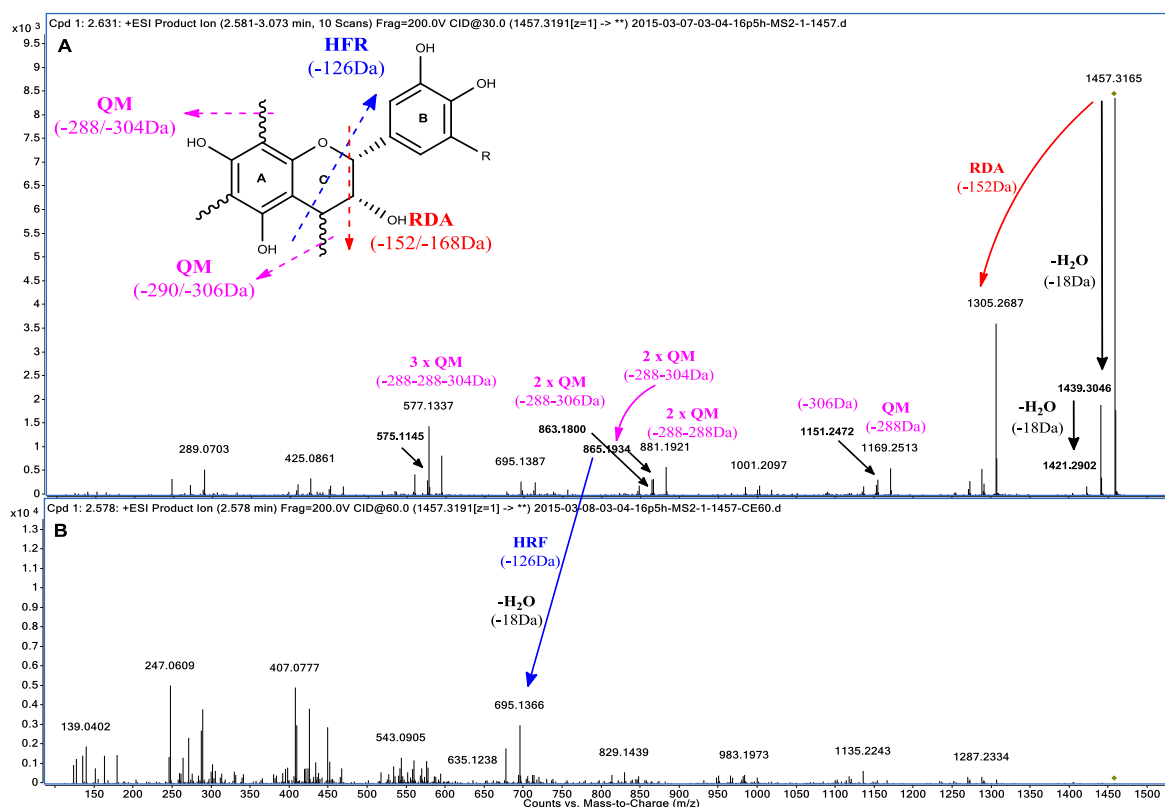


Figure 50. Le spectre de fragmentation du pentamère (1G) 1 (T.R. = 2,631 min). A : Énergie de collision de 30 % ; B : Énergie de collision de 60 %.

L'analyse en MS/MS a permis de confirmer l'identité des oligomères observés provenant de la famille proanthocyanidine avec une indication partielle sur les liaisons inter-flavonoïdes. Les fragments correspondant à la présence des liaisons inter-flavonoïdes de type B ont été observés alors qu'aucun fragment spécifique lié à la liaison inter-flavonoïde de type A n'a été

obtenu. De plus, aucune présence importante de fragments inconnus pouvant expliquer une nouvelle liaison, à part les liaisons de type B, n'a été observée.

Afin de caractériser complètement les liaisons inter-flavanoïdes présentes dans ces molécules, de comprendre l'absence d'unité terminale observée en MS et de clarifier leurs configurations 3D qui pourraient être l'origine de leurs polarités élevées et leur résistance aux conditions de phloroglucinolyse, le tétramère et les pentamères ont été purifiés en vue de leur analyse en RMN.

IV.2 La purification

Une méthode de purification en trois étapes a été établie, avec comme première étape un fractionnement en SPE sur un gel C18, suivie d'une deuxième étape de chromatographie sur le gel d'exclusion stérique TSK HW-40S généralement utilisé pour le fractionnement et la purification des tanins condensés [265], et pour finir une dernière étape d'HPLC semi-préparative sur une colonne C18.

Tout d'abord, vu que ces molécules ont une polarité plus élevée que les proanthocyanidines oligomériques de type B (**Figure 47**), cette caractéristique intrinsèque a été utilisée comme première étape de fractionnement du vin rouge en utilisant une cartouche C18 en phase inverse. Les oligomères ont été élués avec seulement 5 % de méthanol en même temps que quelques impuretés.

Par la suite, une chromatographie d'exclusion stérique sur gel TSK HW-40S a été appliquée pour séparer le tétramère et les deux pentamères des autres composés de faible poids présents dans la fraction issue de la première étape. Après avoir déposé la fraction C18 sur la colonne, le tétramère et les deux pentamères ont été élués séparément entre 15 h et 22 h en utilisant le méthanol comme solvant. Les fractions recueillies ont été évaporées et la présence de composés attendus dans chaque fraction a été confirmée par l'analyse sur UPLC-UV-Q-TOF.

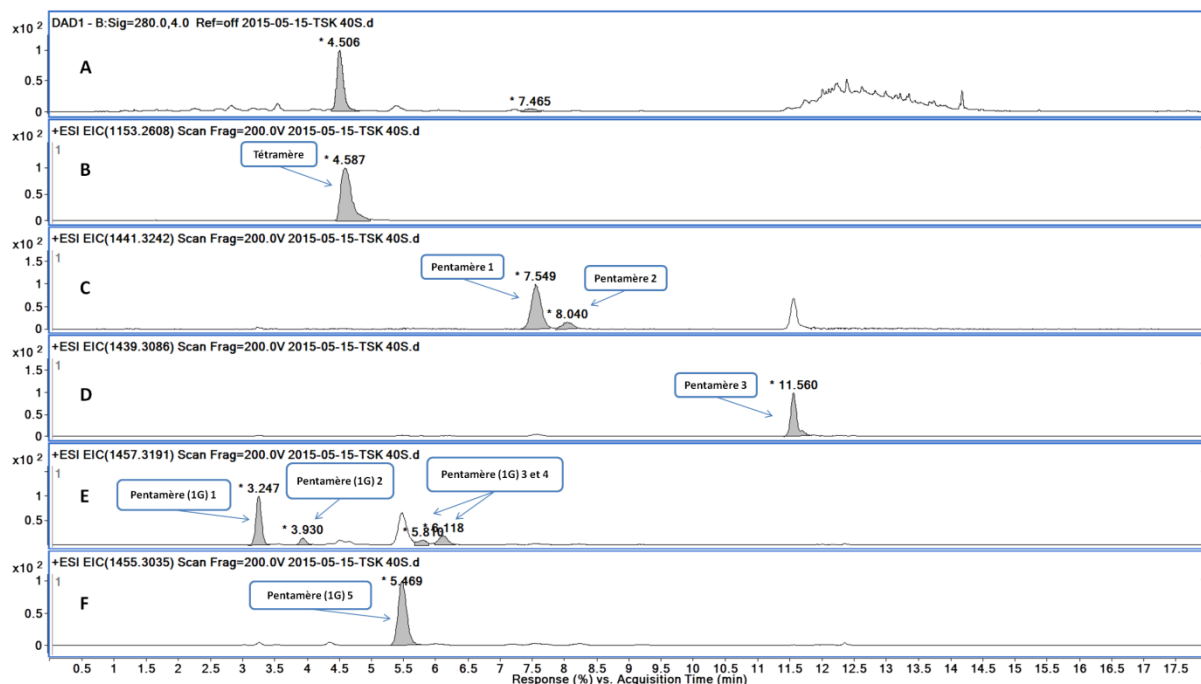


Figure 51. Les chromatogrammes de la fraction après la colonne TSK sur UPLC-UV-MS. A : Chromatogramme UV à 280nm; B : Chromatogramme de $m/z = 1153,2608$ (tétramère); C : Chromatogramme de $m/z = 1441,3242$ (pentamères); D : Chromatogramme de $m/z = 1439,3086$ (pentamères); E : Chromatogramme de $m/z = 1457,3156$ [pentamères (1G)]; F : Chromatogramme de $m/z = 1455,3035$ [pentamères (1G)].

Afin d'améliorer la séparation du tétramère et des pentamères des autres composés en UPLC-UV, un second gradient d'élution a été développé avec 4 % de solvant B pendant 10 minutes. Une fois appliqué le nouveau gradient, le seul pic de pentamère observé jusqu'ici a été divisé en deux pics. Cette observation signifiait qu'il y avait en fait deux pentamères isomères présents dans le vin rouge au lieu d'un seul (**Figure 51C**). En même temps, les quatre isomères des pentamères (1 G) ont été mieux séparés avec ce gradient (**Figure 51E**). Par ailleurs, en plus de ces sept oligomères observés préalablement dans le vin rouge, deux nouveaux ions à m/z 1439,3056 (**Figure 51D**) et à m/z 1455,3017 (**Figure 51F**) ont été observés pour la première fois. Ces deux nouveaux composés pourraient correspondre au pentamère et au pentamère (1G) ayant une liaison carbone-carbone supplémentaire puisqu'ils présentent deux hydrogènes de moins par rapport au pentamère et pentamère (1G) préalablement identifiés. Ces composés ont ensuite été recherchés dans du vin rouge et leur présence a été confirmée, ce qui prouve qu'ils ne sont pas formés durant la purification. Le **Tableau 17** montre leurs formules et leurs différences en ppm avec les masses calculées respectives.

Tableau 17. Les oligomères observés dans le vin rouge.

Composé	Formule	m/z calculé ([M+H] ⁺)	m/z mesuré ([M+H] ⁺)	Diff (ppm)
Tétramère	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	1153,2608	1153,2601	-0,61
Pentamère 1	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₀	1441,3242	1441,3231	-0,76
Pentamère 2	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₀	1441,3242	1441,3214	-1,94
Pentamère 3	C ₇₅ H ₅₈ O ₃₀	1439,3086	1439,3056	-2,08
Pentamère (1G) 1	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₁	1457,3191	1457,3163	-1,92
Pentamère (1G) 2	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₁	1457,3191	1457,3158	-2,26
Pentamère (1G) 3	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₁	1457,3191	1457,3140	-3,50
Pentamère (1G) 4	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₁	1457,3191	1457,3165	-1,78
Pentamère (1G) 5	C ₇₅ H ₅₈ O ₃₁	1455,3035	1455,3017	-1,24

La **Figure 51A** montre que la fraction récupérée après TSK contient principalement le tétramère et les pentamères 1 et 2 et que la concentration de ces oligomères a beaucoup augmenté par rapport au vin de départ. Grâce à ces concentrations plus élevées et au bon fractionnement des composés phénoliques du vin, les pics d'absorption en UV à 280 nm correspondant au tétramère et aux pentamères ont pu être clairement distingués, permettant ainsi de procéder à la purification par HPLC semi-préparative pour obtenir les composés purs. Nous avons décidé dans un premier temps de purifier trois oligomères : le tétramère et les pentamère 1 et 2.

La troisième étape de purification utilisant la technique HPLC semi-préparative permet d'obtenir les composés purs. La colonne utilisée était une C18 et le pourcentage en solvant B (méthanol) augmentait lentement pour passer de 0 % à 4 % B en 30 minutes. Ce gradient très plat permettait la séparation facile et la différenciation des pics correspondant au tétramère et aux pentamères 1 et 2. Le pic de tétramère a été observé et recueilli entre 18 et 19 minutes et les pics de pentamères 1 et 2 entre 27 et 32 minutes.

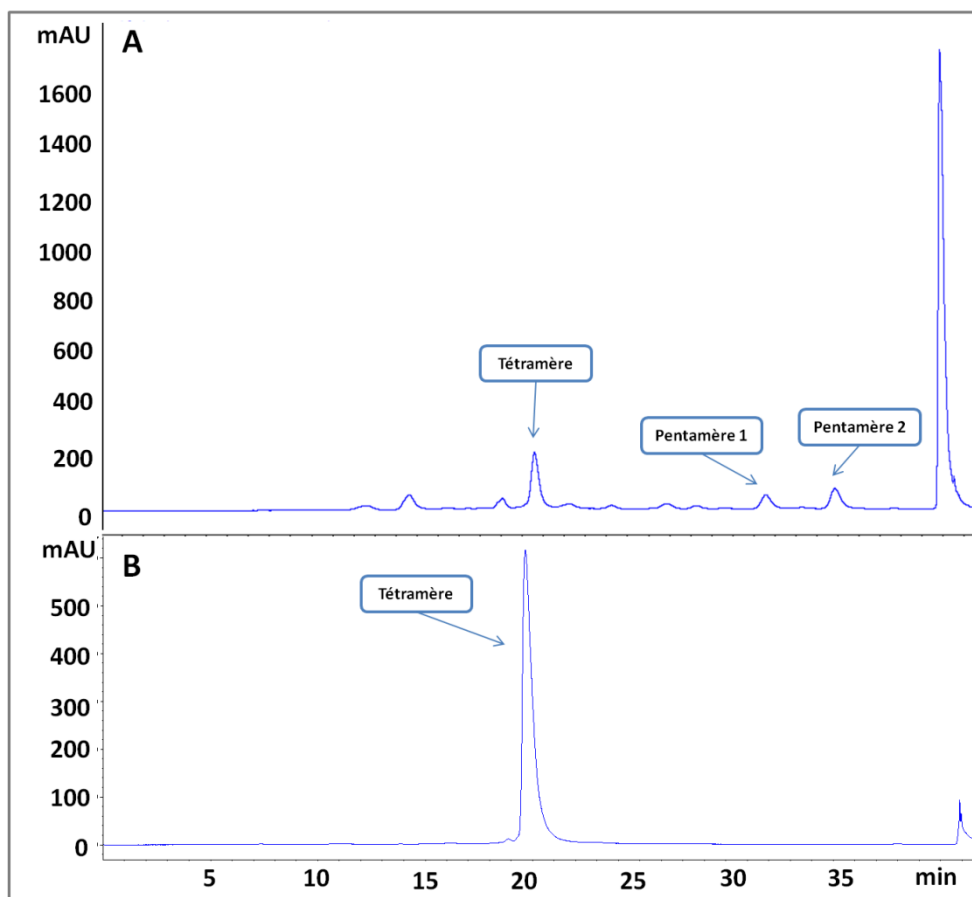


Figure 52. Les chromatogrammes d'absorption UV (280 nm) sur le système HPLC semi-préparative. **A :** La fraction issue du fractionnement TSK-40S; **B :** La fraction pure du tétramère.

La **Figure 52A** montre le chromatogramme de la fraction résultant du fractionnement sur le gel TSK-40S sur le système HPLC semi-préparative. Le tétramère et les deux pentamères 1 et 2 ont été collectés séparément après deux cycles de purification par HPLC semi-préparative. Trois fractions pures ont été obtenues: le tétramère (**Figure 52B**), le pentamère 1 et le pentamère 2. La pureté de ces fractions a été évaluée à 99 % en fonction de l'aire d'absorption à 280 nm sur le système de HPLC-semi-préparative ainsi que sur le système UPLC-UV-Q-TOF (**Figure 53**).

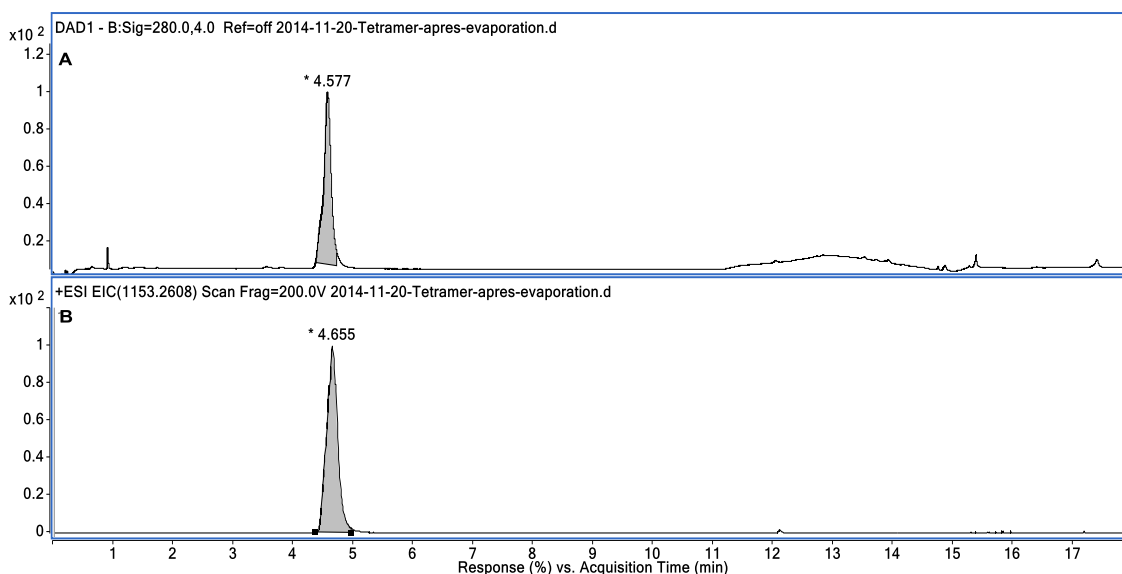


Figure 53. Contrôle de pureté du tétramère par UPLC-UV-Q-TOF. A : Chromatogramme d'absorption UV (280 nm); B : Chromatogramme d'EIC $m/z = 1153,2608$.

Ces fractions issues de HPLC semi-préparative ont été évaporées et lyophilisées pour obtenir une poudre blanche prête à être utilisée pour l'analyse RMN. Avec environ 4 litres de vin rouge, le rendement du protocole de purification était: 5,6 mg de tétramère, 1,5 mg de pentamère 1 et 2 mg de pentamère 2. La concentration relativement plus faible observée des pentamères dans le vin (**Figure 47** et **Figure 51**) est l'explication des masses moins importantes obtenues suivant le protocole de purification. Le rendement de purification de ces trois composés est relativement faible, mais il s'explique par le nombre important d'étapes de purification et la volonté d'obtenir des produits les plus purs possibles, ce qui a inévitablement engendré des pertes importantes.

IV.3 La caractérisation de la structure couronne par RMN et la modélisation moléculaire

Les analyses RMN 1D (^1H and ^{13}C) et 2D (HSQC, HMBC, ROESY) ont été effectuées avec 5,6 mg du tétramère pur dans du méthanol- d_4 . Les données ^1H , ^{13}C et la corrélation HMBC du tétramère sont montrées dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Les données ^1H , ^{13}C et la corrélation HMBC du tétramère.

Cycle	Num.	δ_{C}	δ_{H} m(J en Hz)	HMBC (Unité: C)
Flavanol I				
C	2	78,5	5,17 brs	B2', B6', C4
	3	73,0	4,29 m	C4
	4	37,7	4,22 brd (5,2)	C2
A	4a	104,9	-	A8, C3, C4
	5	155,5	-	F4*, C4
	6	106,3	-	F4*, A8
	7	155,5	-	F4*, A8
	8	96,1	6,13 s	-
	8a	155,1	-	C2, C4, A8
B	1'	131,9	-	B5', C2, C3
	2'	115,4	6,99 d (1,8)	B6', C2
	3'	145,4	-	B5'
	4'	145,5	-	B2', B6'
	5'	115,5	6,72 d (8,1)	-
	6'	119,8	6,84 dd (1,8;8,1)	B2', B5', C2
II				
F	2	75,2	4,45 s	E2', E6', F3, F4
	3	67,9	4,48 d (2,1)	F2, F4
	4	37,8	4,56 d (2,5)	F2, F3
D	4a	98,6	-	D6, F3, F4
	5	157,1	-	D6, F4
	6	97,0	6,10 s	-
	7	157,3	-	D6, C4
	8	109,0	-	D6, C3, C4
	8a	157,2	-	F4, C4
E	1'	131,3	-	E5', F2
	2'	114,4	6,21 d (1,8)	E6', F2
	3'	144,8	-	E5'
	4'	144,6	-	E2', E6'
	5'	115,5	6,43 d (8,1)	-
	6'	119,7	5,76 d (1,8;8,1)	E2', F2

Le spectre proton obtenu apparait relativement simple (**Figure 55A**) pour un tétramère d'unité flavan-3-ol alors qu'un très grand nombre de conformères sont attendus pour un tétramère d'unité flavan-3-ol. De plus, chaque signal de proton aromatique ou aliphatique intègre pour deux protons, ce qui indique une symétrie dans la structure. Une analyse plus fine du spectre proton montre l'absence de proton aliphatique de type CH_2 caractéristique du carbone C4 d'une unité flavan-3-ol terminale et dont le déplacement chimique est entre 2,3 et 3 ppm (**Annexe 8A**).

Par comparaison avec la littérature, les signaux des carbones des unités flavan-3-ols du tétramère dans la plage de déplacement chimique δC 155-160 ppm ont été attribués aux signaux des carbones en position C5, C7, et C8a. Ces attributions ont également été réalisées grâce à des corrélations à longue-distance HMBC entre les carbones C8a et les protons H2 des noyaux hétérocycliques C et F, et entre le carbone C5A et les protons H8A et H4C pour les unités I et entre le carbone C5D et le proton H4F pour les unités II (**Figure 55B**). Les liaisons inter-flavonoïdes (C4/C8 ou C4/C6) ont également été attribuées grâce aux corrélations HMBC. Les corrélations fortes entre les protons H4C et les carbones C7D, C8D et C8aD indiquent que la liaison inter-flavonoïde entre l'unité I et l'unité II (cycle C et D) est 4→8. De plus, les corrélations HMBC entre le proton H4F et les carbones C5A, C6A et C7A prouvent que la liaison inter-flavonoïde entre l'unité II et l'unité III (cycle F et A) est 4→6. Les déplacements chimiques pour les protons et les carbones des unités flavan-3-ols I et III étant identiques, ces dernières corrélations HMBC prouvent également la présence d'une structure cyclique et symétrique.

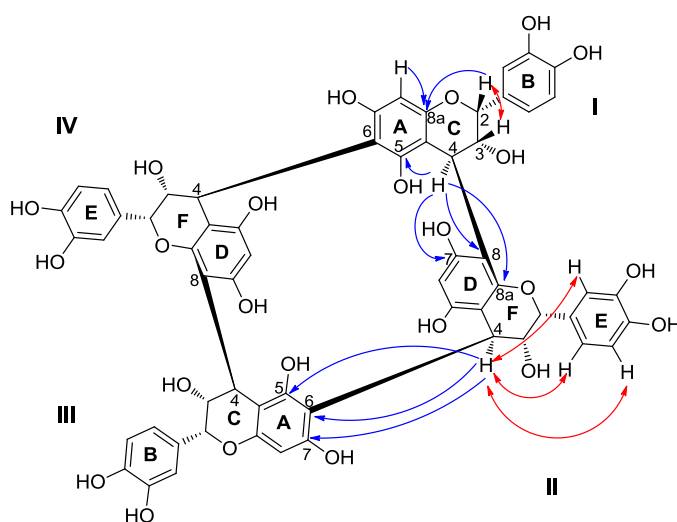


Figure 54. Le tétramère couronne.

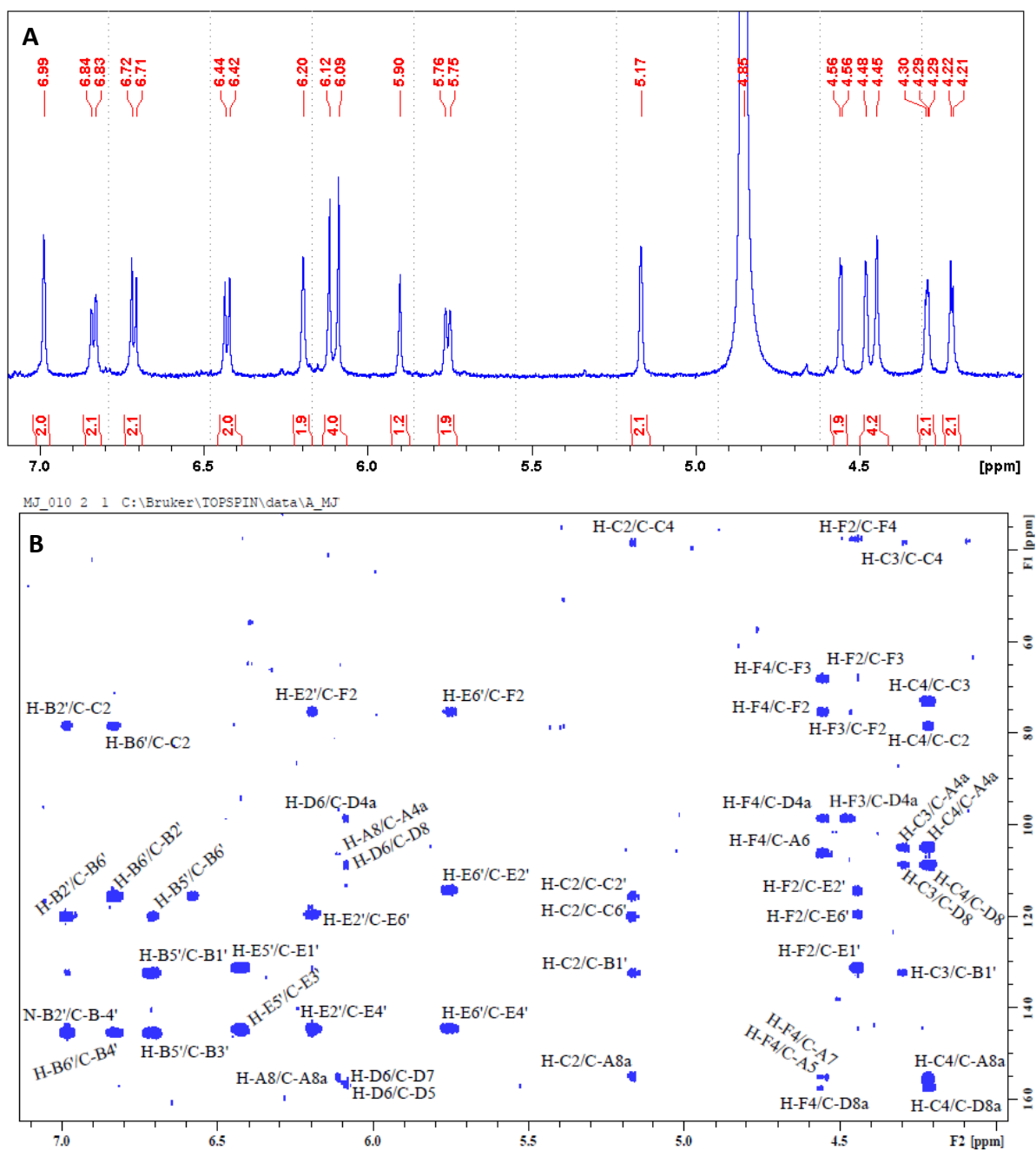


Figure 55. Le spectre proton (A) et le spectre HMBC (B) du tétramère.

La configuration des carbones 2, 3 et 4 du cycle C et du cycle F pour les 4 unités flavan-3-ol a été déterminée en utilisant le spectre ROESY (Figure 56). Une forte corrélation entre les protons H2C et H3C et entre les protons H2F et H3F prouve que ces protons sont orientés vers la même face de l'unité flavan-3-ol et donc que les 4 unités flavan-3-ol constitutives de ce tétramère sont des (-)-épicatéchine. De même, les corrélations fortes observées en ROESY entre les protons aromatiques des cycles B et E et les protons H4C et H4F respectivement suggèrent que ces protons H4C et H4F sont orientés vers l'arrière comme les

cycles aromatiques B et E. Cette orientation vers l'arrière des protons H4C et H4F prouve que toutes les liaisons inter-flavonoïdes entre toutes les unités sont de type β (vers l'avant).

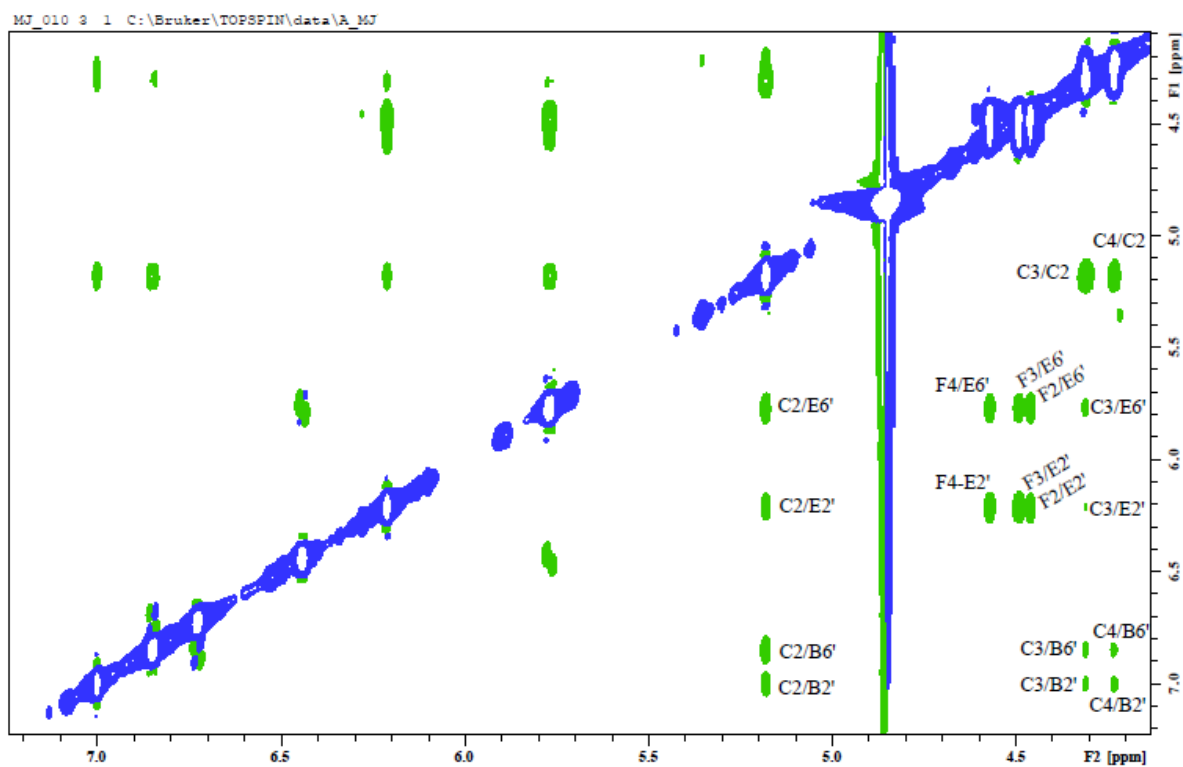


Figure 56. Le spectre ROESY du tétramère.

Toutes les interprétations des résultats RMN ci-dessus conduisent à la structure cyclique montrée à la **Figure 54**. L'unité I est liée avec l'unité II par une liaison inter-flavonoïde de type $4\beta \rightarrow 8$, l'unité II est liée à l'unité III par une liaison $4\beta \rightarrow 6$, l'unité II est liée à l'unité IV par une liaison $4\beta \rightarrow 8$, et l'unité IV est liée à l'unité I par une liaison $4\beta \rightarrow 6$. Les unités I et II sont équivalentes aux unités III et IV du fait de la symétrie. Ce type composé tétramérique cyclique n'avait jusqu'à présent jamais été reporté dans la littérature que ce soit dans le vin ou dans le règne végétal. Au vu de son squelette carboné très particulier, nous avons décidé de nommer cette famille de composés les tanins condensés couronnes.

Suite à ces analyses par RMN, une modélisation moléculaire sous contraintes RMN a été réalisée en utilisant le logiciel Accelrys [266] en tenant compte de toutes les corrélations NOE observées sur le spectre ROESY. La structure obtenue par cette modélisation moléculaire (**Figure 57**) révèle une importante cavité au centre de la structure. Les cycles D des unités II

et IV sont notamment parallèles et à une distance de 5,54 Å alors que les cycles A des unités I et III sont eux distants de 4,97 Å. De façon identique, les deux fonctions phénols portées par les carbones C5 des cycles A des unités I et III, apparaissent orientées vers l'intérieur de la cavité et sont distants de 2,59 Å.

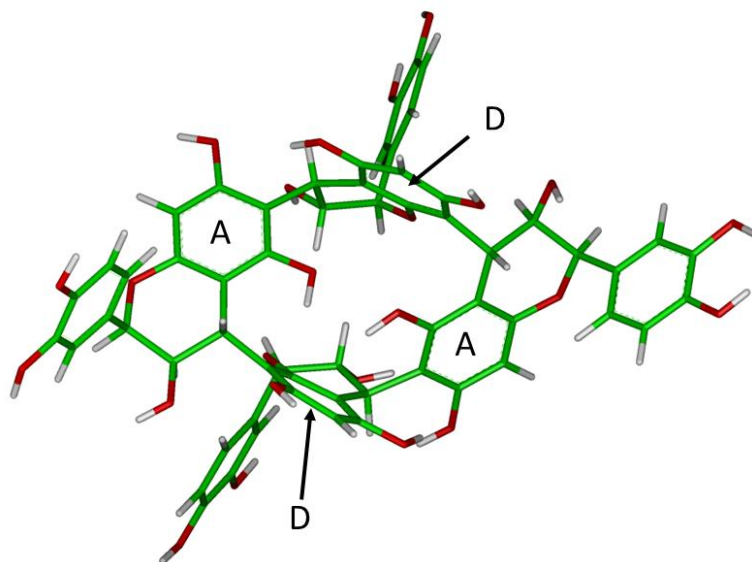


Figure 57. La structure du tétramère modélisée.

IV.4 La phloroglucino lyse des oligomères des tanins condensés couronnes

Pour confirmer ces nouvelles structures cycliques observées par l'analyse RMN, et également mieux comprendre la résistance à la dépolymérisation chimique par phloroglucino lyse observée précédemment à partir du vin, les fractions pures du tétramère et des pentamères 1 et 2 ont été soumises à la phloroglucino lyse.

Tout d'abord, aucun flavan-3-ol monomère n'a été libéré, ce qui est en accord avec le fait que toutes les unités soient reliées entre elles par des liaisons inter-flavonoïdes confirmant la structure cyclique. Le **Tableau 19** montre les unités observées dans les trois fractions après phloroglucino lyse.

Tableau 19. Unités libérées après la phloroglucinyse du tétramère et les deux pentamères.

Oligomère	Composé	Formule brute	m/z calculé [M+H] ⁺	m/z mesuré [M+H] ⁺	Diff (ppm)
T*	EC-phloro	C ₂₁ H ₁₈ O ₉	415,1024	415,1023	-0,24
	B type dimère-phloro 1	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₅	703,1657	703,1649	-1,14
	B type dimère-phloro 2	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₅	703,1657	703,1653	-0,57
	B type trimère-phloro 1	C ₅₁ H ₄₂ O ₂₁	991,2291	991,2305	1,41
	B type trimère-phloro 2		Trace		
P*	EC-phloro	C ₂₁ H ₁₈ O ₉	415,1024	415,1026	0,48
	C-phloro	C ₂₁ H ₁₈ O ₉	415,1024	415,1016	-1,93
	B type dimère-phloro 1	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₅	703,1657	703,1669	1,71
	B type dimère-phloro 2	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₅	703,1657	703,1655	-0,28
	B type trimère-phloro 1	C ₅₁ H ₄₂ O ₂₁	991,2291	991,2288	-0,30
	B type trimère-phloro 2	C ₅₁ H ₄₂ O ₂₁	991,2291	991,2292	0,10
	B type tétramère-phloro**	C ₆₆ H ₅₄ O ₂₇	1279,2925	1279,2910	-1,95

*T pour 'tétramère' et P pour 'pentamère'.

**Les adduits tétramère-phloro libérés par le pentamère 1 et par le pentamère 2 ne sont pas les mêmes isomères.

A part les différents isomères de tétramère-phloro de type B, la plupart des unités libérées observées pour les pentamères 1 et 2 étaient les mêmes. Donc, ils sont regroupés dans la partie «P». Toutes les structures des unités observées ont été confirmées par l'HRMS ainsi que leur mode de fragmentation. Une perte de phloroglucinol et les voies de fragmentation spécifiques du squelette flavan-3-ol ont été observées. En outre, des traces de deux isomères pentamère-phloro de type B ont été observées et confirmées par MS/MS respectivement pour les pentamères 1 et 2 après phloroglucinyse.

En conclusion, les résultats d'RMN et phloroglucinyse montrent que les structures de ces procyanidines oligomères sont cycliques. Pour le tétramère, toutes les unités de base sont de l'(-)-épicatéchine et pour les deux pentamères, les unités de base de la (+)-catéchine sont également présentes. La **Figure 58** montre les trois structures semi-hypothétiques des deux pentamères cycliques : pour la structure A et B, le cycle est formé par cinq unités de base en ajoutant une liaison inter-flavonoïde de C4-C8/C6 et la structure C présente une configuration de structure cyclique de tétramère branchée par une cinquième unité flavanol.

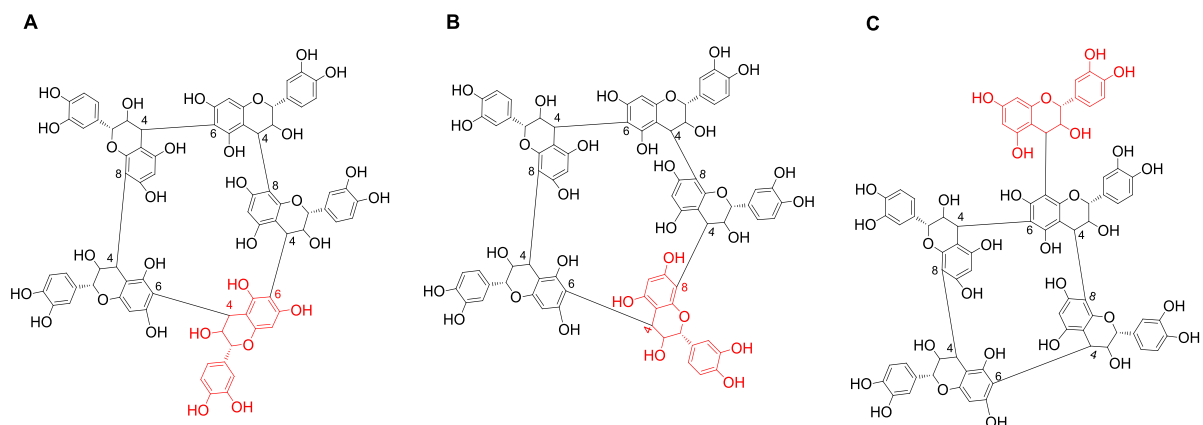


Figure 58. Trois structures semi-hypothétiques des deux pentamères couronnes.

IV.5 La caractérisation chromique et le pouvoir rotatoire

Les composés phénoliques présentent une forte absorbance dans la région ultraviolette (UV). L'absorbance est produite par la structure du cycle aromatique et est souvent détectée à 280 nm [267, 268] pour de nombreuses structures phénoliques. Cette absorbance est due à des transitions électroniques et le balayage d'absorption UV d'un composé phénolique donne le spectre d'absorption UV correspondant. Les absorptions maximales à environ 279 nm pour la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine, l'(-)-épicatéchine-gallate ont été rapportées alors que l'(-)-épigallocatechine a une absorption maximale à environ 271 nm et l'(-)-épigallocatechine-gallate a une absorption maximale à environ 275 nm [269]. Il a été également montré que ce paramètre n'est pas influencé par le nombre d'unités flavan-3-ol [269]. Ainsi, les longueurs d'onde d'absorption maximales pour des dimères, des trimères et un tétramère ayant comme unité de base l'(épi)catéchine ont été observées à 279 nm [269].

Le spectre d'absorption des trois oligomères purifiés : le tétramère, les pentamères 1 et 2 ont été obtenus sur le système UPLC-DAD-Q-TOF. Comme montré à la **Figure 59**, ils ont tous une absorbance maximum à 279 nm.

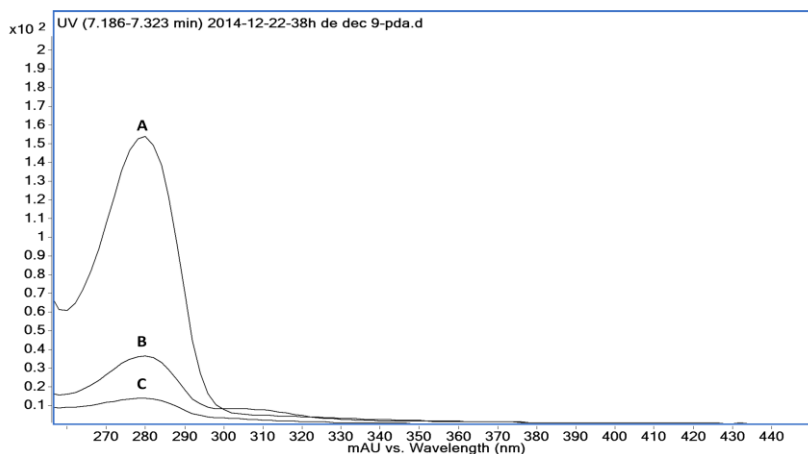


Figure 59. Spectre d'absorption en UV de tétramère (A), pentamère 1 (B) et pentamère 2 (C).

Le pouvoir rotatoire du tétramère couronne a été mesuré et est de +17,14. Cette valeur positive est plutôt surprenante puisqu'il est formé de quatre unités d'épicatéchine dont le pouvoir rotatoire est négatif.

IV.6 L'évaluation des activités neuroprotectrices du tétramère couronne

La maladie d'Alzheimer est la principale maladie neurodégénérative chez les personnes âgées et se manifeste principalement par la perte des fonctions cognitives et mentales résultant de la mort cellulaire et neuronale. L'agrégation du peptide β -amyloïde (β A) est considérée comme un évènement critique dans le développement de la maladie puisque son agrégation va conduire à la formation d'une plaque sénile et à la mort neuronale. En se basant sur ce mécanisme de développement de la maladie d'Alzheimer, le GESVAB a développé un test rapide et fiable pour estimer l'activité neuroprotectrice des composés phénoliques [55]. Ils ont notamment montré que de nombreux composés phénoliques du raisin et du vin tel que les anthocyanes et les stilbènes présentaient une forte inhibition de l'agrégation du peptide β -amyloïde (β A) [55]. Ce test est basé sur la viabilité et la survie des cellules PC12 en présence du peptide β -amyloïde (β A).

Les tanins couronnes étant une nouvelle sous-famille des tanins condensés avec un squelette carboné inhabituel, leur activité neuroprotectrice vis-à-vis de l'agrégation du peptide β -amyloïde (β A) a été estimée. Dans un premier temps, l'effet du tétramère couronne sur la viabilité des cellules PC 12 a été mesurée. Il est apparu que pour une concentration supérieure à 50 μ M, le tétramère couronne diminuait la survie et la viabilité des cellules PC 12 ce qui est

une concentration relativement élevée. Par la suite, en utilisant cette valeur comme concentration plafond, la capacité du tétramère à inhiber la mort cellulaire induite par le peptide à une concentration de 4 μM a été estimée. Il est apparu qu'une concentration de 10 μM en tétramère couronne restaurait déjà la viabilité des cellules PC 12 en présence de 4 μM de βA et que pour une concentration de 30 μM en tétramère couronne, la viabilité des cellules PC 12 est augmentée de 36 %. Dans des conditions identiques, le resvératrol à 25 μM induit une augmentation de viabilité de 30 % [270] alors qu'un gain de seulement 10 % a été rapporté pour une concentration de 50 μM de cyanidine-3-*O*-glucoside [271].

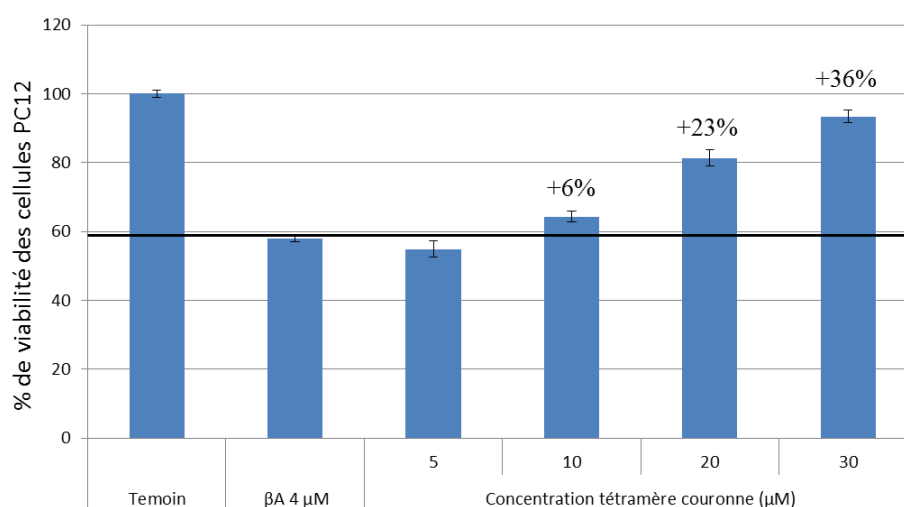


Figure 60. Pourcentage de cellules PC 12 vivantes après traitement.

IV.7 Les structures hypothétiques des autres pentamères

Concernant le pentamère 3 et les pentamères (1G) 1-5, leur purification, leurs spectres MS/MS et les spectres RMN sont indispensables pour élucider leurs structures exactes. Toutes ces données n'ont pas pu être acquises à cause du temps limité de la thèse. Néanmoins, leurs propriétés proches des tétramères et pentamères couronnes nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'ils ont tous une configuration couronne.

Les pentamères (1G) 1-4 (**Tableau 17**) ayant tous comme formule brute $\text{C}_{75}\text{H}_{60}\text{O}_{31}$ pourraient donc être des pentamères couronnes dont l'une des unités serait l'(épi)gallocatéchine. La différence entre ces quatre isomères étant simplement la position de l'unité (épi)gallocatéchine dans le cycle (**Figure 61A**). Une autre possibilité serait un motif tétramère

couronne avec l'unité d'(épi)gallocatéchine branchée sur l'une des quatre unités du tétramère couronne (**Figure 61B**).

De façon similaire, le pentamère 3 et le pentamères (1G) 5 qui présentent respectivement 2Da de moins que les pentamère 1 et 2 ou les pentamères (1G) 1-4 pourraient être des tanins couronnes qui auraient en plus une liaison de type A intra-moléculaire (**Figure 61C**).

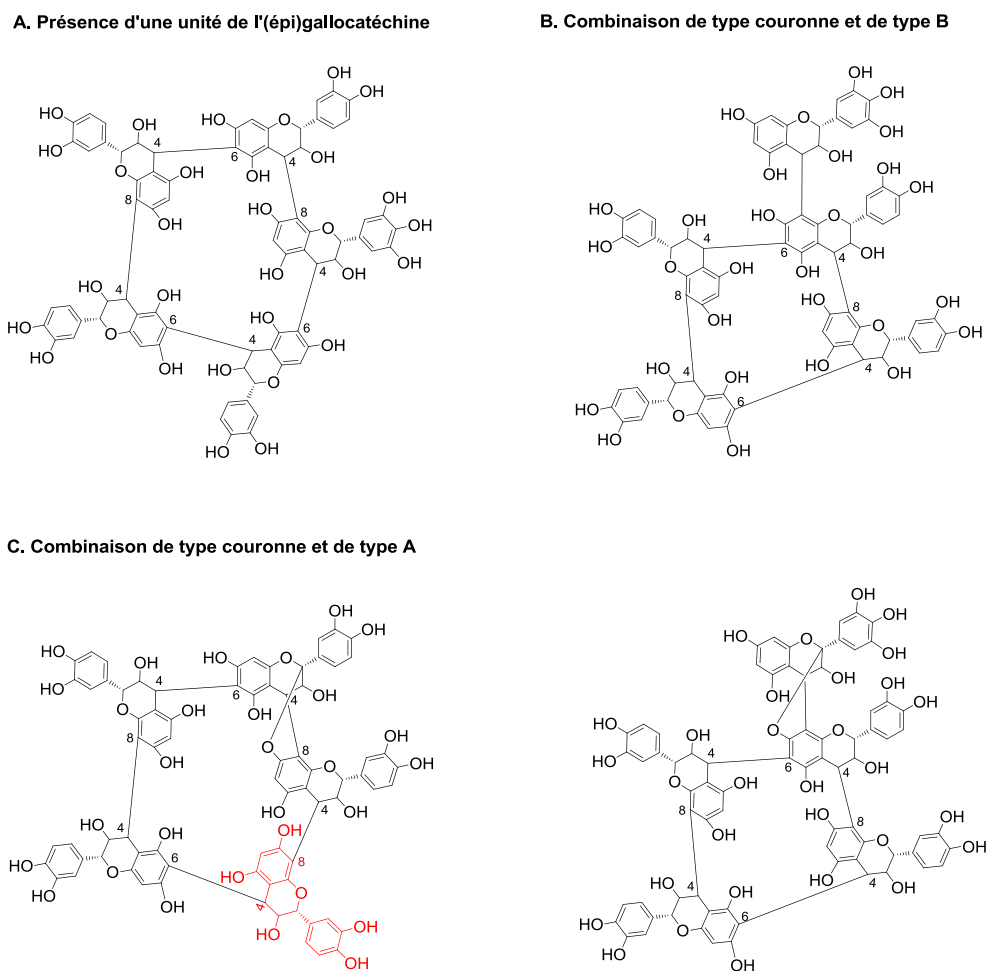


Figure 61. Les structures hypothétiques des pentamères.

IV.8 Le suivi de formation des procyanidines couronnes dans les médias acides

Pour le tétramère couronne, les résultats de RMN révèlent que les unités sont liées par deux liaisons inter-flavonoïdes C4-C8 et deux liaisons inter-flavonoïdes C4-C6 alternativement. En milieu acide, il est connu qu'une liaison de type B peut être clivée pour conduire à la

formation d'un carbocation en position C4 qui peut être attaqué par les carbones C6 et C8 d'un autre flavan-3-ol. Ainsi, une hypothèse de la formation chimique pour le tétramère couronne peut être envisagée : un polymère de procyanidine ayant un degré de polymérisation supérieur ou égal à 5 peut être clivé en milieu acide, ce qui conduit à la formation d'un tétramère avec un carbocation en position C4 terminale. Ce carbocation pourrait alors subir une attaque nucléophile intra-moléculaire des carbones C6 ou C8 à partir de l'unité supérieure qui est spatialement proche de ce carbocation et ainsi fermer le cycle.

Pour vérifier cette hypothèse, une héli-synthèse qualitative a été réalisée dans trois milieux acides différents : un milieu modèle de vin à pH de 3,5; deux solutions aqueuses à pH 2,6 et pH 1,0. Les trois fractions de tanins utilisées étaient deux extraits de pépins et un extrait de pellicule fractionnés et pré-purifiés contenant seulement des tanins de type B.

Tout d'abord, l'absence de procyanidines couronnes dans les fractions utilisées a été vérifiée par HRMS. Le suivi de l'évolution des milieux réactionnels a été effectué chaque semaine pour tous les échantillons jusqu'à 10 semaines sur le système UPLC-DAD-Q-TOF. Comme montré dans le **Tableau 20**, les procyanidines couronnes peuvent être formées en milieu acide mais différentes vitesses et cinétiques de formation ont été observées entre les différents milieux utilisés et les différentes fractions de tanins étudiées.

Les tanins condensés couronnes sont apparus en premier lieu dans la fraction de tanins de pellicule à partir de la première semaine d'incubation, suivis par la fraction polymérique de tanins de pépin à partir de la deuxième semaine. Le fait que les tanins de pellicule et la phase polymérique des tanins de pépin ont des DPm plus élevés, peut expliquer ces différences de vitesse de formation. Un DPm plus élevé induit statistiquement une plus grande possibilité d'apparition d'un tétramère formé par le clivage de liaison inter-flavonoïdes et ayant un carbocation en position C4. De plus, la condition d'acidité plus élevée facilite la formation de ces procyanidines couronnes puisque l'acidité du milieu est le paramètre catalysant du clivage des liaisons inter-flavonoïdes. Enfin, le tétramère couronne montre plus de facilités à être formé que le pentamère dans ces milieux : ayant des concentrations toujours plus élevées que les pentamères, la formation du tétramère couronne a continué jusqu'à la dixième semaine alors que la concentration la plus élevée observée pour les pentamères se situait au bout de la troisième semaine d'incubation.

Tableau 20. Le suivi de formation des tanins condensés couronnes dans les milieux acides. ('-' : absent ; '○' : observé mais très faible ; '+' : présent ; '++' : le plus concentré ; '*' : non analysé)

TÉTAMÈRE COURONNE								PENTAMÈRES COURONNES											
Fraction		pH	Semaine							Fraction		pH	Semaine						
			0	1	2	3	4	5	10				0	1	2	3	4	5	10
Pépin	Mono-oligomérique	1,0	-	-	-	○	+	+	+	Pépin	Mono-oligomérique	1,0	-	-	-	○	○	+	+
		2,6	-	-	-	-	○	○	+			2,6	-	-	-	○	○	○	○
		3,5	-	-	-	-	-	-	○			3,5	-	-	-	-	-	-	-
	Polymérique	1,0	-	○	○	+	+	+	+		Polymérique	1,0	-	-	-	○	○	-	-
		2,6	-	-	-	○	○	+	+			2,6	-	-	-	○	○	-	-
		3,5	-	-	-	-	-	-	○			3,5	-	-	-	-	-	-	-
Pellicule	1,0	-	+	+	+	*	*	++	Pellicule	1,0	-	+	+	++	*	*	+		
	2,6	-	+	+	+	*	*	+		2,6	-	+	+	+	*	*	○		
	3,5	-	○	+	+	*	*	+		3,5	-	○	○	○	*	*	-		

En solution modèle du vin (pH = 3,5), la formation des procyanidines couronnes a été beaucoup plus difficile que dans les deux autres milieux avec des acidités plus basses. Néanmoins, la formation de tétramère et pentamère couronne a été observée à partir de la fraction de tanins de pellicule dès la deuxième semaine de réaction. Même si la solution modèle du vin n'est pas le milieu le plus idéal pour la formation de ces tanins condensés couronnes, leurs formations dans ces conditions sont malgré tous possibles.

V. Le marqueur de quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène

V.1 Rappel

Comme décrit dans le **Chapitre 1 VI.3**, le problème majeur des tanins condensés liés par pont éthylidène est qu'ils interfèrent sur le calcul du DPm d'une fraction de tanins après la phloroglucinolyse. A chaque fois qu'il y a présence d'un pont éthylidène à l'intérieur d'une chaîne de tanins condensés, le clivage par catalyse acide au niveau du pont éthylidène divise cette chaîne polymérique uniquement en deux. Et les deux chaînes ainsi formées vont libérer après dépolymérisation chacune une unité terminale (**Figure 62**). Ainsi, le DPm de la fraction est sous-estimé par rapport à la valeur réelle.

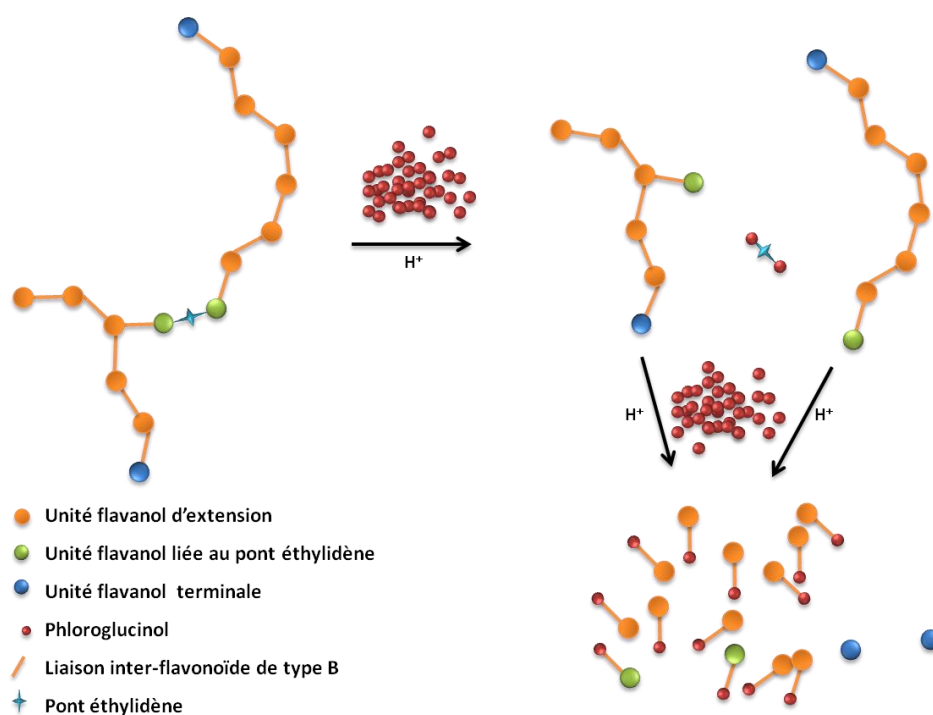


Figure 62. Démonstration de la dépolymérisation d'un tanin (DP = 15) contenant un pont éthylidène.

Le DPm avant correction est égal au nombre d'unités total divisé par le nombre d'unités terminales :

$$DPm = \frac{\sum U.T. + \sum U.E.}{\sum U.T.}$$

Alors qu'en réalité, le DPm réel est plus élevé. La formule pour le calcul avec la correction doit être la suivante :

$$DPm = \frac{\sum U.T. + \sum U.E.}{\sum U.T. - C_{EDP}}$$

En conclusion, la quantification d'EDP libéré après la phloroglucinyse est important dans l'objectif de mieux estimer le DPm d'une fraction de tanins. Due à sa faible concentration dans la fraction dépolymérisée, la détection et la quantification d'EDP sont difficiles avec un détecteur UV ou par la MS avec étalon interne. Une méthode plus sensible et plus sélective est demandée pour accomplir cette correction.

V.2 Le marqueur 2,2'-éthylidènediphloroglucinol

La **Figure 63** porte sur un échantillon de vin rouge de 2 ans après phloroglucinyse. Identifiés par la MS, les produits dérivés classiques comme la (+)-catéchine, l'épicatéchine, l'adduit phloroglucinol de l'épigallocatechine, de la (+)-catéchine, de l'(-)-épicatéchine et de l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate ont été observés.

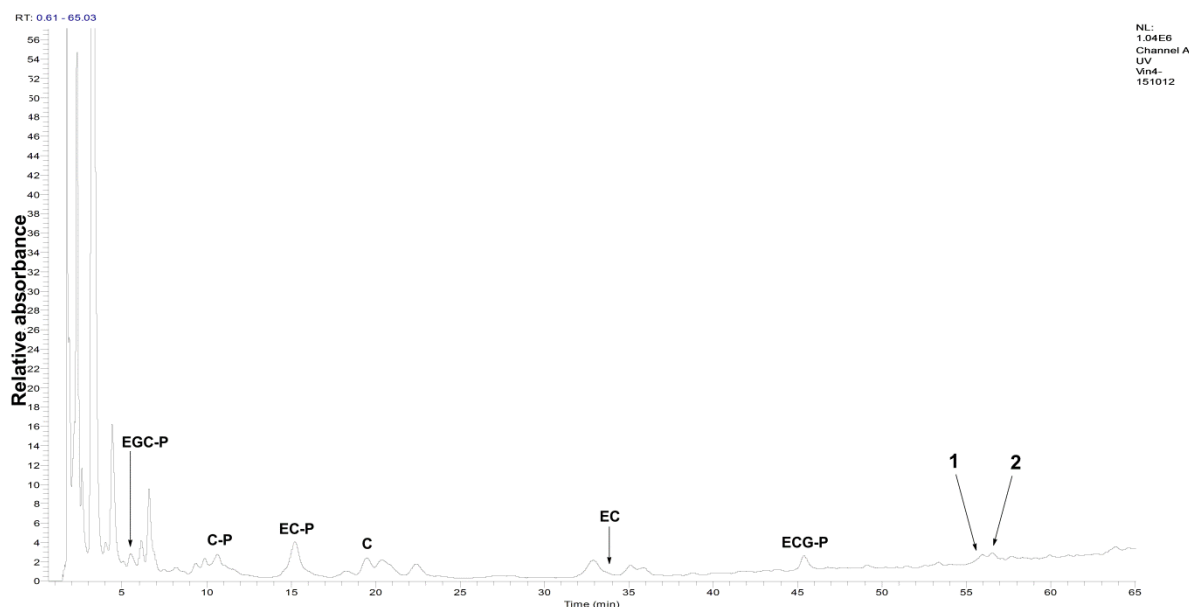


Figure 63. Le chromatogramme d'absorption UV à 280 nm des produits de phloroglucinyse d'un vin rouge.

Vers la fin de l'élution, deux pics d'absorption inconnue ont été notés avec comme ion moléculaire $m/z = 277$ et $m/z = 263$ en mode négatif. Effectivement, le composé 1 sur la **Figure 63** ayant un $m/z = 277$ correspond au 2,2'-éthylidènediphloroglucinol (EDP) préalablement présenté dans la partie bibliographique (**Chapitre 1 VI.3**), qui est le marqueur de quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène. Et le composé 2 sur la **Figure 63** ayant un $m/z = 263$ correspond au méthylidènediphloroglucinol (MDP) (**Figure 64**). Le 2,2'-méthylidènediphloroglucinol est un artéfact formé durant la phloroglucinolyse par réaction entre le phloroglucinol et la trace de formaldéhyde présente dans le solvant utilisé : le méthanol. Ceci a notamment été montré en utilisant de l'éthanol comme solvant à la place du méthanol : la formation de MDP n'était plus observée, cela confirme donc cette hypothèse.



Figure 64. Le 2,2'-éthylidènediphloroglucinol et le 2,2'-méthylidènediphloroglucinol.

Les synthèses d'EDP et de MDP ont été effectuées en présence de phloroglucinol et, soit de l'acétaldéhyde, soit du formaldéhyde. Les produits formés ont les mêmes temps de rétention que les deux composés observés dans le vin rouge après la phloroglucinolyse, ce qui confirme encore leurs identités (**Figure 65**).

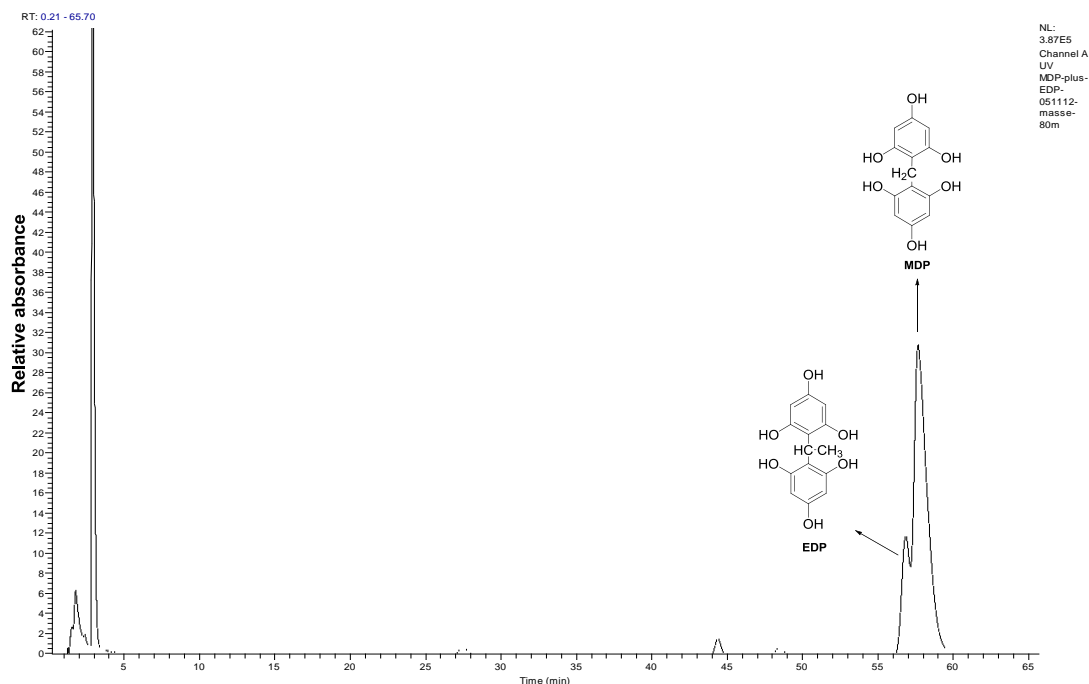


Figure 65. Une fraction contenant de l'EDP et du MDP synthétisés.

V.3 La synthèse de 2,2'-éthylidènediphloroglucinol et sa purification

Afin de quantifier les ponts éthylidènes présents dans les structures de tanins condensés, la synthèse et la purification du marqueur EDP ont été réalisées. Avec la méthode décrite dans le **Chapitre 2 III.1**, une poudre contenant 60 % d'EDP a été obtenue.

Durant la purification, la fragilité de l'EDP a été observée, notamment pendant l'évaporation et la lyophilisation. Pour palier ce problème de fragilité, le protocole a été modifié : ajout d'eau dans la fraction de 40 % méthanol pour diluer la concentration, baisse de température de bain-marie à 25 °C, et l'emploi immédiat du produit après lyophilisation ont été adaptés.

V.4 La détection de 2,2'-éthylidènediphloroglucinol par fluorescence

Due à la faible concentration, la détection et la quantification d'EDP est difficile avec un détecteur UV ou par la MS avec étalon interne. Une méthode plus sensible et sélective avec un détecteur de fluorescence pour la détection et la quantification d'EDP et des autres produits de phloroglucinolyse a été développée.

Dans un premier temps, le spectre d'absorption en UV d'EDP a été obtenu (**Figure 66**) : l'EDP a une absorption maximale à 240 nm. Ainsi, la longueur d'onde d'excitation à 240 nm a été fixée pour ensuite effectuer un balayage de longueur d'onde d'émission avec le détecteur de fluorescence. La gamme de balayage de longueur d'onde d'émission a été fixée de 260 à 650 nm.

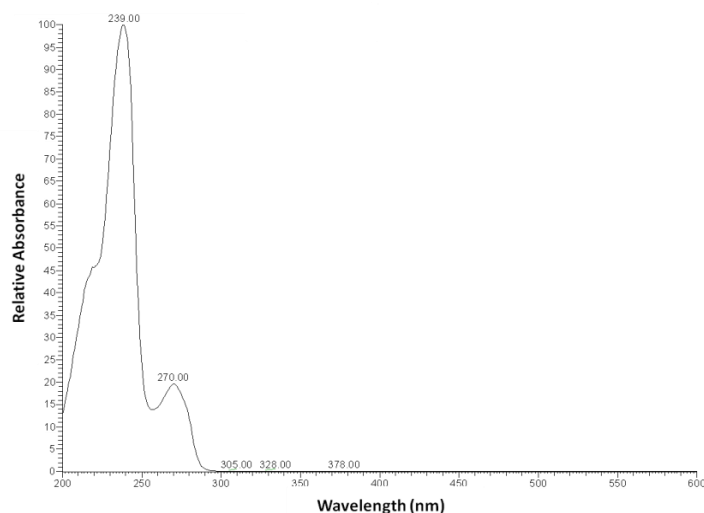
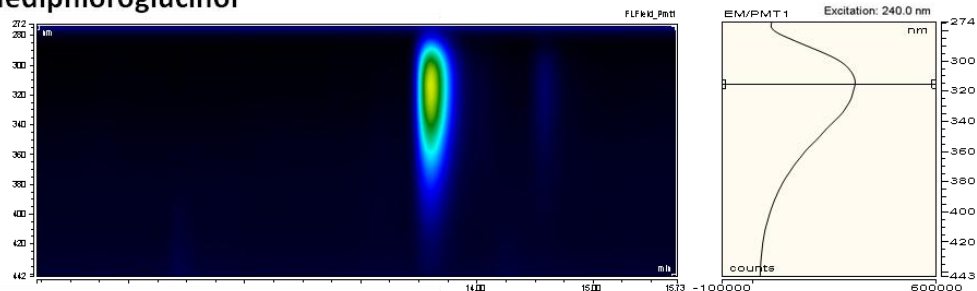
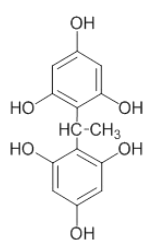


Figure 66. L'EDP a une absorption maximale à 240 nm.

Comme montré à la **Figure 67A**, la longueur d'onde d'émission maximale de l'EDP a été enregistrée à 315 nm. Ceci montre donc que l'EDP peut être détecté et quantifié par la fluorescence en utilisant 240 nm comme longueur d'onde d'excitation et 315 nm comme longueur d'onde d'émission. De même, il a été observé que tous les produits classiques de la phloroglucinyse ont une réponse en fluorescence. Un exemple de l'(-)-épicatéchine-phloroglucinol qui a une longueur d'onde d'émission maximale également à 315 nm avec longueur d'onde d'excitation à 240 nm est donné à la **Figure 67B**.

A. 2,2'-éthylidènediphloroglucinol



B. (-)-épicatéchine-phloroglucinol

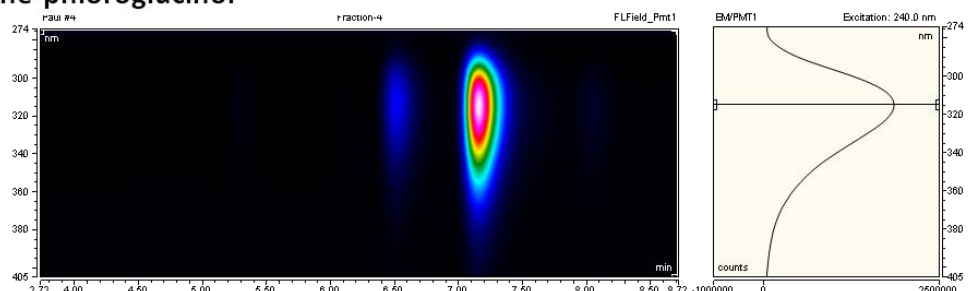
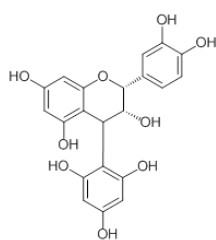


Figure 67. Les spectres d'émission de l'EDP (A) et de l'EC-phloro (B) avec la longueur d'onde d'excitation à 240 nm.

La détection d'EDP par la fluorescence a été comparée à sa détection par UV (**Tableau 21**). Il apparaît que la limite de détection et la limite de quantification sont 80 fois plus faibles par fluorescence par rapport à une détection UV classique.

Tableau 21. La détection d'EDP par fluorescence a une meilleure sensibilité par rapport au détecteur UV.

Détecteur	λ	L_d (mg/L)	L_q (mg/L)
UV	λ_{Ab} : 280 nm	8,75	29,15
Fluorescence	λ_{Ex} : 240 nm λ_{Em} : 315 nm	0,108	0,36

Enfin, les longueurs d'onde d'excitation et les longueurs d'onde d'émission des produits de phloroglucinolyse ont été établies, elles sont montrées dans le **Tableau 22**. La plupart des composés partagent la paire de λ_{Ex} à 240 nm et λ_{Em} à 315 nm à part l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate et son adduit phloroglucinol qui ont des λ_{Ex} à 270 nm et λ_{Em} à 377 nm. De plus, dues aux différentes concentrations des produits de phloroglucinolyse, leurs sensibilités de détection par la fluorescence ont également été optimisées qui varient des niveaux 2 à 8.

Tableau 22. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des produits de phloroglucinyse.

Composé	λ_{Ex}	λ_{Em}	Sensibilité
EGC-phloro	240 nm	315 nm	8
C-phloro	240 nm	315 nm	4
EC-phloro	240 nm	315 nm	2
C	240 nm	315 nm	4
EGC	240 nm	315 nm	8
EC	240 nm	315 nm	4
ECG-phloro	270 nm	377 nm	8
ECG	270 nm	377 nm	8
EDP	240 nm	315 nm	8

Une méthode plus sensible et plus sélective avec un détecteur de fluorescence pour la détection et la quantification d'EDP et des autres produits libérés durant la phloroglucinyse a été établie. L'utilisation de longueur d'onde d'excitation (λ_{Ex} : 240 nm) et d'émission (λ_{Em} : 315 nm) appropriées a permis de diminuer la limite de détection et la limite de quantification de 80 fois par rapport aux valeurs obtenues avec un détecteur UV.

VI. Conclusion

A part les flavan-3-ols, les tanins condensés de type B et de type A, une nouvelle sous-classe de tanins condensés : «les tanins condensés couronnes» a été rapportée pour la première fois dans le vin et dans le règne végétal. Ils sont plus polaires que les tanins condensés de type B et ils sont partiellement résistants aux conditions de phloroglucinolyse. Ces tanins condensés couronnes ont comme particularité structurale d'être cycliques et d'être composés uniquement des liaisons inter-flavonoïdes de type B. Ils présentent au sein de leurs structures une cavité relativement grande et composée de quatre cycles aromatiques et de plusieurs fonctions phénols. Un premier test d'activité biologique du tétramère couronne montre une activité inhibitrice de l'agrégation du peptide β -amyloïde du même ordre de grandeur que le résveratrol.

De plus, une nouvelle méthode de quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène a été développée en utilisant le marqueur 2,2'-éthylidènediphloroglucinol (EDP) et un détecteur fluorescence. L'utilisation d'une longueur d'onde d'excitation à 240 nm et d'une longueur d'onde d'émission à 315 nm a permis de diminuer la limite de détection et la limite de quantification d'un facteur 80 par rapport aux valeurs obtenues avec une détection UV à 280 nm. Il a également été montré que cette stratégie de quantification pouvait être utilisée pour la détermination du Dpm puisque les composés dérivant des unités monomériques des tanins libérés durant la phloroglucinolyse sont détectables et quantifiables avec ce couple de longueur d'onde.

CHAPITRE 4

Les pigments du vin rouge

I. L'identification des pigments monomériques du vin rouge

I.1 Les anthocyanes

Quinze anthocyanes ont été identifiées dans du vin rouge (**Tableau 23**), comprenant les anthocyanes et leurs dérivés acétylés et *p*-coumaroylés. La malvidine-3-*O*-glucoside a été identifiée par son temps de rétention en le comparant avec un standard commercial pur ainsi que par MS et MS/MS. Les autres anthocyanes ont été ensuite uniquement confirmées par MS et MS/MS en mode positif.

Tableau 23. Les principales anthocyanes du vin rouge.

Anthocyanes	T.R.	Formule brute	m/z calculé [M] ⁺	m/z mesuré [M] ⁺	Diff (ppm)
Dp-3- <i>O</i> -glucoside	5,750	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465,1028	465,1025	-0,65
Cy-3- <i>O</i> -glucoside	6,116	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1078	449,1079	0,22
Pt-3- <i>O</i> -glucoside	6,224	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	479,1184	479,1185	0,21
Pn-3- <i>O</i> -glucoside	6,649	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463,1235	463,1235	0,00
Mv-3- <i>O</i> -glucoside	6,765	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493,1341	493,1341	0,00
Dp-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glucoside	7,364	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃	507,1133	507,1129	-0,79
Cy-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glucoside	7,747	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂	491,1184	491,1189	1,02
Pt-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glucoside	7,805	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₃	521,1290	521,1288	-0,38
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glucoside	8,155	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₃	535,1446	535,1445	-0,19
Pn-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glucoside	8,180	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₂	505,1341	505,1349	1,58
Dp-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	8,671	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	611,1395	611,1399	0,65
Cy-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	8,987	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	595,1446	595,1446	0,00
Pt-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	8,995	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	625,1552	625,1550	-0,32
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	9,178	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	639,1708	639,1704	-0,63
Pn-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	9,278	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	609,1603	609,1603	0,00

Le squelette C6-C3-C6 des anthocyanes est relativement rigide et résistant à la fragmentation. Un exemple de la malvidine-3-*O*-glucoside est montré à la **Figure 68**. Les fragmentations ont été effectuées à 20, 40 et 60 % d'énergie de collision respectivement. Jusqu'à 40 % d'énergie

de collision, l'ion $m/z = 331,0802$ correspondant à une perte de glucose (perte de 162,0528 Da, $-C_6H_{10}O_5$) qui est lié à l'oxygène en position C3 (**Figure 68A**), est toujours le fragment majoritaire (**Figure 68B**). Les intensités de fragments issus de la perte d'une des fonctions méthyle ($m/z = 315,0492$; $[C_{16}H_{11}O_7]^+ = 315,0499$, diff : -2,22 ppm) du cycle B et d'une fonction hydroxyle ($m/z = 287,0542$; $[C_{15}H_{11}O_6]^+ = 287,0550$, diff : -2,79 ppm) croissent avec l'augmentation de l'énergie de collision. Au niveau de la concentration, la malvidine-3-*O*-glucoside et ses dérivés acétylé et *p*-coumaroylé sont les plus abondants.

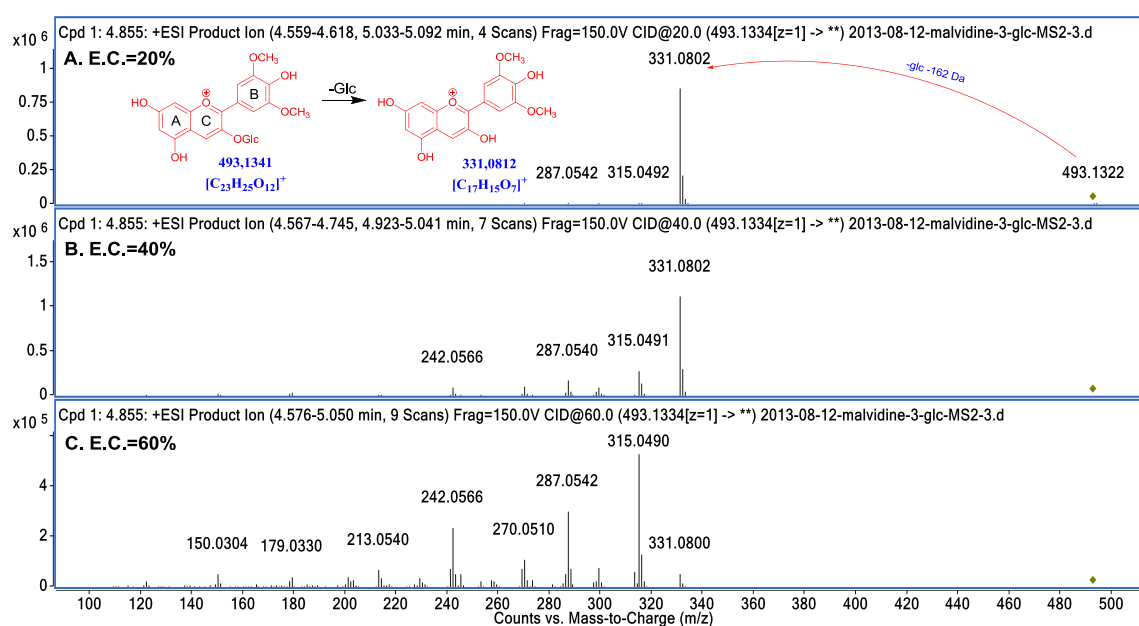


Figure 68. Les spectres de fragmentation de la malvidine-3-*O*-glucoside. A : Énergie de collision de 20 %; B : Énergie de collision de 40 %; C : Énergie de collision de 60 %.

I.2 Les pyranoanthocyanes

Les pyranoanthocyanes sont une famille de pigments aussi importante que les anthocyanes, elles sont également largement étudiées dans la littérature. Durant notre étude, 43 pyranoanthocyanes ont été identifiées dans les vins rouges analysés, y compris le type de vitisine A, de vitisine B et des produits issus de la cyclo-addition des anthocyanes avec des vinyl-phénols (le vinyl-catéchol, le vinyl-phénol et le vinyl-gaïacol) simples (**Tableau 24**).

Les pyranoanthocyanes qui ont des pics seuls et facilement distinguables dans le chromatogramme d'ion pseudo-moléculaire extrait (EIC), ont été identifiées en se basant sur leurs masses exactes et leurs analyses en MS/MS depuis l'injection directe du vin. Lorsque les

chromatogrammes d'ion pseudo-moléculaire extrait (EIC) spécifique à une pyranoanthocyane présentait plusieurs pics ayant des m/z très proches et pouvant interférer avec le pic de la pyranoanthocyane, les pyranoanthocyanes ont donc été identifiées après fractionnement du vin en SPE sur colonne TSK HW-40S qui conduit à l'obtention d'une fraction moins complexe et plus facile à analyser (**Chapitre 2 IV. 3**).

Tableau 24. Les principales pyranoanthocyanes du vin rouge.

Pyranoanthocyanes	T.R.	Formule brute	m/z calculé [M] ⁺	m/z mesuré [M] ⁺	Diff (ppm)
Type Vitisine A (-acide pyruvique)					
Pt-3- <i>O</i> -glc-acide pyruvique	7,472	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₄	547,1082	547,1083	0,18
Mv-3- <i>O</i> -glc-acide pyruvique	8,088	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₄	561,1239	561,1241	0,36
Cy-3- <i>O</i> -glc-acide pyruvique	8,513	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₃	517,0977	517,0952	-4,83
Pn-3- <i>O</i> -glc-acide pyruvique	9,120	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₃	531,1133	531,1107	-4,90
Dp-3- <i>O</i> -glc-acide pyruvique	N.D.	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄	533,0926	-	-
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-acide pyruvique	8,246	C ₂₈ H ₂₇ O ₁₅	603,1344	603,1343	-0,17
Pn-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-acide pyruvique*	9,769	C ₂₇ H ₂₅ O ₁₄	573,1239	573,1217	-3,84
Dp-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-acide pyruvique	N.D.	C ₂₆ H ₂₃ O ₁₅	575,1031	-	-
Pt-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-acide pyruvique	N.D.	C ₂₇ H ₂₅ O ₁₅	589,1188	-	-
Cy-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-acide pyruvique	N.D.	C ₂₆ H ₂₃ O ₁₄	559,1082	-	-
Dp-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-acide pyruvique*	7,830	C ₃₃ H ₂₇ O ₁₆	679,1294	679,1331	5,45
Cy-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-acide pyruvique*	8,438	C ₃₃ H ₂₇ O ₁₅	663,1344	663,1394	7,54
Pt-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-acide pyruvique	8,504	C ₃₄ H ₂₉ O ₁₆	693,1450	693,1462	1,73
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-acide pyruvique	9,045	C ₃₅ H ₃₁ O ₁₆	707,1607	707,1609	0,28
Pn-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-acide pyruvique*	9,062	C ₃₄ H ₂₉ O ₁₅	677,1501	677,1502	0,15
Type Vitisine B (-acétaldéhyde)					
Mv-3- <i>O</i> -glc-acétaldéhyde*	7,639	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	517,1341	517,1332	-1,74
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-acétaldéhyde*	7,839	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₃	559,1446	559,1436	-1,79
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-acétaldéhyde*	8,762	C ₃₄ H ₃₁ O ₁₄	663,1708	663,1666	-6,33

Type Pinotine A (-vinylcatéchol)					
Pt-3- <i>O</i> -glc-4-vinylcatéchol*	9,544	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	611,1395	611,1396	0,16
Pn-3- <i>O</i> -glc-4-vinylcatéchol*	9,852	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	595,1446	595,1436	-1,68
Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylcatéchol*	9,960	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	625,1552	625,1549	-0,48
Dp-3- <i>O</i> -glc-4-vinylcatéchol*	9,977	C ₂₉ H ₂₅ O ₁₄	597,1239	597,1233	-1,00
Pt-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylcatéchol*	9,719	C ₃₂ H ₂₉ O ₁₅	653,1501	653,1528	4,13
Pn-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylcatéchol	10,002	C ₃₂ H ₂₉ O ₁₄	637,1552	637,1577	3,92
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylcatéchol	10,119	C ₃₃ H ₃₁ O ₁₅	667,1657	667,1661	0,60
Dp-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylcatéchol	N.D.	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₅	639,1344	-	-
Pt-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylcatéchol*	9,985	C ₃₉ H ₃₃ O ₁₆	757,1763	757,1799	4,75
Pn-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylcatéchol	10,318	C ₃₉ H ₃₃ O ₁₅	741,1814	741,1796	-2,43
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylcatéchol	10,376	C ₄₀ H ₃₅ O ₁₆	771,1920	771,1907	-1,69
Dp-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylcatéchol	N.D.	C ₃₈ H ₃₁ O ₁₆	743,1607	-	-
Dp-3- <i>O</i> -glc-4-vinylphénol	9,295	C ₂₉ H ₂₅ O ₁₃	581,1290	581,1295	0,86
Pt-3- <i>O</i> -glc-4-vinylphénol*	9,852	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	595,1446	595,1436	-1,68
Pn-3- <i>O</i> -glc-4-vinylphénol*	10,160	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂	579,1497	579,1488	-1,55
Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylphénol*	10,227	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	609,1603	609,1598	-0,82
Dp-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylphénol*	9,436	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₄	623,1395	623,1433	6,10
Pt-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylphénol	10,002	C ₃₂ H ₂₉ O ₁₄	637,1552	637,1552	0,00
Pn-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylphénol*	10,343	C ₃₂ H ₂₉ O ₁₃	621,1603	621,1604	0,16
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylphénol	10,385	C ₃₃ H ₃₁ O ₁₄	651,1708	651,1700	-1,23
Dp-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylphénol	9,777	C ₃₈ H ₃₁ O ₁₅	727,1657	727,1700	5,91
Pt-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylphénol	10,318	C ₃₉ H ₃₃ O ₁₅	741,1814	741,1796	-2,43
Pn-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylphénol*	10,609	C ₃₉ H ₃₃ O ₁₄	725,1865	725,1868	0,41
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylphénol	10,643	C ₄₀ H ₃₅ O ₁₅	755,1970	755,1953	-2,25
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -cafféoyl)-glc-4-vinylphénol	10,376	C ₄₀ H ₃₅ O ₁₆	771,1920	771,1907	-1,69
Dp-3- <i>O</i> -glc-4-vinylguaïacol*	9,544	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	611,1395	611,1389	-0,98
Pt-3- <i>O</i> -glc-4-vinylguaïacol*	9,960	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	625,1552	625,1548	-0,64
Pn-3- <i>O</i> -glc-4-vinylguaïacol*	10,227	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	609,1603	609,1601	-0,33
Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylguaïacol*	10,310	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	639,1708	639,1697	-1,72
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acétyl)-glc-4-vinylguaïacol*	10,468	C ₃₄ H ₃₃ O ₁₅	681,1814	681,1797	-2,50
Mv-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glc-4-vinylguaïacol*	10,693	C ₄₁ H ₃₇ O ₁₆	785,2076	785,2057	-2,42

N.D. : Non Détecté ;

*Composés identifiés à l'aide du fractionnement sur TSK-40S.

La fragmentation des pyranoanthocyanes est difficile dû au fait que leur structure est plane et que les quatre cycles aromatiques sont totalement conjugués entre eux. Un exemple de la fragmentation de la vitisine A est donné à la **Figure 69A**. Le seul fragment majoritaire obtenu correspond à une perte de l'unité glucose (perte de 162,0528 Da, -C₆H₁₀O₅) à 399,0707

($[C_{20}H_{15}O_9]^+ = 399,0711$, diff : -1,00 ppm). Une fragmentation identique a été observée pour les vitisines A avec le glucose acétylé (perte de 204,0634 Da, $-C_8H_{12}O_6$) (**Figure 69B**) ou *p*-coumaroylé (perte de 308,0896 Da, $-C_{15}H_{16}O_7$) (**Figure 69C**).

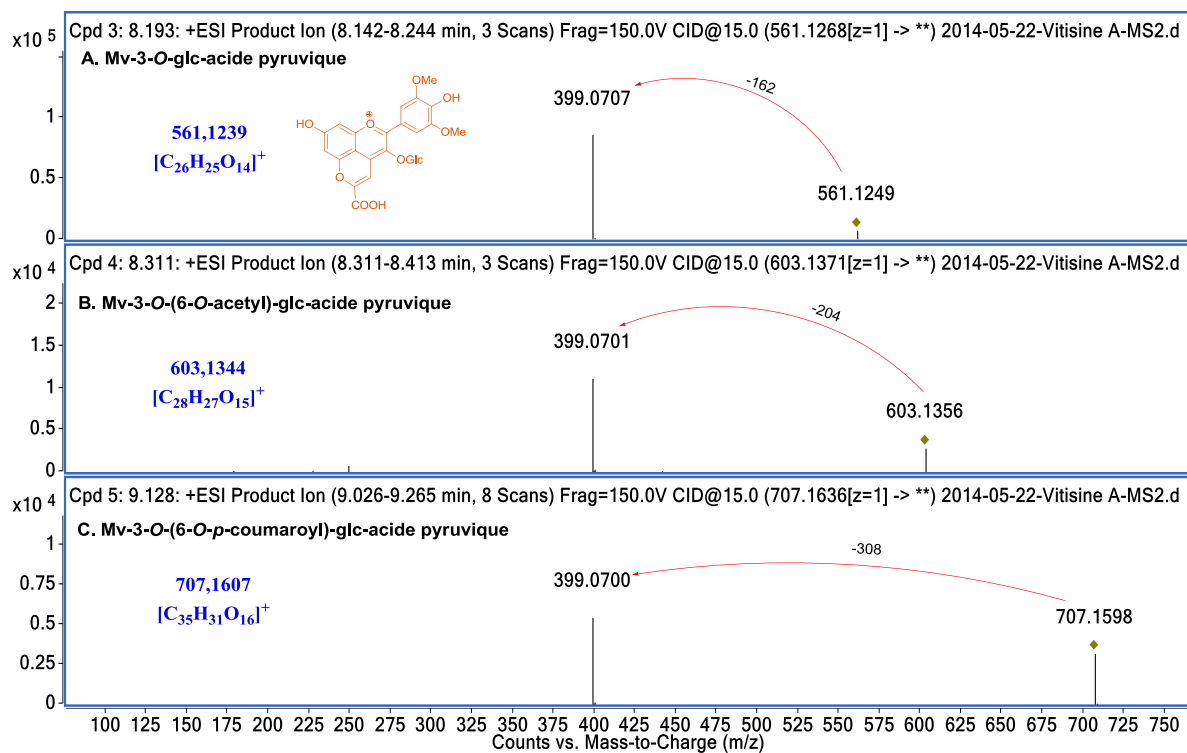


Figure 69. Les spectres de fragmentation des vitisines A. A : Mv-3-O-glc-acide pyruvique; B : Mv-3-O-(6-O-acétyl)-glc-acide pyruvique; C : Mv-3-O-(6-O-p-coumaroyl)-glc-acide pyruvique.

II. L'identification des pigments polymérisés du vin rouge et leurs marqueurs

II.1 Résumé des pigments polymérisés

Durant notre étude sur l'identification des pigments polymérisés du vin rouge et leurs marqueurs de quantification, 54 composés ont été identifiés, comprenant les familles de condensation directe et indirecte, des anthocyanes oligomères et des flavano-pyranoanthocyanes. Le **Tableau 25** récapitule les composés identifiés et numérotés ('P1' signifiant 'Pigment 1'). Les détails de leurs identifications en utilisant la technique MS/MS sont présentés dans les parties suivantes **II.2-II.8**.

La malvidine-3-*O*-glucoside est l'anthocyane la plus abondante dans le vin rouge. C'est pour cette raison que la malvidine-3-*O*-glucoside et ses dérivés acylés sont les anthocyanes majoritairement impliqués dans les structures de pigments polymérisés identifiés. Les unités de base de flavan-3-ols impliquées sont la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine. L'identification des pigments polymérisés avec d'autres unités d'anthocyanes et flavan-3-ols sera la suite de ce travail.

Tableau 25. Des pigments polymérisés et leurs marqueurs de quantification identifiés dans du vin rouge.

No.	Composé	Formule [M] ⁺ ou [M+H] ⁺	m/z calculé	T.R. (min)	m/z mesuré	Diff (ppm)
P1	EC-Mv-(3- <i>O</i> -glc)	[C ₃₈ H ₃₇ O ₁₈] ⁺	781,1974	4,720	781,1965	-1,15
P2	C-Mv-(3- <i>O</i> -glc)			5,404	781,1966	-1,02
P3	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-C/EC	[C ₃₈ H ₃₇ O ₁₈] ⁺	781,1974	6,679	781,1986	1,54
P4				7,172	781,1981	0,90
P5	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-C(type A)	[C ₃₈ H ₃₈ O ₁₈ +H] ⁺	783,2131	6,690	783,2130	-0,13
P6	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-EC(type A)			7,514	783,2122	-1,15
P7	C/EC-[Mv-(3- <i>O</i> -glc)-C/EC(type A)]	[C ₅₃ H ₅₀ O ₂₄ +H] ⁺	1071,2765	4,923	1071,2770	0,47
P8				5,597	1071,2781	1,49
P9	[Mv-(3- <i>O</i> -glc)-C/EC(type A)]-C/EC	[C ₅₃ H ₅₀ O ₂₄ +H] ⁺	1071,2765	5,846	1071,2764	-0,09
P10				6,487	1071,2775	0,93
P11	[Mv-(3- <i>O</i> -glc)-C/EC(type A)]- phloroglucinol	[C ₄₄ H ₄₂ O ₂₁ +H] ⁺	907,2291	5,490	907,2269	-2,42
P12				5,648	907,2302	1,21
P13	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-pont éthylidène-C/EC	[C ₄₀ H ₄₁ O ₁₈] ⁺	809,2287	7,839	809,2169	-14,58*
P14				7,980	809,2278	-1,11
P15				8,263	809,2283	-0,49
P16	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-pont éthylidène- C/EC-phloroglucinol	[C ₄₆ H ₄₅ O ₂₁] ⁺	933,2448	8,396	809,2280	-0,87
P17				7,562	933,2457	0,96
P18				7,845	933,2449	0,11

P19				8,053	933,2459	1,18
P20	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-pont éthylidène- C/EC-C/EC	[C ₅₃ H ₅₃ O ₂₄] ⁺	1097,2920	7,447	1097,2893	-2,46
P21	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-pont éthylidène- Mv- (3- <i>O</i> -glc)	[C ₄₈ H ₅₁ O ₂₄] ⁺	1011,2765	9,536	1011,2783	1,78
P22				11,209	1011,2787	2,18
P23	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-pont éthylidène- Mv- (3- <i>O</i> -glc-acétylé)	[C ₅₀ H ₅₃ O ₂₅] ⁺	1053,2870	10,634	1053,2831	-3,70
P24				12,057	1053,2850	-1,90
P25	Mv-(3- <i>O</i> -glc-acétylé)-pont éthylidène- Mv-(3- <i>O</i> -glc-acétylé)	[C ₅₂ H ₅₅ O ₂₆] ⁺	1095,2976	11,028	1095,2972	-0,37
P26				12,886	1095,2963	-1,19
P27				10,646	1301,3482	-5,61
P28				11,577	1301,3495	-4,61
P29	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-pont éthylidène-[Mv- (3- <i>O</i> -glc)-C/EC]	[C ₆₃ H ₆₅ O ₃₀] ⁺	1301,3555	12,493	1301,3498	-4,38
P30				13,159	1301,3454	-7,76
P31				13,808	1301,3479	-5,84
P32				4,984	985,2548	-6,09
P33				5,725	985,2561	-4,77
P34	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-Mv-(3- <i>O</i> -glc)	[C ₄₆ H ₄₉ O ₂₄] ⁺	985,2608	6,374	985,2530	-7,92
P35				7,289	985,2557	-5,18
P36				8,363	985,2568	-4,06
P37	C/EC-Mv-(3- <i>O</i> -glc)-Mv-(3- <i>O</i> -glc)	[C ₆₁ H ₆₁ O ₃₀] ⁺	1273,3242	5,205	1273,3150	-7,23
P38	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-Mv-(3- <i>O</i> -glc)-Mv-(3- <i>O</i> -glc)	[C ₆₉ H ₇₃ O ₃₆] ⁺	1477,3876	5,109	1477,3839	-2,50
P39				5,384	1519,3887	-6,25
P40				5,833	1519,3967	-0,99
P41	Mv-(3- <i>O</i> -glc)-Mv-(3- <i>O</i> -glc)-Mv-(3- <i>O</i> -glc-acétylé)	[C ₇₁ H ₇₅ O ₃₇] ⁺	1519,3982	5,991	1519,3849	-8,75
P42	PyranoMv-(3- <i>O</i> -glc)-C/EC	[C ₄₀ H ₃₇ O ₁₈] ⁺	805,1974	9,336	805,1973	-0,12
P43				9,886	805,1969	-0,62
P44	PyranoMv-(3- <i>O</i> -glc-acétylé)-C/EC	[C ₄₂ H ₃₉ O ₁₉] ⁺	847,2080	9,611	847,2071	-1,06
P45				9,819	847,2082	0,24
P46	PyranoMv-(3- <i>O</i> -glc- <i>p</i> -coumaroylé)- C/EC	[C ₄₉ H ₄₃ O ₂₀] ⁺	951,2342	9,769	951,2331	-1,16
P47	PyranoMv-(3- <i>O</i> -glc)-C/EC-C/EC	[C ₅₅ H ₄₉ O ₂₄] ⁺	1093,2610	7,353	1093,2607	-0,27
P48				7,436	1093,2616	0,55
P49	PyranoMv-(3- <i>O</i> -glc-acétylé)-C/EC- C/EC	[C ₅₇ H ₅₁ O ₂₅] ⁺	1135,2714	7,561	1135,2719	0,44
P50				7,644	1135,2718	0,35
P51				8,468	1239,2979	0,24
P52	PyranoMv-(3- <i>O</i> -glc- <i>p</i> -coumaroylé)- C/EC-C/EC	[C ₆₄ H ₅₅ O ₂₆] ⁺	1239,2976	8,468	1239,2976	0,24
P53				8,468	1239,2976	0,24
P54				8,468	1239,2976	0,24

*Cette valeur de différence en ppm élevée est due à la faible concentration de ce composé.

II.2 La distinction entre les adduits A⁺-F et les adduits F-A⁺

Après injection directe du vin rouge jeune (après uniquement 10 mois d'élevage en barrique) sur le système UPLC-UV-ESI-Q-TOF, lorsque le m/z calculé de l'adduit malvidine-3-O-glucoside-(épi)catéchine ([C₃₈H₃₇O₁₈]⁺) à 781,1974 a été extrait, quatre pics ont été distingués (**Annexe 9**). Ces quatre ions peuvent être soit l'adduit F-A⁺, soit l'adduit A⁺-F, des fragmentations MS/MS ont été réalisées pour leur identification.

Les adduits F-A⁺ ont déjà été synthétisés et caractérisés par Salas *et al.* [157]. En utilisant une fragmentation MS³, ils proposaient les pertes successives du glucose de l'unité d'anthocyane (perte de 162 Da, -C₆H₁₀O₅) suivie par la perte du cycle A de l'unité flavan-3-ol (perte de 126 Da, -C₆H₆O₃) par une fragmentation de type HRF, ce qui conduit à l'obtention d'un fragment de m/z = 493. Ce fragment peut également venir du clivage de la liaison entre l'unité flavan-3-ol et malvidine-3-O-glucoside conduisant à la libération de malvidine-3-O-glucoside (m/z = 493). Pour confirmer l'origine de cet ion à m/z = 493, ils ont donc effectué une fragmentation de l'ion m/z = 619 en MS³. Cette fragmentation conduit à la formation du fragment 493 et prouve que la fonction glucose était déjà perdue lors de la première fragmentation et donc que ce fragment à 493 ne pouvait pas être la malvidine-3-O-glucoside. Ces fragmentations successives ont permis de montrer que l'unité flavan-3-ol était bien l'unité supérieure.

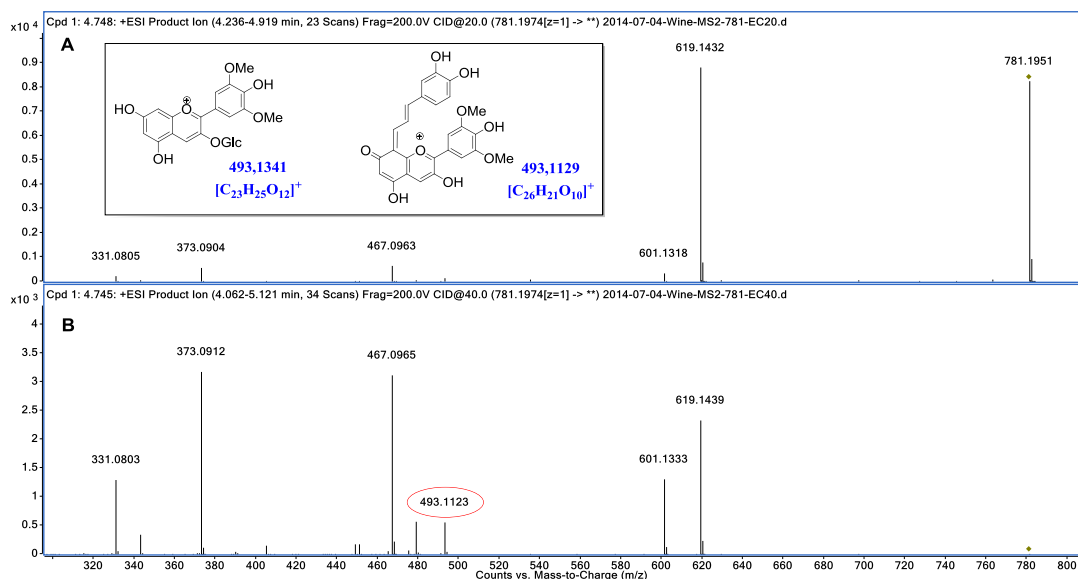


Figure 70. Les spectres de fragmentation des adduits (épi)catéchine-malvidine-3-O-glucoside à 20 % (A) et 40 % (B) d'énergie de collision.

Avec la spectrométrie de masse haute résolution, l'identification des adduits F-A⁺ peut être faite simplement et directement en MS² grâce au fragment à 493 au lieu d'une fragmentation en MS³ comme indiqué précédemment. En fait, ce fragment peut avoir deux origines : soit les pertes successives du glucose de l'unité d'anthocyane (perte de 162,0528 Da, -C₆H₁₀O₅), suivie par la perte du cycle A de l'unité flavan-3-ol (perte de 126,0317 Da, -C₆H₆O₃) qui conduit à un fragment à 493,1129 ([C₂₆H₂₁O₁₀]⁺), soit une perte d'unité flavanol conduisant à un fragment de malvidine-3-O-glucoside ([C₂₃H₂₅O₁₂]⁺ = 493,1341). Ainsi, les adduits F-A⁺ (composé P1 et P2) ont été identifiés uniquement en MS² grâce à la présence du fragment à 493,1123 ([C₂₆H₂₁O₁₀]⁺ = 493,1129, diff : 1,22 ppm). Avec l'énergie de collision de 40 %, l'intensité de ce fragment a été plus importante qu'avec une énergie de collision de 20 % (**Figure 70**). L'identification des adduits F-A⁺ a donc été simplifiée avec l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution, les détails de la fragmentation des adduits F-A⁺ (composé P1 et P2) sont montrés à la **Figure 71**. A part le fragment à 493,1123, un fragment issu de la perte de glucose à 619,1439 ([C₃₂H₂₇O₁₃]⁺ = 619,1446, diff : -1,13 ppm), un fragment issu de la fission HFR de l'unité flavanol à 467,0965 ([C₂₄H₁₉O₁₀]⁺ = 467,0973, diff : -1,71 ppm), et un fragment résultant de la fission du cycle C de l'unité flavanol à 373,0912 ([C₁₉H₁₇O₈]⁺ = 373,0918, diff : -1,61 ppm) ont également été observés ainsi que celui résultant du clivage de la liaison entre l'unité flavan-3-ol et malvidine-3-O-glucoside conduisant au fragment à 331,0805 ([C₁₇H₁₅O₇]⁺ = 331,0812, diff : -2,11 ppm).

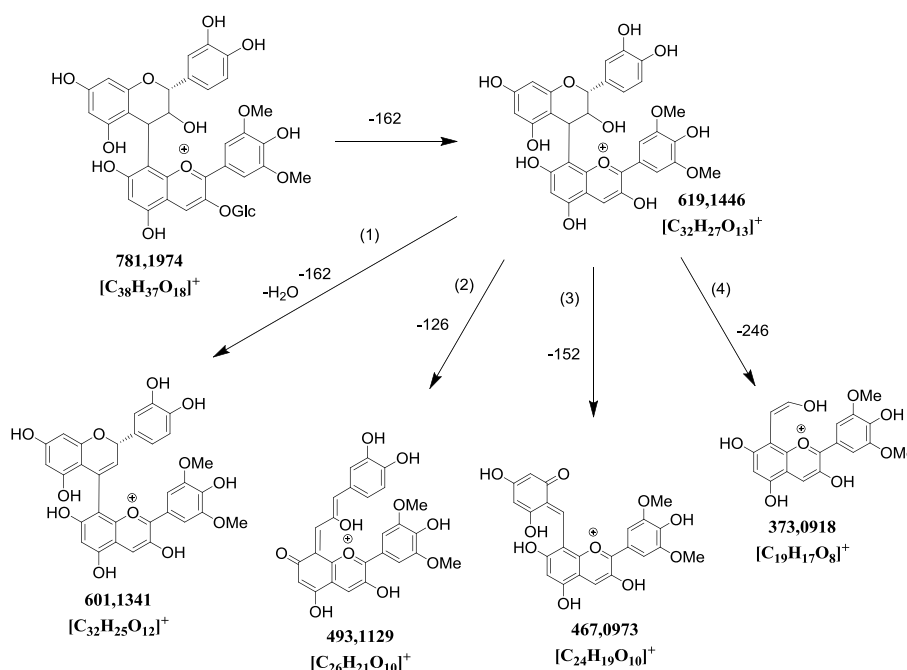
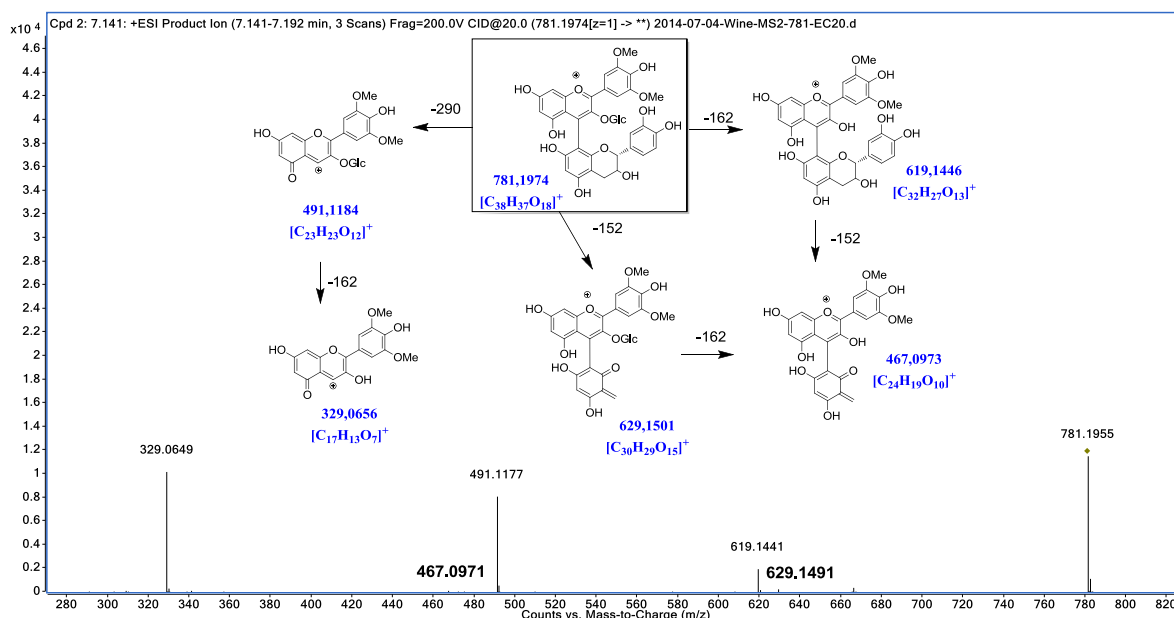


Figure 71. Les voies de fragmentation des adduits (épi)catéchine-malvidine-3-O-glucoside.

De plus, la synthèse de l'adduit C-Mv⁺ que nous avons réalisée a montré le même résultat que ceux de Salas *et al.* [157], ce qui nous a permis d'attribuer l'adduit C-Mv⁺ au composé P2. Par conséquent, nous en avons déduit que le composé P1 devait être l'adduit EC-Mv⁺.

Les deux autres ions détectés avec une formule brute de [C₃₈H₃₇O₁₈]⁺ (le composé P3 et P4) ont des spectres de fragmentation complètement différents par rapport aux adduits F-A⁺ (**Figure 72**). Notamment le fragment à m/z 491,1177 ([C₂₃H₂₃O₁₂]⁺ = 491,1184, diff : -1,43 ppm) correspondant à la perte de l'unité flavan-3-ol (perte de 290,0790, Da, -C₁₅H₁₄O₆) a été observé. Comme mentionné dans le **Chapitre 3 II.1**, dans le cas des procyanidines dimères, le clivage de la liaison inter-flavonoïde (C4-C8/C6) génère deux types d'ions fragments. L'un est une quinone conjuguée dérivant de l'unité flavan-3-ol supérieure induisant une perte de 290 Da et l'autre est une unité flavan-3-ol protonée induisant une perte de 288 Da dérivant de l'unité inférieure [264]. Ainsi, la perte de 290 Da indique que le fragment de flavanol est situé comme unité inférieure. Deux autres fragments majoritaires à 619,1441 ([C₃₂H₂₇O₁₃]⁺ = 619,1446, diff : -0,83 ppm) correspondant à la perte d'unité glucose, et à 329,0649 ([C₁₇H₁₃O₇]⁺ = 329,0656, diff : -2,13 ppm) correspondant à l'unité malvidine ont été également observés.



La fragmentation des A⁺-F dimères utilisant un spectromètre de masse de basse résolution a déjà été rapportée [272]. Dans cette publication, contrairement à notre résultat, une perte de 288 Da a été observée, l'utilisation d'une source d'ionisation avec une géométrie différente ainsi que d'un analyseur différent pourrait être à l'origine de cette différence.

II.3 L'identification des adduits A-F incolores (type A, type flavène)

Au cours de la condensation directe entre les anthocyanes et les flavan-3-ols ou les tanins condensés, en plus des pigments colorés A⁺-F et F-A⁺, des structures incolores peuvent également être formées. Dans l'étude de Sánchez-Ilárduya *et al.* [174], les auteurs proposent trois types de structures incolores qui partagent la même formule moléculaire C₃₈H₃₈O₁₈ ([C₃₈H₃₈O₁₈ + H]⁺ = 783,2131), qui sont les adduits F-A(type A), F-A(flavène) et A(flavène)-F (**Figure 73**).

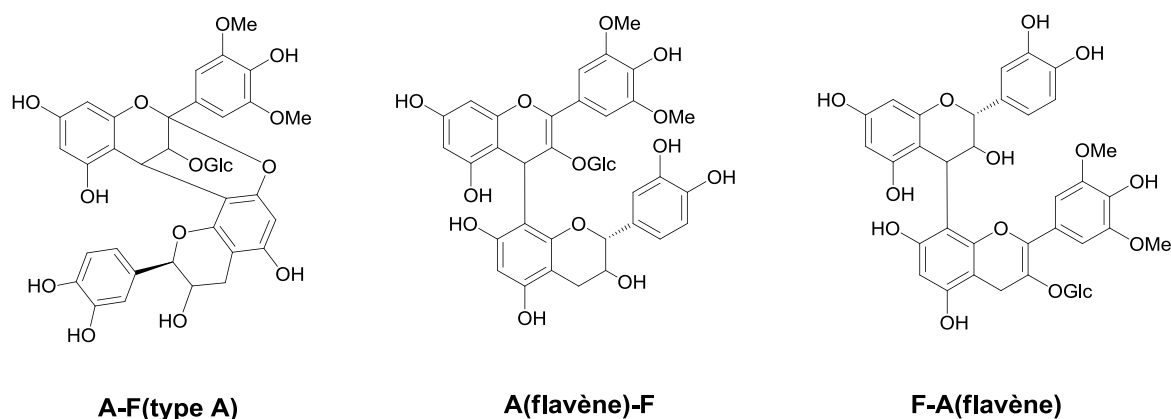


Figure 73. Les formes incolores des adduits flavano-anthocyanine de type A, de type A(flavène)-F et de type F-A(flavène).

Concernant l'adduit de type A, un produit de condensation de ce type entre la malvidine-3,5-diglucoside et la (+)-catéchine a été synthétisé et caractérisé par Bishop et Nagel en 1984 [273]. En 2003, Rémy-Tanneau *et al.* [217] ont synthétisé et caractérisé avec succès les adduits de type A de la malvidine-3-O-glucoside avec l'(-)-épicatéchine ainsi qu'avec la (+)-catéchine. En revanche, la synthèse des deux autres structures incolores proposées par Sánchez-Ilárduya *et al.* [174] n'a jamais été rapportée dans la littérature.

Lorsque le m/z calculé de ces adduits en mode positif à 783,2131 est extrait depuis un échantillon de vin rouge après injection sur le système UPLC-Q-TOF, deux pics sont distingués (composé P5 et P6, **Annexe 10**). Les fragmentations MS/MS de ces deux composés ont été ensuite réalisées pour leur identification.

Le mode de fragmentation de ces deux ions pseudo-moléculaires observés a montré le même profil que l'adduit de type A obtenu par Rémy-Tanneau *et al.* [217]. De plus, en utilisant la spectrométrie de masse haute résolution, il a été possible d'attribuer correctement les formules moléculaires aux fragments obtenus (**Figure 74A**).

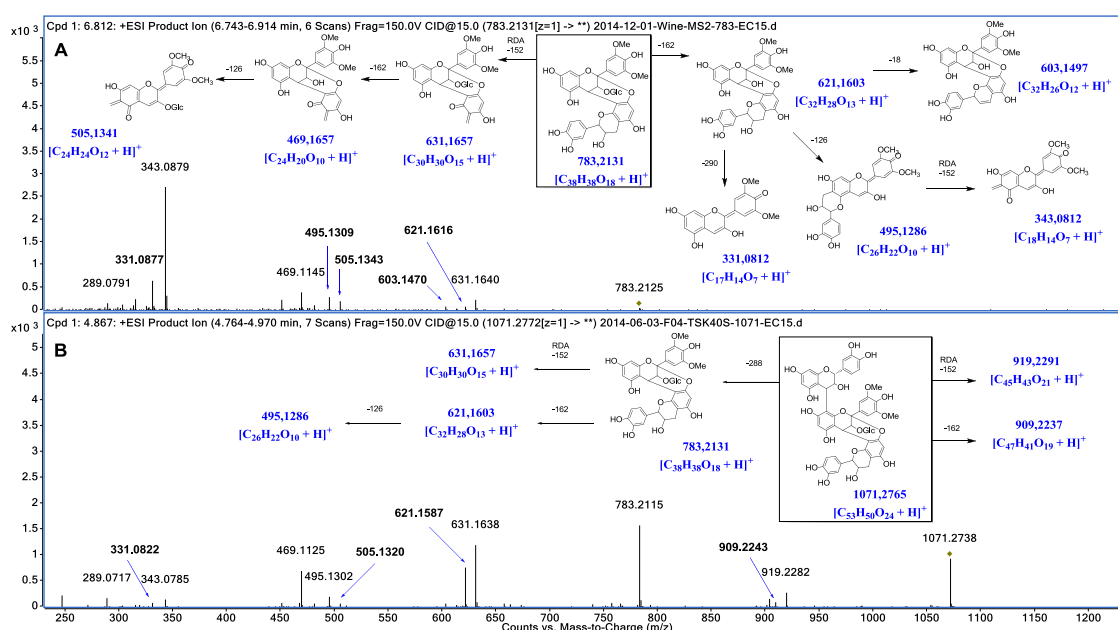


Figure 74. Les spectres et les schémas de fragmentation de la malvidine-3-O-glucoside-(épi)catéchine (type A) (A) et de l'(épi)catéchine-malvidine-3-O-glucoside-(épi)catéchine (type A) (B).

Tout d'abord, on observe la perte successive de glucose (perte de 162,0528 Da, -C₆H₁₀O₅) de l'unité anthocyane qui engendre le fragment à m/z 621,1603, suivie par la perte de cycle A de l'unité anthocyane (perte de 126,0317 Da, -C₆H₆O₃) par la fission HRF conduisant à la formation d'un ion fragment à m/z 495,1309 ([C₂₆H₂₂O₁₀+H]⁺ = 495,1286, diff : 4,65 ppm), ce qui élimine la possibilité de l'adduit A(flavène)-F. En effet, dans une telle structure d'adduit [A(flavène)-F], l'unité supérieure d'anthocyane est sous sa forme flavène ce qui exclut la possibilité d'une fission HRF de son noyau C en raison de la double liaison supplémentaire entre les carbones C2 et C3.

En outre, la perte successive de -152,0473 Da ($-C_8H_8O_3$) issu de la fission RDA du cycle C de l'unité flavan-3-ols suivi par la perte du cycle A (perte de 126,0317 Da, $-C_6H_6O_3$) par une fission HRF de l'unité anthocyanique, qui amène à la formation d'un ion fragment à m/z 505,1343 ($[C_{24}H_{24}O_{12}+H]^+ = 505,1341$, diff : 0,40 ppm) exclut également la possibilité de l'adduit F-A(flavène). En effet, selon le mécanisme de fragmentation de l'unité flavan-3-ol [206], pour pouvoir réaliser successivement la fission RDA et la fission HRF, il faut que le cycle C de chacune des unités (flavan-3-ol et anthocyanique) soit complètement saturé (cycle flavane). Or, cela n'est pas le cas de l'unité anthocyanique qui est sous la forme flavène. De plus, la formation d'un tel adduit F-A(flavène) (**Figure 73C**) n'a jamais été rapportée dans le vin et est peu susceptible de se produire, car la formation d'une telle structure exige une attaque nucléophile de l'unité anthocyanique sur le carbone C4 de l'unité de flavan-3-ol. Dans les conditions du vin, l'unité anthocyanique présente un caractère nucléophile seulement sous sa forme hémicétal hydraté, l'attaque nucléophile avec cette forme hémicétal engendrera la formation d'un dérivé de type F-A(OH). Dans ces conditions, le dérivé sera ensuite en équilibre avec la formation du pigment F-A⁺. Pour obtenir la structure F-A(flavène) depuis le dérivé F-A(OH), le groupe hydroxyle en position C4 ou C2 doit bien être désoxygéné, ce qui est peu probable dans les conditions du vin. L'autre possibilité de formation du dérivé F-A(flavène) serait l'attaque nucléophile d'un hydrure (H⁻) sur le pigment F-A⁺, ce qui est là encore peu probable dans les conditions du vin.

Ainsi, les structures de condensation de type A ont été attribuées aux deux adduits observés dans du vin rouge (composé P5 and P6). De plus, des synthèses des adduits de type A-F(type A) ont également été réalisées durant notre étude. Lorsque la (+)-catéchine est incubée avec de la malvidine-3-*O*-glucoside, la formation de composé P5 a été observée au bout d'une semaine, alors que quand l'(-)-épicatéchine est utilisée, la formation de composé P6 a été observée. Ces observations nous ont permis d'attribuer la structure Mv-C(type A) et la structure Mv-EC(type A) au composé P5 et P6 respectivement.

Dans l'étude de Sánchez-Ilárduya *et al.* [174], les auteurs ont assigné par spectrométrie de masse basse résolution, trois groupes d'isomères détectés comme des adduits A(flavène)-F, F-A(flavène) et A-F(type A) selon leurs coefficients de partages calculés. Les résultats de fragmentation ont montré le même profil pour les trois familles. Les auteurs ont hypothétiquement attribué le fragment détecté à m/z 493 au groupement anthocyane ($[C_{23}H_{25}O_{12}]^+$) issu de l'unité anthocyane sous forme de flavène. Cependant, le fragment

mineur à 493,1139 qui a été observé dans notre étude correspond à la formule de $[C_{26}H_{20}O_{10} + H]^+$ et pas la formule $[C_{23}H_{25}O_{12}]^+$. En outre, les structures des ions fragments à m/z 505 et à m/z 343 issus des adduits A(flavène)-F et des adduits F-A(flavène) n'ont pas été clarifiées par les auteurs. Une hémisynthèse de ces composés avec caractérisation structurale par RMN devra être conduite pour assigner définitivement les structures de ces adduits.

II.4 Les condensations directes de type F-A-F(type A) et A-F(type A)-F

Quatre ions obtenus en mode positif ont été distingués avec des masses très proches entre 1071,2764 et 1071,2781 et assignées à la formule moléculaire de $C_{53}H_{50}O_{24}$ (**Annexe 11**). Une telle formule moléculaire peut être un trimère contenant une unité de malvidine-3-*O*-glucoside et deux unités flavan-3-ol telles que la (+)-catéchine ou l'(-)-épicatéchine. L'analyse en MS/MS a montré que les deux premiers pics (les composés P7 et P8) partagent le même mode de fragmentation qui est différent des deux autres pics (les composés P9 et P10). Pour les deux premiers composés (P7 et P8) (**Figure 74B**), une perte de 288 Da correspondant à la perte de l'unité de flavan-3-ol comme unité supérieure a été observée tandis que pour les deux autres composés (P9 et P10) (**Figure 76B**), une perte de 290 Da correspondant à la perte de l'unité de flavan-3-ol comme unité inférieure a été observée.

En ce qui concerne les composés P7 et P8, après une perte de 288 Da conduisant à la formation d'un ion fragment à m/z 783,2115 ($[C_{38}H_{38}O_{18} + H]^+ = 783,2131$, diff : -2,04 ppm), ils partagent également le même profil de fragmentation que celui décrit précédemment pour l'adduit A-F(type A) (**Figure 74A**). Ainsi, ces deux composés présentent une structure trimérique avec l'(épi)catéchine comme unité supérieure et l'adduit A-F(type A) comme unité inférieure avec donc comme motif général F-A-F(type A) (**Figure 75A**).

En outre, après la dépolymérisation chimique en milieu acide, ces deux composés trimériques F-A-F(type A) disparaissent, cela indique la présence de l'unité flavan-3-ol comme unité supérieure. En effet, la liaison entre l'unité flavan-3-ol comme unité supérieure et l'adduit A-F(type A) comme unité inférieure est une liaison de type B classique, et peut donc être facilement clivée dans des conditions de phloroglucinyse. Ainsi, le motif A-F(type A) après dépolymérisation chimique, peut être considéré comme un marqueur de quantification de toutes les structures oligomériques et polymériques ayant l'adduit A-F(type A) comme unité

inférieure, puisqu'en condition acide, la dépolymérisation conduira à l'augmentation de la concentration de l'adduit A-F(type A).

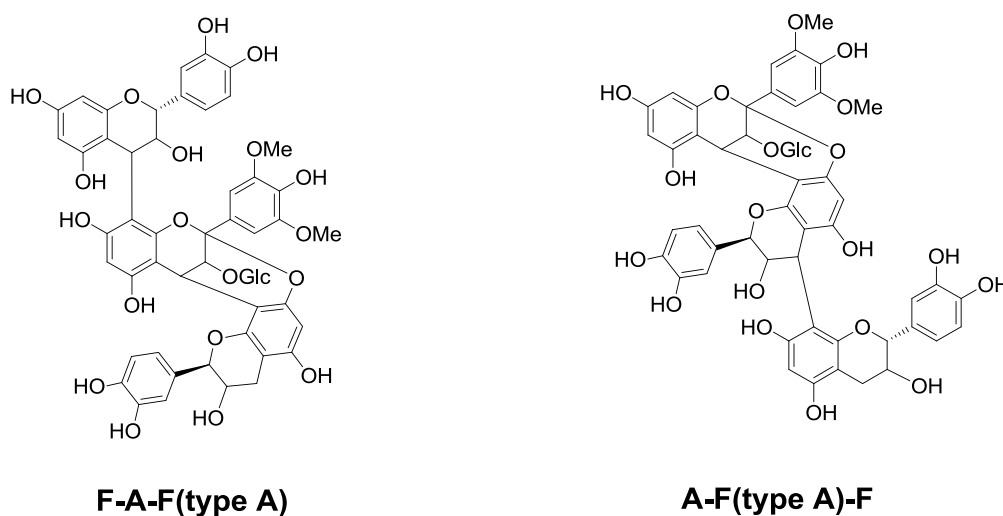


Figure 75. Les structures des trimères pigmentés de F-A-F(type A) et de A-F(type A)-F.

Par ailleurs, après la phloroglucinolyse du vin rouge, deux nouveaux ions (les composés P11 et P12) ont été détectés à $m/z = 907,2269$ (diff : -2,42 ppm) et $m/z = 907,2302$ (diff : 1,21 ppm) (**Annexe 12**), ils ont été attribués à la même formule moléculaire de $[C_{44}H_{42}O_{21}+H]^+ = 907,2291$. Cette formule brute peut être attribuée à un squelette carboné de type A-F(type A)-phloroglucinol et serait formée, durant la phloroglucinolyse, à partir des structures oligomériques et polymériques ayant l'adduit A-F(type A) comme unité supérieure. L'analyse en MS/MS de ces ions conduit notamment à la formation du fragment caractéristique à $m/z = 493,1121$ ($[C_{26}H_{20}O_{10}+H]^+ = 493,1129$, diff : -1,62 ppm) qui n'est pas la malvidine-3-O-glucoside ($[C_{23}H_{25}O_{12}]^+ = 493,1341$) mais correspond à la perte séquentielle de l'unité phloroglucinol (le fragment de $m/z = 781,1913$) suivie par la perte de glucose (le fragment de $m/z = 619,1436$) et la perte de cycle A issue de la fission HRF (**Figure 76A**) comme discuté précédemment (**Chapitre 4 II.2**).

De même, la comparaison des modes de fragmentation des composés P9 et P10 avec les composés P11 et P12 a révélé qu'ils avaient la plupart des fragments en commun (**Figure 76A** et **Figure 76B**). Les composés P9 et P10 possèdent notamment le fragment décrit précédemment à $m/z 493,1113$ caractéristique d'une unité A-F(type A) en tant qu'unité supérieure. Ce fragment prouve que la structure trimérique des composés P9 et P10 possède

l'adduit A-F(type A) comme unité supérieure lié par une liaison de type B à une unité flavan-3-ol en position terminale (**Figure 76B**). Étant donné que ces deux composés ont une formule moléculaire de $C_{53}H_{50}O_{24}$ qui correspond à une structure trimérique comme montré ci-dessus, leurs structures ont été attribuées à A-F(type A)-F (**Figure 75B**).

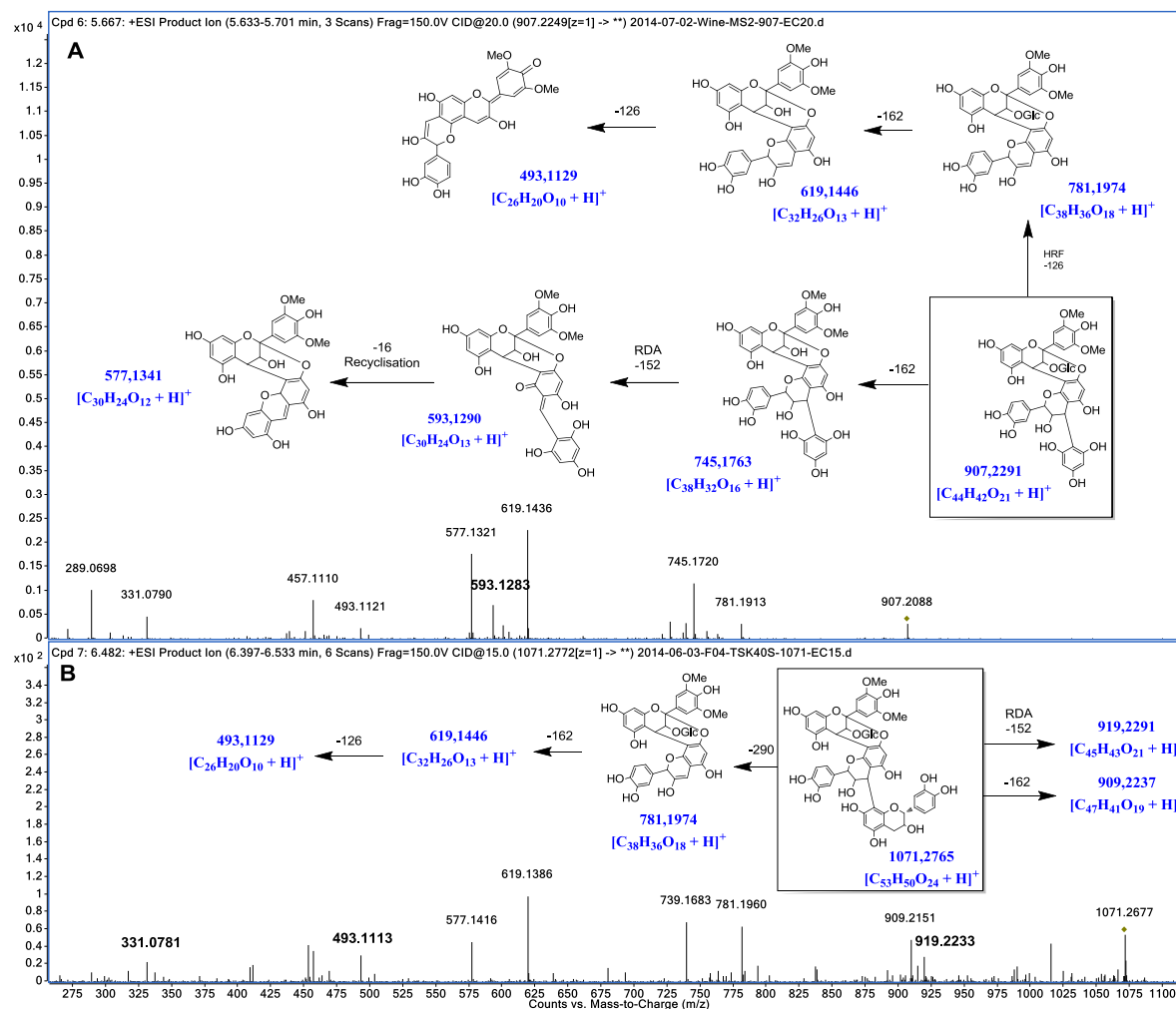


Figure 76. Les spectres et les schémas de fragmentation de la malvidine-3-*O*-glucoside-(épi)catéchine(type A)-phloroglucinol (A) et de la malvidine-3-*O*-glucoside-(épi)catéchine(type A)-(épi)catéchine (B).

Leur présence dans le vin ainsi que des oligomères et des polymères ayant l'adduit A-F(type A) comme unité supérieure explique la formation des adduits A-F(type A)-phloroglucinol après la dépolymérisation chimique par phloroglucinolyse. Comme montré précédemment, le motif A-F(type A)-phloroglucinol après phloroglucinolyse peut être considéré comme un marqueur de quantification de toutes les structures oligomériques et polymériques ayant l'adduit A-F(type A) comme unité supérieure. Ainsi, la quantification après phloroglucinolyse des structures A-F(type A)-phloroglucinol et A-F(type A) pourra permettre de connaître la

quantité de structures oligomériques et polymériques ayant une liaison de type A-F(type A) et également de différencier les structures ayant ce motif comme unité supérieure et comme unité inférieure.

II.5 La condensation indirecte A⁺-pont éthylidène-T

A part des pigments polymérisés issus des condensations directes, il peut y avoir dans le vin des pigments polymérisés issus des condensations indirectes par pont éthylidène. Dans le vin rouge, quatre isomères de malvidine-3-*O*-glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine ont été détectés ayant des *m/z* entre 809, 2169 et 809,2283 ($[\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{O}_{18}]^+ = 809,2287$) (**Annexe 13**).

La présence d'un pont éthylidène dans leurs structures a été confirmée par MS/MS, sans que les carbones des cycles A (C8 ou C6) impliqués dans les liaisons avec le pont éthylidène aient pu être identifiés. Comme montré à la **Figure 77**, l'analyse en MS/MS de l'ion pseudo-moléculaire à 809,2287 montre la formation de plusieurs fragments. Premièrement, une perte de glucose (perte de 162,0528 Da, $-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) de l'unité d'anthocyane conduisant au fragment à 647,1712 ($[\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{O}_{13}]^+ = 647,1759$, diff : -7,26 ppm), ou la fission du cycle C par RDA de l'unité flavanol (perte de 152 Da, $-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) qui conduit au fragment à 657,1765 ($[\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{O}_{15}]^+ = 657,1814$, diff : -7,46 ppm). De plus, deux autres voies de fragmentation liées à la liaison pont éthylidène sont également observées, soit une perte de l'unité flavan-3-ol seul (perte de 290 Da, $-\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$) qui conduit à l'ion 519,1465 ($[\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{O}_{12}]^+ = 519,1497$, diff : -6,16 ppm) ou la perte de l'unité flavan-3-ol avec le pont éthylidène (perte de 316 Da, $-\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$) qui conduit à l'ion 493,1276 ($[\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}]^+ = 493,1341$, diff : -13,18 ppm). La différence en ppm entre la masse calculée et la masse mesurée est très élevée pour ce fragment à 493,1276. Cette différence importante est peut-être due à la très faible concentration de ce fragment (**Figure 77**). Une fois formé, le fragment à 519,1465 peut conduire à la formation du fragment à 357,0956 ($[\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_7]^+ = 357,0969$, diff : -3,64 ppm) par la perte d'unité de glucose (perte de 162,0528 Da, $-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$). Les deux fragments $[\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{O}_{12}]^+ = 519,1497$ et $[\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_7]^+ = 357,0969$ sont des fragments caractéristiques de l'unité de malvidine-3-*O*-glucoside liée par pont éthylidène.

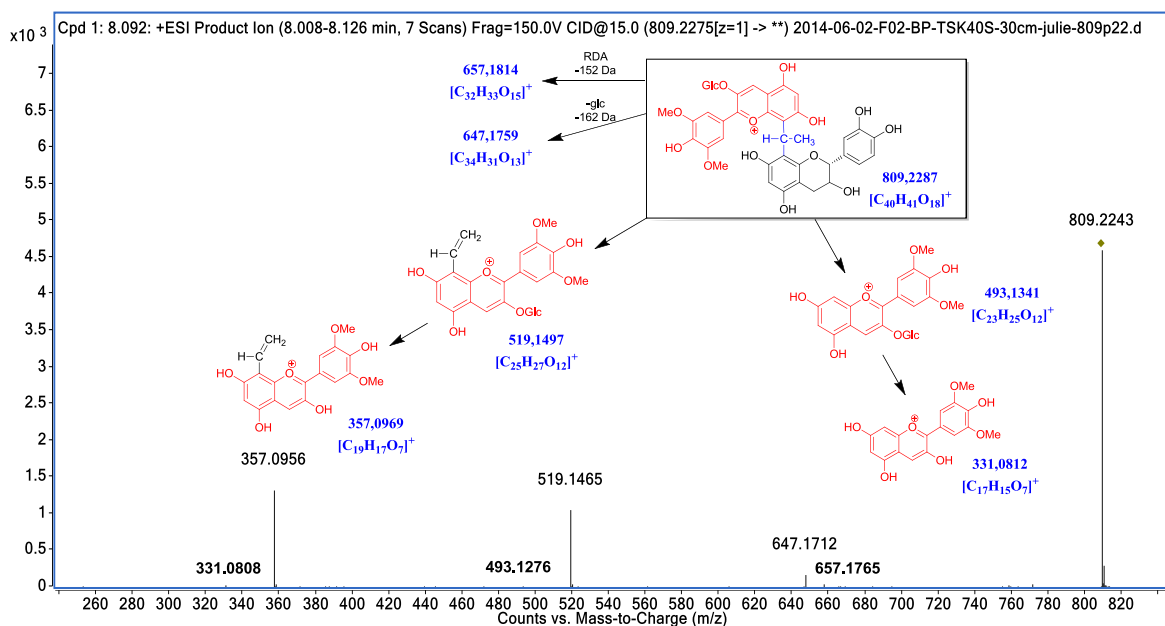


Figure 77. Le spectre et les voies de fragmentation de la malvidine-3-*O*-glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine.

Vu que l'unité d'anthocyané et l'unité flavanol peuvent être liées au pont éthylidène par leur carbone C8 ou C6 du cycle A, plusieurs possibilités d'isomère peuvent être présentes dans le vin rouge, ce qui explique les quatre pics observés (Annexe 13), même si d'un point de vue théorique, il y a 8 isomères possibles.

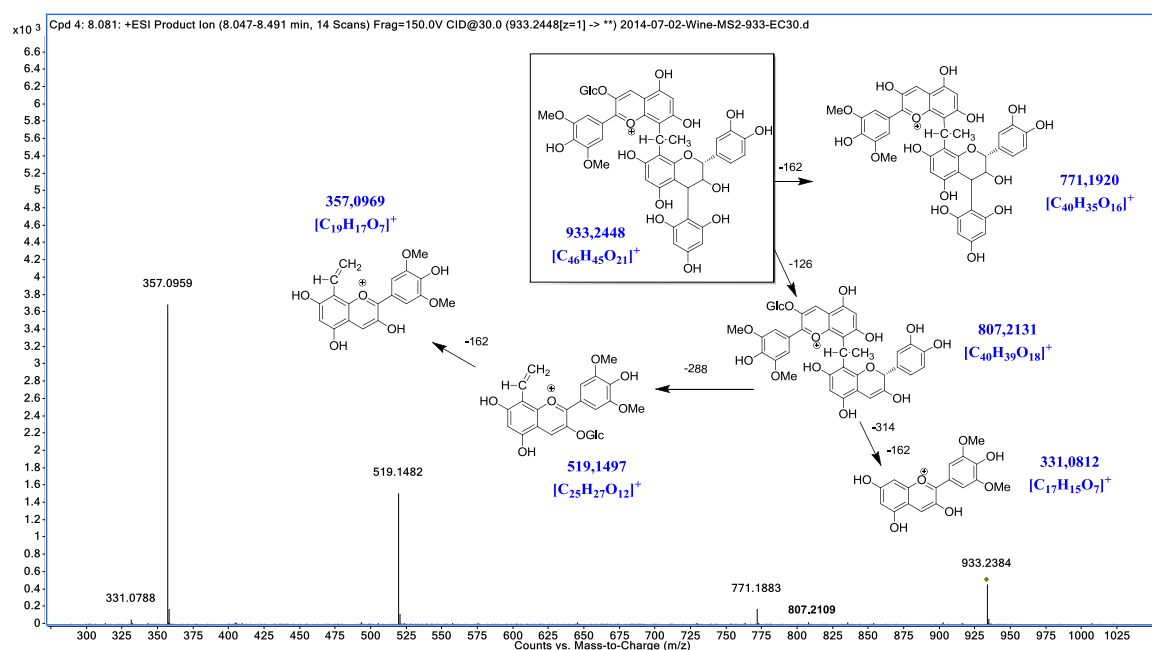


Figure 78. Le spectre et les voies de fragmentation des adduits malvidine-3-*O*-glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine-phloroglucinol.

De façon identique avec les structures de condensation directe entre anthocyane et flavanol, la structure de A⁺-pont éthylidène-F avait été rapportée comme résistante à la dépolymérisation en condition acide (en condition de thiolysse) [160] et sa résistance aux conditions de phloroglucinolyse a également été observée et confirmée durant nos analyses. En effet, trois adduits A⁺-pont éthylidène-F-phloroglucinol (les composés P17, P18 et P19) ont été détectés dans la solution après phloroglucinolyse (**Annexe 14**) et peuvent être utilisés en tant que marqueurs de quantification pour les pigments polymérisés de type A⁺-pont éthylidène-T. L'analyse en MS/MS a été utilisée pour confirmer leurs structures (**Figure 78**). Les fragments correspondant à la perte du glucose (perte de 162,0528 Da, -C₆H₁₀O₅), du phloroglucinol (perte de 126,0317 Da, -C₆H₆O₃) et de l'unité de flavanol (perte de 288,0634 Da, -C₁₅H₁₂O₆) ont été observés.

Pour confirmer ce mode de fragmentation, il est intéressant de voir s'il y a des pigments trimériques de type A⁺-pont éthylidène-F-F ([C₅₅H₅₃O₂₄]⁺ = 1097,2920). Lorsque m/z = 1097,2920 est extrait d'un échantillon de vin rouge, plusieurs pics sont observés (**Annexe 15**). Pourtant, selon les fragments obtenus après MS/MS, il y a que l'ion avec un temps de rétention de 7,447 min qui correspond à cette structure A⁺-pont éthylidène-F-F (**Figure 79**).

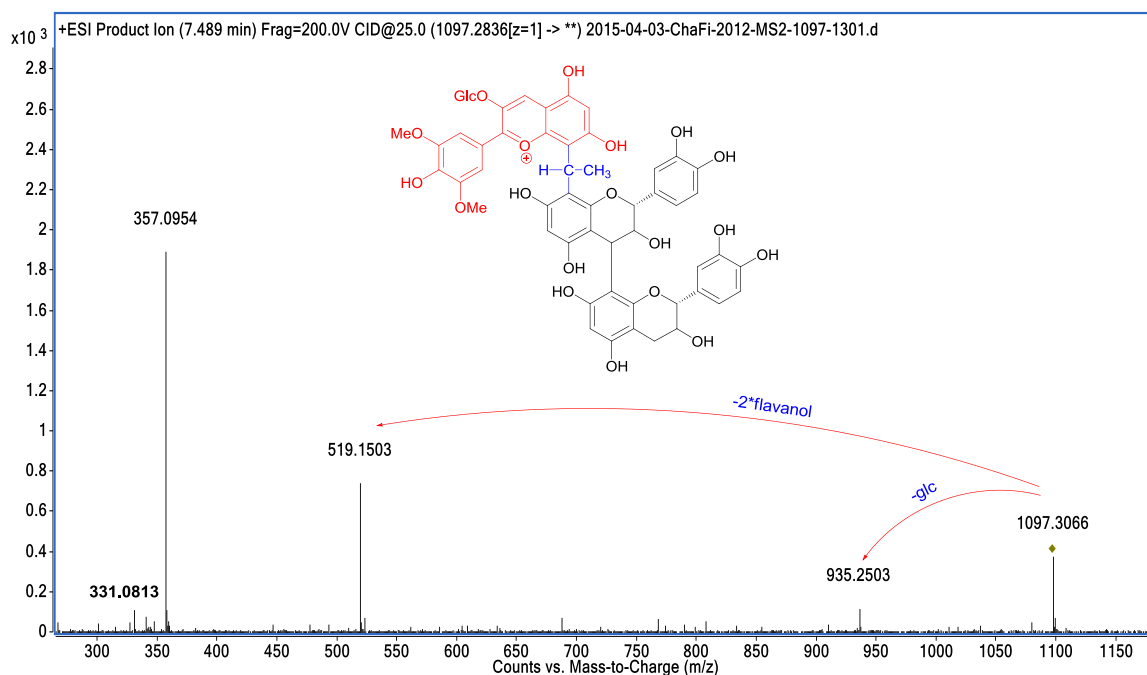


Figure 79. Le spectre et les voies de fragmentation de la malvidine-3-O-glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine-(épi)catéchine.

Ce composé présente, en effet, une perte d'unité glucose (perte de 162,0528 Da, $-C_6H_{10}O_5$) et des fragments contenant l'unité d'anthocyane indiquent qu'il s'agit d'un composé oligomérique avec une unité d'anthocyane impliquée. De plus, la présence des fragments à 519,1503 ($[C_{25}H_{27}O_{12}]^+ = 519,1497$, diff : -1,16 ppm) et à 357,0954 ($[C_{19}H_{17}O_7]^+ = 357,0969$, diff : 4,20 ppm) prouve que l'unité anthocyanique était connectée par le pont éthylidène à l'unité procyanidine.

De plus, comme observé précédemment avec les pigments polymérisés de type A-F(type A)-F, lorsque l'échantillon contenant le composé A⁺-pont éthylidène-F-F est soumis à la dépolymérisation chimique dans les conditions de phloroglucinyse, il disparaît totalement et en même temps, le dérivé A⁺-pont éthylidène-F-phloroglucinol est formé. La structure proposée pour ces composés est basée uniquement sur leurs masses exactes et leurs spectres de fragmentation en haute résolution. Pour pouvoir confirmer de façon indiscutable leurs structures, leur purification et leur caractérisation structurale par RMN serait nécessaire.

II.6 La condensation indirecte A-pont éthylidène-A⁺ et ses dérivés

II.6.1 A-pont éthylidène-A⁺

Un dimère de malvidine-3-*O*-glucoside lié par l'intermédiaire d'un pont éthylidène entre leurs carbones C8 (A-pont éthylidène-A⁺) a été synthétisé et caractérisé par RMN en 2002 par Atanasova *et al.* [190]. Depuis, il y a peu d'études qui se sont intéressées à cette famille de composés. Durant nos analyses, deux isomères de condensation indirecte par pont éthylidène entre deux unités de malvidine-3-*O*-glucoside ont été détectés (**Annexe 16**). En plus de ces deux isomères, quatre composés de cette famille ayant des unités d'anthocyane acétylé et cinq isomères de type A⁺-pont éthylidène-A-F ont également été détectés dans du vin rouge.

Tout d'abord, concernant les deux isomères A-pont éthylidène-A⁺, leur analyse en MS/MS montre les fragments correspondant à une première perte de glucose (perte de 162,0528 Da, $-C_6H_{10}O_5$) à 849,2227 ($[C_{42}H_{41}O_{19}]^+ = 849,2237$, diff : -1,18 ppm), puis la perte du second glucose (perte de 324 Da, $-C_{12}H_{20}O_{10}$) à 687,1708 ($[C_{36}H_{31}O_{14}]^+ = 687,1708$, diff : -0,00 ppm) (**Figure 80**). Les fragments caractéristiques d'anthocyane liée par pont éthylidène comme observés précédemment à 519,1495 ($[C_{25}H_{27}O_{12}]^+ = 519,1497$, diff : -0,39 ppm) et à 357,0963

($[C_{19}H_{17}O_7]^+ = 357,0969$, diff : -1,68 ppm) ont également été obtenus. Vu que le carbone en position C8 est plus réactif par rapport au carbone en position C6, les deux isomères détectés sont probablement les suivants : pour l'un des dimères, une unité de malvidine-3-*O*-glucoside liée par l'intermédiaire de son carbone C8 au pont éthylidène, lui-même lié au carbone C8 de la seconde unité de malvidine-3-*O*-glucoside ; pour le seconde dimère, la première unité de malvidine-3-*O*-glucoside sera bien liée par l'intermédiaire de son carbone C8 au pont éthylidène mais cette fois-ci, le pont éthylidène sera relié à la seconde malvidine-3-*O*-glucoside par l'intermédiaire de son carbone C6.

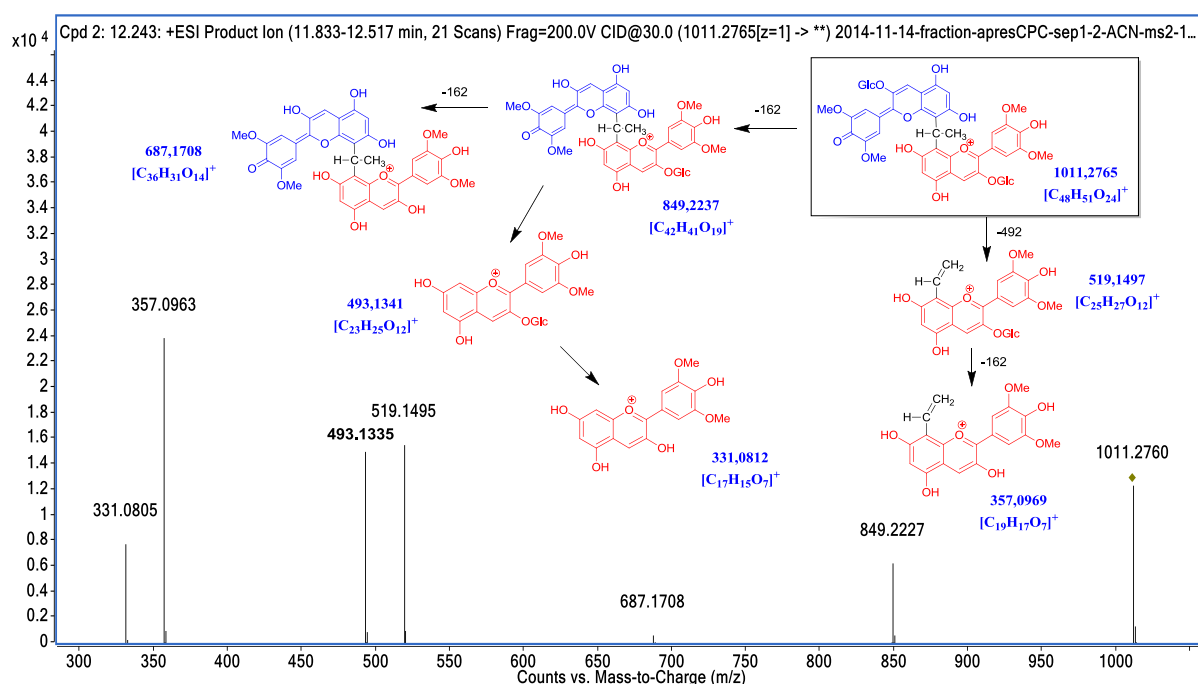


Figure 80. Le spectre et les voies de fragmentation de la malvidine-3-*O*-glucoside-pont éthylidène-malvidine-3-*O*-glucoside.

Durant nos investigations sur cette famille, des phénomènes intéressants liés à la spectrométrie de masse ont été observés. Pour ces deux isomères, des ions résultant de l'addition des solvants utilisés en UPLC : l'eau et le méthanol, ont été observés à $m/z = 1029,2870$ et $m/z = 1043,3027$ respectivement. Ces ions ne résultent pas de l'addition covalente du solvant sur l'ion pseudo-moléculaire A-pont éthylidène- A^+ mais de la formation d'un complexe non-covalent dans la source d'ionisation. Leurs fragmentations ont également été effectuées pour déterminer le mode de fragmentation de ces adduits.

Pour les ions avec addition H₂O, des fragments avec 18 Da (H₂O) de plus par rapport aux fragments issus de l'ion monochargé ont été observés, mais uniquement au niveau des fragments issus des pertes d'unité de glucose (**Figure 81**).

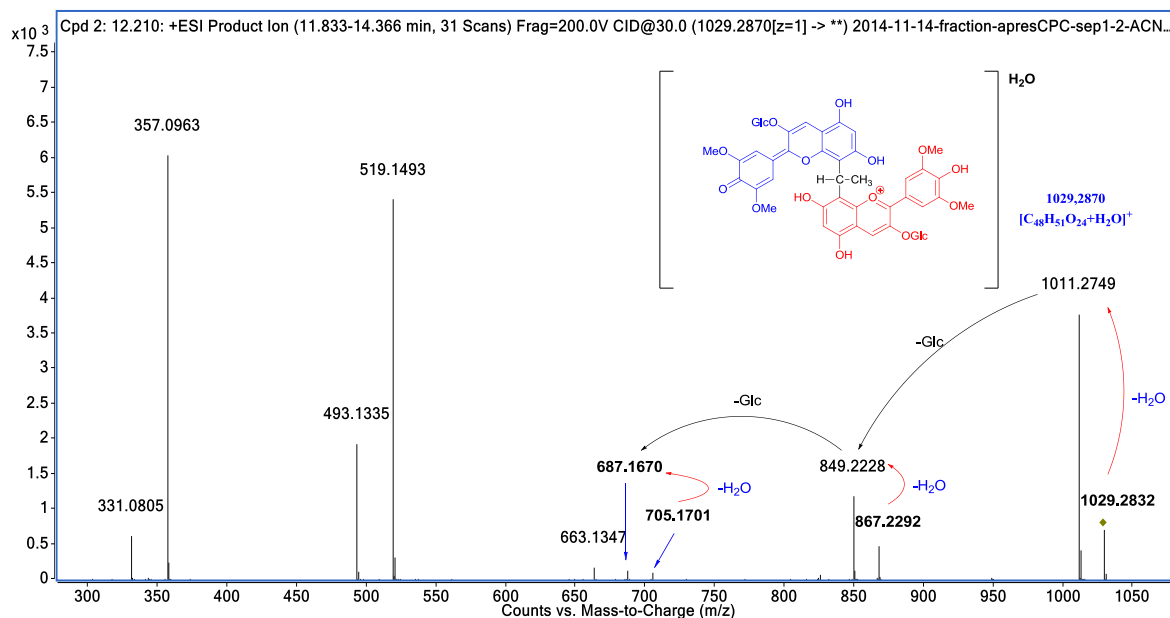


Figure 81. Le spectre de fragmentation de l'ion d'adduit d'eau de la malvidine-3-*O*-glucoside -pont éthylidène- malvidine-3-*O*-glucoside.

Les mêmes phénomènes ont été observés pour les ions résultant de l'addition de méthanol ou 32 Da (CH₃OH) de plus par rapport aux fragments issus de l'ion monochargé ont été observés (**Figure 82**).

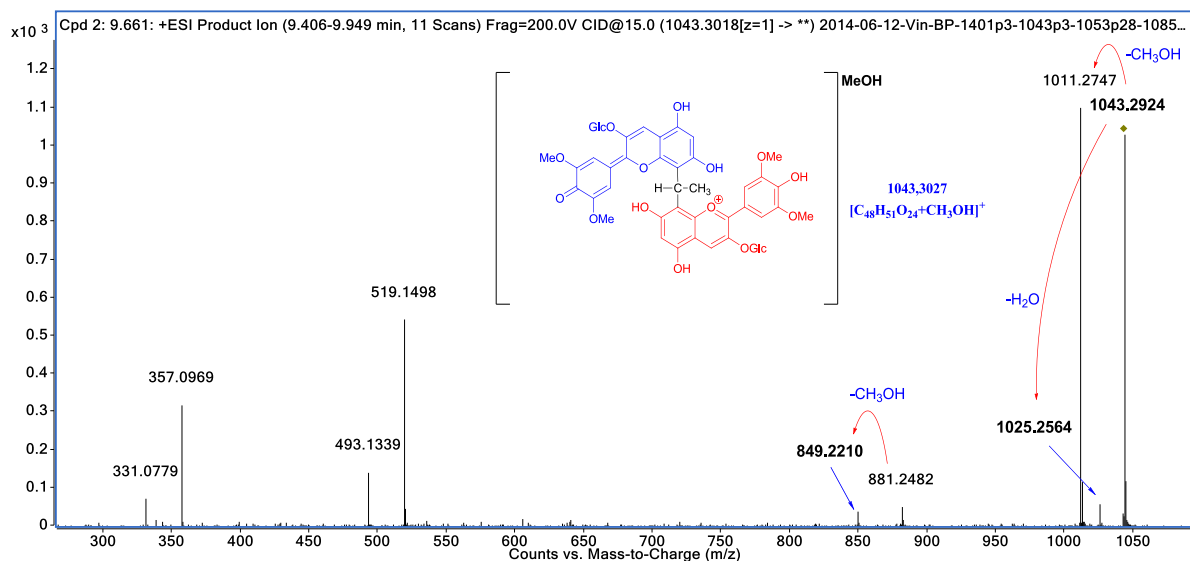


Figure 82. Le spectre de fragmentation de l'ion d'adduit de méthanol de la malvidine-3-*O*-glucoside -pont éthylidène- malvidine-3-*O*-glucoside.

De plus, comme le montre la **Figure 83**, la formation dans la source d'ionisation d'un ion pseudo-moléculaire bichargé à $m/z = 506,1419$ a également été observé. Lorsque cet ion bichargé est fragmenté, un fragment bichargé à $344,0888$ ($[C_{36}H_{31}O_{14}+H]^{2+} = 344,0891$, diff : $-0,87$ ppm) correspondant à une perte de deux unités de glucose a été observé. La présence de ce fragment bichargé indique que l'addition du proton se situe plutôt sur le squelette C3-C6-C3 de l'une des deux unités d'anthocyane, ce qui conduit à avoir les deux unités anthocyaniques sous forme flavylum.

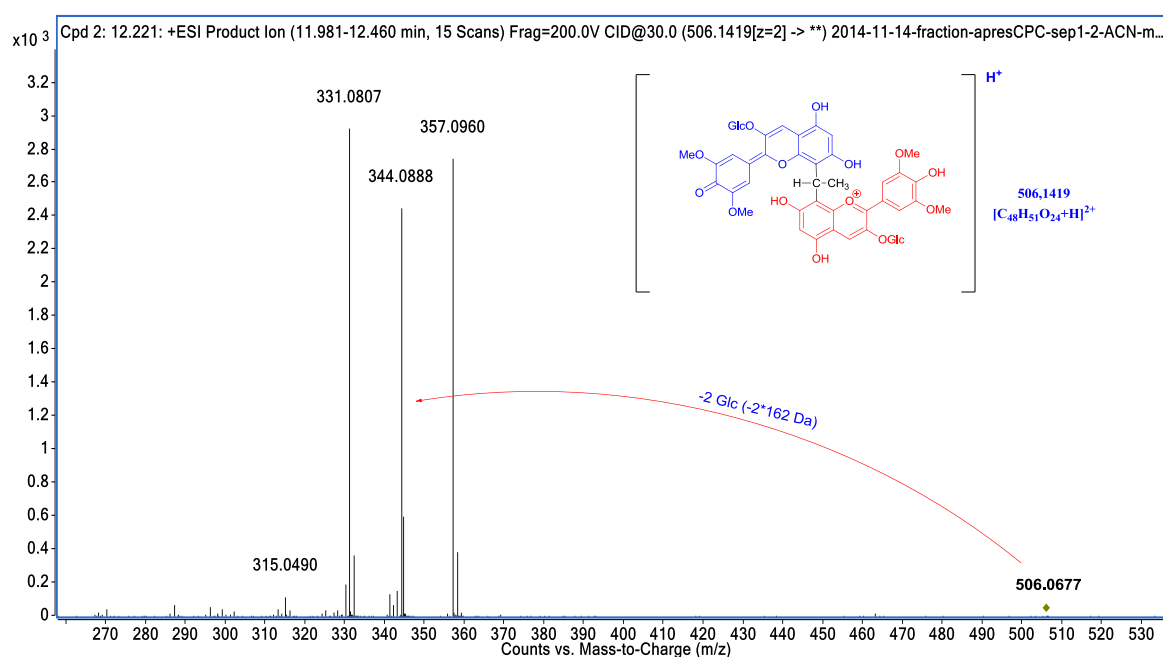


Figure 83. Le spectre de fragmentation de l'ion bichargé de la malvidine-3-O-glucoside-pont éthylidène-malvidine-3-O-glucoside.

II.6.2 A-pont éthylidène-A⁺(acétylé) et A(acétylé)-pont éthylidène-A⁺(acétylé)

En plus des deux isomères A-pont éthylidène-A⁺, deux autres isomères correspondant à des dérivés de type A-pont éthylidène-A⁺ dont seulement l'une des deux unités anthocyaniques est acétylée (composé P23 et P24) ayant comme formule brute $[C_{50}H_{53}O_{25}]^+ = 1053,2870$ (**Annexe 17**) ont été détectés dans du vin rouge, ainsi que deux autres isomères avec les deux unités anthocyaniques acétylées (composé P25 et P26) ayant comme formule brute $[C_{52}H_{55}O_{26}]^+ = 1095,2976$ (**Annexe 18**). Leurs structures ont été confirmées par les analyses

en MS/MS. A notre connaissance, cette étude montre pour la première fois ces formes acétylées de cette famille de pigments polymérisés dans le vin rouge.

La **Figure 84** montre le spectre de fragmentation des deux isomères de A-pont éthylidène-A⁺ (mono-acétylé) qui a une partie de ces fragments en commun avec les fragments des deux isomères de A-pont éthylidène-A⁺ comme notamment les fragments caractéristiques de la malvidine-3-*O*-glucoside liée par pont éthylidène à 519,1491 et à 357,0960. Des fragments différents dus à l'unité de glucose acétylée ont été également observés. La perte de cette unité induit une perte de 204,0634 Da (-C₈H₁₂O₆) et logiquement, les fragments à 535,1430 et à 561,1589 qui contiennent cette unité montrent 42 Da de plus. La coexistence des fragments de Mv-3-*O*-glucoside (m/z = 493,1331) et de Mv-3-*O*-(-6-*O*-acétyl)-glucoside (m/z = 535,1403) est due à l'équilibre des formes flavylum entre les deux unités d'anthocyaniques. En effet, la molécule n'étant pas symétrique, il y a co-existence entre une forme où c'est la Mv-3-*O*-glucoside qui est l'unité anthocyanique sous forme flavylum et une autre forme où c'est la Mv-3-*O*-(-6-*O*-acétyl)-glucoside qui est sous forme flavylum.

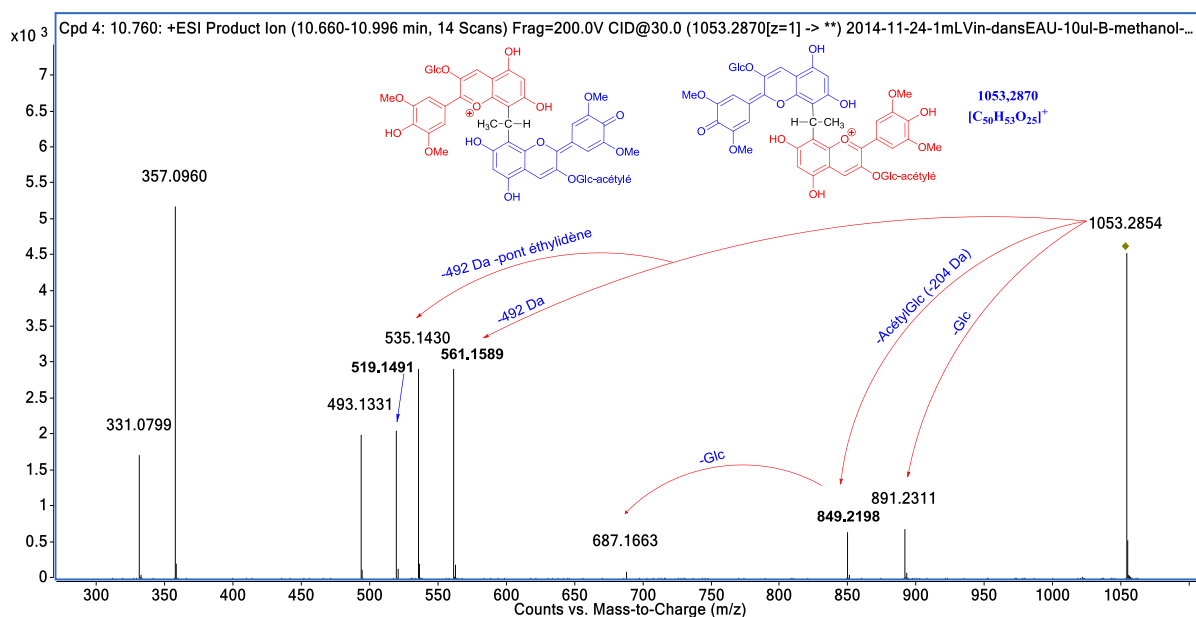


Figure 84. Le spectre de fragmentation de la malvidine-3-*O*-glucoside-pont éthylidène-malvidine-3-*O*-(-6-*O*-acétyl)glucoside.

Le spectre de fragmentation des deux isomères de A-pont éthylidène-A⁺ di-acétylé (composés 25 et 26) est montré à la **Figure 85**. Les fragments obtenus des deux isomères de la Mv-3-*O*-(-6-*O*-acétyl)glucoside-pont éthylidène-Mv-3-*O*-(-6-*O*-acétyl)glucoside sont issus des mêmes

mécanismes de fragmentation que des isomères Mv-3-O-glucoside-pont éthylidène-Mv-3-O-glucoside. Des pertes des deux unités de glucose acétylées conduisant à la formation des fragments à $m/z = 891,2317$ et à $m/z = 687,1656$ ont été observées.

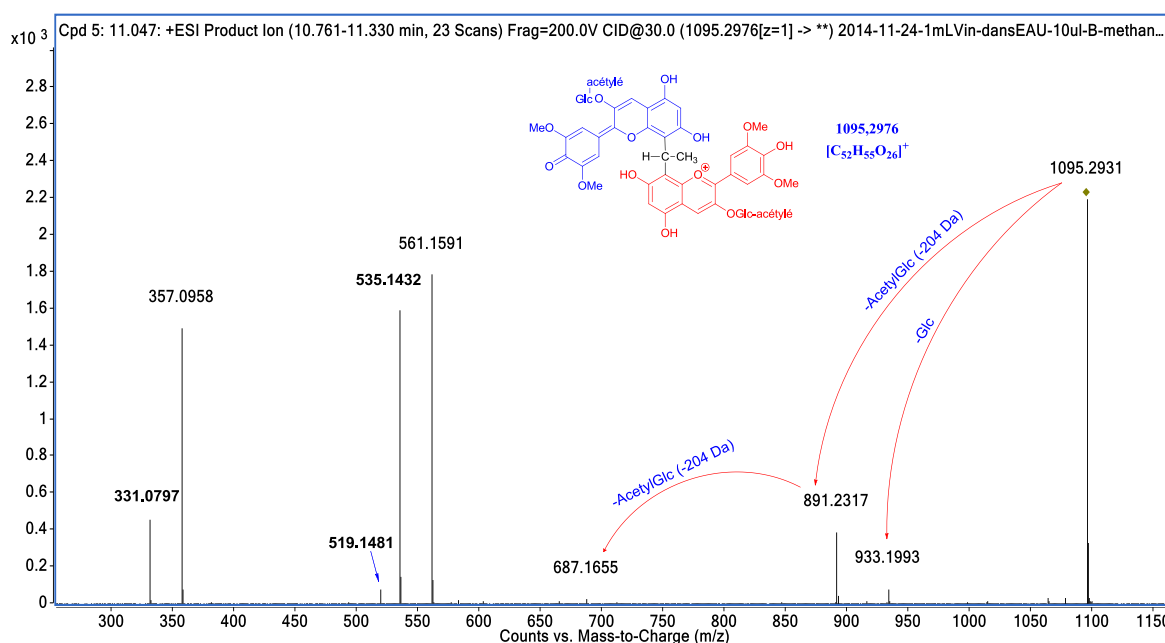


Figure 85. Le spectre de fragmentation de la malvidine-3-O-(acétyl)glucoside-pont éthylidène- malvidine-3-O-(acétyl) glucoside.

II.6.3 A⁺-pont éthylidène-(A-F)(type A)

Cinq ions correspondant à la formule brute [C₆₃H₆₅O₃₀]⁺ = 1301,3555 avec des m/z entre 1301,3454 et 1301,3498 (composé P27-P31) ont été détectés dans le vin analysé (**Annexe 19**). Les analyses en MS/MS ont été effectuées afin de déterminer leurs structures.

Comme montré à la **Figure 86**, une fois soumis à la fragmentation en utilisant l'énergie de collision à 30 %, ils partagent tous les cinq le même mode de fragmentation avec premièrement une perte de l'unité glucose (perte de 162,0528 Da, -C₆H₁₀O₆) suivie par des fragments caractéristiques d'une unité malvidine-3-O-glucoside liée par pont éthylidène à $m/z = 519,1495$ et à $m/z = 357,0986$. Cette observation indique que ces composés sont des pigments polymérisés présentant une liaison de type pont éthylidène. La formule brute [C₆₃H₆₅O₃₀]⁺ de ces isomères peut correspondre à un trimère qui contient deux unités de malvidine-3-O-glucoside, une unité d'(épi)catéchine et un pont éthylidène.

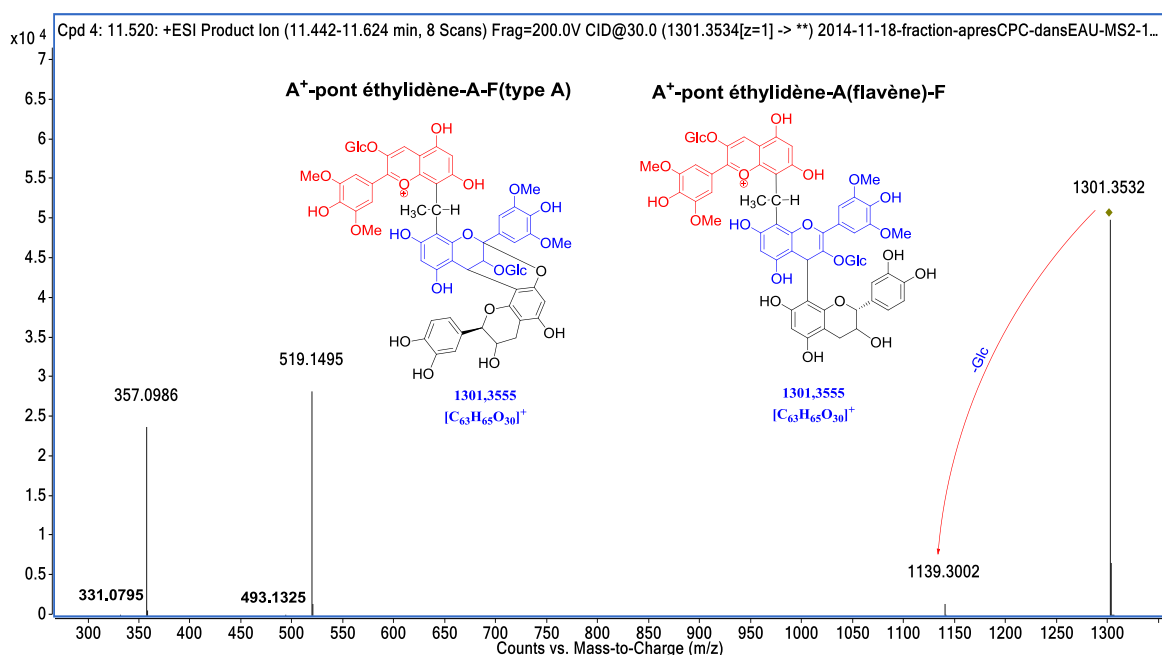


Figure 86. Le spectre de fragmentation de l'A⁺-pont éthylidène-A-F.

Vu que les fragments caractéristiques d'une unité malvidine-3-*O*-glucoside liée par pont éthylidène ont été observés, deux possibilités de structures peuvent être envisagées : soit la forme A⁺-pont éthylidène-A-F(type A), soit la forme A⁺-pont éthylidène-A(flavène)-F (**Figure 86**). Par la suite, malgré l'augmentation de l'énergie de collision jusqu'à 60 %, aucun fragment caractéristique n'est formé à partir de ces composés. Même avec 60 % d'énergie de collision, seul le fragment à $m/z = 357,0986$ était présent (spectre non montré). Il a donc été impossible de différencier les deux hypothèses structurales formées. Soit un trimère avec une liaison de type A, soit un trimère avec une unité anthocyanique sous forme flavène (**Figure 86**). Néanmoins, il a été observé durant notre étude que ces cinq composés résistaient à la phloroglucinolyse, ce qui est une propriété importante des liaisons de type A. De plus, un trimère A⁺-pont éthylidène-A-F(type A) a été synthétisé en milieu modèle en présence d'acétaldéhyde [200]. Donc, il est très vraisemblable que les cinq composés détectés soient des trimères de type A⁺-pont éthylidène-A-F(type A), mais cela reste à confirmer.

II.7 Les anthocyanes oligomères

II.7.1 Dimères A-A⁺

Plusieurs ions qui correspondent aux anthocyanes dimériques ayant la formule brute $[C_{46}H_{49}O_{26}]^+ = 985,2608$ (composé P32-P36) ont été détectés dans du vin rouge analysé (**Annexe 20**). Malgré le manque de netteté des pics, leurs identités ont pu être confirmées par leurs masses exactes détectées et par les analyses en MS/MS.

Comme montré à la **Figure 87**, en mode positif et en utilisant l'énergie de collision de 30 %, les fragments correspondant aux pertes successives des unités de glucose (perte de 162,0528 Da, $-C_6H_{10}O_5$) ont été observés à 823,2063 ($[C_{40}H_{39}O_{19}]^+ = 823,2080$, diff : -2,07 ppm) et à 661,1547 ($[C_{34}H_{29}O_{14}]^+ = 661,1552$, diff : -0,76 ppm). Néanmoins, le type de liaison entre les deux unités de malvidine-3-*O*-glucoside soit une liaison de type A ou une liaison inter-unité de type B avec l'une des deux unités anthocyanique sous forme flavène n'a pas pu être déterminée uniquement avec ces résultats de MS/MS (**Figure 87**).

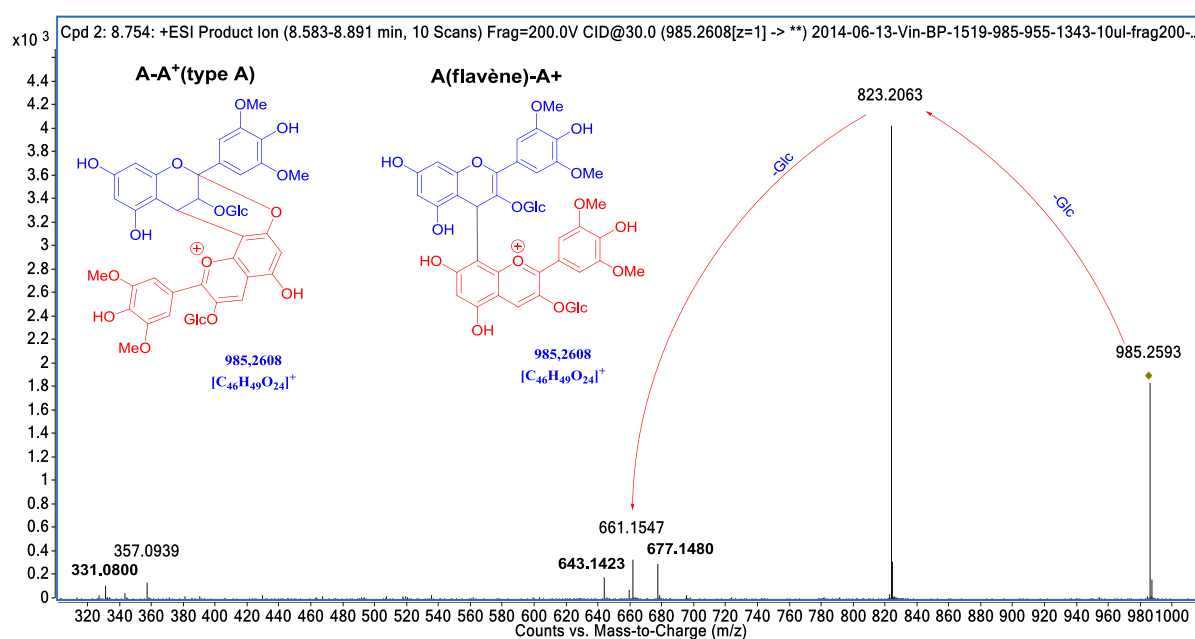


Figure 87. Le spectre de fragmentation de la malvidine-3-*O*-glucoside dimérique.

Ces anthocyanes dimériques résistent à la phloroglucinolyse et leurs concentrations ont légèrement augmenté après la dépolymérisation de la fraction polymérique du vin rouge. De plus, un trimère de malvidine-3-*O*-glucoside ayant deux liaisons inter-unité de type A a été détecté et caractérisé dans un vin rouge de Porto par Oliveira *et al.* [177]. Il est donc vraisemblable que les composés dimériques détectés dans du vin rouge soient des dimères de malvidine-3-*O*-glucoside ayant une liaison inter-unité de type A.

De plus, un pigment trimérique issu de la condensation de l'(épi)catéchine à une anthocyane dimérique : F-A-A⁺ ([C₆₁H₆₁O₃₀]⁺ = 1273,3242) a également été détecté dans le vin analysé (composé P37). Après fragmentation en mode positif en utilisant l'énergie de collision à 40 %, les fragments correspondant aux pertes successives des deux groupements glucose ont été observés à m/z = 1111,2639 ([C₅₅H₅₁O₂₅]⁺ = 1111,2714, diff : -6,75 ppm) et à m/z = 949,2144 ([C₄₉H₄₁O₂₀]⁺ = 949,2186, diff : -4,42 ppm) (**Figure 88**). Là encore, la liaison entre les deux unités de malvidine-3-*O*-glucoside n'a pas pu être déterminée et peut être soit de type A, soit l'une des deux malvidine-3-*O*-glucoside est sous la forme flavène.

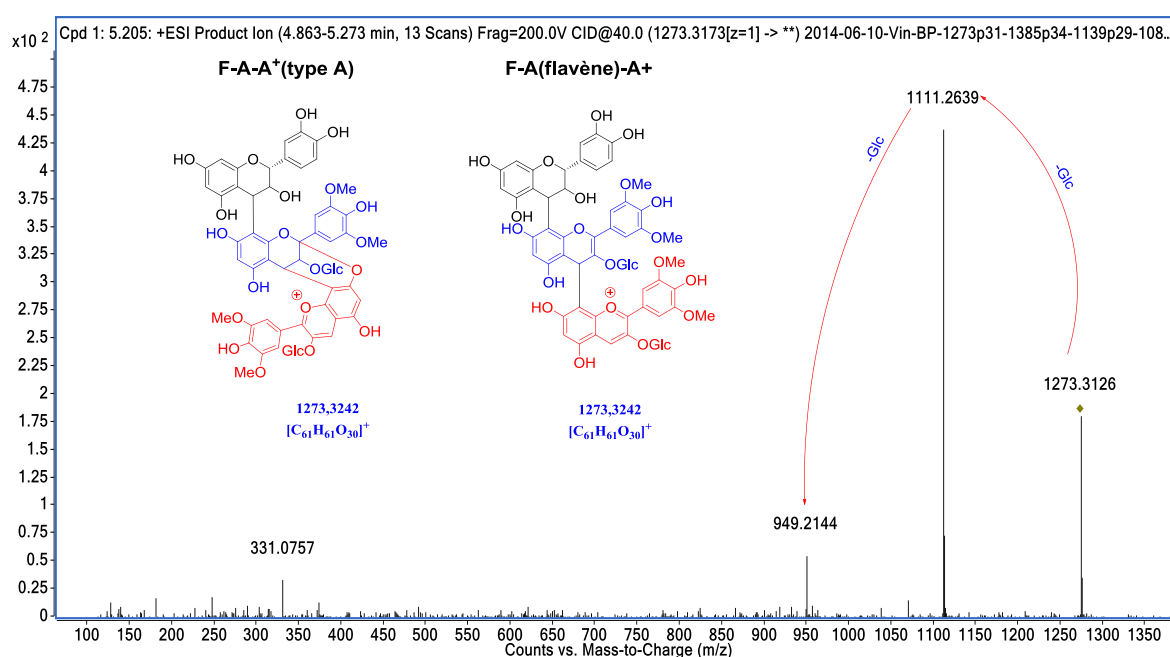


Figure 88. Le spectre de fragmentation de la C/EC-A-A⁺.

II.7.2 Trimères A-A-A⁺

Un trimère de malvidine-3-*O*-glucoside a été détecté, purifié et caractérisé par RMN dans un vin de Porto en 2013 [177]. Dans cette étude, les liaisons entre les trois unités de malvidine-3-*O*-glucoside ont été confirmées comme étant deux liaisons de type A.

Lors de nos analyses, un ion à 1477,3839 ([C₆₉H₇₃O₃₆]⁺ = 1477,3876, diff : -2,50 ppm) pouvant correspondre à ce composé a été également détecté dans le vin (composé P38) (**Annexe 21**). Ce composé a une structure relativement difficile à fragmenter, même avec une énergie de collision de 50 %, seuls deux fragments ont été observés. Ces fragments

majoritaires correspondent aux deux pertes successives de l'unité glucose à $m/z = 1315,3277$ ($[C_{63}H_{63}O_{31}]^+ = 1315,3348$, diff : -5,40 ppm) et à $m/z = 1153,2747$ ($[C_{57}H_{53}O_{26}]^+ = 1153,2820$, diff : -6,33 ppm) (**Figure 89**). Dans ce cas également, uniquement avec la spectrométrie de masse, il n'est pas possible de déterminer de façon certaine si les trois unités de malvidine-3-*O*-glucoside sont liées entre elles par des liaisons de type A ou sous leur forme flavène. Cependant, au vu de la structure isolée et caractérisée dans le porto, il est possible de faire l'hypothèse d'un trimère avec des liaisons inter-unité de type A [177].

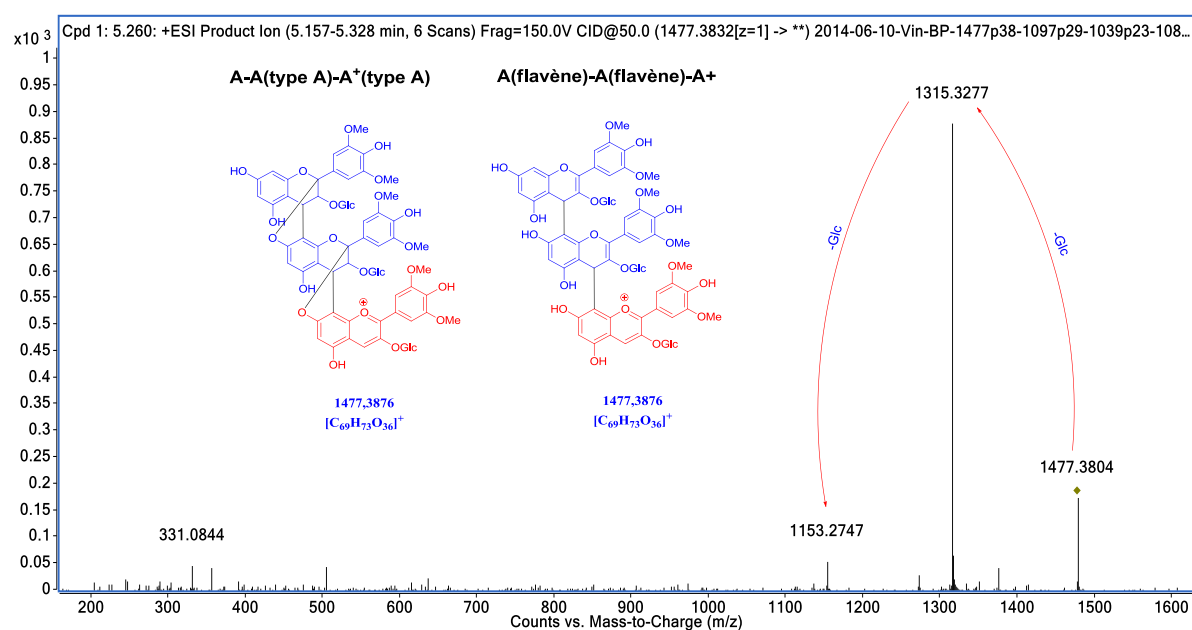


Figure 89. Le spectre de fragmentation de l'anthocyane trimérique.

En plus de cette anthocyane trimérique détectée, trois isomères d'anthocyane trimérique ayant l'un des trois glucose acétylé $[C_{71}H_{75}O_{37}]^+ = 1519,3982$ ont été également détectées (composé P39-P41) (**Annexe 22**).

En mode positif, une énergie de collision 60 % a été utilisée pour leur fragmentation (**Figure 90**). Les fragments correspondant à une perte de sucre acétylé (perte de 204,0634 Da, $-C_8H_{12}O_6$) à $m/z = 1315,3304$ ($[C_{63}H_{63}O_{31}]^+ = 1315,3348$, diff : -3,35 ppm) et des pertes successives de glucose (perte de 162,0528 Da, $-C_6H_{10}O_5$) à $m/z = 1357,3407$ ($[C_{65}H_{65}O_{32}]^+ = 1357,3453$, diff : -3,39 ppm), $m/z = 1195,2854$ ($[C_{59}H_{55}O_{27}]^+ = 1195,2925$, diff : -5,94 ppm), $m/z = 1153,2749$ ($[C_{57}H_{53}O_{26}]^+ = 1153,2820$, diff : -6,61 ppm) et à $m/z = 991,2261$ ($[C_{51}H_{43}O_{21}]^+ = 991,2291$, diff : -3,03 ppm) ont été observées.

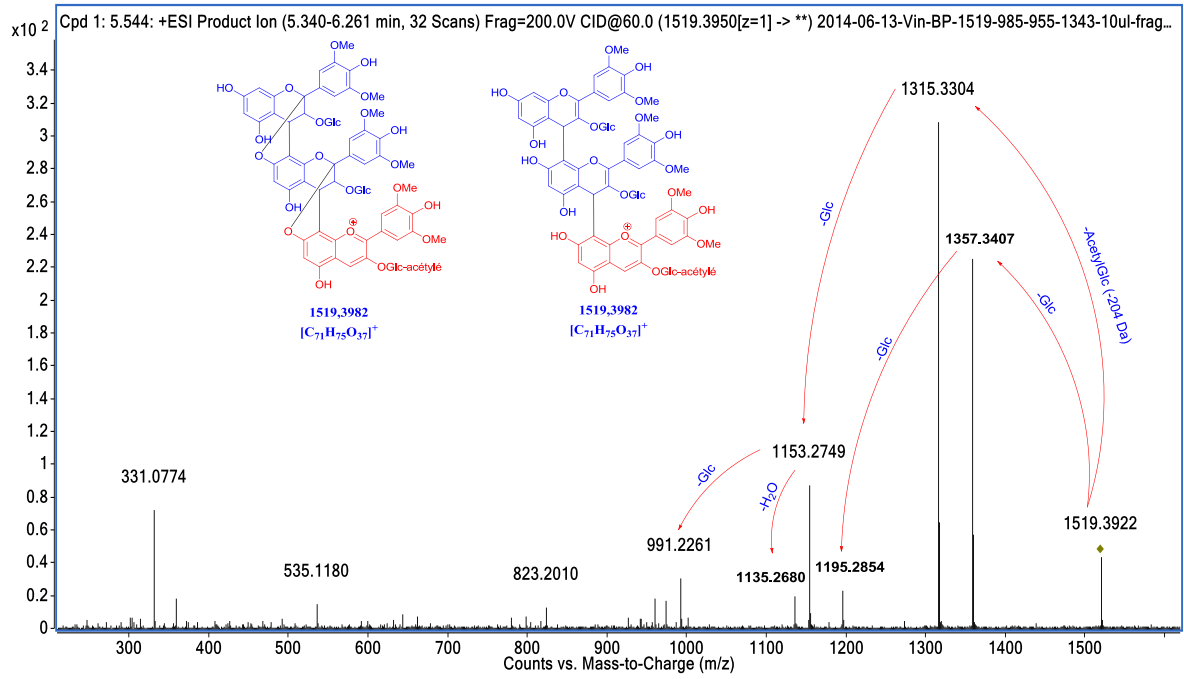


Figure 90. Le spectre de fragmentation de l'anthocyane trimérique ayant une unité avec le glucose acétylé.

II.8 Les flavano-pyranoanthocyanes

II.8.1 Pyranoanthocyanane-flavan-3-ol (monomère)

Après injection directe des échantillons de vin rouge bordelais, quatre pics principaux ont été observés avec un m/z correspondant à la formule brute $[C_{40}H_{37}O_{18}]^+ = 805,1974$ et qui pouvaient être attribués à des pyranoanthocyanane-flavanols (**Figure 91A**).

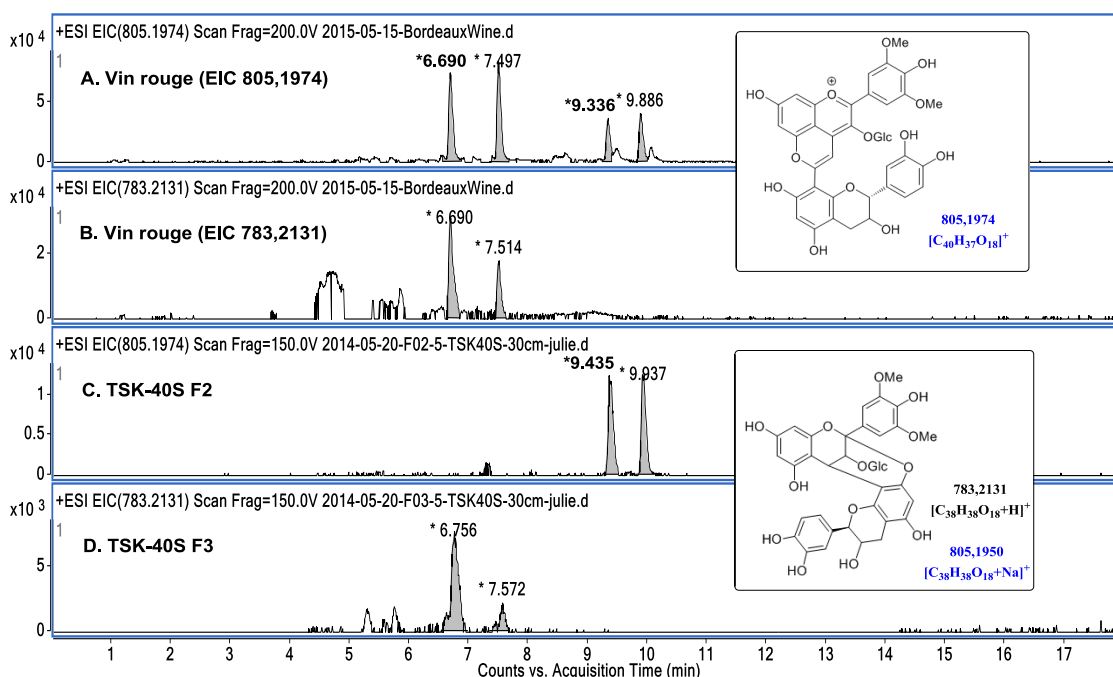


Figure 91. Les chromatogrammes des ions extraits de 805,1974 et 783,2131 depuis un échantillon de vin rouge (A et B) et deux fractions des TSK-40S (C et D).

Parmi ces quatre signaux, les deux premiers pics à 6,690 min et à 7,497 min présentent le même temps de rétention que les adduits A-F(type A) précédemment identifiés (**Chapitre 4 II.3**) (**Figure 91B**). En effet, il y a une différence de 22 Da entre $m/z = 805,1974$ et $m/z = 783,2131$, cette différence pouvant résulter de la formation d'adduits sodium à partir des ions pseudo-moléculaires à $m/z = 783,2131$.

Afin de confirmer cette hypothèse, ces deux composés à 6,690 min et à 7,497 min ont dans un premier temps été fragmentés en MS/MS. Le spectre de fragmentation des deux premiers pics est montré à la **Figure 92B**. Ce spectre montre des pertes similaires par rapport aux isomères de A-F(type A). En effet, si le spectre de fragmentation de A-F(type A) (**Figure 92A**) est comparé à ceux des deux premiers pics, des groupes de fragments avec 22 Da de différence

ont été observés (**Figure 92**). En conséquence, les deux premiers pics correspondent aux deux adduits sodium ($+Na^+$) formés dans la source d'ionisation à partir des isomères de A-F (type A) qui ont des masses exactes de 805,1950 ($[C_{38}H_{38}O_{18}+Na]^+$), ce qui est très proche de la masse des isomères de pyranoanthocyane-F à 805,1974 ($[C_{40}H_{37}O_{18}]^+$).

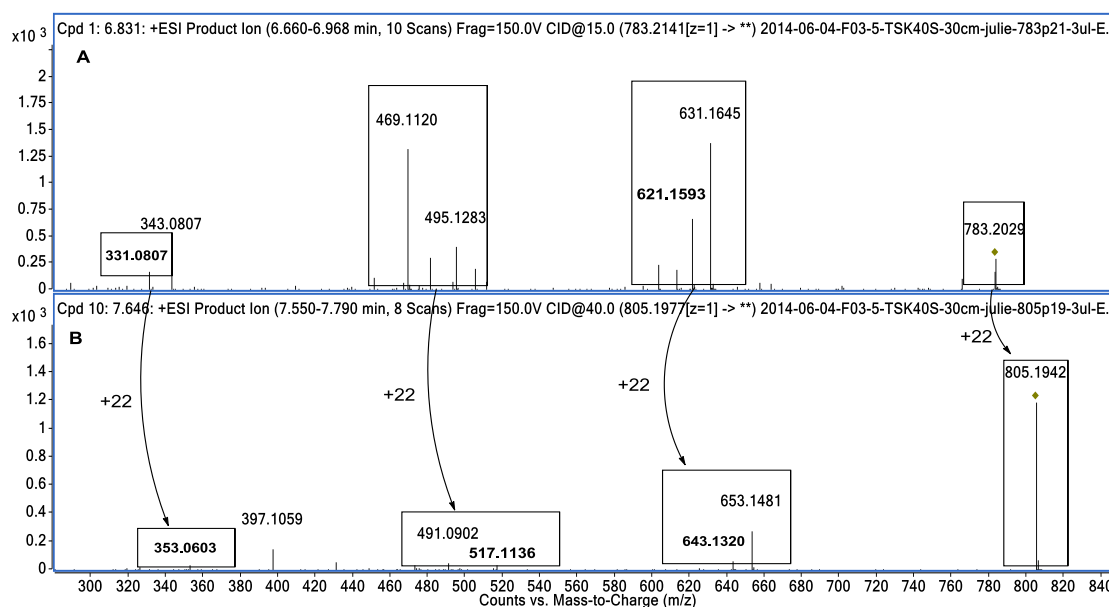


Figure 92. Le spectre de fragmentation de l'adduit hydrogène (A) et de l'adduit sodium (B) de Mv-C/EC (Type A).

De plus, durant le fractionnement d'un vin rouge avec une colonne de TSK 40S, on a pu facilement séparer les quatre pics en deux groupes. L'élution avec du méthanol en deux heures a permis de récupérer les deux derniers composés (**Figure 91C**), tout en laissant les deux premiers composés sur gel, sortant ensuite pendant la troisième heure d'élution (**Figure 91D**). Ce comportement différent supporte le fait que les deux premiers composés et les deux derniers composés proviennent de deux familles distinctes.

Le spectre de fragmentation des deux derniers pics à 9,336 min et 9,886 min est montré à la **Figure 93A**. Cette fois-ci, le spectre est beaucoup plus simple avec un fragment à $m/z = 643,1450$ ($[C_{34}H_{27}O_{13}]^+ = 643,1446$, diff : 0,62 ppm) correspondant à une perte de glucose (perte de 162,0528 Da, $-C_6H_{10}O_5$) et un autre fragment à $m/z = 491,0979$ ($[C_{26}H_{19}O_{10}]^+ = 491,0973$, diff : 1,22 ppm) provenant de la fission RDA du cycle C de l'unité flavanols (perte de 314,1002 Da, $-C_{14}H_{18}O_8$). Ce résultat comparé aux données de la littérature sur les

pyranoanthocyanine-flavanols [195] confirme que les deux derniers pics correspondent aux deux isomères pyranoanthocyanine-flavanols.

Par ailleurs, deux isomères de pyranoanthocyanine(acétylé)-F et un pyranoanthocyanine(*p*-coumaroylé)-F ont également été détectés dans nos échantillons. Leurs spectres de fragmentation sont reportés sur la **Figure 93B** et la **Figure 93C**. Les composés acétylés ou *p*-coumaroylés partagent les mêmes fragments que les deux isomères pyranoanthocyanine-F.

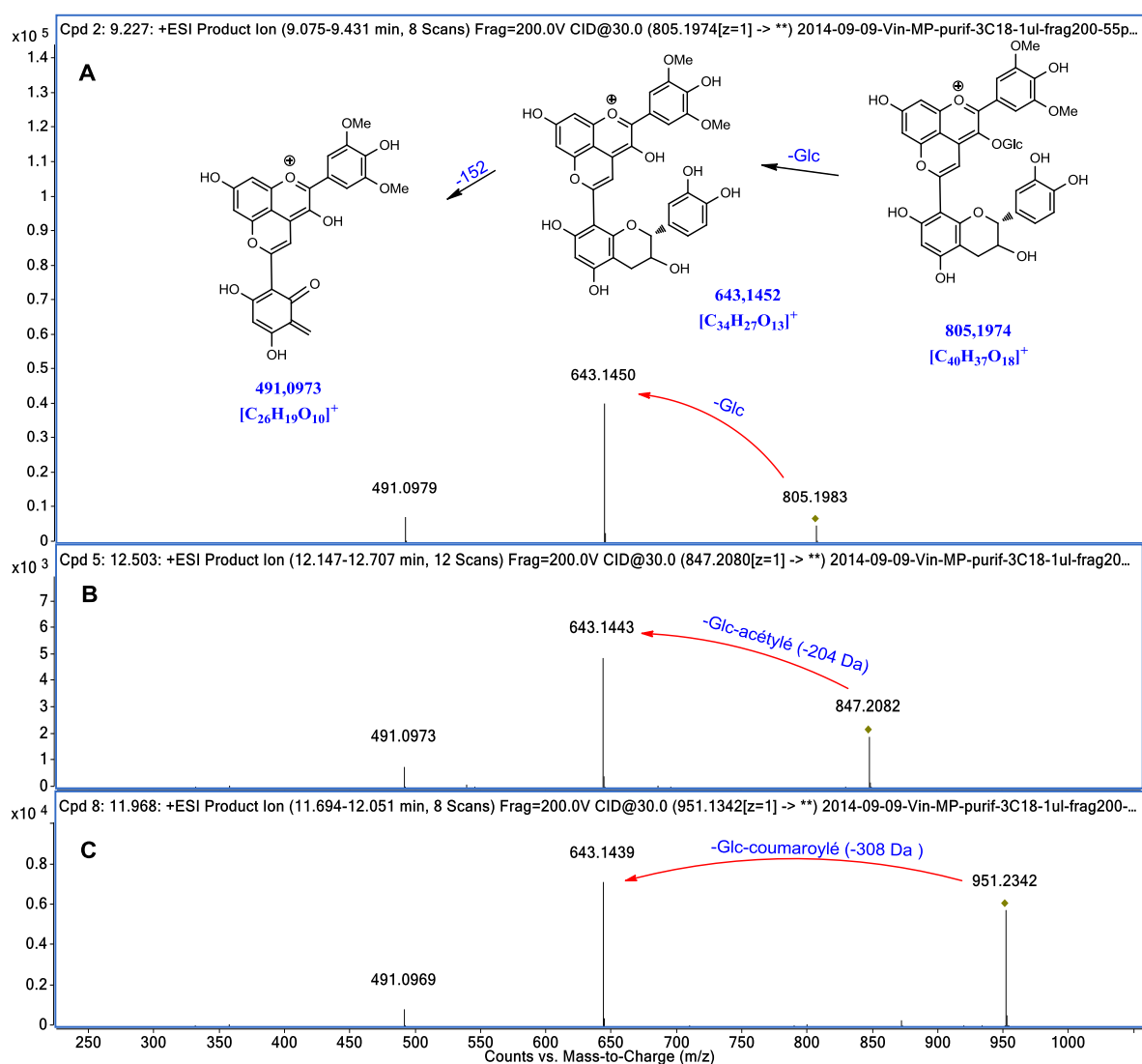


Figure 93. Le spectre de fragmentation de A : Pyranoanthocyanine-C/EC; B : Pyranoanthocyanine (acétylé)-C/EC; C : Pyranoanthocyanine (coumaroylé)-C/EC.

II.8.2 Pyranoanthocyane-flavan-3-ol (dimère)

Des pics de réponse ont été observés lorsque les trois ions $[C_{55}H_{49}O_{24}]^+ = 1093,2610$, $[C_{57}H_{51}O_{25}]^+ = 1135,2714$ et $[C_{64}H_{55}O_{26}]^+ = 1239,2976$ correspondant à la pyranoanthocyane-F-F et leurs dérivés acétylés et *p*-coumaroylés sont extraits d'un échantillon de vin rouge par injection directe. Comme précédemment aux isomères de pyranoanthocyane-F, des adduits sodium de F-malvidine-3-*O*-glucoside-F(type A) ($[C_{53}H_{50}O_{24}+Na]^+ 1093,2584$) interfèrent dans le chromatogramme d'ion pseudo-moléculaire extrait.

Pour simplifier la matrice, un fractionnement en SPE sur cartouche C18 a été utilisé et les pyranoanthocyane-F-F et leurs dérivés ont été récupérés avec 55 % de méthanol. La fraction avec 55 % de méthanol a été analysée sur le système UPLC-Q-TOF, et comme montré à la **Figure 94A1, A2 et A3**, des pics superposés ont été observés. Ainsi, une autre méthode d'éluion d'UPLC a été développée pour mieux séparer ces composés (**Figure 94B1, B2 et B3**).

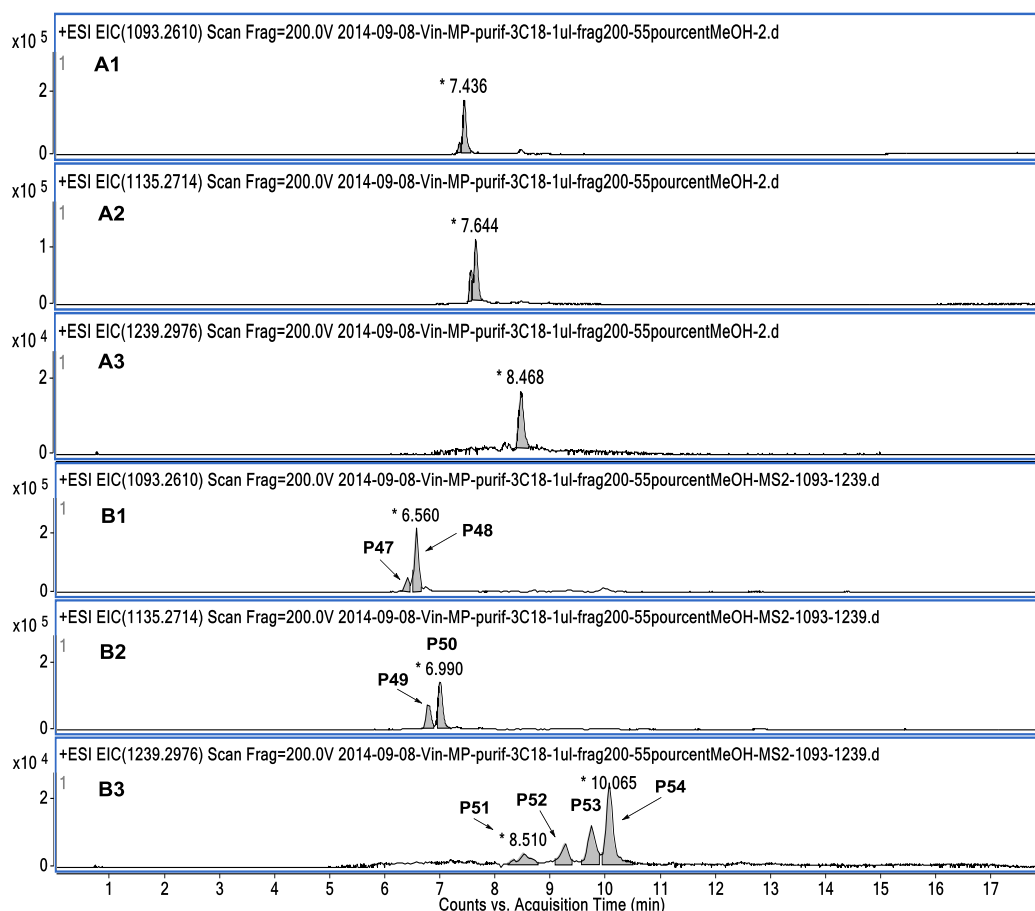


Figure 94. Les chromatogrammes des ions extraits depuis la fraction 55 % méthanol issue de la cartouche C18. A1-3 : La méthode UPLC de quantification ; B1-3 : La méthode UPLC de séparation.

Après avoir mieux séparé ces composés, deux isomères de pyranoanthocyane-F-F (les composés P47 et P48) accompagnés par deux isomères acétylés (les composés P49 et P50) et quatre isomères *p*-coumaroylés (les composés P51 à P54) ont été observés. La **Figure 95** montre les spectres de fragmentation de la pyranoanthocyane-F-F ainsi que leurs dérivés acétylés et *p*-coumaroylés.

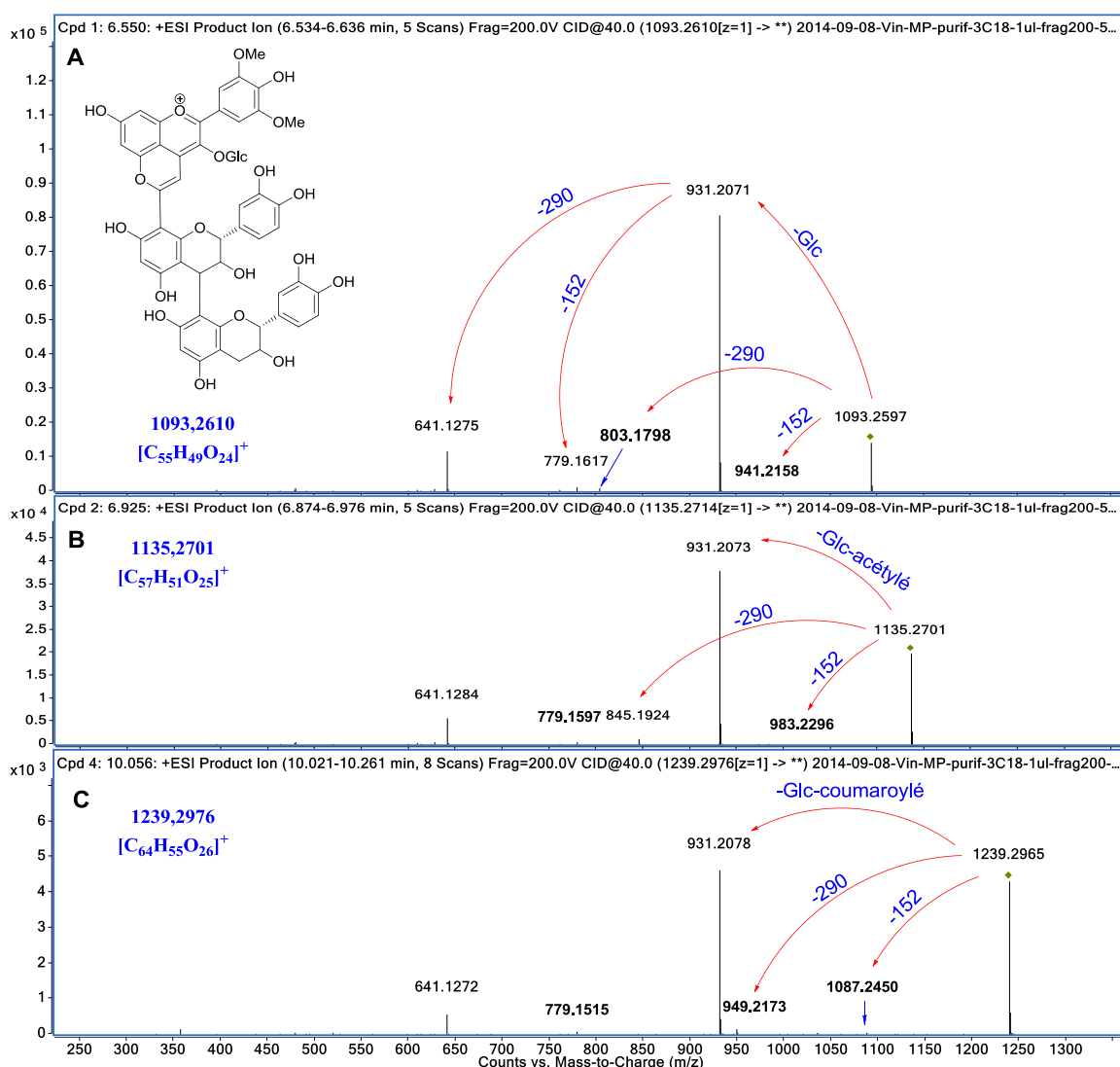


Figure 95. Le spectre de fragmentation de **A** : Pyranoanthocyanone-C/EC-C/EC; **B** : Pyranoanthocyanone (acétylé)-C/EC-C/EC; **C** : Pyranoanthocyanone (*p*-coumaroylé)-C/EC-C/EC.

Les composés fragmentés partagent les mêmes fragments majoritaires issus de la perte de l'unité glucose (acylé) et de la perte d'une unité d'(épi)catéchine. Les fragments minoritaires issus de la fission RDA de l'unité d'(épi)catéchine ont également été observés. Le **Tableau 26** résume les fragments observés pour ces composés.

Tableau 26. Les fragments issus de la fragmentation de la pyranoanthocyane-C/EC-C/EC ainsi que la fragmentation de ses dérivés acylés, identifiés par Q-TOF.

m/z mesuré	Formule [M] ⁺	m/z calculé [M] ⁺	Diff (ppm)	Masse perdue calculée	Formule perdu
Mv-3-O-glc-vinyl-C/EC-C/EC					
1093,2597	C ₅₅ H ₄₉ O ₂₄	1093,2610	-1,19		Ion mère
941,2158	C ₄₇ H ₄₁ O ₂₁	941,2135	2,44	152,0473	C ₈ H ₈ O ₃
931,2071	C ₄₉ H ₃₉ O ₁₉	931,2080	-0,97	162,0528	C ₆ H ₁₀ O ₅
803,1798	C ₄₀ H ₃₅ O ₁₈	803,1818	-2,49	290,079	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
779,1617	C ₄₁ H ₃₁ O ₁₆	779,1607	1,28	314,1002	C ₁₄ H ₁₈ O ₈
641,1275	C ₃₄ H ₂₅ O ₁₃	641,1290	-2,34	452,1319	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁
Mv-3-O-glc(acétylé)-vinyl-C/EC-C/EC					
1135,2701	C ₅₇ H ₅₁ O ₂₅	1135,2714	-1,15		Ion mère
983,2296	C ₄₉ H ₄₃ O ₂₂	983,2240	5,70	152,0473	C ₈ H ₈ O ₃
931,2073	C ₄₉ H ₃₉ O ₁₉	931,2080	-0,75	204,0634	C ₈ H ₁₂ O ₆
845,1924	C ₄₂ H ₃₇ O ₁₉	845,1924	0,00	290,079	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
779,1579	C ₄₁ H ₃₁ O ₁₆	779,1607	-3,59	356,1107	C ₁₆ H ₂₀ O ₉
641,1284	C ₃₄ H ₂₅ O ₁₃	641,1290	-0,94	494,1424	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₂
Mv-3-O-glc(coumaroylé)-vinyl-C/EC-C/EC					
1239,2965	C ₆₄ H ₅₅ O ₂₆	1239,2976	-0,89		Ion mère
1087,2450	C ₅₆ H ₄₇ O ₂₃	1087,2503	-4,87	152,0473	C ₈ H ₈ O ₃
949,2173	C ₄₉ H ₄₁ O ₂₀	949,2186	-1,37	290,079	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
931,2078	C ₄₉ H ₃₉ O ₁₉	931,2080	-0,21	308,0896	C ₁₅ H ₁₆ O ₇
779,1515	C ₄₁ H ₃₁ O ₁₆	779,1607	-11,81	460,1369	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀
641,1272	C ₃₄ H ₂₅ O ₁₃	641,1290	-2,81	598,1686	C ₃₀ H ₃₀ O ₁₃

En 2001, une pyranoanthocyane-F-F a déjà été détectée dans du vin rouge de Syrah sans caractérisation des unités flavanols [194] et sans la détection de ses dérivés acétylés ou *p*-coumaroylés. En 2002, la pyranoanthocyane-dimère B3 a été purifiée et caractérisée par RMN

depuis un vin de Porto [195] suivie par la publication par la même équipe d'une pyranoanthocyane (*p*-coumaroylé)-dimère B1 en 2003 [196].

Dans notre étude, avec les techniques de fractionnement, de séparation par UPLC et de détection par HRMS, 8 isomères de la famille pyranoanthocyane-dimère ont été détectés. Ce chiffre est largement plus grand que ce qui a été rapporté dans la littérature. L'intérêt d'étudier et de caractériser ce grand nombre d'isomères détectés dans du vin rouge bordelais dans un futur proche est évident. De plus, le dimère B3 n'est pas le dimère le plus abondant dans du vin rouge bordelais, les structures des isomères détectés dans notre étude peuvent être différentes de la structure pyranoanthocyane-dimère B3 caractérisée dans du vin de Porto. Le développement des techniques de séparation afin d'obtenir les produits purs et les analyses en RMN dans le futur permettront de révéler les structures exactes de ces composés.

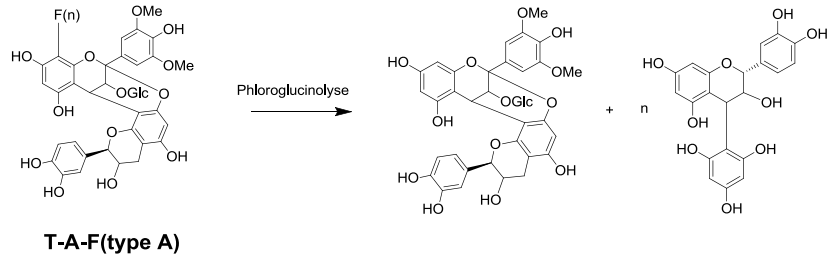
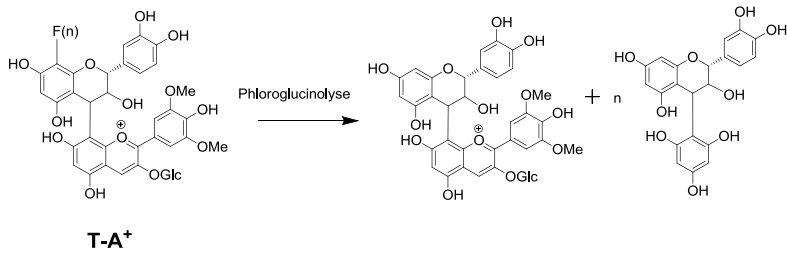
III. La dépolymérisation des pigments polymérisés

Comme présenté dans la partie précédente, la complexité des pigments polymérisés présents dans le vin rouge est due non seulement aux différentes unités de base des anthocyanes et des flavanols mais aussi aux différentes liaisons inter-flavonoïdes possibles telles que les liaisons de type B, de type A, de type indirect et des dérivés de cyclo-addition. Un grand défi pour étudier les pigments polymérisés du vin rouge est la quantification d'une gamme de composés ayant des masses variées de 400 Da jusqu'à plusieurs milliers de daltons et avec des concentrations très différentes. Dans le but d'établir une méthode de quantification des pigments polymérisés, la stratégie de dépolymérisation a été utilisée.

En effet, il a déjà été rapporté dans la littérature que les liaisons entre les anthocyanes et les unités flavanol telles que les liaisons de type F-A⁺, A-F(type A) et A⁺-pont éthyliène-F sont résistantes aux conditions de la dépolymérisation [157, 160, 217]. Leur résistance à la phloroglucinolyse a été également observée par notre étude. En même temps, les liaisons inter-flavonoïdes entre deux unités de flavanol sont facilement coupées dans ces conditions. Ainsi, en utilisant la stratégie de phloroglucinolyse, la problématique de quantification des pigments polymérisés de hauts poids moléculaires est réduite à l'analyse, la séparation et la quantification d'unités dimériques. Chaque dimère flavanol-anthocyane et son adduit phloroglucinol identifié précédemment dans ce chapitre peuvent être utilisés pour la quantification de chaque type de pigment polymérisé dans du vin rouge après la dépolymérisation chimique. Dans cette optique de travail, les modes de dépolymérisation des pigments polymérisés ont été établis.

La **Figure 96** montre les réactions de dépolymérisation des pigments polymérisés. Les pigments polymérisés sont séparés en deux groupes. Le Groupe I contient des pigments polymérisés avec l'unité dimérique flavanol-anthocyane comme unité terminale alors que le Groupe II regroupe les pigments polymérisés avec l'unité dimérique flavanol-anthocyane comme unité supérieure.

Groupe I. Anthocyane polymérique engagée comme unité terminale



Groupe II. Anthocyane polymérique engagée comme unité supérieure

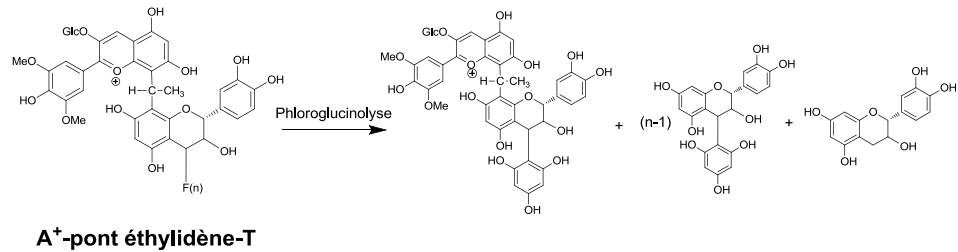
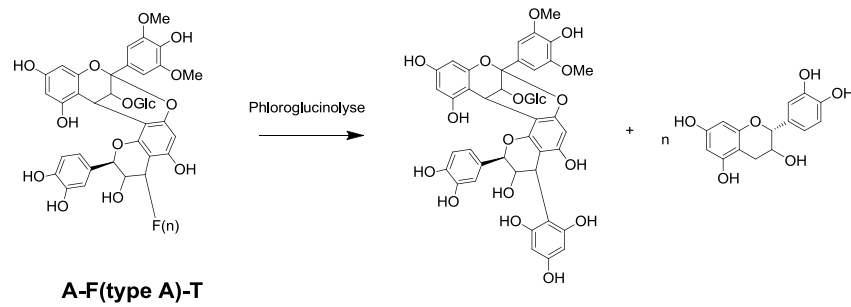
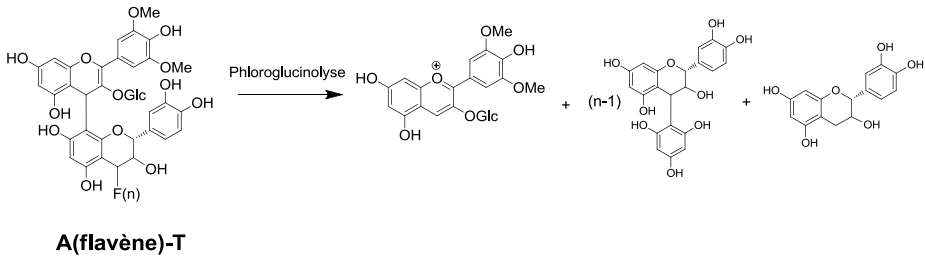


Figure 96. Les mécanismes de dépolymérisation des pigments polymérisés.

Tout d'abord, si l'unité dimérique flavanol-anthocyane est engagée comme unité terminale dans la structure de pigment polymérisé, cette structure dimérique sera libérée sans modification de la structure. Ces libérations expliquent l'augmentation des concentrations des isomères de F-Mv-3-O-glucoside et Mv-3-O-glucoside-F(type A) observée après la phloroglucino-lyse.

Ensuite, si l'unité dimérique flavano-anthocyane est engagée comme unité supérieure dans la chaîne de pigment polymérisé, cette structure dimérique flavanol-anthocyane sera alors libérée sous forme d'adduit avec le phloroglucinol. Ces mécanismes expliquent l'apparition des deux isomères de type A-F(type A)-phloroglucinol et des trois isomères de type A⁺-pont éthylidène-F-phloroglucinol après la phloroglucino-lyse.

Après la phloroglucino-lyse, une augmentation de la concentration des anthocyanes a également été observée. Cette partie d'anthocyane libérée ne provient pas des adduits F-A⁺ puisque cette structure résiste à la phloroglucino-lyse et la concentration des deux isomères F-A⁺ a augmenté. Elles ne proviennent non plus des adduits A⁺-F puisque la concentration des deux isomères A⁺-F est restée stable après la phloroglucino-lyse. La seule possibilité de l'origine de ces anthocyanes libres libérées est la dépolymérisation des structures de type A(flavène)-T avec l'unité anthocyanique sous forme flavène (**Figure 96** Groupe II).

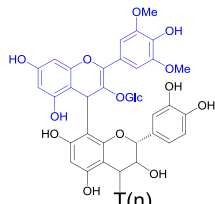
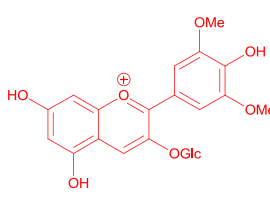
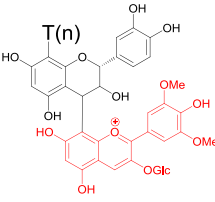
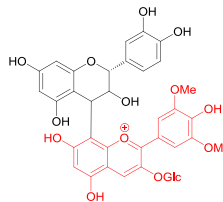
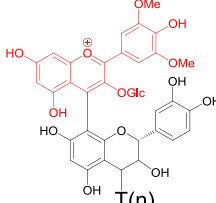
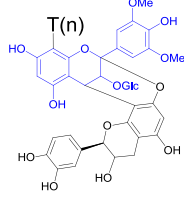
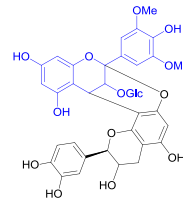
De plus, la résistance des pigments polymérisés des anthocyanes dimériques et trimériques et des flavano-pyranoanthocyanes à la phloroglucino-lyse a été observée.

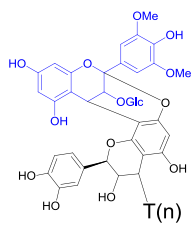
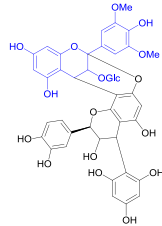
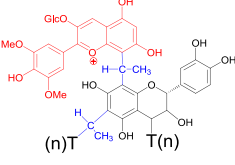
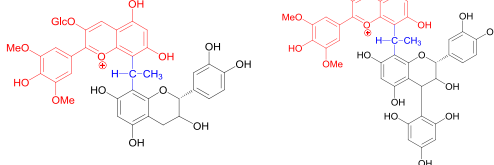
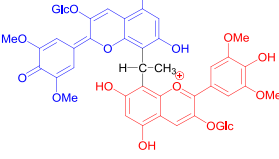
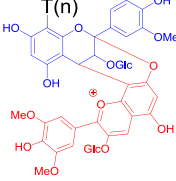
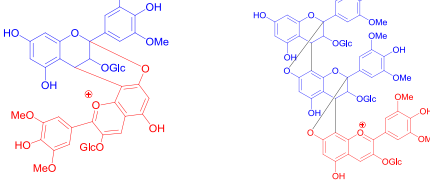
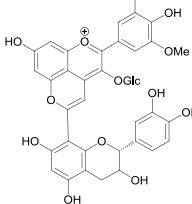
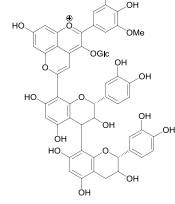
IV. Conclusion

54 composés concernant les pigments polymérisés ainsi que leurs marqueurs de quantification après la phloroglucinolyse ont été identifiés. Des ambiguïtés de fragmentation entre des adduits F-A⁺ et des adduits A⁺-F ont été clairement présentées. De plus, les structures de type A-F(type A)-F(n) et de type F(n)-A-F(type A), les formes acétylés de l'anthocyane trimère et de l'anthocyane dimères liés par pont éthylidène ont été montrées pour la première fois.

Les mécanismes de dépolymérisation des différentes familles de pigments polymérisés ont été clarifiés grâce aux marqueurs identifiés en spectrométrie de masse haute résolution Q-TOF. Ces marqueurs de quantification seront utilisés pour déterminer les teneurs spécifiques de chacune des familles de pigments polymérisés ainsi que leurs cinétiques d'évolution durant le vieillissement du vin rouge. Le **Tableau 27** récapitule les neuf familles de pigments polymérisés avec leurs structures générales et leurs marqueurs de quantification respectifs.

Tableau 27. Structures générales de pigments polymérisés et leurs marqueurs de quantification.

Groupe	Structure générale	Marqueur de quantification
Groupe 1: A(flavène)-T		
Groupe 2: T-A ⁺		
Groupe 3: A ⁺ -T		Adduit phloroglucinol non détecté
Groupe 4: T-A-F(type A)		

<p>Groupe 5: A-F(type A) -T</p>		
<p>Groupe 6: A⁺-P. E.-T</p>		
<p>Groupe 7: A⁺-P. E.-A</p>		
<p>Groupe 8: T-A⁺(oligomère)</p>		
<p>Groupe 9: Flavano- Pyranoanthocyan</p>	 	

CHAPITRE 5

Évolution des tanins et des pigments au cours du vieillissement

I. Généralités

La quantification des composés identifiés précédemment a été réalisée dans les trois séries de vins provenant de trois propriétés différentes et composées de cépages différents (**Tableau 10**). La première série de vin provient de l'appellation Languedoc Montpeyroux issue de 100 % Syrah. Les deux autres séries de vin proviennent de la région bordelaise des appellations Saint-Émilion (rive droite) et Saint-Estèphe (rive gauche). La série de vins de l'appellation Saint-Émilion est composée de 35 % de Cabernet franc, 35 % de Cabernet sauvignon et 30 % de Merlot. La série de vins de l'appellation Saint-Estèphe est composée majoritairement de Cabernet sauvignon (63 %), avec 23 % de Merlot, 10 % de Cabernet franc et 4 % de Petit verdot. Ces assemblages varient très peu (entre 1 à 2 %) en fonction des millésimes sélectionnés et analysés.

La Syrah est un cépage riche en anthocyane qui est de plus en plus présente dans le vignoble méridional. Le Cabernet sauvignon, le Merlot et le Cabernet franc sont les cépages représentatifs du vignoble bordelais. En général, les vins issus du cépage Cabernet sauvignon sont plus riches en tanins que ceux issus du cépage Merlot. Le Cabernet franc produit des vins proches de ceux du Cabernet sauvignon, mais moins colorés et moins tanniques. Le Petit verdot est un cépage que l'on considère comme accessoire mais qui présente l'avantage d'apporter la couleur et les tanins au vin.

Tout en sachant qu'il y a certainement des effets millésimes [137], les vins d'une même propriété sont produits à partir des raisins cultivés dans les mêmes vignobles et sont vinifiés par le même personnel de la propriété, qui devraient obtenir des compositions plus cohérentes une année après l'autre. Chaque échantillon représenterait alors un moment donné dans la vie d'un vin. Cette approche fournira des informations raisonnables sur l'évolution des tanins condensés et pigments polymérisés durant le vieillissement du vin.

La quantification des tanins condensés et des pigments polymérisés a été effectuée afin de mieux comprendre leurs évolutions durant le vieillissement du vin rouge. Une séance de dégustation a été également effectuée sur la série de vin de l'appellation de Languedoc Montpeyroux car cette série de vins était la plus complète et avait le plus grand nombre de millésimes. Les résultats sensoriels et les résultats chimiques ont été comparés afin d'estimer

l'impact des évolutions des composés polyphénoliques sur l'aspect couleur et l'aspect gustatif du vin rouge durant le vieillissement.

II. Les tanins condensés

II.1 L'évolution des tanins condensés de type B

Les tanins condensés de type B préalablement identifiés ont été quantifiés et exprimés en mg/L et en équivalents (+)-catéchine sur le système UPLC-Q-TOF. La **Figure 97** montre l'évolution de la (+)-catéchine et de l'(-)-épicatéchine ainsi que des tanins condensés (des dimères jusqu'aux pentamères) ayant comme unités de base la (+)-catéchine ou l'(-)-épicatéchine dans des vins rouges. Les vins analysés proviennent de l'appellation de Languedoc Montpeyrroux et sont âgés de 3 à 23 ans. Les indices de polyphénols totaux (IPT) des vins ont également été mesurés (**Figure 97**).

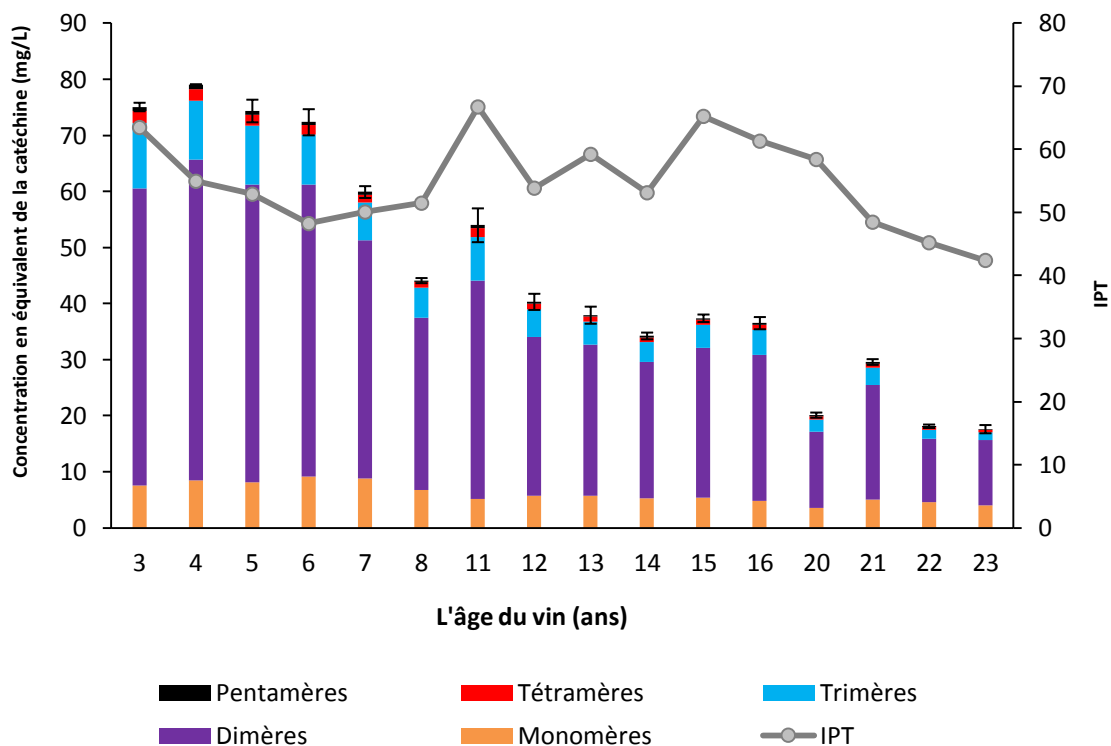


Figure 97. L'évolution des tanins condensés de type B durant le vieillissement du vin rouge (Languedoc Montpeyrroux).

Comme illustré à la **Figure 97**, une légère diminution d'indice IPT a été observée durant le vieillissement, mais elle reste plutôt stable dans tous les échantillons. L'effet millésime

contribue fortement à la variation d'IPT. En revanche, les concentrations des tanins condensés de type B (des monomères aux pentamères) mesurés montrent une forte tendance à la diminution durant le vieillissement. Cette observation confirme partiellement l'hypothèse proposée dans le **Chapitre 1 VII.6** : la diminution du DPM calculé par la méthode phloroglucinolyse durant le vieillissement du vin rouge indique uniquement une diminution des tanins condensés natifs de type B dans le vin. Les tanins condensés de type B s'oxydent, se réarrangent, se re-condensent et se transforment pour former de nouveaux oligomères ayant des masses différentes durant le vieillissement. Néanmoins, l'évolution des hexamères jusqu'aux polymères des tanins condensés de type B doit être clarifiée. En augmentant de taille, la stabilité des composés est probablement modifiée.

La même tendance de diminution des tanins condensés de type B a été également observée pour les deux autres séries de vins rouges de Bordeaux (vins de Saint-Émilion **Figure 98A** et vins de Saint-Estèphe **Figure 98B**). La concentration en monomères reste relativement stable durant le vieillissement, surtout pour les millésimes les plus vieux. En revanche, la diminution de la concentration des tanins dimères et oligomères de type B semble plus rapide et continue même pour les millésimes les plus anciens.

Les tanins dimères et oligomères ont probablement une plus grande réactivité durant le vieillissement notamment vis-à-vis des réactions oxydatives. En effet, les dimères et oligomères peuvent, contrairement aux monomères, former des liaisons intra-moléculaires dérivant de mécanisme oxydatif (formation de liaison de type A ou de liaison entre cycle B).

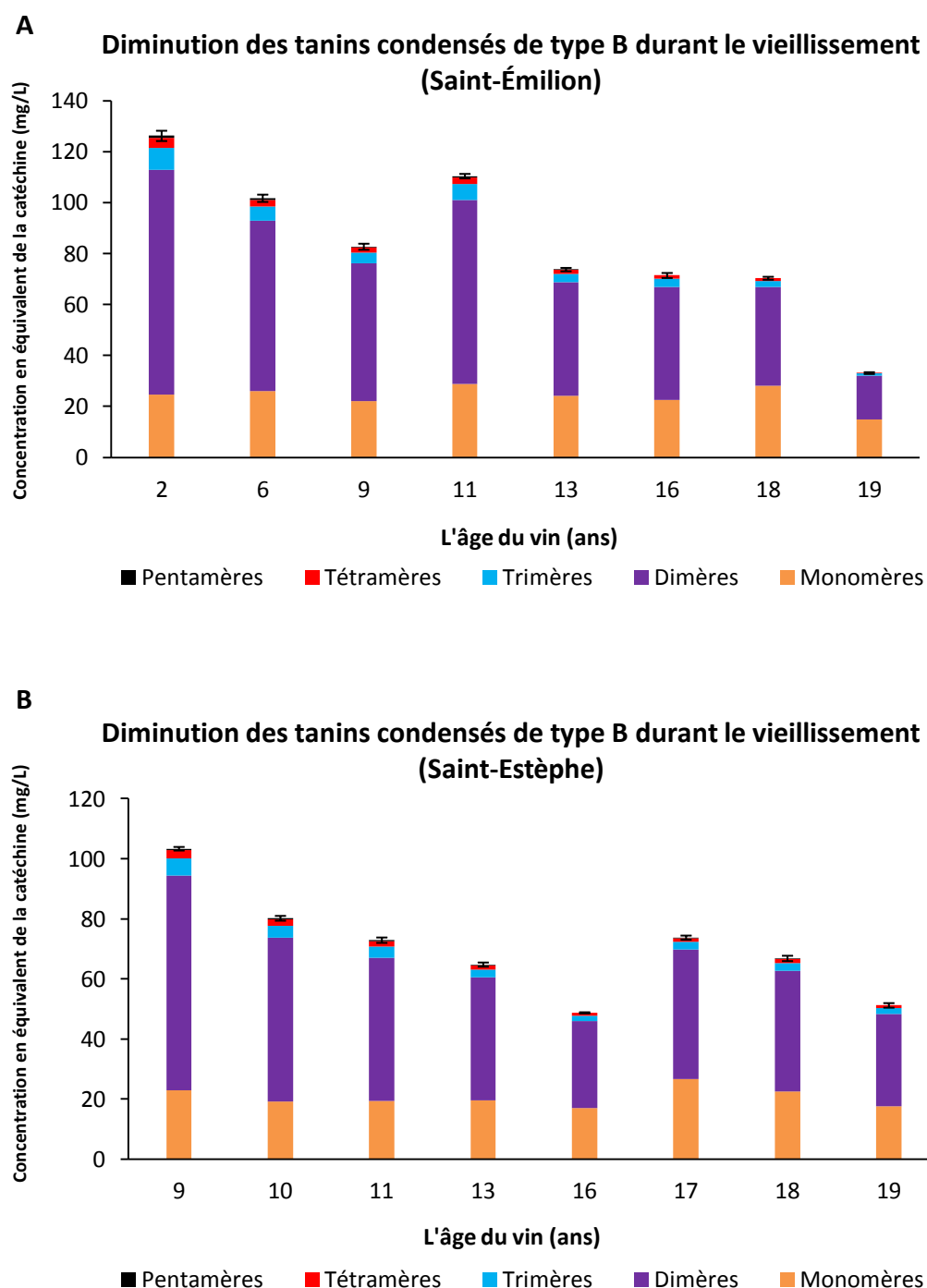


Figure 98. L'évolution des tanins condensés de type B durant le vieillissement du vin rouge. A : La série des vins de l'appellation Saint-Émilion ; B : La série des vins de l'appellation Saint-Estèphe.

Si l'on superpose les courbes d'évolution des tanins condensés de type B dans les trois séries de vin rouge, une différence entre les vins de Languedoc Montpeyrroux et les deux séries de vins de Bordeaux a été observée (**Figure 99**). Les concentrations des tanins condensés de type B dans les deux séries de vins de Bordeaux de différents millésimes sont proches et elles sont plus élevées que celles des vins de Languedoc Montpeyrroux pour tous les millésimes mesurés.

Ces différences de concentration peuvent découler de la teneur en tanin dans les différents cépages et également du mode de vinification (remontage et macération post-fermentaire). De plus, si l'on compare les pentes des trois courbes d'évolution avec une régression linéaire, la diminution de la concentration des tanins condensés de type B dans les vins de Bordeaux ($\alpha = -4,24$ et $\alpha = -3,33$) est plus rapide que celle des vins de Languedoc Montpeyrroux ($\alpha = -3,00$). Cette diminution plus rapide dans les vins de Bordeaux est peut-être due à l'acidité légèrement plus élevée dans ces vins, favorisant les mécanismes d'évolution sous contrôle acide.

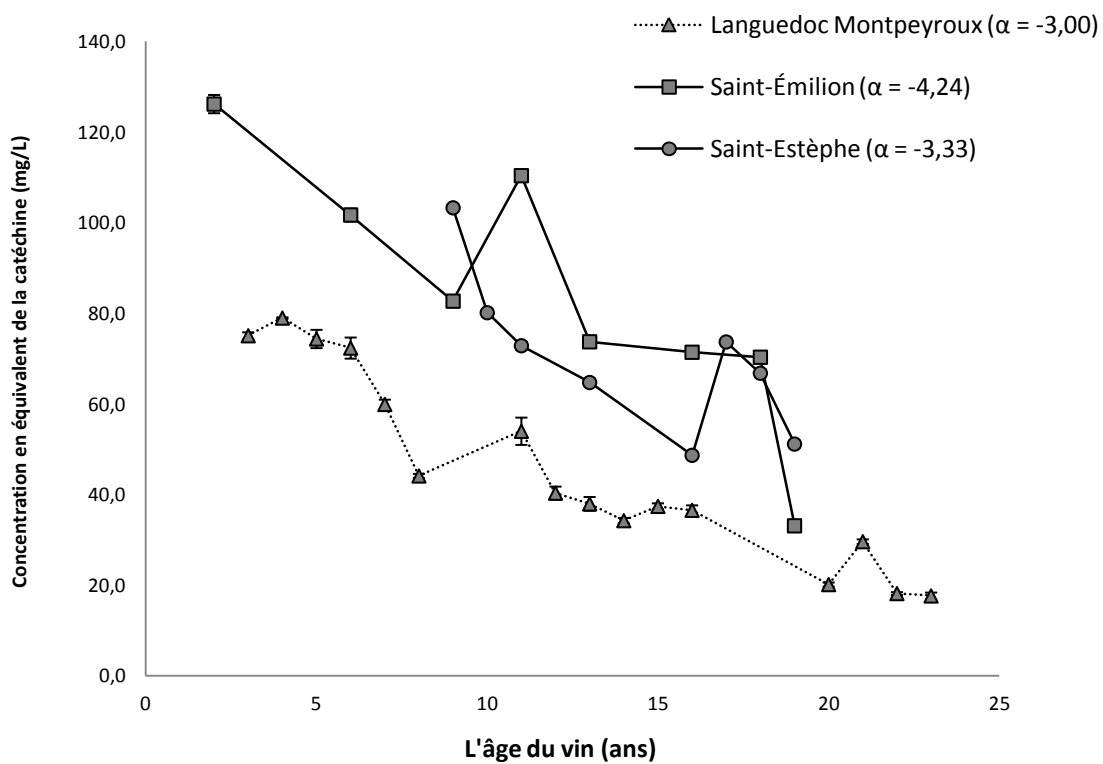


Figure 99. L'évolution des tanins condensés de type B (des monomères aux pentamères) au cours du vieillissement dans les trois séries de vin rouge. (α : pente de régression linéaire)

II.2 L'évolution des tanins condensés couronnes

La quantification des tanins condensés tétramère et pentamères couronnes a été réalisée en utilisant la courbe de calibration du tétramère couronne. Afin de comparer leurs

concentrations et leurs évolutions avec les tannins condensés de type B, cette méthode de quantification a été également appliquée aux tétramère et pentamères de type B.

Les concentrations en tétramère couronne dans les vins rouges de Languedoc Montpeyroux s'élèvent de 15 à 45 mg/L (**Figure 100**). Afin de comparer l'évolution du tétramère couronne avec un tétramère de type B au cours du vieillissement, le tétramère de type B le plus abondant (R.T. = 4,968) a été quantifié avec la courbe de calibration du tétramère couronne. Les concentrations de ce tétramère de type B varient entre 5 et 47 mg/L dans les vins rouges de Languedoc Montpeyroux et diminuent fortement durant le vieillissement. En comparant avec l'évolution du tétramère de type B, une stabilité élevée de la concentration du tétramère couronne durant le vieillissement a été observée. De plus, les variations de concentration observées pour ce tétramère couronne s'avèrent être corrélées avec la richesse polyphénolique totale du vin (IPT). C'est-à-dire que la variation de la concentration du tétramère couronne est plutôt due à l'effet millésime qu'au vieillissement et que sa concentration est relativement stable avec le temps.

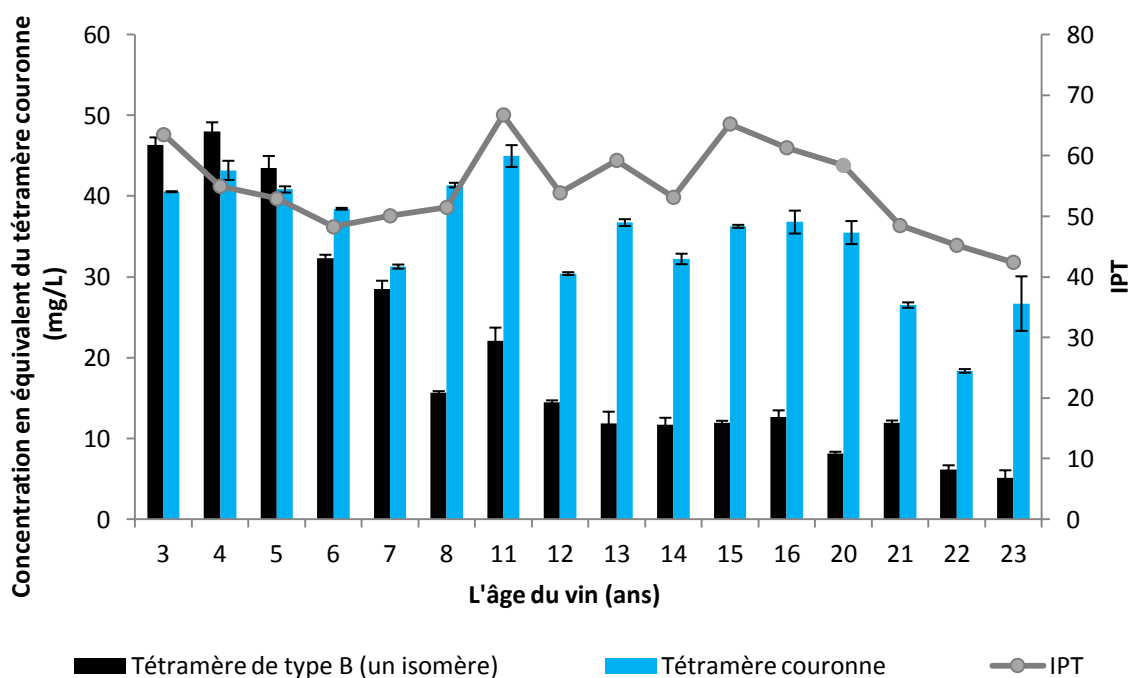


Figure 100. La comparaison des évolutions d'un tannin tétramère de type B et le tétramère couronne durant le vieillissement (Languedoc Montpeyroux).

L'évolution des pentamères couronnes durant le vieillissement du vin présente la même stabilité que pour le tétramère couronne mais avec une concentration moins élevée (entre 10 et 45 mg/L équivalent du tétramère couronne) (**Figure 101**). Comme pour le tétramère, l'évolution des pentamères couronnes suit la même tendance que l'IPT des vins. Pour les pentamères de type B, un seul isomère ne pouvait pas être quantifié en raison de sa faible concentration dans les vins de plus de 5 ans. Pour cette raison, la comparaison a été faite entre tous les pentamères de type B avec les deux pentamères couronnes (pentamère 1 et pentamère 2).

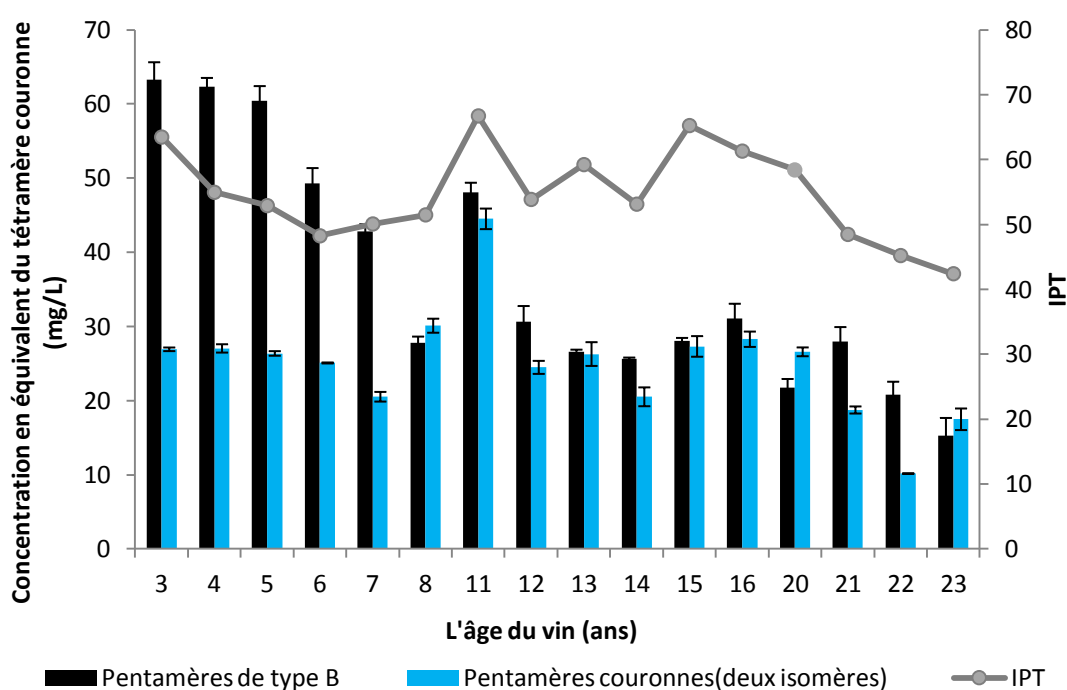


Figure 101. La comparaison des évolutions des tanins pentamères de type B et les deux isomères de pentamère couronne durant le vieillissement (Languedoc Montpeyroux).

La stabilité de la concentration du tétramère couronne a également été observée pour les deux séries de vins de Bordeaux. En revanche, pour tous les millésimes, le niveau du tétramère couronne est légèrement plus élevé dans les vins de Languedoc Montpeyroux issus du cépage Syrah que dans les vins de Bordeaux issus des cépages Cabernet Sauvignon, Merlot et Cabernet Franc (**Figure 102**). Cette observation est à l'inverse des niveaux obtenus pour les tanins condensés de type B qui sont plus abondants dans les vins de Bordeaux que dans les vins de Languedoc Montpeyroux (**Figure 99**). Il y a donc proportionnellement plus de tanins couronnes dans les vins issus de Syrah quel que soit le millésime.

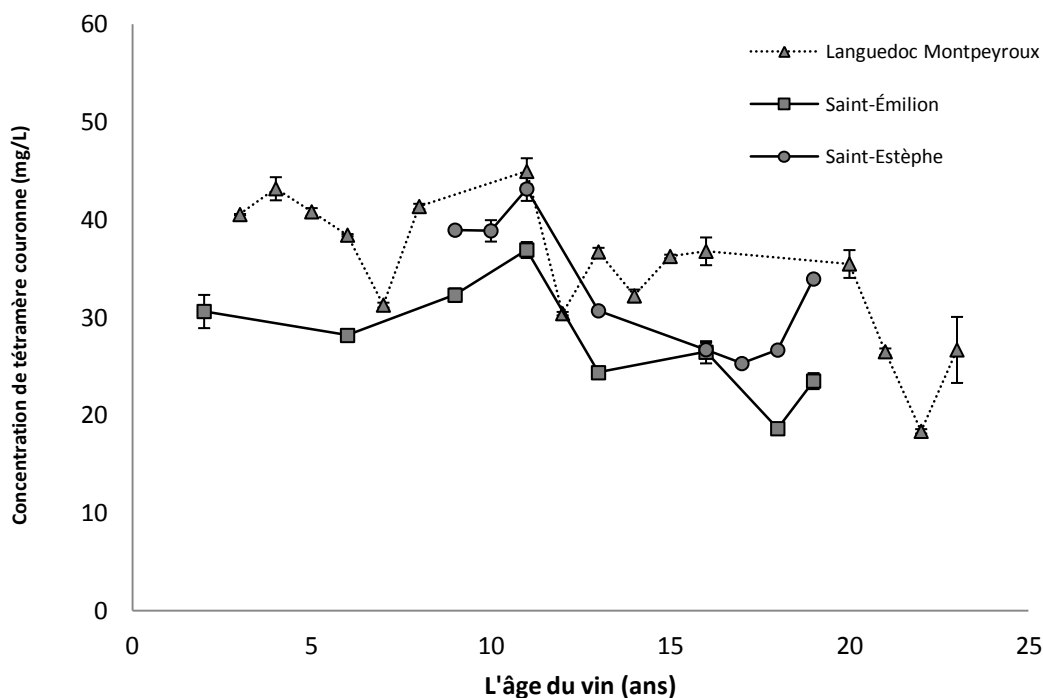


Figure 102. L'évolution du tétramère couronne durant le vieillissement dans les trois séries de vin rouge.

Si les tanins couronnes sont présents dans le raisin et donc extraits durant la macération, ces résultats indiquent donc une concentration plus élevée des tanins couronnes dans les raisins de Syrah que dans les raisins de Cabernet sauvignon, de Cabernet franc et de Merlot. Même si nous avons montré que les tanins couronnes peuvent être formés en milieu modèle du vin (**Chapitre 3 IV.8**), leur mécanisme de formation est sous contrôle acide. En effet, nous avons montré que plus le milieu était acide, plus il y avait formation du tétramère couronne à partir des oligomères de type B. Dans les vins étudiés, les teneurs les plus importantes ont été trouvées dans les vins les moins acides (les vins de Languedoc Montpeyroux), donc les différences de teneur ne peuvent s'expliquer par une formation de ces tanins durant l'élevage et le vieillissement mais bien par une différence de concentration dans les raisins. De plus, si les tanins couronnes étaient formés durant le vieillissement à partir des tanins oligomères de type B, leurs concentrations devraient augmenter, ce qui n'est pas le cas. Ces tanins seraient donc extraits des parties solides du raisin durant les étapes de vinification du vin. Des études plus approfondies sur ces tanins couronnes sont nécessaires pour pouvoir caractériser précisément leur origine et leur cinétique d'extraction.

II.3 L'évolution des dimères de type A

A cause des faibles concentrations des deux dimères de type A identifiés dans le vin rouge, leur quantification a été effectuée uniquement dans la série de vin de Languedoc Montpeyrroux (**Figure 103**). Une diminution beaucoup moins marquée que celle des tanins de type B a été observée. Effectivement, il a été montré que les procyanidines dimères de type A sont plus stables vis-à-vis des modifications de pH et de température que les procyanidines dimères de type B [173]. Ils peuvent également avoir une meilleure stabilité vis-à-vis de la transformation oxydative au cours du vieillissement.

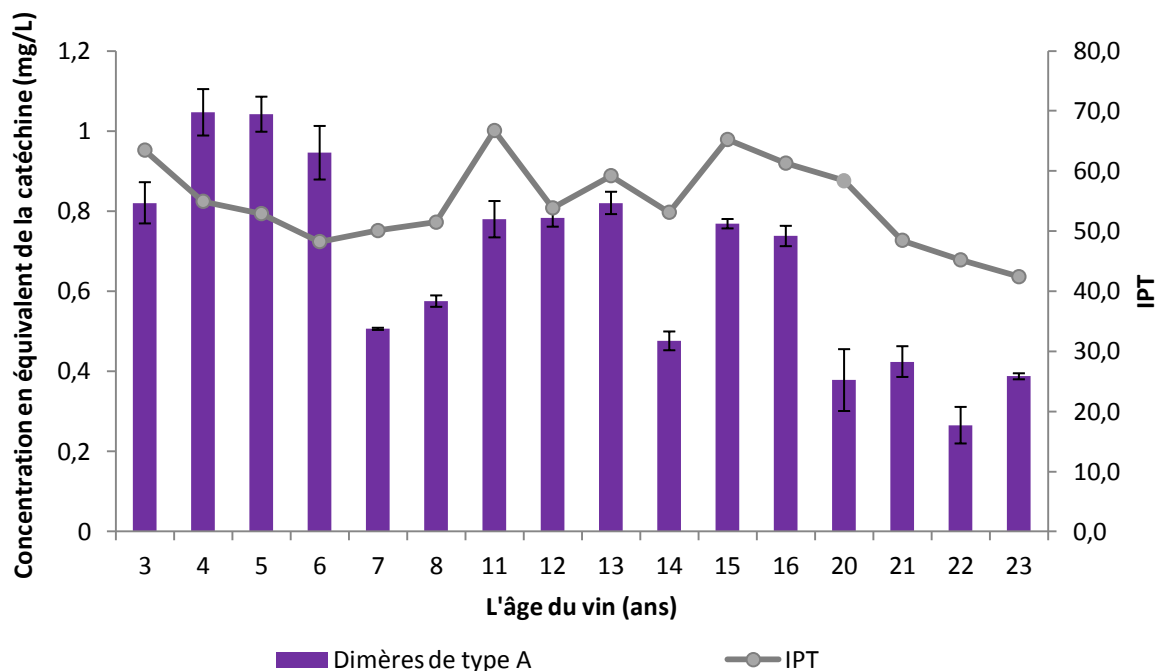


Figure 103. L'évolution des tanins dimères de type A durant le vieillissement (Languedoc Montpeyrroux).

II.4 L'évolution des tanins liés par pont éthylidène

La quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène a été réalisée via la quantification du marqueur EDP. Comme montré par la **Figure 104**, les concentrations du marqueur EDP dans les trois séries de vin analysées sont entre 1,0 et 11,1 mg/L. Cette gamme de concentration est plus élevée que celle qui a été rapportée par Drinkine *et al.* [187] qui est entre 0,8 et 2,8 mg/L mesurée dans trois séries de vins de Bordeaux.

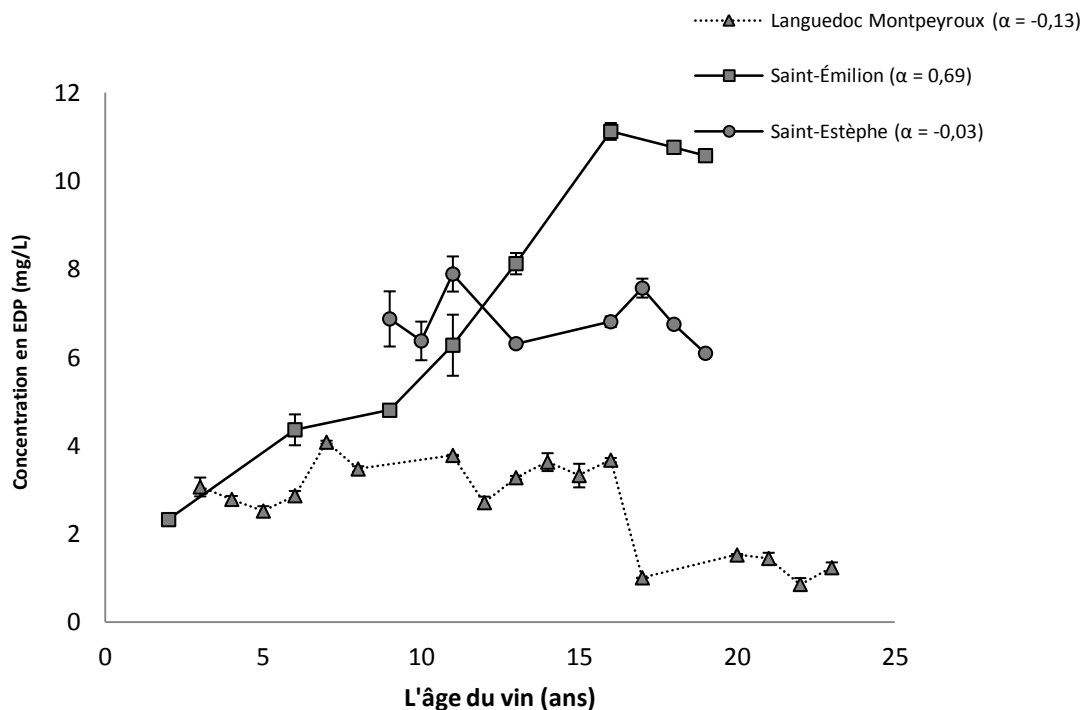


Figure 104. L'évolution des tanins liés par pont éthylidène durant le vieillissement dans les trois séries de vin rouge. (α : pente de régression linéaire)

De plus, différentes tendances d'évolution ont été observées pour les trois séries de vins analysées. La concentration des tanins condensés liés par pont éthylidène diminue dans les vins de Languedoc Montpeyroux (pente de régression linéaire $\alpha = -0,13$) durant le vieillissement alors que leur niveau augmente fortement dans les vins de Bordeaux issus de l'appellation Saint-Émilion ($\alpha = 0,69$). En revanche, leur concentration est restée quasi stable durant le vieillissement dans les vins de Bordeaux issus de l'appellation Saint-Estèphe ($\alpha = -0,03$). L'étude de Drinkine *et al.* [187] a également montré que les quantités de pont éthylidène sont significativement différentes dans les trois séries de vins de Bordeaux, mais aucune corrélation statistique n'a pu être obtenue avec l'âge du vin.

Cette grande variation observée selon l'origine des vins est probablement due aux conditions d'élevage et de stockage bien que dans les trois cas, les vins ont été élevés en barrique et ont été bouchés avec un bouchon en liège naturel. Néanmoins, une variation entre 0,1 et 8 $\mu\text{l}/\text{jour}$ d'oxygène dissous dans une bouteille bouchée avec un même lot de bouchons en liège naturel a été rapportée dans la littérature [274]. En conclusion, une augmentation du nombre de liaisons inter-flavanols par pont éthylidène indique forcément, soit une oxydation plus

importante des vins durant leur vieillissement en bouteille, soit une production importante d'acétaldéhyde durant la vinification ou l'élevage, pour que la polymérisation par pont éthylidène puisse continuer à se faire même durant le vieillissement en bouteille.

III. Les pigments monomériques

Comme illustré dans le **Chapitre 4 I.1-2** concernant l'identification des pigments du vin rouge, les anthocyanes et leurs dérivés acylés ainsi que des pyranoanthocyanes de type vitisine A, vitisine B et pinotine ont été identifiés. Une comparaison d'évolution durant le vieillissement entre les dérivés d'anthocyanes et des pyranoanthocyanes dans les trois séries de vins rouges a été effectuée afin de mieux comprendre le rôle des pyranoanthocyanes durant le vieillissement du vin. Les composés quantifiés sont à base de malvidine-3-*O*-glucoside qui est l'anthocyanane la plus abondante dans le vin rouge, ceux-ci sont listés dans le **Tableau 28**.

Tableau 28. Les anthocyanes et les pyranoanthocyanes quantifiées pour la comparaison.

Les anthocyanes	Les pyranoanthocyanes
	Mv-3- <i>O</i> -glc-acide pyruvique
	Mv-3- <i>O</i> -acétylglc-acide pyruvique
	Mv-3- <i>O</i> -coumaroylgc-acide pyruvique
	Mv-3- <i>O</i> -glc-acétaldéhyde
	Mv-3- <i>O</i> -acétylglc-acétaldéhyde
	Mv-3- <i>O</i> -coumaroylgc-acétaldéhyde
Mv-3- <i>O</i> -glucoside	Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylcatéchol
Mv-3- <i>O</i> -acétylglucoside	Mv-3- <i>O</i> -acétylglc-4-vinylcatéchol
Mv-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	Mv-3- <i>O</i> -coumaroylgc-4-vinylcatéchol
	Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylphénol
	Mv-3- <i>O</i> -acétylglc-4-vinylphénol
	Mv-3- <i>O</i> -coumaroylgc-4-vinylphénol
	Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylguaiacol
	Mv-3- <i>O</i> -acétylglc-4-vinylguaiacol
	Mv-3- <i>O</i> -coumaroylgc-4-vinylguaiacol

La **Figure 105** montre les évolutions des anthocyanes et des pyranoanthocyanes durant le vieillissement dans les trois séries de vins analysées. Cette évolution est cohérente avec les observations rapportées dans la littérature, soit une diminution rapide des anthocyanes et la concentration des différentes pyranoanthocyanes restant stable durant le vieillissement. Leurs teneurs et les cinétiques d'évolution suivent la même tendance dans les trois séries de vins rouges avec les concentrations légèrement plus élevées dans les deux séries de vins de Bordeaux. A partir de l'âge de 6 ans, les concentrations des pyranoanthocyanes sont plus élevées que celles des anthocyanes suite à la diminution continue des anthocyanes.

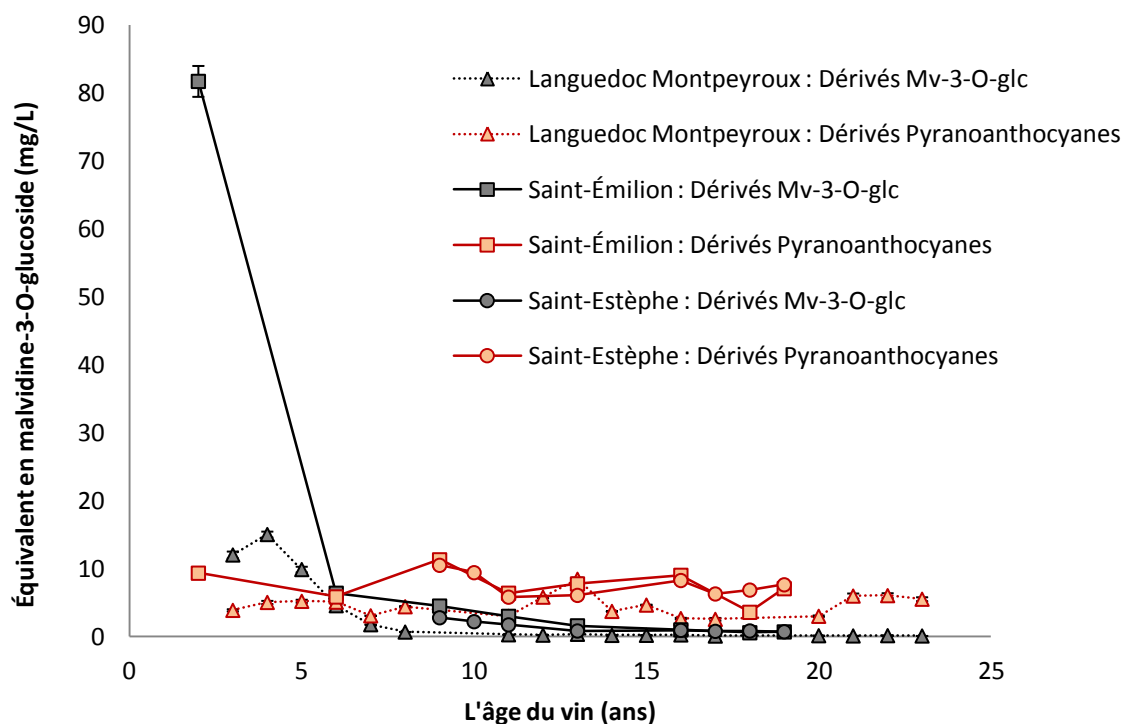


Figure 105. L'évolution des anthocyanes et des pyranoanthocyanes durant le vieillissement du vin.

Malgré la stabilité globale observée pour les pyranoanthocyanes, les pyranoanthocyanes de type vitisine A et B ne contribuent pas de la même façon que les pyranoanthocyanes de type pinotine ou hydroxyphényl-pyranoanthocyanes. Comme montré à la **Figure 106**, parmi eux, les composés ayant des concentrations les plus élevées dans le vin sont les dérivés de la vitisine A et les dérivés de la Mv-3-O-glc-4-vinylphénol. Les dérivés de la vitisine B et les dérivés de la Mv-3-O-glc-4-vinylgalaïacol sont les moins concentrés. Les concentrations des dérivés de type vitisine A et de type vitisine B diminuent au cours du vieillissement. A contrario, les concentrations des dérivés de la Mv-3-O-glc-4-vinylphénol et de la Mv-3-O-glc-4-vinylgalaïacol ont tendance à augmenter. Notons que la diminution des dérivés de vitisine B est importante durant les premières années de vieillissement. Par ailleurs, il n'y a pas de différences d'évolution significatives entre les trois séries de vins analysées.

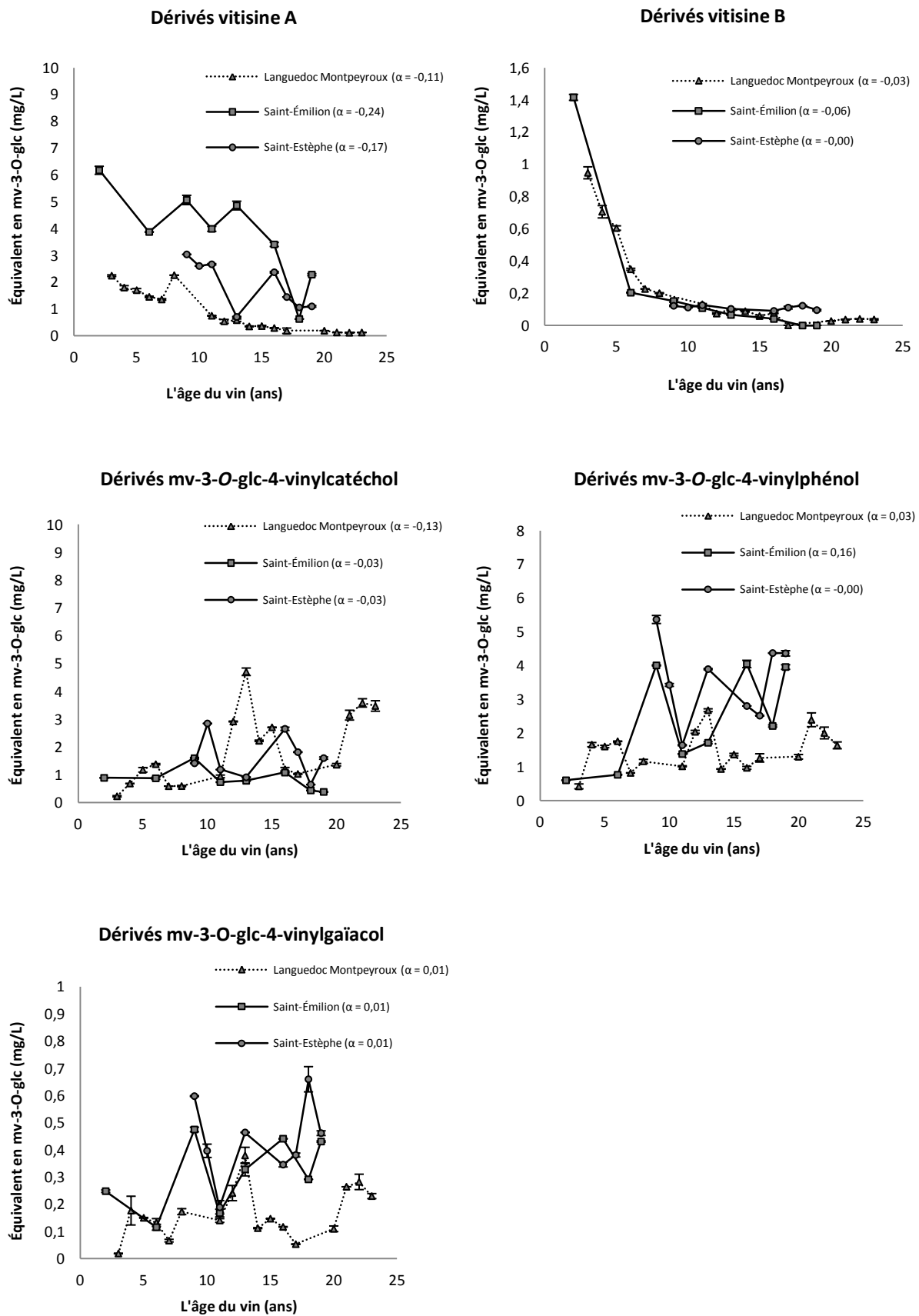


Figure 106. L'évolution des différents pyranoanthocyanes durant le vieillissement du vin. (α : pente de régression linéaire)

IV. Les pigments polymérisés

IV.1 Introduction

Les pigments polymérisés préalablement identifiés ont été quantifiés en utilisant leurs marqueurs respectifs libérés après la phloroglucinolyse, cela permet d'évaluer les impacts respectifs des différentes familles de pigments polymérisés au cours du vieillissement du vin rouge.

Les liaisons de type B de la fraction oligomérique et polymérique sont clivées durant la phloroglucinolyse, ce qui conduit à la libération soit des marqueurs monomériques ou dimériques pour les unités terminales, soit des marqueurs sous forme d'adduit de phloroglucinol pour les unités d'extension. Pour les marqueurs monomériques et dimériques, leurs concentrations avant et après phloroglucinolyse ont été déterminées et la différence correspond à la partie libérée par la dépolymérisation. Quant aux adduits de phloroglucinol libérés, ils ont été quantifiés uniquement dans la fraction dépolymérisée.

Des différences de concentrations entre les différentes familles de pigments polymérisés ainsi que l'importance des structures polymériques par rapport aux structures dimériques ont été mises en évidence.

IV.2 L'évolution des pigments polymérisés par condensation directe de type B

Comme discuté précédemment dans le **Chapitre 4 II.2-3**, trois formes de pigments polymérisés issus de la condensation directe entre les anthocyanes et les tanins condensés par les liaisons inter-flavonoïdes de type B sont possibles : A^+-T , A(flavène)-T et $T-A^+$.

En effet, parmi ces trois formes, la forme A^+-T identifiée dans un vin rouge jeune après seulement 10 mois d'élevage en barrique (**Chapitre 3 II.2**) n'a pas été détectée dans nos trois séries de vin. L'absence de ces adduits dans nos échantillons en cours de vieillissement (2 ans et plus) peut être expliquée par le fait que ces pigments polymérisés seraient peu stables dans le vin et qu'une fois formés, ils seraient oxydés et/ou transformés en forme xanthylum.

Certes, ces résultats ont été obtenus sur une quantité de vin limitée (32 vins différents), néanmoins au vu de ces résultats, la participation réelle des pigments polymérisés de type A⁺-T à la couleur des vins au cours du vieillissement est à modérer, voire à réévaluer. Leur participation à la couleur des vins devant peut-être être limitée aux vins très jeunes et uniquement en cours d'élevage. Des investigations supplémentaires en fonction des conditions d'élevage des vins (barrique, cuve inox, micro-oxygénation) seront nécessaires pour éclaircir ce point.

Malgré l'absence de ces adduits dans nos trois séries de vin analysées, les pigments polymérisés de type A⁺-T ont été identifiés dans un vin rouge jeune après seulement 10 mois d'élevage en barrique (**Chapitre 3 II.2**). La phloroglucinyse a été effectuée sur cet échantillon de vin jeune qui contient les deux adduits A⁺-F afin de mieux comprendre leur comportement vis-à-vis de la dépolymérisation chimique. En effet, les concentrations des deux adduits A⁺-F restent stables après la phloroglucinyse et aucun adduit de type A⁺-F-phloroglucinol n'a été libéré. Cette observation prouve directement pour la première fois que ce type de liaison A⁺-F résiste également à la phloroglucinyse comme les adduits de type T-A⁺, de type A-F (type A) et de type A⁺-pont éthyliène-F. Ainsi, l'avis hypothétique des auteurs sur l'origine des anthocyanes libérées après la dépolymérisation est soutenue : elles proviennent des structures A(flavène)-T mais pas des structures A⁺-T [158, 161].

Afin de quantifier la structure polymérique de type Mv(flavène)-T, l'augmentation de la malvidine-3-*O*-glucoside après la phloroglucinyse a été mesurée. Comme montré à la **Figure 107**, différentes tendances d'évolution des structures polymériques de type Mv(flavène)-T ont été observées pour les trois séries de vins analysées. Une augmentation d'environ 117 % a été observée pour la série de vin de Bordeaux de l'appellation Saint-Émilion ($\alpha = 0,32$). Les deux autres séries de vin montrent, quant à elles, des tendances de diminution concernant ce type de structure ($\alpha = -0,12$ et $\alpha = -0,61$), avec une importante variabilité entre les millésimes. Une différence en termes de concentration totale entre les vins de Bordeaux et les vins de Languedoc Montpeyroux a été observée. La concentration des polymères incolores de type Mv(flavène)-T est plus élevée dans les vins de Bordeaux.

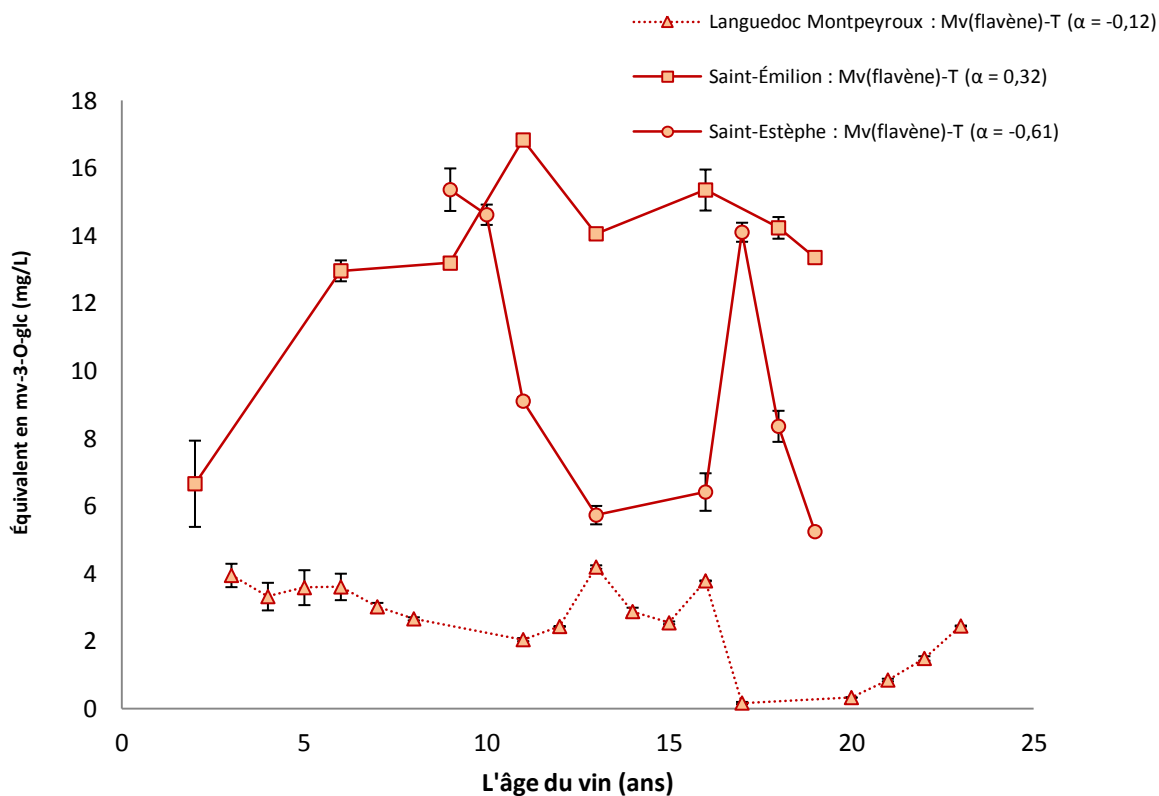


Figure 107. L'évolution des polymères incolores de type Mv(flavène)-T durant le vieillissement. (α : pente de régression linéaire)

Concernant le troisième type de pigments polymérisés issus de la condensation directe, les pigments polymérisés de type T-A⁺, leurs quantités peuvent être déterminées par la quantification des adduits F-Mv⁺ libérés durant la phloroglucinolyse. Dans ce cas également, une quantification des composés de type F-Mv⁺ doit être effectuée avant et après dépolymérisation puisque des dimères F-Mv⁺ sont présents dans le vin. Les adduits F-Mv⁺ libérés à partir des pigments polymérisés ont été quantifiés dans les trois séries de vins étudiées et leurs évolutions ont été comparées avec les adduits F-Mv⁺ (sous forme dimérique) présentes dans les vins (**Figure 108**). La concentration des adduits F-Mv⁺ dimériques et les pigments polymérisés de type T-Mv⁺ diminuent tout au long du vieillissement. De plus, cette famille de pigments est plus présente sous forme polymérique que dimérique malgré la vitesse de diminution plus rapide pour des structures polymériques. Comme observé précédemment pour les structures incolores de type Mv(flavène)-T, une différence de teneur entre des vins de Bordeaux et des vins de Languedoc Montpeyroux a été observée. Leurs concentrations étaient là encore plus élevées dans les vins de Bordeaux. Dans ce cas également, cette différence est probablement induite par la différence d'acidité des vins.

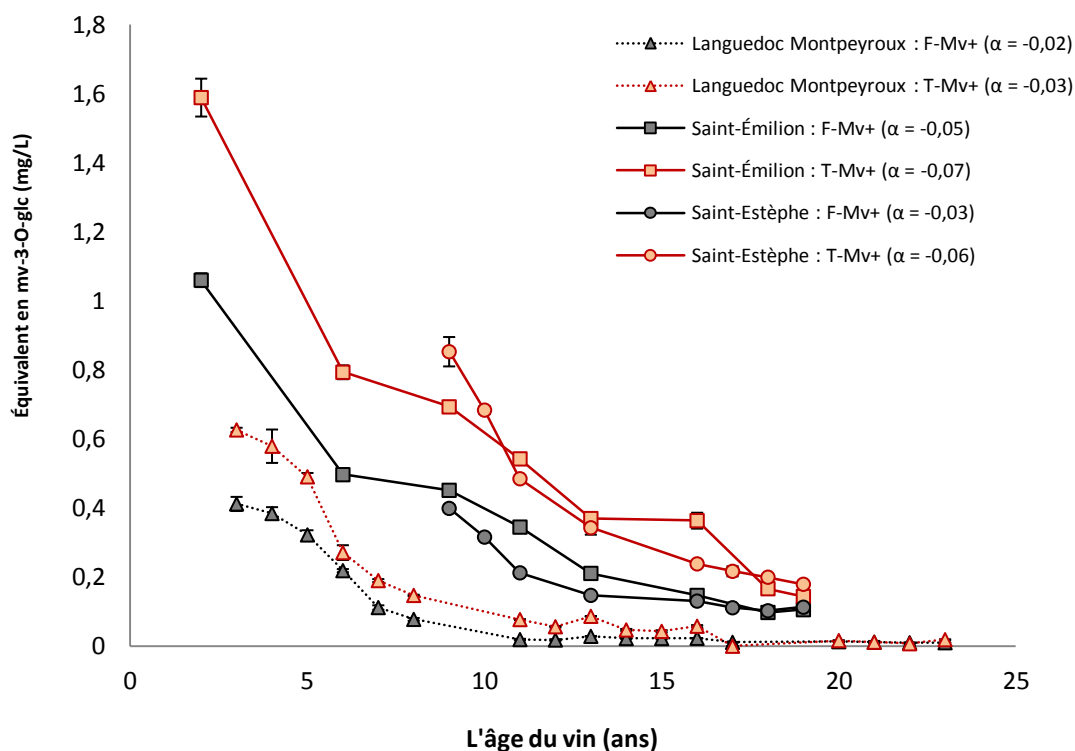


Figure 108. L'évolution des pigments polymérisés de type T-Mv⁺ durant le vieillissement. (α : pente de régression linéaire)

IV.3 L'évolution des structures polymériques par condensation directe de type A

Comme mentionné dans le **Chapitre 4 II.3-4**, deux types de marqueurs ont été identifiés pour cette famille de composés incolores résultant d'une réaction entre les anthocyanes et les tanins. La quantification après phloroglucinolyse des dérivés de type A-F(type A)-phloroglucinol permet de quantifier les structures oligomériques et polymériques ayant l'adduit A-F(type A) comme unité supérieure. Alors que la quantification des dérivés de type A-F(type A) libérés également durant la phloroglucinolyse permet de quantifier les structures oligomériques et polymériques ayant une liaison de type A-F(type A) comme unité inférieure. L'analyse des trois séries de vins étudiées montre que la concentration de cette famille de dérivés est relativement stable durant le vieillissement avec des valeurs de pente de droites de régression proches de zéro (**Figure 109**). Néanmoins, une augmentation (93 %) des structures oligomériques et polymériques a été observée pour la série de vin de Bordeaux de l'appellation Saint-Émilion jusqu'à 18 années de vieillissement. Dans chacune des séries de

vins analysées, les structures polymériques ayant le motif A-F(type A) comme unité inférieure sont plus abondantes pour tous les millésimes. De plus, comme observé précédemment, une différence de niveaux entre des vins de Bordeaux et des vins de Languedoc Montpeyroux a été observée. Pour les trois formes, leurs concentrations sont plus élevées dans les vins de Bordeaux.

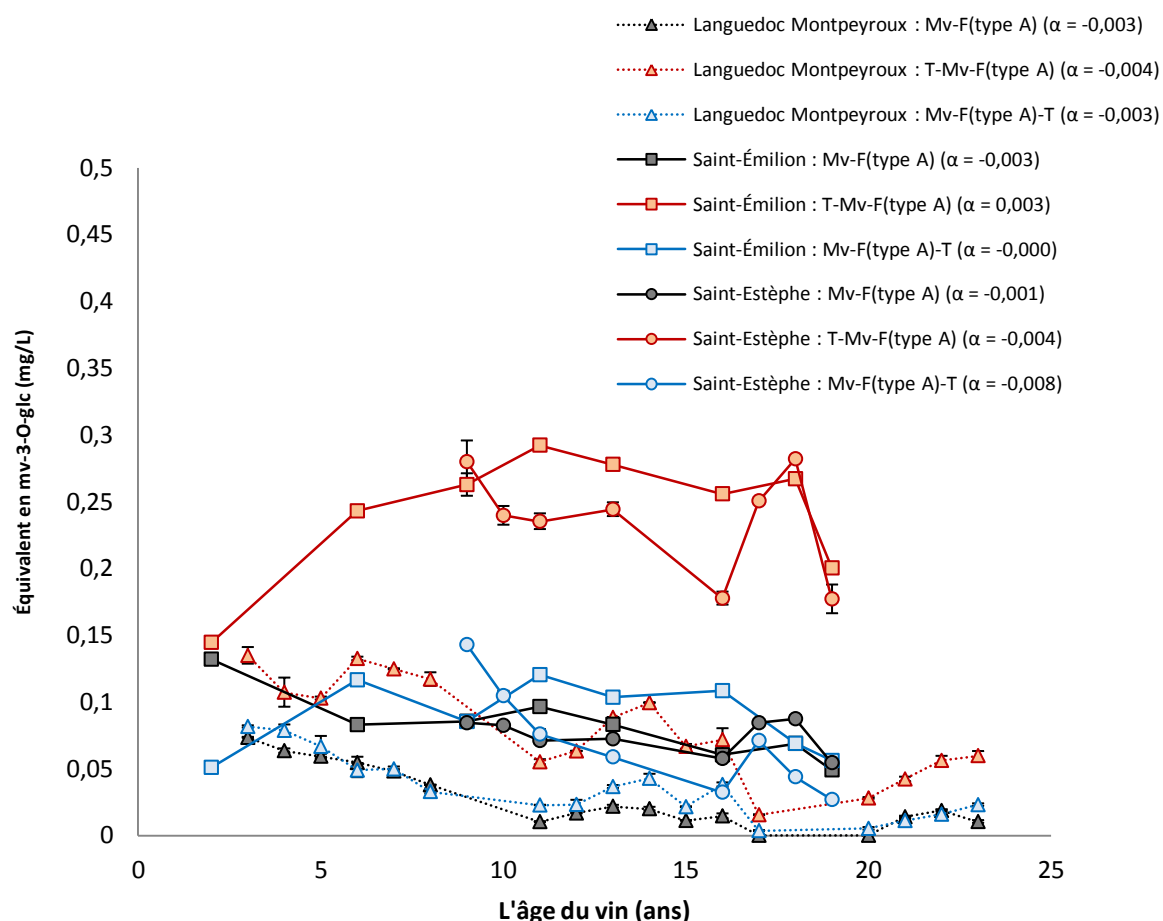


Figure 109. L'évolution des polymères incolores de type T-Mv-F(type A) et de type Mv-F(type A)-T durant le vieillissement du vin. (α : pente de régression linéaire)

IV.4 L'évolution des pigments polymérisés par condensation indirecte

Il a été montré dans le **Chapitre 4 II.6** que les liaisons via pont éthylidène entre une unité anthocyanique et une unité flavanol ne sont pas clivables dans les conditions de phloroglucinolyse, contrairement aux tanins liés par pont éthylidène. Néanmoins, comme montré précédemment, des marqueurs spécifiques des liaisons A⁺-pont éthylidène-F

permettant la quantification de ces pigments polymérisés ont été identifiés. Grâce à ces marqueurs, la concentration des Mv-pont éthylidène-F et leurs analogues polymériques Mv-pont éthylidène-T a été mesurée dans les trois séries de vins étudiées (**Figure 110**). Une diminution importante durant les 6 premières années de vieillissement est observée pour cette famille de pigments polymérisés dans les trois séries de vins étudiées. De plus, contrairement à ce qui a été observé précédemment pour les pigments polymérisés issus d'une liaison directe tanins anthocyane, dans le cas de ces pigments polymérisés, leur teneur était du même ordre de grandeur dans les trois séries de vins analysées.

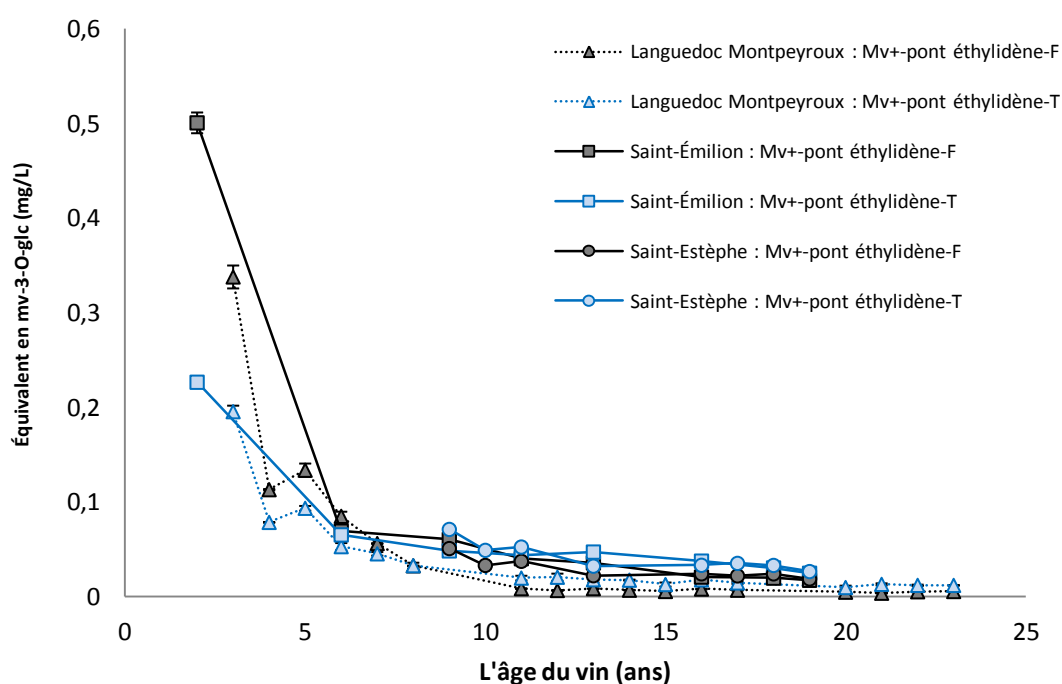


Figure 110. L'évolution des pigments polymérisés de type Mv⁺-pont-éthylidène-T durant le vieillissement du vin.

Les pigments polymérisés de type Mv⁺-pont éthylidène-Mv sont également étudiés, mais ils sont détectés uniquement dans le millésime le plus jeune (2012) de la série de vin de Bordeaux de l'appellation Saint-Émilion, et leurs concentrations deviennent trop faibles pour qu'ils puissent être quantifiables dans les millésimes plus vieux.

Ces cinétiques d'évolution montrent que les pigments polymérisés ayant un pont éthylidène, soit entre l'unité d'anthocyane et l'unité flavanol, soit entre deux unités d'anthocyane sont

principalement formés durant la vinification et l'élevage du vin. Une fois formé, la concentration dans le vin de ces pigments diminue rapidement et la cinétique d'évolution observée est identique pour les trois séries de vin étudiées. Cette similarité d'évolution peut laisser supposer que ce sont des mécanismes oxydatifs qui sont impliqués dans cette évolution plutôt que des mécanismes sous contrôle de l'acidité comme pour les familles de pigments précédemment. En effet, les vins ayant tous été bouchés avec des bouchons en liège naturel et conservés à température contrôlée dans le chai des domaines respectifs, la quantité d'oxygène qui a pénétré dans les bouteilles avec le temps est probablement du même ordre de grandeur. De plus, la formation d'un tel pigment durant le vieillissement en bouteille est peu probable notamment dans des vins ayant plus de 3 ans puisque la concentration en anthocyanes libres dans ces vins est très faible (< 20 mg/L). C'est pour cette raison que même pour les vins de l'appellation Saint-Émilion dans lesquels une augmentation des tanins liés par pont éthylidène a été observée, on ne voit pas d'augmentation des pigments Mv^+ -pont éthylidène-F.

Pour finir, il a également été montré qu'en solution modèle, des dimères de type Mv -pont éthylidène-F pouvaient être oxydés et conduire à la formation d'une structure de type xanthylum [162].

IV.5 L'évolution des anthocyanes oligomériques

Une augmentation de la concentration des anthocyanes dimériques durant la réaction de phloroglucinyse a été observée, elles peuvent être libérées à partir de la structure T- Mv - Mv . Il a été observé que les concentrations des Mv - Mv et les T- Mv - Mv diminuent durant le vieillissement (α : de -0,017 à -0,006) (**Figure 111**).

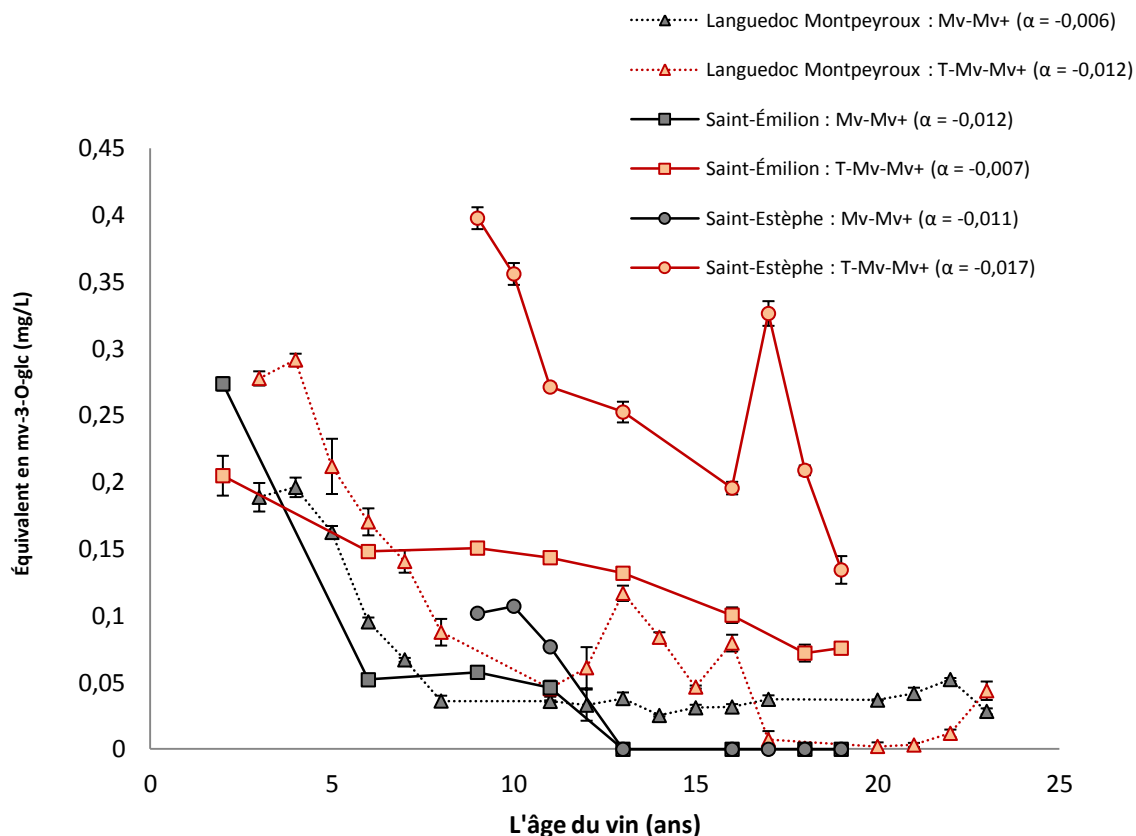


Figure 111. L'évolution des anthocyanes dimériques et des structures de type T-Mv-Mv⁺ durant le vieillissement. (α : pente de régression linéaire)

La diminution des anthocyanes dimériques est moins rapide dans les vins de Languedoc Montpeyroux ($\alpha = -0,006$) que dans les vins de Bordeaux ($\alpha = -0,012$ pour l'appellation Saint-Émilion et $\alpha = -0,011$ pour l'appellation Saint-Estèphe). Pour cette famille de pigments polymérisés encore, les structures polymériques présentent une concentration plus importante que les structures dimériques dans les trois séries de vins analysées.

Une diminution a également été observée pour l'anthocyane trimérique durant le vieillissement (**Figure 112**). Aucune différence significative en termes de teneur n'a été observée au niveau des trois séries de vins analysés concernant cette anthocyane trimérique. Leurs vitesses de diminution sont également identiques dans ces trois séries de vins ($\alpha = -0,001$). De plus, la présence de structure oligomérique de type T-Mv-Mv-Mv⁺ n'a pas été détectée puisque la concentration de la structure trimérique Mv-Mv-Mv⁺ n'a pas augmenté durant la phloroglucinyse.

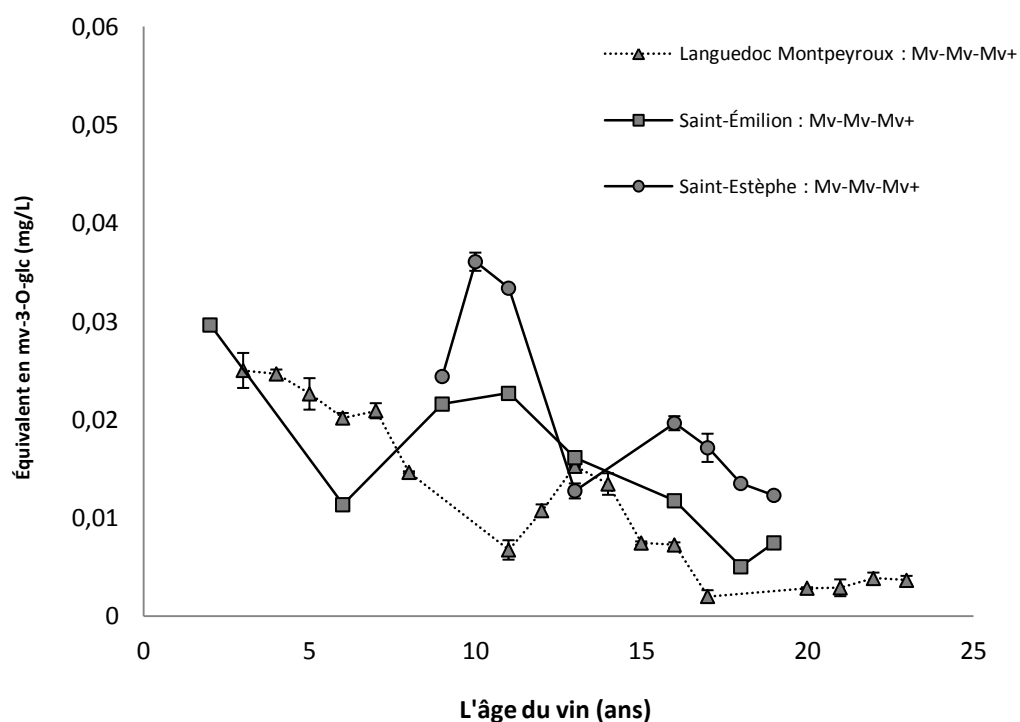


Figure 112. L'évolution des anthocyanes trimériques durant le vieillissement.

IV.6 L'évolution des flavano-pyranoanthocyanes

Les concentrations des deux pyranoanthocyanes-F et des deux pyranoanthocyanes-F-F restent stables après la phloroglucinolyse. Il n'y a pas d'adduit de type pyranoanthocyanes-F-phloroglucinol libéré. La **Figure 113** montre l'évolution des deux pyranoanthocyanes-F et des deux pyranoanthocyanes-F-F durant le vieillissement dans les trois séries de vins analysées. Malgré les effets millésimes, une augmentation de la concentration de ces composés durant les 9 premières années de vieillissement pour les deux pyranoanthocyanes-F a été observée pour les trois séries de vins. Les deux pyranoanthocyanes-F-F montrent une concentration stable durant le vieillissement.

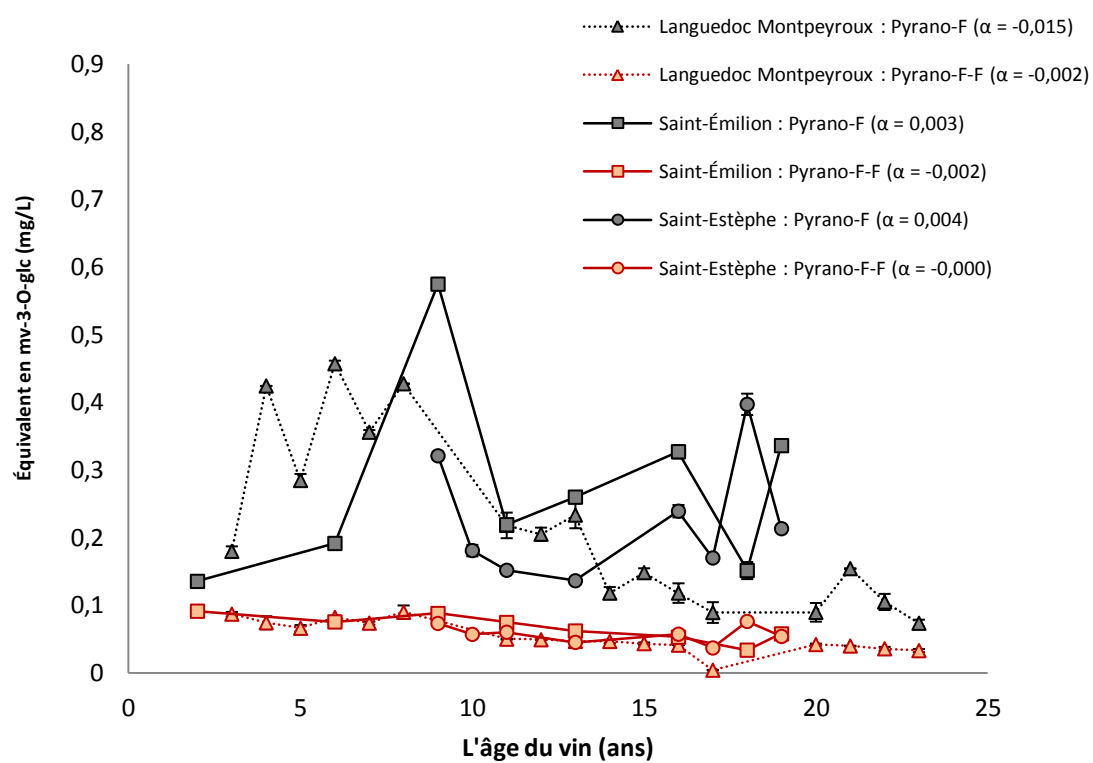


Figure 113. L'évolution des flavano-pyranoanthocyanes durant le vieillissement. (α : pente de régression linéaire)

IV.7 Conclusion

En résumé, les structures polymériques sont généralement plus abondantes que les structures dimériques. L'évolution de la concentration des différentes familles de pigments polymérisés a pu être évaluée pour la première fois avec la stratégie de phloroglucinolyse. Le **Tableau 29** récapitule les pigments monomériques, les pigments polymérisés, et les structures polymériques incolores du vin rouge quantifiés dans cette étude en fonction de l'évolution de leurs concentrations au cours du vieillissement.

Tableau 29. La comparaison des stabilités des concentrations des pigments monomériques, des pigments polymérisés et des polymères incolores durant le vieillissement en bouteille.

Les structures dont les concentrations diminuent	Les structures dont les concentrations sont plutôt stables
Dérivés vitisine A	Dérivés Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylcatéchol
Dérivés vitisine B	Dérivés Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylphénol
Mv ⁺	Dérivés Mv-3- <i>O</i> -glc-4-vinylguaïacol
T-Mv ⁺	Mv(flavène) –T
Mv-pont éthylidène-F	Mv-F(type A)
Mv-pont éthylidène-T	T-Mv-F(type A)
Mv-Mv ⁺	Mv-F(type A)-T
Mv-Mv-Mv ⁺	Mv-vinyl-F
	Mv-vinyl-F-F

V. Les analyses colorimétriques et les analyses sensorielles

V.1 L'évolution de la couleur du vin rouge durant le vieillissement

L'évolution de la couleur du vin durant le vieillissement a été évaluée par trois méthodologies différentes : la mesure de l'intensité colorante et de la teinte par spectrophotométrie, la caractérisation de la couleur en utilisant l'espace de couleur CIELAB avec la mesure des variables $L^*a^*b^*$ à l'aide d'un colorimètre, et l'évaluation sensorielle réalisée par les dégustateurs. Les échantillons étudiés correspondent à la série de 16 vins rouges de Languedoc Montpeyroux.

Tableau 30. Les valeurs des paramètres de couleurs au cours du vieillissement du vin.

Millésimes	Age (ans)	Valeurs spectrométrique		Variables CIELAB						
		IC	Teinte	L*	a*	b*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
2011	3	12,42	0,79	6,65	35,04	11,23	0,00	0,00	0,00	0,00
2010	4	11,00	0,85	10,81	40,97	18,48	4,10	5,77	7,09	10,02
2009	5	13,18	0,85	8,75	38,35	14,88	2,04	3,15	3,49	5,13
2008	6	11,60	0,90	12,21	42,40	20,93	5,51	7,20	9,54	13,16
2007	7	12,91	0,90	9,51	39,17	16,24	2,80	3,97	4,86	6,87
2006	8	14,26	0,93	8,48	37,84	14,46	1,77	2,64	3,07	4,42
2003	11	13,16	1,05	14,85	44,55	25,46	8,14	9,35	14,08	18,76
2002	12	14,19	1,08	12,73	42,17	21,84	6,03	6,97	10,45	13,94
2001	13	12,86	1,10	13,96	43,64	23,90	7,26	8,44	12,52	16,74
2000	14	12,55	1,07	14,81	43,86	25,39	8,10	8,66	14,00	18,35
1999	15	13,01	1,18	12,65	40,78	21,52	5,94	5,58	10,13	13,00
1998	16	12,38	1,26	10,23	37,25	17,30	3,52	2,05	5,92	7,18
1994	20	13,27	1,17	19,19	46,09	32,84	12,48	10,89	21,46	27,10
1993	21	11,41	1,24	23,69	45,65	40,34	16,98	10,45	28,96	35,16
1992	22	11,24	1,28	26,19	46,55	44,66	19,49	11,35	33,27	40,19
1991	23	11,30	1,27	24,58	47,62	42,09	17,87	12,42	30,71	37,64

Le **Tableau 30** montre les valeurs spectrométriques et les variables CIELAB obtenues pour les vins étudiés. Les écarts-types pour chaque mesure étudiée sont montrés à l'**Annexe 23**. Comme montré ci-dessus, l'intensité colorante est relativement stable durant le vieillissement alors que la valeur de la teinte augmente ce qui indique l'augmentation du ratio DO_{420}/DO_{520} au cours du vieillissement en bouteille.

Les valeurs de $L^*a^*b^*$ obtenues pour les différents millésimes analysés projetées sur l'espace couleur sont présentées à la **Figure 114**. Le point rouge correspond au millésime le plus jeune 2011 et l'évolution de l'aspect visuel du vin en fonction des différents millésimes est montrée par les points gris. L'augmentation de la variable L^* au cours du vieillissement indique que la clarté de la couleur du vin croît. La couleur du vin rouge durant le vieillissement évolue légèrement vers le rouge sur l'axe a^* et de manière beaucoup plus importante sur l'axe jaune (b^*). En utilisant le millésime le plus jeune (2011) comme référence, les valeurs ΔL^* , Δa^* , Δb^* et ΔE^*_{ab} obtenues confirment que la variation sur l'axe b^* est la plus importante durant le vieillissement (**Tableau 30**).

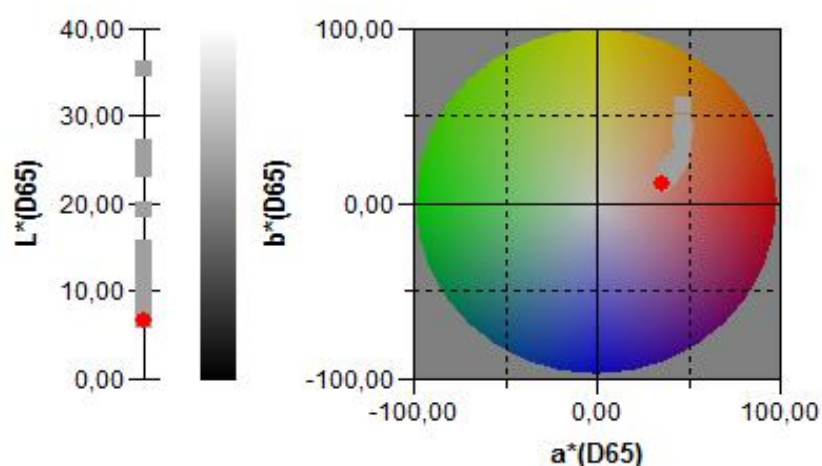


Figure 114. L'évolution de l'aspect visuel du vin rouge exprimé dans l'espace couleur représenté par les variables $L^*a^*b^*$.

Afin d'établir des corrélations entre l'âge du vin et les valeurs mesurées par la spectrométrie et par la méthode CIELAB, des tests de Pearson ont été réalisés. Le niveau de significativité a été fixé à 5 %. Comme présenté dans le **Tableau 31**, de fortes corrélations positives ont été observées entre l'âge du vin et la teinte ($r = 0,961$; $p < 0,0001$) ainsi qu'avec les valeurs L^* ($r = 0,881$; $p < 0,0001$), a^* ($r = 0,749$; $p = 0,0001$) et b^* ($r = 0,880$; $p < 0,0001$). En revanche, il n'y a pas de corrélation entre l'âge du vin et l'intensité colorante (IC).

Tableau 31. Les corrélations entre l'âge du vin et les valeurs mesurées de l'aspect couleur du vin ; les corrélations entre l'intensité de la couleur évaluée par les dégustateurs et les valeurs IC et L* ; les corrélations entre la teinte évaluée par les dégustateurs et les valeurs teinte (DO₄₂₀/DO₅₂₀), a*, b*, et ΔE*ab.

Age du vin		
Les valeurs	r	p
IC	/	/
Teinte	0,961	<0,0001
L*	0,881	<0,0001
a*	0,749	0,001
b*	0,880	<0,0001
Intensité de la couleur (D.)	-0,907	<0,0001
Teinte (D.)	0,958	<0,0001
Intensité de la couleur (D.)		
IC	/	/
L*	-0,940	<0,0001
Teinte (D.)		
Teinte	0,988	<0,0001
a*	0,678	0,004
b*	0,776	0,000
ΔE*ab	0,770	0,000

'/' : pas de corrélation.

'D.' : Données de dégustation.

Deux exemples de corrélation sont montrés à la **Figure 115**. La teinte et la clarté du vin augmentent durant le vieillissement du vin rouge. Leurs corrélations avec l'âge du vin sont d'autant plus visibles en utilisant une régression polynomiale ($R^2 = 0,95$ pour la teinte, **Figure 115A** ; et $R^2 = 0,85$ pour la valeur L*, **Figure 115B**).

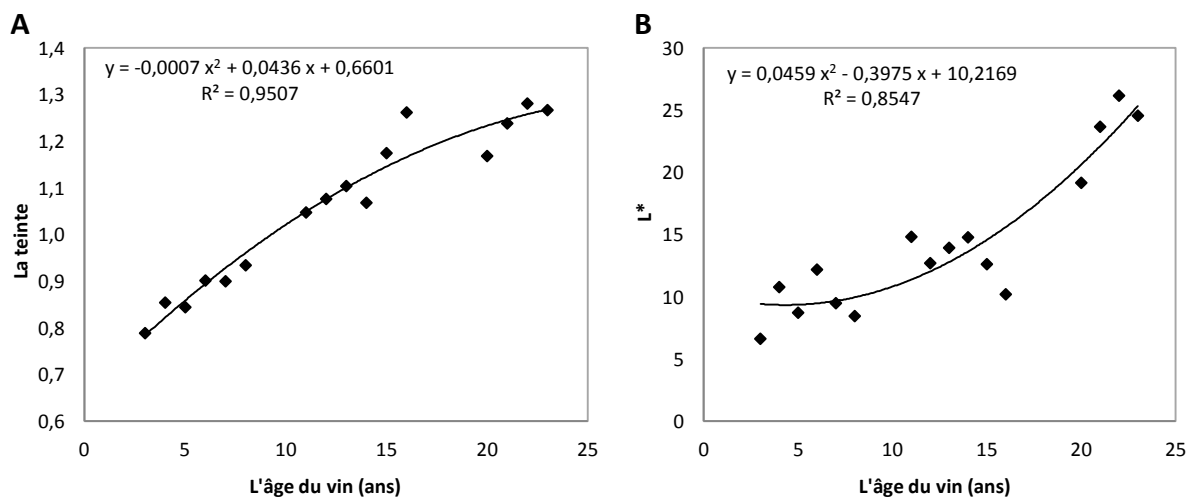


Figure 115. Les corrélations entre l'âge du vin avec la teinte (A) et la valeur L* de l'espace couleur CIELAB (B).

L'évaluation de la couleur des vins rouges a également été réalisée par des dégustateurs. Pour chaque vin étudié, les dégustateurs devaient indiquer sur une échelle continue le niveau de la teinte (du violet vers l'orangé) et l'intensité de la couleur (intensité faible vers forte). Du fait que les dégustateurs n'utilisaient pas de façon identique les échelles de mesure, les données obtenues ont été tout d'abord centrées et réduites à la distribution normale. La **Figure 116** montre deux histogrammes concernant la teinte (**Figure 116A**) et l'intensité de la couleur (**Figure 116B**) évaluées par les dégustateurs. Les résultats obtenus montrent que, au cours du vieillissement du vin, la teinte évolue vers l'orange en même temps que l'intensité de la couleur diminue. Ces corrélations avaient d'ailleurs été confirmées et mises en évidence par les tests de Pearson effectués précédemment (la teinte (D.) : $r = 0,958$; $p < 0,0001$; l'intensité de la couleur (D.) : $r = -0,907$; $p < 0,0001$) (**Tableau 31**).

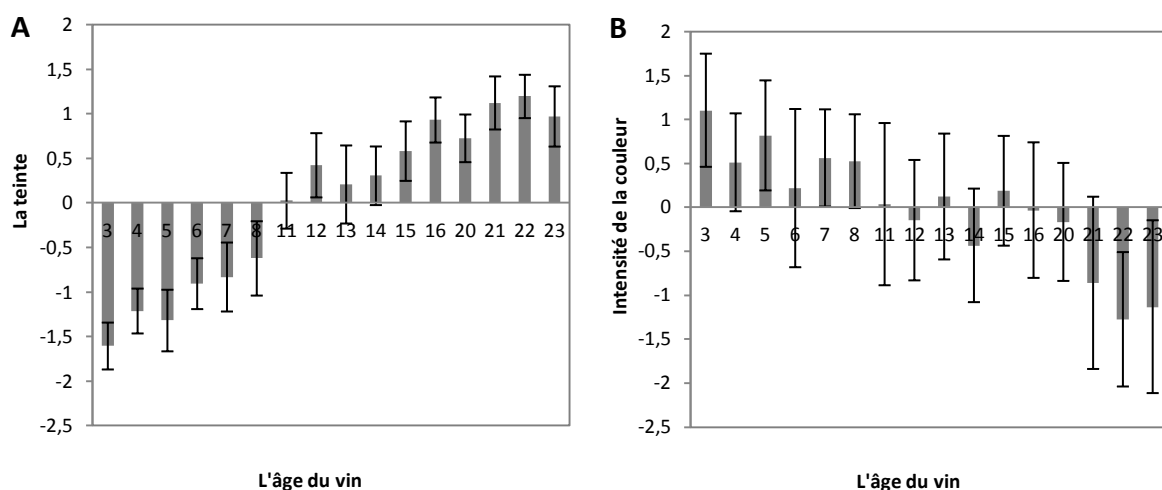


Figure 116. L'évaluation de la teinte et de l'intensité de la couleur des vins rouges par les dégustateurs. A : La teinte; B : L'intensité de la couleur.

En conclusion, il apparaît que, même si l'indice IC reste stable durant le vieillissement, les dégustateurs ont observé une diminution de l'intensité de la couleur du vin. De plus, la clarté du vin, exprimée par la variable L^* avec la méthode CIELAB diminue également, ce qui est cohérent avec l'observation faite par les dégustateurs ($r = -0,940$; $p = <0,001$) (**Tableau 31**). La méthode CIELAB apparaît donc comme une méthode de choix pour l'évaluation visuelle de l'intensité de la couleur du vin. Néanmoins, les trois approches sont cohérentes, du fait que la teinte du vin évolue vers l'orange durant le vieillissement, ce qui constitue le changement le plus significatif au niveau de l'aspect visuel du vin (noté Δb^*). Une très forte corrélation entre la teinte évaluée par les dégustateurs et la teinte exprimée par le ratio DO_{420}/DO_{520} a été obtenue ($r = 0,988$; $p = <0,001$) (**Tableau 31**). Cette corrélation est plus significative que la corrélation entre la teinte évaluée par les dégustateurs et les valeurs a^* ($r = 0,678$; $p = 0,004$), b^* ($r = 0,776$; $p = 0,000$), et ΔE^*ab ($r = 0,770$; $p = 0,000$) (**Tableau 31**).

V.2 L'évolution de l'aspect gustatif du vin rouge durant le vieillissement

Concernant l'aspect gustatif des vins, les dégustateurs devaient évaluer au moyen d'une échelle continue, l'intensité de l'astringence, la qualité tannique, l'amertume, l'acidité et l'équilibre en bouche des 16 vins. Du fait que les dégustateurs n'utilisaient pas là encore de façon identique les échelles de mesure, les données obtenues ont tout d'abord été centrées et réduites à la distribution normale. Des tests de Pearson (niveau de significativité fixé à 5 %)

ont ensuite été réalisés pour étudier des corrélations possibles avec l'âge du vin. Les résultats obtenus montrent une diminution significative au cours du vieillissement de l'intensité d'astringence ($r = -0,731$; $p = 0,0001$), de l'acidité perçue ($r = -0,660$; $p = 0,005$) et de l'équilibre en bouche ($r = -0,658$; $p = 0,006$) (**Tableau 32**). En revanche, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'âge du vin et la qualité tannique ou l'amertume perçue par les dégustateurs.

Tableau 32. Les corrélations entre l'âge du vin et les paramètres gustatifs.

Age du vin		
Les paramètres gustatifs	r	p
L'intensité d'astringence	-0,731	0,001
La qualité tannique	/	/
L'amertume	/	/
L'acidité	-0,660	0,005
L'équilibre en bouche	-0,658	0,006

‘/’ : pas de corrélation.

Les évolutions de l'intensité de l'astringence et de l'équilibre en bouche sont représentées à la **Figure 117**. Les résultats mettent en évidence une diminution de l'astringence durant le vieillissement, tandis que l'équilibre en bouche est très influencé par le facteur millésime.

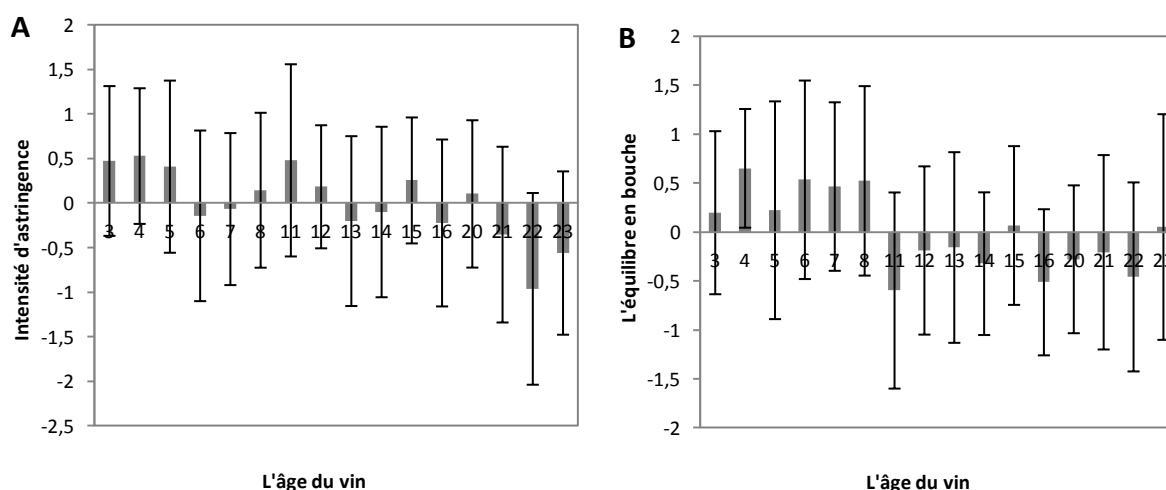


Figure 117. L'évaluation de l'intensité d'astringence et l'équilibre en bouche des vins rouges par les dégustateurs. A : L'intensité d'astringence; B : L'équilibre en bouche.

V.3 Corrélation des résultats sensoriels et chimiques

Les corrélations entre l'âge du vin et les teneurs des composés étudiés ont été réalisées en utilisant le test de Pearson (niveau de significativité fixé à 5 %). Le **Tableau 33** montre les valeurs r et p ainsi obtenues.

Tableau 33. Les corrélations entre l'âge du vin et les composés du vin.

Age du vin		
Les composés	r	p
IPT	/	/
Monomères de type B	-0,890	<0,0001
Dimères de type B	-0,948	<0,0001
Trimères de type B	-0,932	<0,0001
Tétramères de type B	-0,910	<0,0001
Pentamères de type B	-0,868	<0,0001
Dimères de type A	-0,773	0,000
Tétramère couronne	-0,712	0,002
Pentamères couronnes	/	/
EDP	-0,628	0,009
Mv	-0,733	0,001
Mv(flavène)-T	-0,667	0,005
F-Mv ⁺	-0,798	0,000
T-Mv ⁺	-0,824	<0,0001
Mv-F(type A)	-0,863	<0,0001
T-Mv-F(type A)	-0,842	<0,0001
Mv-F(type A)-T	-0,843	<0,0001
Mv-Pont éthylidène-F	-0,684	0,003
Mv-Pont éthylidène-T	-0,716	0,002
Mv trimérique	-0,933	<0,0001
Dérivés Mv-acide pyruvique	-0,900	<0,0001
Dérivés Mv-acétaldéhyde	-0,799	0,000
Dérivés Mv-vinylcatéchol	0,673	0,004
Dérivés Mv-vinylphénol	/	/
Dérivés Mv-vinylgâiacol	/	/
PyranoMv-F	-0,773	0,000
PyranoMv-F-F	-0,889	<0,0001

‘/’ : pas de corrélation.

De manière générale, de fortes corrélations ont été obtenues pour la plupart des composés identifiés à part les pentamères couronnes, les dérivés Mv-vinylphénol et les dérivés Mv-vinylgallaïacol, ce qui était attendu au vu des analyses chimiques. Pour les autres composés corrélés significativement avec l'âge du vin, la plupart d'entre eux ont des coefficients de Pearson (r) négatifs ce qui indique une diminution significative de leurs teneurs au cours du vieillissement. C'est notamment le cas des tanins condensés dimères ($r = -0,948$; $p < 0,0001$) et tétramères de type B ($r = -0,910$; $p < 0,0001$), des dérivés de type vitisine A ($r = -0,900$; $p < 0,0001$) et de type vitisine B ($r = -0,799$; $p = 0,000$). A contrario, une augmentation significative des dérivés de type Mv-vinylcatéchol a été observée ($r = 0,673$; $p = 0,004$).

Les résultats des tests de Pearson entre l'intensité de l'astringence, l'IPT, le tétramère couronne, les deux pentamères couronnes, l'EDP ainsi que les tanins de type B et de type A sont présentés dans le **Tableau 34**. A part pour les flavanols monomères, des corrélations significativement positives ont été obtenues, notamment entre l'intensité de l'astringence et l'évolution du tétramère couronne durant le vieillissement ($r = 0,840$; $p < 0,0001$).

Afin d'évaluer l'impact des différentes familles de pigments précédemment identifiées et quantifiées sur l'aspect visuel du vin au cours du vieillissement, des tests de Pearson entre la couleur des vins estimée par la dégustation (l'intensité de la couleur (D.) et la teinte (D.)) et des différentes familles de pigments polymérisés ont été réalisés. Des corrélations positives ont été obtenues entre l'intensité de la couleur (D.) et la plupart des familles de pigments. Cela indique que la diminution de l'intensité de couleur au cours du vieillissement est probablement liée à la diminution de ces pigments de manière directe. De manière identique pour le changement de la teinte (D.) au cours du vieillissement, des corrélations fortement négatives ont été obtenues pour la plupart des familles de pigments de couleur rouge-pourpre (A^+-T), pourpre-bleu (A^+-pont éthylidène- T), incolore (polymère de type A) et même des pigments de couleur orange (type vitisine A et B, pyranoanthocyane-F et pyranoanthocyane-F-F).

Tableau 34. Les corrélations entre l'intensité d'astringence du vin et l'IPT, le tétramère couronne, les pentamères couronnes et les tanins liés par pont éthyldène.

Intensité d'astringence		
Les composés	r	p
IPT	0,658	0,006
Tétramère couronne	0,840	<0,0001
Pentamères couronnes	0,755	0,001
EDP	0,542	0,030
Monomères	/	/
Dimères de type B	0,697	0,003
Trimères de type B	0,738	0,001
Tétramères de type B	0,739	0,001
Pentamères de type B	0,700	0,003
Dimères de type A	0,700	0,003
Intensité de la couleur (D.)		
Mv	0,639	0,008
Mv(flavène)-T	0,601	0,014
F-Mv ⁺	0,708	0,002
T-Mv ⁺	0,747	0,001
Mv-F(type A)	0,722	0,002
T-Mv-F(type A)	0,701	0,003
Mv-F(type A)-T	0,732	0,001
Mv-Pont éthyldène-F	0,669	0,005
Mv-Pont éthyldène-T	0,696	0,003
Mv trimérique	0,814	0,000
Dérivés Mv-acide pyruvique	0,831	<0,0001
Dérivés Mv-acétaldéhyde	0,729	0,001
Dérivés Mv-vinylcatéchol	-0,695	0,003
Dérivés Mv-vinylphénol	/	/
Dérivés Mv-vinylgaïacol	-0,544	0,029
PyranoMv-F	0,603	0,013
PyranoMv-F-F	0,801	0,000
Teinte (D.)		
Mv	-0,812	0,000
Mv(flavène)-T	-0,598	0,015
F-Mv ⁺	-0,881	<0,0001
T-Mv ⁺	-0,896	<0,0001
Mv-F(type A)	-0,925	<0,0001
T-Mv-F(type A)	-0,850	<0,0001

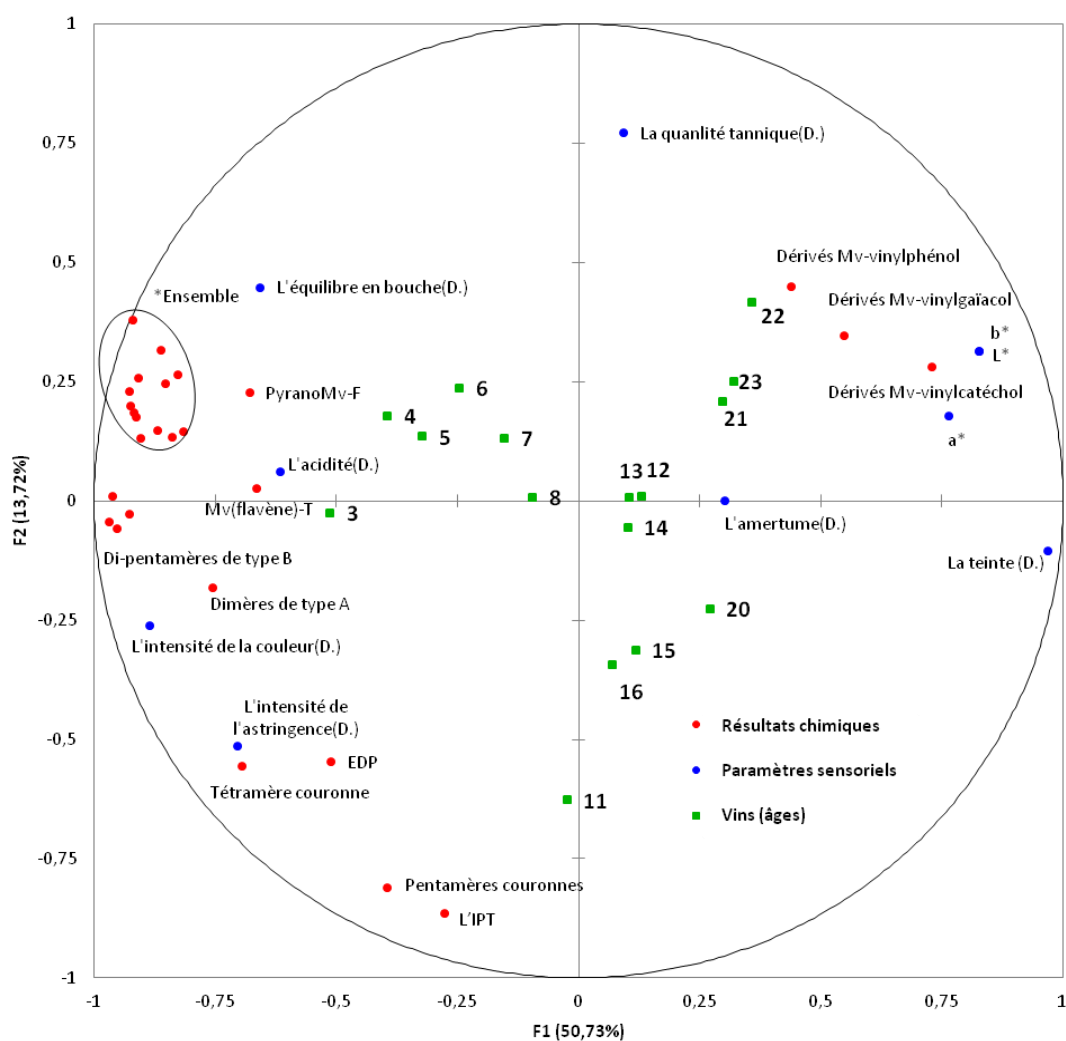
Mv-F(type A)-T	-0,872	<0,0001
Mv-Pont éthylidène-F	-0,778	0,000
Mv-Pont éthylidène-T	-0,801	0,000
Mv trimérique	-0,945	<0,0001
Dérivés Mv-acide pyruvique	-0,938	<0,0001
Dérivés Mv-acétaldéhyde	-0,876	<0,0001
Dérivés Mv-vinylcatéchol	0,685	0,003
Dérivés Mv-vinylphénol	/	/
Dérivés Mv-vinylgalaïacol	/	/
PyranoMv-F	-0,740	0,001
PyranoMv-F-F	-0,911	<0,0001

Enfin, afin de mieux comprendre les contributions des divers composés étudiés, une régression par moindres carrés partiels (PLS : Partial Least Squares regression) a été réalisée sur l'ensemble des données sensorielles et chimiques obtenues (**Figure 118**). La régression PLS est actuellement très utilisée en analyse sensorielle pour mettre en perspective des données d'origines sensorielle et instrumentale [275]. La raison principale de son succès réside dans le fait qu'elle combine de façon efficace l'analyse statistique descriptive (réduction de dimensions) et la modélisation (régression). La régression PLS permet de prédire un ensemble de variables dépendantes par un nombre important de variables indépendantes, et ceci même quand elles sont multi-colinéaires.

Cet outil statistique réduit l'espace initial des (nombreuses) variables en un espace de faible dimensionnalité avec un petit nombre de variables, appelées « facteurs » ou « variables latentes », qui sont construites les unes après les autres de façon interactive. Dans notre contexte, des variables dépendantes (Y) comprennent toutes les données sensorielles (point bleu) et des variables explicatives (X) sont les concentrations des composés quantifiés (point rouge). Les observations sont les différents millésimes de vins étudiés (carré vert).

Comme montré à la **Figure 118**, l'analyse statistique a permis d'obtenir un modèle formé par les deux premières composantes F1 et F2 qui représentent 64,45 % des variances totales. L'axe F1 représente à lui seul 50,73 % de la variance totale, ce qui signifie que les données sont significativement discriminées selon cet axe. Les paramètres sensoriels sont séparés par l'axe F1 avec l'équilibre en bouche, l'acidité, l'intensité de la couleur et l'intensité d'astringence opposés à la qualité tannique, l'amertume, les valeurs L* a* b* et la teinte. Le tétramère

couronne est très proche de l'intensité d'astringence, cela indique qu'il y a une très forte corrélation entre les deux. Concernant la couleur, l'intensité de la couleur est opposée aux valeurs L^* , a^* , b^* et à la teinte. L'intensité de la couleur est plutôt corrélée positivement avec la plupart des pigments, des pigments polymérisés et des structures polymériques incolores (**Figure 118***ensemble), alors que les valeurs L^* , a^* , b^* et la teinte sont positivement corrélées avec les dérivés Mv-vinylphénol, les dérivés Mv-vinylgâïacol et les dérivés Mv-vinylcatéchol. On constate finalement que les vins sont répartis selon leur âge suivant les axes, confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment avec les tests de Pearson sur la corrélation avec le vieillissement du vin.



*Ensemble : C et EC; Mv⁺; F-Mv⁺; T-Mv⁺; Mv-F(type A); T-Mv-F(type A); Mv-F(type A)-T; Mv⁺-pont éthylidène-F; Mv⁺-pont éthylidène-T; Mv trimérique; Dérivés Mv-acide pyruvique; Dérivés Mv-acétaldéhyde; PyranoMv-F-F

Figure 118. Cercle de corrélation issu de la régression PLS obtenu à partir des résultats sensoriels et des résultats chimiques ('D.' : Données de dégustation).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion Générale

L'objectif de ce travail était d'approfondir les connaissances sur la composition macromoléculaire du vin et des raisins ainsi que sur leurs évolutions durant le vieillissement en bouteille. Les tanins condensés et les pigments polymérisés sont deux familles importantes de macromolécules du vin et des raisins. La difficulté de leurs purifications, de leurs caractérisations et de leurs quantifications est causée par leurs hauts poids moléculaires. Les études sur ces deux familles ont été réalisées de façon simultanée en utilisant différentes techniques de fractionnement et de caractérisation ainsi que la stratégie de dépolymérisation chimique en milieu acide par phloroglucinolyse.

Les résultats obtenus concernent d'une part les tanins condensés et de l'autre, les pigments polymérisés. L'identification des composés phénoliques du vin rouge a pu amener à la démonstration d'une nouvelle sous-famille de tanins condensés et de plusieurs nouvelles structures oligomériques de pigments polymérisés. Deux nouvelles méthodes de quantification ont été développées pour les tanins condensés liés par pont éthyldène et pour les pigments polymérisés ayant différentes liaisons inter-flavonoïdes impliquées. Des quantifications ont ensuite été effectuées afin d'obtenir les différentes cinétiques d'évolution des tanins condensés et des pigments polymérisés au cours du vieillissement en bouteille. Finalement, une étude sensorielle a été réalisée et les résultats ainsi obtenus ont été traités et corrélés avec les résultats chimiques.

Tout d'abord, à part les tanins condensés de type B et de type A qui ont été largement montrés dans la littérature, une nouvelle sous-classe de tanins condensés : «les tanins condensés couronnes» a été rapportée pour la première fois dans le vin et dans le règne végétal. Ces tanins condensés couronnes ont comme particularité structurale d'être cycliques et d'être composés uniquement des liaisons inter-flavonoïdes de type B. De plus, ils présentent au sein de leurs structures une cavité relativement grande et composée de quatre cycles aromatiques et de plusieurs fonctions phénols. Les tanins condensés couronnes montrent des propriétés spécifiques : ils sont plus polaires que les tanins condensés de type B; ils ont une stabilité plus

élevée que les tanins condensés de type B durant le vieillissement et ils sont partiellement résistants aux conditions de phloroglucinolyse, même s'ils contiennent uniquement des liaisons inter-flavonoïdes de type B. Un premier test d'activité biologique du tétramère couronne montre une activité inhibitrice de l'agrégation du peptide β -amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer intéressante. Une évaluation plus approfondie de ces activités devra être envisagée. De plus, il a été montré que leurs concentrations étaient plus élevées dans les vins de Syrah que dans les vins de Cabernet Sauvignon et Merlot. Une forte corrélation entre la concentration des tanins couronnes et l'intensité d'astringence ressentie par les dégustateurs a également été montrée.

De plus, une nouvelle méthode de quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène a été développée en utilisant le marqueur 2,2'-éthylidènediphloroglucinol (EDP) et un détecteur fluorescence. L'utilisation d'une longueur d'onde d'excitation à 240 nm et d'une longueur d'onde d'émission à 315 nm a permis de diminuer la limite de détection et la limite de quantification d'un facteur 80 par rapport aux valeurs obtenues avec une détection UV à 280 nm. Il a également été montré que cette stratégie de quantification pouvait être utilisée pour la détermination du Dpm puisque les composés dérivant des unités monomériques des tanins libérés durant la phloroglucinolyse sont détectables et quantifiables avec ce couple de longueur d'onde.

L'identification et la quantification des tanins condensés de type B qui sont bien connus dans la littérature de dimère à pentamère a également été effectuée. Leurs concentrations sont plus élevées dans les vins de Cabernet Sauvignon et Merlot que dans les vins de Syrah et la diminution des tanins condensés de type B durant le vieillissement a été confirmée.

Concernant les pigments polymérisés, leur large gamme de masse allant des oligomères jusqu'aux polymères rend leur quantification individuelle impossible. Une stratégie de dépolymérisation chimique en milieu acide par phloroglucinolyse a ainsi été utilisée afin de quantifier les pigments polymérisés selon les types de liaisons impliqués. Les mécanismes de dépolymérisation des différentes familles de pigments polymérisés ont été clarifiés grâce aux marqueurs identifiés en spectrométrie de masse haute résolution Q-TOF. Ces marqueurs de quantification ont été utilisés pour déterminer les teneurs spécifiques de chacune des familles de pigments polymérisés ainsi que leurs cinétiques d'évolution durant le vieillissement du vin rouge. La concentration de la plupart d'entre eux diminue durant le vieillissement en bouteille.

Néanmoins, différentes tendances d'évolution ont été obtenues. Les concentrations des pigments polymérisés de type T-A⁺ et de type A⁺-pont éthylidène-T diminuent rapidement durant le vieillissement, alors que les concentrations plus stables ont été observées pour les structures polymériques avec des liaisons de type A. Cette stabilité relative a également été observée pour les flavano-pyranonathocyanes. De plus, les structures oligo/polymériques sont généralement plus abondantes que les structures dimériques. Durant nos investigations sur les pigments polymérisés, les structures de type A-F(type A)-F(n) et de type F(n)-A-F(type A), les formes acétylés de l'anthocyane trimère et des anthocyane dimères liées par pont éthylidène ont été montrées pour la première fois.

Une dégustation verticale a été réalisée afin d'évaluer les changements d'aspect visuel et d'aspect gustatif durant le vieillissement. Avec le temps, l'intensité de la couleur du vin diminue et la teinte évolue vers le tuilé-orangé. Une diminution de l'intensité d'astringence a été notée par les dégustateurs. Finalement, les résultats de l'étude sensorielle ont été corrélés avec les résultats chimiques afin de mieux comprendre les réactions impliquées durant le vieillissement du vin rouge conduisant au changement de couleur et à l'adoucissement de la sensation d'astringence. Presque tous les composés étudiés sont fortement corrélés avec l'âge du vin. La contribution importante des dérivés hydroxyphényl-pyranoanthocyanes aux vins vieux a été montrée et une forte corrélation entre la concentration des tanins couronnes et l'intensité d'astringence ressentie par les dégustateurs a été obtenue.

Grâce aux nombreuses études précédentes consacrées aux polyphénols du vin rouge, cette thèse a pu poursuivre des pistes ouvertes dans la littérature, avancer à petits pas et aboutir à sa fin. L'exploitation des nouvelles connaissances concernant les polyphénols du vin rouge continuera pour tous les passionnés.

Perspectives

Cette étude a pu ouvrir des portes vers de futures recherches sur les polyphénols du vin rouge.

La famille des tanins condensés couronnes, rapportée pour la première fois dans le vin et dans le règne végétal, devra notamment être étudiée plus profondément. Leur origine, issus du raisin ou formés durant la vinification du vin, doit être clarifiée. Une étude de la concentration de ces tanins dans les vins et dans les raisins en fonction des cépages devra être effectuée précisément puisqu'il semblerait qu'il y ait une différence entre les cépages au vu de nos premiers résultats sur les vins. Une étude approfondie de leurs propriétés sensorielles à l'aide de dégustations hédoniques et de l'étude de leurs interactions tanins/protéines reste également à réaliser. La structure tridimensionnelle très particulière de ces tanins couronnes, avec notamment la présence d'une cavité importante, ouvre la porte à une multitude de questions et interactions possibles avec les autres constituants du vin. Des interactions avec des ions métalliques ou des arômes du vin rouge pourront être réalisées afin d'évaluer leur capacité de capture et ainsi leur influence sur la stabilité colloïdale des vins rouges. De plus, des études plus approfondies sur leur activité biologique, notamment leur effet neuroprotecteur ainsi que leur biodisponibilité devront être effectuées. Afin d'effectuer les études proposées, une nouvelle méthode d'hémisynthèse et de purification avec un rendement plus élevé des tanins couronnes devra être développée.

Les tanins oligomériques de type A n'ont pas été détectés durant cette étude mais les liaisons inter-flavonoïdes de type A (sous forme dimérique) montrent une stabilité élevée. Leur présence dans du vin rouge et leur impact sur la qualité sensorielle du vin rouge devront être clarifiés.

Durant notre étude, de nombreux ions inconnus ont été détectés et fragmentés. Les concentrations de certains d'entre eux augmentent durant le vieillissement. A cause du temps limité, leur identification n'a pas pu aboutir. De plus, les concentrations de la plupart des composés identifiés durant cette étude diminuent alors que l'indice IPT reste plutôt stable

durant le vieillissement. De nouvelles formes oxydatives oligomériques des tanins condensés et des pigments polymérisés sont possibles et doivent être recherchés et caractérisés.

L'étude des cinétiques d'évolution des pigments polymérisés durant le vieillissement en bouteille ayant été réalisé durant cette thèse, la détermination des cinétiques d'extraction et de formation de ces structures oligomériques et polymériques en fonction des conditions de vinification (température, fréquence de remontage, délestage...) et d'élevage (barrique, cuve inox, micro-oxygénation...) serait intéressante et pourrait notamment aider le vinificateur dans ses choix de parcours œnologiques pour garantir la qualité optimum des vins obtenus. Cette nouvelle méthode de quantification des pigments polymérisés peut également être appliquée dans les problématiques plus larges comme l'influence du réchauffement climatique sur la couleur du vin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Peynaud, E. and Blouin, J., eds. Le goût du vin: le grand livre de la dégustation. 5ème ed. **2013**, DUNOD.
2. Picard, M., Tempere, S., de Revel, G. and Marchand, S., A sensory study of the ageing bouquet of red Bordeaux wines: A three-step approach for exploring a complex olfactory concept. *Food Qual. Prefer*, **2015**. **42**: p. 110-122.
3. Carando, S., Teissedre, P.-L., Pascual-Martinez, L. and Cabanis, J.-C., Levels of flavan-3-ols in french wines. *J. Agr. Food Chem.*, **1999**. **47**(10): p. 4161-4166.
4. Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S. and Teissedre, P.L., Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *J. Agr. Food Chem.*, **2009**. **57**(2): p. 545-553.
5. Lorrain, B., Chira, K. and Teissedre, P.L., Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.*, **2011**. **126**(4): p. 1991-1999.
6. Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L. and Glories, Y., Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual. Prefer*, **2008**. **19**(3): p. 286-291.
7. Chira, K., Jourdes, M. and Teissedre, P.-L., Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *Eur. Food Res. Technol.*, **2011**. **234**(2): p. 253-261.
8. He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J. and Duan, C.-Q., Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, **2012**. **17**(2): p. 1483.
9. Somers, T.C., The polymeric nature of wine pigments. *Phytochem.*, **1971**. **10**(9): p. 2175-2186.
10. Staudinger, H., Über polymerisation. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1920**. **53**(6): p. 1073-1085.
11. Meisel, I. and Mülhaupt, R., The 60th anniversary of the first polymer journal (“Die makromolekulare chemie”): moving to new horizons. *Macromol. Chem. and Phys.*, **2003**. **204**(2): p. 199-206.
12. Lorrain, B., Tempere, S., Iturmendi, N., Moine, V., De Revel, G. and Teissedre, P.L., Influence of phenolic compounds on the sensorial perception and volatility of red wine esters in model solution: An insight at the molecular level. *Food Chem.*, **2013**. **140**(1-2): p. 76-82.
13. Han, G., Ugliano, M., Currie, B., Vidal, S., Diéval, J.B. and Waterhouse, A.L., Influence of closure, phenolic levels and microoxygenation on Cabernet Sauvignon wine composition after 5 years' bottle storage. *J. Sci. Food Agr.*, **2015**. **95**(1): p. 36-43.
14. Bindon, K., Holt, H., Williamson, P.O., Varela, C., Herderich, M. and Francis, I.L., Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 2. Wine sensory properties and consumer preference. *Food Chem.*, **2014**. **154**: p. 90-101.

15. Bindon, K., Varela, C., Kennedy, J., Holt, H. and Herderich, M., Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 1. Grape and wine chemistry. *Food Chem.*, **2013**. **138**(2-3): p. 1696-1705.
16. Xi, Z.m., Zhang, Z.w., Cheng, Y.f. and Li, H., The effect of vineyard cover crop on main monomeric phenols of grape berry and wine in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Agric. Sci. China*, **2010**. **9**(3): p. 440-448.
17. Li, S.Y., Liu, P.T., Pan, Q.H., Shi, Y. and Duan, C.Q., Association between modification of phenolic profiling and development of wine color during alcohol fermentation. *J. Food Sci.*, **2015**. **80**(4): p. C703-C710.
18. Zhang, B., Liu, R., He, F., Zhou, P.P. and Duan, C.Q., Copigmentation of malvidin-3-O-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions: Experimental and theoretical investigations. *Food Chem.*, **2014**. **170**: p. 226-233.
19. Pina, F., Oliveira, J. and de Freitas, V., Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations. *Tetrahedron*, **2015**. **71**(20): p. 3107-3114.
20. Cliff, M.A., Stanich, K., Edwards, J.E. and Saucier, C.T., Adding grape seed extract to wine affects astringency and other sensory attributes. *J. of Food Quality*, **2012**. **35**(4): p. 263-271.
21. Tao, Y.S., Liu, Y.q. and Li, H., Sensory characters of Cabernet Sauvignon dry red wine from Changli county (China). *Food Chem.*, **2009**. **114**(2): p. 565-569.
22. Nikolantonaki, M., Magiatis, P. and Waterhouse, A.L., Measuring protection of aromatic wine thiols from oxidation by competitive reactions vs wine preservatives with ortho-quinones. *Food Chem.*, **2014**. **163**: p. 61-67.
23. Waterhouse, A.L., Wine oxidation: recent revelations, observations, and predictions, in *ACS Symposium Series*. **2012**. p. 159-166.
24. Ferrer-Gallego, R., Soares, S., Mateus, N., Rivas-Gonzalo, J., Escribano-Bailón, M.T. and De Freitas, V., New anthocyanin-human salivary protein complexes. *Langmuir*, **2015**. **31**(30): p. 8392-8401.
25. Brandão, E., Soares, S., Mateus, N. and De Freitas, V., In vivo interactions between procyanidins and human saliva proteins: Effect of repeated exposures to procyanidins solution. *J. Agr. Food Chem.*, **2014**. **62**(39): p. 9562-9568.
26. Canon, F., Ployon, S., Mazauric, J.P., Sarni-Manchado, P., Réfrégiers, M., Giuliani, A. and Cheyrier, V., Binding site of different tannins on a human salivary proline-rich protein evidenced by dissociative photoionization tandem mass spectrometry. *Tetrahedron*, **2015**. **71**(20): p. 3039-3044.
27. Rinaldi, A., Jourdes, M., Teissedre, P.L. and Moio, L., A preliminary characterization of Aglianico (*Vitis vinifera* L. cv.) grape proanthocyanidins and evaluation of their reactivity towards salivary proteins. *Food Chem.*, **2014**. **164**: p. 142-149.
28. Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M. and Teissedre, P.-L., Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chem.*, **2011**. **126**(4): p. 1971-1977.
29. McRae, J.M., Damberg, R.G., Kassara, S., Parker, M., Jeffery, D.W., Herderich, M.J. and Smith, P.A., Phenolic compositions of 50 and 30 year sequences of Australian red wines: the impact of wine age. *J. Agr. Food Chem.*, **2012**. **60**(40): p. 10093-10102.

30. Saucier, C., How do wine polyphenols evolve during wine ageing? *Cerevisia*, **2010**. **35**(1): p. 11-15.
31. Bindon, K., Kassara, S., Hayasaka, Y., Schulkin, A. and Smith, P., Properties of wine polymeric pigments formed from anthocyanin and tannins differing in size distribution and subunit composition. *J. Agr. Food Chem.*, **2014**. **62**(47): p. 11582-11593.
32. Chung, K.-T., Wong, T.Y., Wei, C.-I., Huang, Y.-W. and Lin, Y., Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1998**. **38**(6): p. 421-464.
33. Di Lorenzo, C., Sousa, L.P.d., Pastor, R.F., Colombo, F., Frigerio, G. and Restani, P., Beneficial effects of non-alcoholic grape-derived products on human health: A literature review. *BIO Web of Conferences*, **2015**. **5**: p. 04002.
34. Petti, S. and Scully, C., Polyphenols, oral health and disease: a review. *J. Dent.*, **2009**. **37**(6): p. 413-423.
35. Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A. and Teissedre, P.-L., Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules*, **2014**. **19**(1): p. 482.
36. Tournour, H.H., Segundo, M.A., Magalhães, L.M., Barreiros, L., Queiroz, J. and Cunha, L.M., Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Ind. Crop. Prod.*, **2015**. **74**: p. 397-406.
37. Rodríguez-Morgado, B., Candiracci, M., Santa-María, C., Revilla, E., Gordillo, B., Parrado, J. and Castaño, A., Obtaining from grape pomace an enzymatic extract with anti-inflammatory properties. *Plant Food. Hum. Nutr.*, **2015**. **70**(1): p. 42-49.
38. Decendit, A., Mamani-Matsuda, M., Aumont, V., Waffo-Teguo, P., Moynet, D., Boniface, K., Richard, E., Krisa, S., Rambert, J., Mérillon, J.M. and Mossalayi, M.D., Malvidin-3-O- β glucoside, major grape anthocyanin, inhibits human macrophage-derived inflammatory mediators and decreases clinical scores in arthritic rats. *Biochem. Pharmacol.*, **2013**. **86**(10): p. 1461-1467.
39. Forester, S.C., Choy, Y.Y., Waterhouse, A.L. and Oteiza, P.I., The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Mol. Carcinogen.*, **2014**. **53**(6): p. 432-439.
40. Song, N.R., Yang, H., Park, J., Kwon, J.Y., Kang, N.J., Heo, Y.S., Lee, K.W. and Lee, H.J., Cyanidin suppresses neoplastic cell transformation by directly targeting phosphatidylinositol 3-kinase. *Food Chem.*, **2012**. **133**(3): p. 658-664.
41. Rivière, C., Richard, T., Quentin, L., Krisa, S., Mérillon, J.M. and Monti, J.P., Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**. **15**(2): p. 1160-1167.
42. Santos-Buelga, C. and Scalbert, A., Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agr.*, **2000**. **80**(7): p. 1094-1117.
43. Rouanet, J.M. and Teissédre, P.L., Effects of wine consumption on cardiovascular diseases. *J. Wine Res.*, **2011**. **22**(2): p. 159-163.
44. Belcaro, G., Ledda, A., Hu, S., Cesarone, M.R., Feragalli, B. and Dugall, M., Grape seed procyanidins in pre- and mild hypertension: a registry study. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**. **2013**: p. 5.

45. Benjamin, S., Roshni, Thomas, S.S. and Nainan, M.T., Grape seed extract as a potential remineralizing agent: a comparative in vitro study. *J. Contemp. Dent. Pract.*, **2012**. **13**(4): p. 425-430.
46. Tang, C.F., Fang, M., Liu, R.R., Dou, Q., Chai, Z.G., Xiao, Y.H. and Chen, J.H., The role of grape seed extract in the remineralization of demineralized dentine: micromorphological and physical analyses. *Arch. Oral Biol.*, **2013**. **58**(12): p. 1769-1776.
47. Hemmati, A.A., Foroozan, M., Houshmand, G., Moosavi, Z.B., Bahadoram, M. and Maram, N.S., The topical effect of grape seed extract 2% cream on surgery wound healing. *Glob. J. Health Sci.*, **2015**. **7**(3): p. 52-58.
48. Stockley, C., Teissedre, P.-L., Boban, M., Di Lorenzo, C. and Restani, P., Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: a review. *Food & Funct.*, **2012**. **3**(10): p. 995-1007.
49. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D., eds. *Traité d'Œnologie 2. Chimie du vin stabilisation et traitements*. 5^e ed. **2004**, Dunod. 179.
50. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D., eds. *Traité d'Œnologie 2. Chimie du vin stabilisation et traitements*. 5^e ed. **2004**, Dunod. 182.
51. Langcake, P. and Pryce, R.J., A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, **1977**. **33**(2): p. 151-152.
52. Carando, S., Teissedre, P.L., Waffo-Téguo, P., Cabanis, J.C., Deffieux, G. and Mérillon, J.M., High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection for the determination of trans-astringin in wine. *J. Chromatogr. A*, **1999**. **849**(2): p. 617-620.
53. Ribeiro de Lima, M.T., Waffo-Téguo, P., Teissedre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J.C. and Mérillon, J.M., Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in portuguese wines. *J. Agr. Food Chem.*, **1999**. **47**(7): p. 2666-2670.
54. Moreno-Labanda, J.F., Mallavia, R., Pérez-Fons, L., Lizama, V., Saura, D. and Micol, V., Determination of piceid and resveratrol in spanish wines deriving from monastrell (Vitis vinifera L.) grape variety. *J. Agr. Food Chem.*, **2004**. **52**(17): p. 5396-5403.
55. Papastamoulis, Y., Richard, T., Nassra, M., Badoc, A., Krisa, S., Harakat, D., Monti, J.-P., Mérillon, J.-M. and Waffo-Teguo, P., Viniphenol A, a complex resveratrol hexamer from Vitis vinifera stalks: structural elucidation and protective effects against amyloid- β -induced toxicity in PC12 cells. *J. Nat. Prod.*, **2014**. **77**(2): p. 213-217.
56. Xu, Q. and Si, L.-Y., Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action. *Nutr. Res.*, **2012**. **32**(9): p. 648-658.
57. Palmefors, H., DuttaRoy, S., Rundqvist, B. and Börjesson, M., The effect of physical activity or exercise on key biomarkers in atherosclerosis – A systematic review. *Atherosclerosis*, **2014**. **235**(1): p. 150-161.
58. Richard, T., Poupard, P., Nassra, M., Papastamoulis, Y., Iglésias, M.-L., Krisa, S., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J.-M. and Monti, J.-P., Protective effect of ϵ -viniferin on β -amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**. **19**(10): p. 3152-3155.

59. Keller, R., Les chênes dans le monde. Les chênes de tonnellerie en France: *Quercus petraea* et *Quercus robur*. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1992**: p. 1-38.
60. Mayer, v.W., Seitz, H. and Jochims, J.C., Die struktur des castalagins. *Liebigs. Ann. Chem.*, **1969**. **721**: p. 186-193.
61. Quideau, S. and Feldman, K.S., Ellagitannin chemistry. *Chem. Rev.*, **1996**. **96**: p. 475-503.
62. Haslam, E. and Cai, Y., Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat. Prod. Rep.*, **1994**. **11**(0): p. 41-66.
63. Glabasnja, A. and Hofmann, T., Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and european oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *J. Agr. Food Chem.*, **2006**. **54**(9): p. 3380-3390.
64. Breslin, P.A.S., Gilmore, M.M., Beauchamp, G.K. and Green, B.G., Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chem. Senses*, **1993**. **18**(4): p. 405-417.
65. Chira, K., Zeng, L., Le Floch, A., Péchamat, L., Jourdes, M. and Teissedre, P.-L., Compositional and sensory characterization of grape proanthocyanidins and oak wood ellagitannin. *Tetrahedron*, **2015**. **71**(20): p. 2999-3006.
66. Haslam, E., Vegetable tannins – lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochem.*, **2007**. **68**(22–24): p. 2713-2721.
67. Bate-Smith, E.C. and Ribéreau-Gayon, P., Leuco-anthocyanins in seeds. *Qual. Plant. Mater. Veg.*, **1959**. **5**(3): p. 189-198.
68. Bate-Smith, E.C., The contribution of phenolic substances to quality in plant products. *Qual. Plant. Mater. Veg.*, **1958**. **3-4**(1): p. 440-455.
69. Bate-Smith, E.C. and Westall, R.G., Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1950**. **4**(0): p. 427-440.
70. Bradfield, A.E. and Bate-Smith, E.C., Chromatographic behaviour and chemical structure II. The tea catechins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1950**. **4**(0): p. 441-444.
71. Freudenberg, K., Die chemie der natürlichen gerbstoffe. *J. Springer*, **1920**.
72. Khanbabae, K. and van Ree, T., Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.*, **2001**. **18**(6): p. 641-649.
73. Ky, I., Le Floch, A., Zeng, L., Pechamat, L., Jourdes, M. and Teissedre, P.L., Tannins, in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P.M. Finglas and F. Toldrá, Editors. **2016**, Academic Press: Oxford. p. 247-255.
74. Glombitza, K.-W., Koch, M. and Eckhardt, G., Chlorierte phloretrole aus *Laminaria ochroleuca*. *Phytochem.*, **1977**. **16**(6): p. 796-798.
75. Boralle, N., Gottlieb, H.E., Gottlieb, O.R., Kubitzki, K., Lopes, L.M.X., Yoshida, M. and M. Young, M.C., Oligostilbenoids from *Gnetum venosum*. *Phytochem.*, **1993**. **34**(5): p. 1403-1407.
76. Quideau, S., Jourdes, M., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P. and Baudry, C., DNA topoisomerase inhibitor acutissimin A and other flavano-ellagitannins in red wine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**. **42**(48): p. 6012-6014.

77. Heffernan, N., Brunton, N., FitzGerald, R. and Smyth, T., Profiling of the molecular weight and structural isomer abundance of macroalgae-derived phlorotannins. *Marine Drugs*, **2015**. **13**(1): p. 509.
78. Porter, L.J., Hrstich, L.N. and Chan, B.G., The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem.*, **1985**. **25**(1): p. 223-230.
79. Vrhovsek, U., Mattivi, F. and Waterhouse, A.L., Analysis of red wine phenolics: Comparison of HPLC and spectrophotometric methods. *Vitis*, **2001**. **40**(2): p. 87-91.
80. Bate-Smith, E.C., Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochem. j.*, **1954**. **58**(1): p. 122-125.
81. Aron, P.M. and Kennedy, J.A., Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**. **52**(1): p. 79-104.
82. Freudenberg, K. and Weinges, K., Systematik und nomenklatur der flavonoide. *Tetrahedron*, **1960**. **8**(3-4): p. 336-349.
83. Geissman, T.A. and Dittmar, H.F.K., A proanthocyanidin from avocado seed. *Phytochem.*, **1965**. **4**(3): p. 359-368.
84. Gagné, S., Saucier, C. and Gény, L., Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *J. Agr. Food Chem.*, **2006**. **54**(25): p. 9465-9471.
85. Delcambre, A. and Saucier, C., Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. *J. Mass Spectrom.*, **2012**. **47**(6): p. 727-736.
86. Lokvam, J., Coley, P.D. and Kursar, T.A., Cinnamoyl glucosides of catechin and dimeric procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae). *Phytochem.*, **2004**. **65**(3): p. 351-358.
87. Karioti, A., Bilia, A.R., Gabbiani, C., Messori, L. and Skaltsa, H., Proanthocyanidin glycosides from the leaves of *Quercus ilex* L. (Fagaceae). *Tetrahedron Lett.*, **2009**. **50**(16): p. 1771-1776.
88. Stringano, E., Cramer, R., Hayes, W., Smith, C., Gibson, T. and Mueller-Harvey, I., Deciphering the complexity of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) proanthocyanidins by maldi-tof mass spectrometry with a judicious choice of isotope patterns and matrixes. *Anal. Chem.*, **2011**. **83**(11): p. 4147-4153.
89. Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H. and Yoshida, T., Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochem.*, **2002**. **59**(7): p. 749-758.
90. Cho, H.-K., Kim, H.-H., Seo, D.-H., Jung, J.-H., Park, J.-H., Baek, N.-I., Kim, M.-J., Yoo, S.-H., Cha, J., Kim, Y.-R. and Park, C.-S., Biosynthesis of (+)-catechin glycosides using recombinant amylosucrase from *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. *Enzyme Microb. Tech.*, **2011**. **49**(2): p. 246-253.
91. Raab, T., Barron, D., Vera, F.A., Crespy, V., Oliveira, M. and Williamson, G., Catechin glucosides: occurrence, synthesis, and stability. *J. Agr. Food Chem.*, **2010**. **58**(4): p. 2138-2149.
92. Creasy, L.L. and Swain, T., Structure of condensed tannins. *Nature*, **1965**. **208**: p. 151-153.

93. Xu, S.-f., Zou, B., Yang, J., Yao, P. and Li, C.-m., Characterization of a highly polymeric proanthocyanidin fraction from persimmon pulp with strong Chinese cobra PLA2 inhibition effects. *Fitoterapia*, **2012**. **83**(1): p. 153-160.
94. Teissedre, P.L., Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Peleg, H. and German, J.B., Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agr.*, **1996**. **70**(1): p. 55-61.
95. Appeldoorn, M.M., Sanders, M., Vincken, J.-P., Cheynier, V., Le Guernevé, C., Hollman, P.C.H. and Gruppen, H., Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds. *Food Chem.*, **2009**. **117**(4): p. 713-720.
96. Jacques, D., Haslam, E., Bedford, G.R. and Greatbanks, D., Structure of the dimeric proanthocyanidin-A2 and its derivatives. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973**(15): p. 518-520.
97. Adams, D.O., Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2006**. **57**(3): p. 249-256.
98. Amrani Joutei, K., Glories, Y. and Mercier, M., Localisation des tannins dans les pellicule de raisin. *Vitis*, **1994**. **33**: p. 133-138.
99. Thorngate, J.H. and Singleton, V.L., Localization of procyanidins in grape seeds. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1994**. **45**(2): p. 259-262.
100. Geny, L., Saucier, C., Bracco, S., Daviaud, F. and Glories, Y., Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *J. Agr. Food Chem.*, **2003**. **51**(27): p. 8051-8054.
101. Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V. and Moutounet, M., The international journal of plant biochemistry oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochem.*, **1994**. **36**(3): p. 781-784.
102. Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F. and Moutounet, M., Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochem.*, **1996**. **43**(2): p. 509-512.
103. Cheynier, V., Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American J. Clin. Nutr.*, **2005**. **81**(1): p. 223S-229S.
104. Kennedy, J.A. and Peyrot des Gachons, C., Phenolic extraction in red wine production. *Winemaking*, **2003**.
105. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D., eds. *Traité d'Enologie 2. Chimie du vin stabilisation et traitements*. 5^e ed. **2004**, Dunod. 191.
106. Delcambre, A. and Saucier, C., High-throughput oenomics: shotgun polyphenomics of wines. *Anal. Chem.*, **2013**. **85**(20): p. 9736-9741.
107. ASTM, Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. *Philadelphia: ASTM*, **2004**.
108. Bajec, M.R. and Pickering, G.J., Astringency: mechanisms and perception. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2008**. **48**(9): p. 858-875.
109. Sáenz-Navajas, M.-P., Avizcuri, J.-M., Ferreira, V. and Fernández-Zurbano, P., Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chem.*, **2012**. **134**(3): p. 1484-1493.

110. Robichaud, J.L. and Noble, A.C., Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agr.*, **1990**. **53**(3): p. 343-353.
111. O'Mahony, M., Who told you the triangle test was simple? *Food Qual. Prefer*, **1995**. **6**(4): p. 227-238.
112. Hersleth, M., Mevik, B.-H., Næs, T. and Guinard, J.-X., Effect of contextual factors on liking for wine—use of robust design methodology. *Food Qual. Prefer*, **2003**. **14**(7): p. 615-622.
113. Lawless, H.T., Sensory interactions in mixtures. *J. Sens. Stud.*, **1986**. **1**(3-4): p. 259-274.
114. Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L., Moir, A.J.G., Haslam, E., Davies, A.P. and Williamson, M.P., Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agr. Food Chem.*, **2002**. **50**(6): p. 1593-1601.
115. Condelli, N., Dinnella, C., Cerone, A., Monteleone, E. and Bertuccioli, M., Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Qual. Prefer*, **2006**. **17**(1-2): p. 96-107.
116. Collins, L.M.C. and Dawes, C., The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J. Dent. Res.*, **1987**. **66**(8): p. 1300-1302.
117. Guinard, J.-X., Pangborn, R.M. and Lewis, M.J., The time-course of astringency in wine upon repeated ingestion. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1986**. **37**(3): p. 184-189.
118. Green, B.G., Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychol.*, **1993**. **84**(1): p. 119-125.
119. Schmauch, G., Teissedre, P.L. and Saucier, C., Etude des interactions entre les tanins du vin et les protéines de la salive lors de la dégustation. *Rev. Œno.*, **2010**. **137**: p. 48-50.
120. Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y. and Li, H., A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends Food Sci. Tech.*, **2014**. **40**(1): p. 6-19.
121. Gibbins, H.L. and Carpenter, G.H., Alternative mechanisms of astringency – What is the role of saliva? *J. Texture Stud.*, **2013**. **44**(5): p. 364-375.
122. Kennedy, J.A., Ferrier, J., Harbertson, J.F. and des Gachons, C.P., Analysis of tannins in red wine using multiple methods: correlation with perceived astringency. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2006**. **57**(4): p. 481-485.
123. Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M.N. and Vallis, L., Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Qual. Prefer*, **2001**. **12**(2): p. 145-152.
124. Lee, C.B. and Lawless, H.T., Time-course of astringent sensations. *Chem. Senses*, **1991**. **16**(3): p. 225-238.
125. Harbertson, J.F., Kilmister, R.L., Kelm, M.A. and Downey, M.O., Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation. *Food Chem.*, **2014**. **160**: p. 16-21.

126. Soares, S., Mateus, N. and de Freitas, V., Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *J. Agr. Food Chem.*, **2007**. **55**(16): p. 6726-6735.
127. Ferrer-Gallego, R., García-Marino, M., Miguel Hernández-Hierro, J., Rivas-Gonzalo, J.C. and Teresa Escribano-Bailón, M., Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Anal. Chim. Acta*, **2010**. **660**(1–2): p. 22-28.
128. Schwarz, B. and Hofmann, T., Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *Eur. Food Res. Technol.*, **2008**. **227**(6): p. 1693-1698.
129. Kallithraka, S., Bakker, J. and Clifford, M.N., Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid. *J. Food Sci.*, **1997**. **62**(2): p. 416-420.
130. Demiglio, P. and Pickering, G.J., The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *J. Food Agric. Environ.*, **2008**. **6**: p. 163-150.
131. Noble, A.C., Bitterness in foods and beverages-Bitterness and astringency in wine. **1990**, Ed.R.L. Rouseff. p. 145-148.
132. Fischer, U., Boulton, R.B. and Noble, A.C., Special issue: advances in sensory food science - Rose Marie Pangborn memorial symposium physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Qual. Prefer*, **1994**. **5**(1): p. 55-64.
133. Hufnagel, J.C. and Hofmann, T., Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *J. Agr. Food Chem.*, **2008**. **56**(19): p. 9190-9199.
134. Sáenz-Navajas, M.-P., Ferreira, V., Dizy, M. and Fernández-Zurbano, P., Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta*, **2010**. **673**(2): p. 151-159.
135. Peleg, H. and Noble, A.C., Perceptual properties of benzoic acid derivatives. *Chem. Senses*, **1995**. **20**(4): p. 393-400.
136. Kallithraka, S., Bakker, J. and Clifford, M.N., Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *J. Sens. Stud.*, **1997**. **12**(1): p. 25-37.
137. Kennedy, J.A., Grape and wine phenolics: observations and recent findings. *Cienc. Inv. Agr.*, **2008**. **35**(2): p. 107-120.
138. Montmayeur, J.-P. and Matsunami, H., Receptors for bitter and sweet taste. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2002**. **12**(4): p. 366-371.
139. Soares, S., Kohl, S., Thalmann, S., Mateus, N., Meyerhof, W. and De Freitas, V., Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *J. Agr. Food Chem.*, **2013**. **61**(7): p. 1525-1533.
140. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D., eds. *Traité d'Enologie 2. Chimie du vin stabilisation et traitements*. 5^e ed. **2004**, Dunod. 193.
141. Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J.C., Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta*, **2006**. **563**(1–2): p. 238-254.

142. Coombe, B.G., Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1987**. **38**(2): p. 120-127.
143. Glories, Y., La couleur des vins rouges. 2ème partie mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **1984**. **18**: p. 253-271.
144. Clayden, J., Warren, S., Greeves, N. and Wothers, P., eds. *Chimie organique*. **2002**, de boeck. 171.
145. Danilewicz, J.C., Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2007**. **58**(1): p. 53-60.
146. Barbe, J.-C., La combinaison du dioxyde de soufre dans les moûts et vins issus de raisins botrytisés. Rôle des bactéries acétiques. **2000**, Université de Bordeaux 2.
147. Berké, B., Chèze, C., Vercauteren, J. and Deffieux, G., Bisulfite addition to anthocyanins: revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Lett.*, **1998**. **39**(32): p. 5771-5774.
148. Glories, Y., La matière colorante du vin rouge. **1978**, Université de Bordeaux 2.
149. Weinges, K. and Freudenberg, K., Condensed proanthocyanidins from cranberries and cola nuts. *Chem. Commun.*, **1965**(11): p. 220-222.
150. Dixon, R.A., Xie, D.-Y. and Sharma, S.B., Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.*, **2005**. **165**(1): p. 9-28.
151. Haslam, E., Opie, C.T. and Porter, L.J., Procyanidin metabolism—A hypothesis. *Phytochem.*, **1977**. **16**(1): p. 99-102.
152. Haslam, E., In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochem.*, **1980**. **19**(12): p. 2577-2582.
153. Fletcher, A.C., Porter, L.J., Haslam, E. and Gupta, R.K., Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1977**(14): p. 1628-1637.
154. Stafford, H.A., *Flavonoid metabolism*. **1990**, CRC Press: New York. p. 63-99.
155. Xie, D.-Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D. and Dixon, R.A., Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, **2003**. **299**(5605): p. 396-399.
156. Czochanska, Z., Foo, L.Y., Newman, R.H., Porter, L.J., Thomas, W.A. and Jones, W.T., Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**(8): p. 375-377.
157. Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J.P. and Cheynier, V., Demonstration of the occurrence of flavanol–anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Anal. Chim. Acta*, **2004**. **513**(1): p. 325-332.
158. Hayasaka, Y. and Kennedy, J.A., Mass spectrometric evidence for the formation of pigmented polymers in red wine. *Aust. J. of Grape Wine R.*, **2003**. **9**(3): p. 210-220.
159. Salas, E., Dueñas, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., Cheynier, V. and Fulcrand, H., Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *J. Agr. Food Chem.*, **2005**. **53**(11): p. 4536-4546.

160. Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheynier, V. and Moutounet, M., Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (–)-epicatechin and malvidin 3-*O*-glucoside in a model solution system. *J. Agr. Food Chem.*, **1999**. **47**(5): p. 2096-2102.
161. Remy, S., Fulcrand, H., Labarbe, B., Cheynier, V. and Moutounet, M., First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin–tannin reactions. *J. Sci. Food Agr*, **2000**. **80**(6): p. 745-751.
162. Santos-Buelga, C., Bravo-Haro, S. and Rivas-Gonzalo, J., Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Z. Lebensm. Unters. For.*, **1995**. **201**(3): p. 269-274.
163. Jurd, L. and Somers, T.C., The formation of xanthylium salts from proanthocyanidins. *Phytochemistry*, **1970**. **9**(2): p. 419-427.
164. Mayer, W., Goll, L., Arndt, E.M.v. and Mannschreck, A., Procyanidino(-)-epicatechin, ein zweiarmig verknüpfte, kondensiertes proanthocyanidin aus aesculus hippocastanum. *Tetrahedron Lett.*, **1966**. **7**(4): p. 429-435.
165. Weinges, K., Kaltenhäuser, W., Marx, H.-D., Nader, E., Nader, F., Perner, J. and Seiler, D., Zur kenntnis der proanthocyanidine, X procyanidine aus fruchten. *J. Liebigs Ann. der Chem.*, **1968**. **711**(1): p. 184-204.
166. Schilling, G., Isomerie der C₃₀H₂₄O₁₂-procyanidine; eine ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopische Untersuchung. *J. Liebigs Ann. Chem.*, **1975**. **1975**(10): p. 1822-1830.
167. Xie, D.-Y. and Dixon, R.A., Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochem.*, **2005**. **66**(18): p. 2127-2144.
168. Y. Glories, N.S.C., N. Vivas and M. Augustin, Identification et dosage de la procyanidine A2 dans les raisins et les vins de Vitis vinifera L. C.V. Merlot Noir, Cabernet Sauvignon et Cabernet Franc. *Polyph. Commun.* **96**, **1996**: p. 153.
169. Berbrand, M.-H.S.-A.a.A., Wine phenolics-analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agr.*, **1984**. **35**: p. 1241-1247.
170. Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K., Tanaka, T., Suzuki, T., Miyata, N. and Toyoda, M., Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Lett.*, **2000**. **41**(4): p. 485-488.
171. Bate-Smith, E.C., Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochem.*, **1975**. **14**(4): p. 1107-1113.
172. Dong, X.-q., Zou, B., Zhang, Y., Ge, Z.-z., Du, J. and Li, C.-m., Preparation of A-type proanthocyanidin dimers from peanut skins and persimmon pulp and comparison of the antioxidant activity of A-type and B-type dimers. *Fitoterapia*, **2013**. **91**: p. 128-139.
173. Xu, Z., Wei, L.-h., Ge, Z.-z., Zhu, W. and Li, C.-m., Comparison of the degradation kinetics of A-type and B-type proanthocyanidins dimers as a function of pH and temperature. *Eur. Food Res. Technol.*, **2014**. **240**(4): p. 707-717.
174. Sánchez-Ilárduya, M.B., Sánchez-Fernández, C., Garmón-Lobato, S., Abad-García, B., Berrueta, L.A., Gallo, B. and Vicente, F., Detection of non-coloured anthocyanin–flavanol derivatives in Rioja aged red wines by liquid chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, **2014**. **121**: p. 81-88.

175. Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J.C., Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI/MSn. *J. Mass Spectrom.*, **2007**. **42**(6): p. 735-748.
176. Vidal, S., Meudec, E., Cheynier, V., Skouroumounis, G. and Hayasaka, Y., Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *J. Agr. Food Chem.*, **2004**. **52**(23): p. 7144-7151.
177. Oliveira, J., da Silva, M.A., Jorge Parola, A., Mateus, N., Brás, N.F., Ramos, M.J. and de Freitas, V., Structural characterization of a A-type linked trimeric anthocyanin derived pigment occurring in a young Port wine. *Food Chem.*, **2013**. **141**(3): p. 1987-1996.
178. Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J.A., Teissedre, P.-L. and Saucier, C., Analysis of ethylidene-bridged flavan-3-ols in wine. *J. Agr. Food Chem.*, **2007**. **55**(4): p. 1109-1116.
179. Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L. and Polsinelli, M., Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbio. Lett.*, **1994**. **118**(3): p. 213-218.
180. Li, E. and Mira de Orduña, R., Evaluation of the acetaldehyde production and degradation potential of 26 enological *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast strains in a resting cell model system. *J. Ind. Microbiol. Biotechn.*, **2011**. **38**(9): p. 1391-1398.
181. Wildenrad, H.L. and Singleton, V.L., The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1974**. **25**(2): p. 119-126.
182. Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheynier, V. and Moutounet, M., Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols. *J. Agr. Food Chem.*, **1999**. **47**(5): p. 2088-2095.
183. Weber, F. and Winterhalter, P., Synthesis and structure elucidation of ethylden-linked anthocyanin - Flavan-3-ol oligomers. *Food Research International*, **2014**.
184. Fulcrand, H., Doco, T., Es-Safi, N.-E., Cheynier, V. and Moutounet, M., Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1996**. **752**(1-2): p. 85-91.
185. Timberlake C.F. and P., B., Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1976**. **27**: p. 97-105.
186. Es-Safi, N.-E., Cheynier, V. and Moutounet, M., Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J. Food Comp. Anal.*, **2003**. **16**(5): p. 535-553.
187. Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J.A., Teissedre, P.-L. and Saucier, C., Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *J. Agr. Food Chem.*, **2007**. **55**(15): p. 6292-6299.
188. Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D. and Glories, Y., Characterization of (+)-catechin-acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of wine polyphenols. *J. Agr. Food Chem.*, **1997**. **45**(4): p. 1045-1049.
189. Cruz, L., Mateus, N. and de Freitas, V., Identification by mass spectrometry of new compounds arising from the reactions involving malvidin-3-glucoside-(O)-catechin,

- catechin and malvidin-3-glucoside. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2012**. **26**(18): p. 2123-2130.
190. Atanasova, V., Fulcrand, H., Le Guernevé, C., Cheynier, V. and Moutounet, M., Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Lett.*, **2002**. **43**(35): p. 6151-6153.
 191. Vivar-Quintana, A.M., Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E. and Rivas-Gonzalo, J.C., Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines. *Food Sci. Tech. Int.*, **1999**. **5**(4): p. 347-352.
 192. Francia-Aricha, E.M., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C. and Santos-Buelga, C., New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agr. Food Chem.*, **1997**. **45**(6): p. 2262-2266.
 193. Cruz, L., Teixeira, N., Silva, A.M.S., Mateus, N., Borges, J. and de Freitas, V., Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)-catechin. *J. Agr. Food Chem.*, **2008**. **56**(22): p. 10980-10987.
 194. Asenstorfer, R.E., Hayasaka, Y. and Jones, G.P., Isolation and structures of oligomeric wine pigments by bisulfite-mediated ion-exchange chromatography. *J. Agr. Food Chem.*, **2001**. **49**(12): p. 5957-5963.
 195. Mateus, N., Silva, A.M.S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C. and De Freitas, V., Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.*, **2002**. **50**(7): p. 2110-2116.
 196. Mateus, N., Carvalho, E., Carvalho, A.R.F., Melo, A., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Silva, A.M.S. and de Freitas, V., Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in aging red wines. *J. Agr. Food Chem.*, **2003**. **51**(1): p. 277-282.
 197. Pechamat, L., Zeng, L., Jourdes, M., Ghidossi, R. and Teissedre, P.-L., Occurrence and formation kinetics of pyranomalvidin-procyanidin dimer pigment in merlot red wine: Impact of acidity and oxygen concentrations. *J. Agr. Food Chem.*, **2014**. **62**(7): p. 1701-1705.
 198. Mateus, N., Silva, A.M.S., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. and De Freitas, V., A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *J. Agr. Food Chem.*, **2003**. **51**(7): p. 1919-1923.
 199. Cruz, L., Teixeira, N., Silva, A.M.S., Mateus, N., Borges, J. and De Freitas, V., Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)- catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**. **56**(22): p. 10980-10987.
 200. Cruz, L., Mateus, N. and De Freitas, V., Identification by mass spectrometry of new compounds arising from the reactions involving malvidin-3-glucoside-(O)-catechin, catechin and malvidin-3-glucoside. *Rapid Commun. Mass Sp.*, **2012**. **26**(18): p. 2123-2130.
 201. Griffiths, I.W., J. J. Thomson — the centenary of his discovery of the electron and of his invention of mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.*, **1997**. **11**(1): p. 2-16.
 202. Downard, K.M., 1912: a titanic year for mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2012**. **47**(8): p. 1034-1039.
 203. Guan, S., Marshall, A.G. and Scheppele, S.E., Resolution and chemical formula identification of aromatic hydrocarbons and aromatic compounds containing sulfur,

- nitrogen, or oxygen in petroleum distillates and refinery streams. *Anal. Chem.*, **1996**. **68**(1): p. 46-71.
204. Kind, T. and Fiehn, O., Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*, **2006**. **7**(1): p. 234.
205. Feng, X. and Siegel, M., FTICR-MS applications for the structure determination of natural products. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**. **389**(5): p. 1341-1363.
206. Li, H.-J. and Deinzer, M.L., Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Anal. Chem.*, **2007**. **79**(4): p. 1739-1748.
207. Bate-Smith, E.C. and Swain, T., Recent developments in the chemotaxonomy of flavonoid compounds. *Lloydia*, **1965**. **28**: p. 313-331.
208. Ribéreau-Gayon, P. and Stonestreet, E., Le dosage des tannins du vin rouge et la détermination de leur structure. *Chim. Anal.*, **1966**. **48**: p. 188-196.
209. Rigaud, J., Perez-Illarbe, J., Da Silva, J.M.R. and Cheynier, V., Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1991**. **540**: p. 401-405.
210. Mouls, L. and Fulcrand, H., UPLC-ESI-MS study of the oxidation markers released from tannin depolymerization: toward a better characterization of the tannin evolution over food and beverage processing. *J. Mass Spectrom.*, **2012**. **47**(11): p. 1450-1457.
211. Kennedy, J.A. and Jones, G.P., Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agr. Food Chem.*, **2001**. **49**(4): p. 1740-1746.
212. Bordiga, M., Coisson, J., Locatelli, M., Arlorio, M. and Travaglia, F., Pyrogallol: an alternative trapping agent in proanthocyanidins analysis. *Food Anal. Method.*, **2013**. **6**(1): p. 148-156.
213. Foo, L.Y., Lu, Y., Howell, A.B. and Vorsa, N., The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochem.*, **2000**. **54**(2): p. 173-181.
214. Guyot, S., Vercauteren, J. and Cheynier, V., Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochem.*, **1996**. **42**(5): p. 1279-1288.
215. Weinges, K. and Huthwelker, D., Oxydative kupplung von phenolen, III) Isolierung und konstitutions beweis eines 8.6'-verknüpften dehydro-dicatechins (B4). *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1970**. **731**: p. 161.
216. Weinges, K. and Mattauch, H., Der chemische konstitutionsbeweis des dehydro-dicatechins A. *Chemiker Ztg*, **1971**. **95**: p. 155.
217. Remy-Tanneau, S., Le Guernevé, C., Meudec, E. and Cheynier, V., Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.*, **2003**. **51**(12): p. 3592-3597.
218. Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P. and Glories, Y., Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *J. Sci. Food Agr.*, **1983**. **34**(5): p. 505-516.

219. Ribéreau-Gayon, P., The anthocyanins of grapes and wines. Vol. 6. **1982**: Academic Press: New York.
220. Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V. and Moutounet, M., A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochem.*, **1998**. **47**(7): p. 1401-1407.
221. Bordignon-Luiz, M.T., Gauche, C., Gris, E.F. and Falcão, L.D., Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Sci. Tech.*, **2007**. **40**(4): p. 594-599.
222. Hillmann, M.C.R., Burin, V.M. and Bordignon-Luiz, M.T., Thermal degradation kinetics of anthocyanins in grape juice and concentrate. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2011**. **46**(9): p. 1997-2000.
223. Morais, H., Ramos, C., Forgasc, E., Cserhádi, T., Matos, N., Almeida, V. and Oliveira, J., Stability of anthocyanins extracted from grape skins. *Chromatographia*, **2002**. **56**(1): p. S173-S175.
224. Furtado, P., Figueiredo, P., Chaves das Neves, H. and Pina, F., Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *J. Photochem. Photobiol., A*, **1993**. **75**(2): p. 113-118.
225. Piffaut, B., Kader, F., Girardin, M. and Metche, M., Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chemistry*, **1994**. **50**(2): p. 115-120.
226. Lopes, P., Richard, T., Saucier, C., Teissedre, P.-L., Monti, J.-P. and Glories, Y., Anthocyanone A: a quinone methide derivative resulting from malvidin-3-O-glucoside degradation. *J. Agr. Food Chem.*, **2007**. **55**(7): p. 2698-2704.
227. Scheffeldt, P. and Hrazdina, G., Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *J. Food Sci.*, **1978**. **43**(2): p. 517-520.
228. Jasmina, M., Petranović, N.A. and Jelisaveta, M.B., A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *J. Agr. Food Chem.*, **2000**. **48**(11): p. 5530-5536.
229. Lambert, S.G., Asenstorfer, R.E., Williamson, N.M., Iland, P.G. and Jones, G.P., Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chem.*, **2011**. **125**(1): p. 106-115.
230. Brouillard, R., Wigand, M.-C., Dangles, O. and Cheminat, A., pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1991**(8): p. 1235-1241.
231. Liao, H., Cai, Y. and Haslam, E., Polyphenol interactions. Anthocyanins: copigmentation and colour changes in red wines. *J. Sci. Food Agr.*, **1992**. **59**(3): p. 299-305.
232. Berké, B. and de Freitas, V.A.P., Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chem.*, **2005**. **90**(3): p. 453-460.
233. Boulton, R., The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2001**. **52**(2): p. 67-87.
234. Bakker, J. and Timberlake, C.F., The distribution and content of anthocyanins in young port wines as determined by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agr.*, **1985**. **36**(12): p. 1325-1333.

235. Bakker, J., Bridle, P., Honda, T., Kuwano, H., Saito, N., Terahara, N. and Timberlake, C.F., Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochem.*, **1997**. **44**(7): p. 1375-1382.
236. Bakker, J. and Timberlake, C.F., Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agr. Food Chem.*, **1997**. **45**(1): p. 35-43.
237. Asenstorfer, R.E., Markides, A.J., Iland, P.G. and Jones, G.P., Formation of vitisin A during red wine fermentation and maturation. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2003**. **9**(1): p. 40-46.
238. Monagas, M. and Bartolomé, B., Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds, in *Wine Chemistry and Biochemistry*, M.V. Moreno-Arribas and M.C. Polo, Editors. **2009**, Springer New York. p. 439-462.
239. de Freitas, V. and Mateus, N., Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**. **401**(5): p. 1463-1473.
240. Schwarz, M., Jerz, G. and Winterhalter, P., Isolation and structure of pinotin A, a new anthocyanin derivative from pinotage wine. *Vitis*, **2003**. **42**: p. 105-106.
241. Oliveira, J., Azevedo, J., Silva, A.M.S., Teixeira, N., Cruz, L., Mateus, N. and de Freitas, V., Pyranoanthocyanin dimers: A new family of turquoise blue anthocyanin-derived pigments found in port wine. *J. Agr. Food Chem.*, **2010**. **58**(8): p. 5154-5159.
242. Nagel, C.W. and Wulf, L.W., Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of merlot and cabernet sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1979**. **30**(2): p. 111-116.
243. Cabrita, L., Fossen, T. and Andersen, Ø.M., Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.*, **2000**. **68**(1): p. 101-107.
244. Salas, E., Fulcrand, H., Meudec, E. and Cheynier, V., Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *J. Agr. Food Chem.*, **2003**. **51**(27): p. 7951-7961.
245. He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J. and Duan, C.-Q., Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, **2012**. **17**(2): p. 1571.
246. Salas, E., Guernevé, C.L., Fulcrand, H., Poncet-Legrand, C. and Cheynier, V., Structure determination and colour properties of a new directly linked flavanol–anthocyanin dimer. *Tetrahedron Lett.*, **2004**. **45**(47): p. 8725-8729.
247. Fulcrand, H., dos Santos, P.-J.C., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. and Favre-Bonvin, J., Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1996**(7): p. 735-739.
248. Eglinton, J., Griesser, M., Henschke, P., Kwiatkowski, M., Parker, M. and Herderich, M., Yeast-mediated formation of pigmented polymers in red wine, in *Red Wine Color*. **2004**, American Chemical Society. p. 7-21.
249. Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V. and Waters, E.J., The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agr.*, **2003**. **83**(6): p. 564-573.

250. Poncet-Legrand, C., Cabane, B., Bautista-Ortín, A.-B., Carrillo, S., Fulcrand, H., Pérez, J. and Vernhet, A., Tannin oxidation: intra- versus intermolecular reactions. *Biomacromolecules*, **2010**. **11**(9): p. 2376-2386.
251. Chris Somers, T. and Evans, M.E., Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical age”. *J. Sci. Food Agr.*, **1977**. **28**(3): p. 279-287.
252. Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M. and Watson, B.T., Cluster sun exposure and quercetin in Pinot Noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1995**. **46**(2): p. 187-194.
253. Wightman, J.D., Price, S.F., Watson, B.T. and Wrolstad, R.E., Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot Noir and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1997**. **48**(1): p. 39-48.
254. Peng, Z., Iland, P.G., Oberholster, A., Sefton, M.A. and Waters, E.J., Analysis of pigmented polymers in red wine by reverse phase HPLC. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2002**. **8**(1): p. 70-75.
255. De Freitas, V., Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines oligomères du raisin et du vin. **1995**, Université de Bordeaux 2.
256. Derdelinckx, G. and Jerumanis, J., Separation of malt and hop proanthocyanidins on fractogel TSK HW-40 (S). *J. Chromatogr. A*, **1984**. **285**(0): p. 231-234.
257. Xiao, J.-S., Liu, L., Wu, H., Xie, B.-J., Yang, E.-N. and Sun, Z.-D., Rapid preparation of procyanidins B2 and C1 from Granny Smith apples by using low pressure column chromatography and identification of their oligomeric procyanidins. *J. Agr. Food Chem.*, **2008**. **56**(6): p. 2096-2101.
258. Braun, W., Bösch, C., Brown, L.R., Go, N. and Wüthrich, K., Combined use of proton-proton overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1981**. **667**: p. 377-396.
259. Richard, T., Lefeuvre, D., Descendit, A., Quideau, S. and Monti, J.P., Recognition characters in peptide–polyphenol complex formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **2006**. **1760**(6): p. 951-958.
260. CIE, CIE colorimetry. **1986**.
261. Ayala, F., Echávarri, J.F. and Negueruela, A.I., A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rosé wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1997**. **48**(3): p. 357-363.
262. OIV, Recueil des méthodes internationales d'analyses des vins et des moûts. **2009**.
263. Minolta, K., Analyse des couleurs, parlons clair.
264. Karchesy, J.J., Hemingway, R.W., Foo, Y.L., Barofsky, E. and Barofsky, D.F., Sequencing procyanidin oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **1986**. **58**(12): p. 2563-2567.
265. De Freitas, V., Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines oligomères du raisin et du vin. **1995**.
266. Tarascou, I., Barathieu, K., Simon, C., Ducasse, M.-A., André, Y., Fouquet, E., Dufourc, E.J., de Freitas, V., Laguerre, M. and Pianet, I., A 3D structural and

- conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling. *Magn. Reson. Chem.*, **2006**. **44**(9): p. 868-880.
267. Liu, J., Lu, J.-f., Kan, J., Wen, X.-y. and Jin, C.-h., Synthesis, characterization and in vitro anti-diabetic activity of catechin grafted inulin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**. **64**: p. 76-83.
268. Bloor, S.J., Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, in *Methods in Enzymology*. **2001**, Academic Press. p. 3-14.
269. Bartolomé, B., Hernández, T., Bengoechea, M.L., Quesada, C., Gómez-Cordovés, C. and Estrella, I., Determination of some structural features of procyanidins and related compounds by photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A*, **1996**. **723**(1): p. 19-26.
270. Jang, J.-H. and Surh, Y.-J., Protective effect of resveratrol on β -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radical Bio. Med.*, **2003**. **34**(8): p. 1100-1110.
271. Tarozzi, A., Morroni, F., Merlicco, A., Bolondi, C., Teti, G., Falconi, M., Cantelli-Forti, G. and Hrelia, P., Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25–35) oligomer-induced toxicity. *Neurosci. Lett.*, **2010**. **473**(2): p. 72-76.
272. Sánchez-Ilárduya, M.B., Sánchez-Fernández, C., Vilorio-Bernal, M., López-Márquez, D.M., Berrueta, L.A., Gallo, B. and Vicente, F., Mass spectrometry fragmentation pattern of coloured flavanol-anthocyanin and anthocyanin-flavanol derivatives in aged red wines of Rioja. *Aust. J. of Grape Wine R.*, **2012**. **18**(2): p. 203-214.
273. Bishop, P.D. and Nagel, C.W., Characterization of the condensation product of malvidin 3,5-diglucoside and catechin. *J. Agr. Food Chem.*, **1984**. **32**(5): p. 1022-1026.
274. Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.-L. and Glories, Y., Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles. *J. Agr. Food Chem.*, **2006**. **54**(18): p. 6741-6746.
275. Jaffré, J., Valentin, D., Meunier, J.-M., Siliani, A., Bertuccioli, M. and Le Fur, Y., The Chardonnay wine olfactory concept revisited: a stable core of volatile compounds, and fuzzy boundaries. *Food Res. Int.*, **2011**. **44**(1): p. 456-464.

ANNEXES

Annexe 1. Les 16 vins ont été numérotés pour l'analyse sensorielle verticale.

Millésime	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2003	2002	2001	2000	1999	1998	1997	1994	1993	1992	1991
Numéro	536	229	738	961	495	323	869	397	656	234	579	608	921	746	793	808	639

Annexe 2. Exemple de la fiche de dégustation pour l'analyse sensorielle verticale.

Nom du dégustateur:

Date :

Dégustation Verticale : Visuelle

Indiquez, à l'aide d'une croix, les caractéristiques des vins rouge suivants.



Rouge/Violet

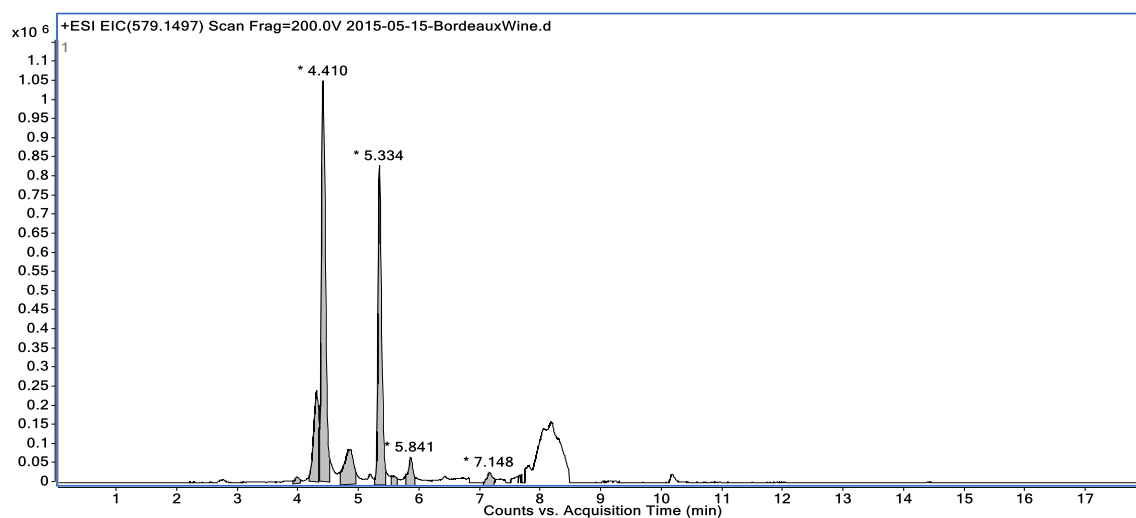
Teinte



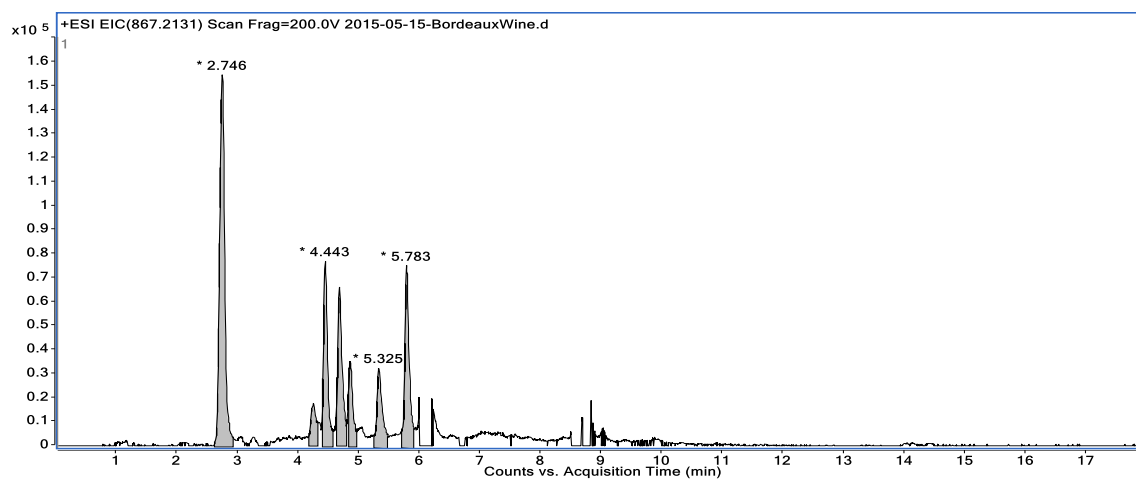
Tuilé/Orangé

397 :	-----
639 :	-----
579 :	-----
323 :	-----
738 :	-----
495 :	-----
229 :	-----
746 :	-----
808 :	-----
656 :	-----
234 :	-----
961 :	-----
536 :	-----
921 :	-----
869 :	-----
608 :	-----
793 :	-----

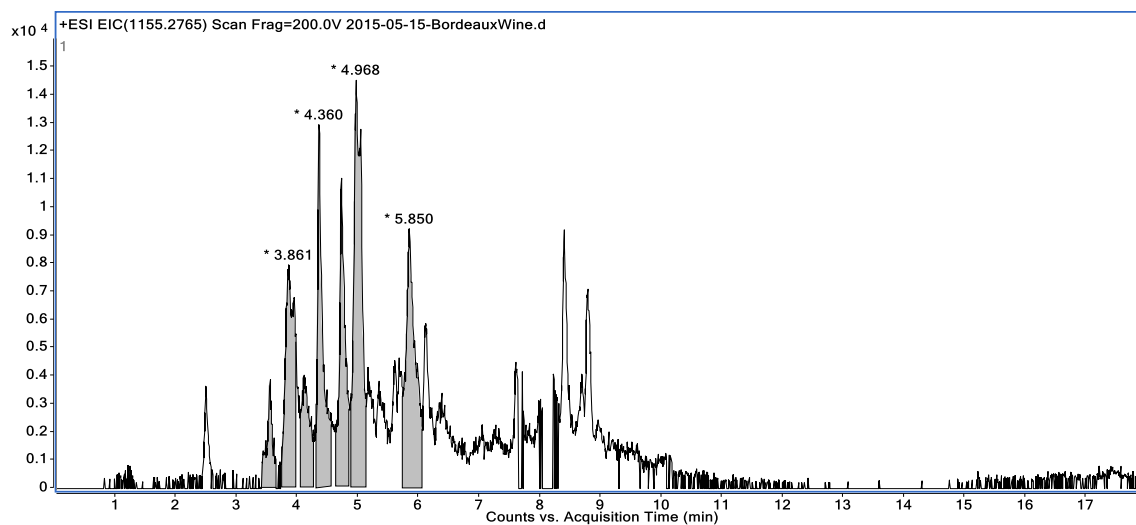
Annexe 3. Huit dimères de type B à la base de l'(épi)catéchine détectés dans le vin rouge.



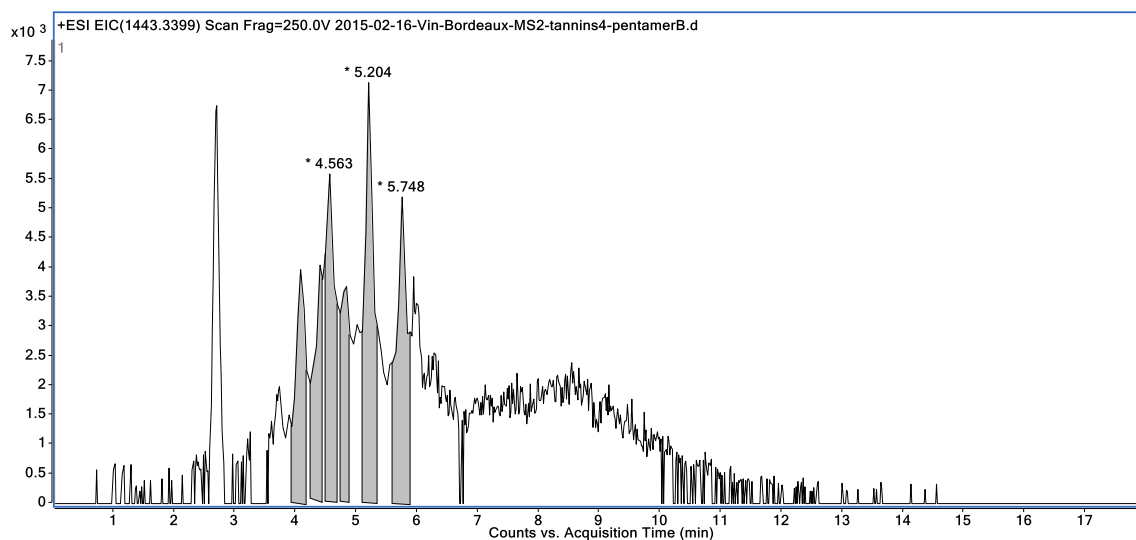
Annexe 4. Sept trimères de type B à la base de l'(épi)catéchine détectés dans le vin rouge.



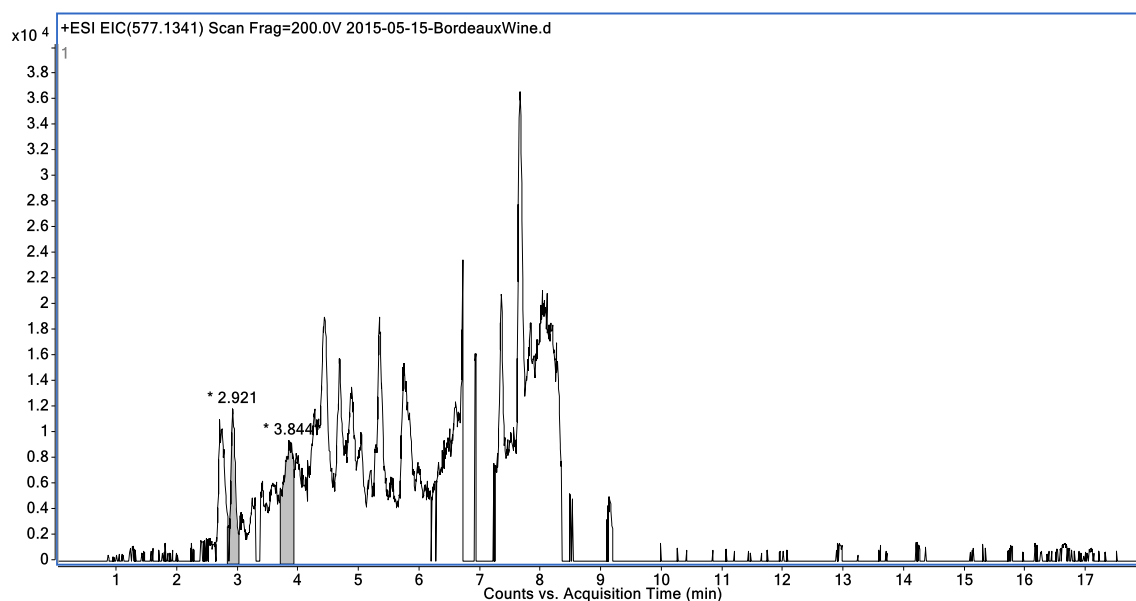
Annexe 5. Sept tétramères de type B à la base de l'(épi)catéchine détectés dans le vin rouge.



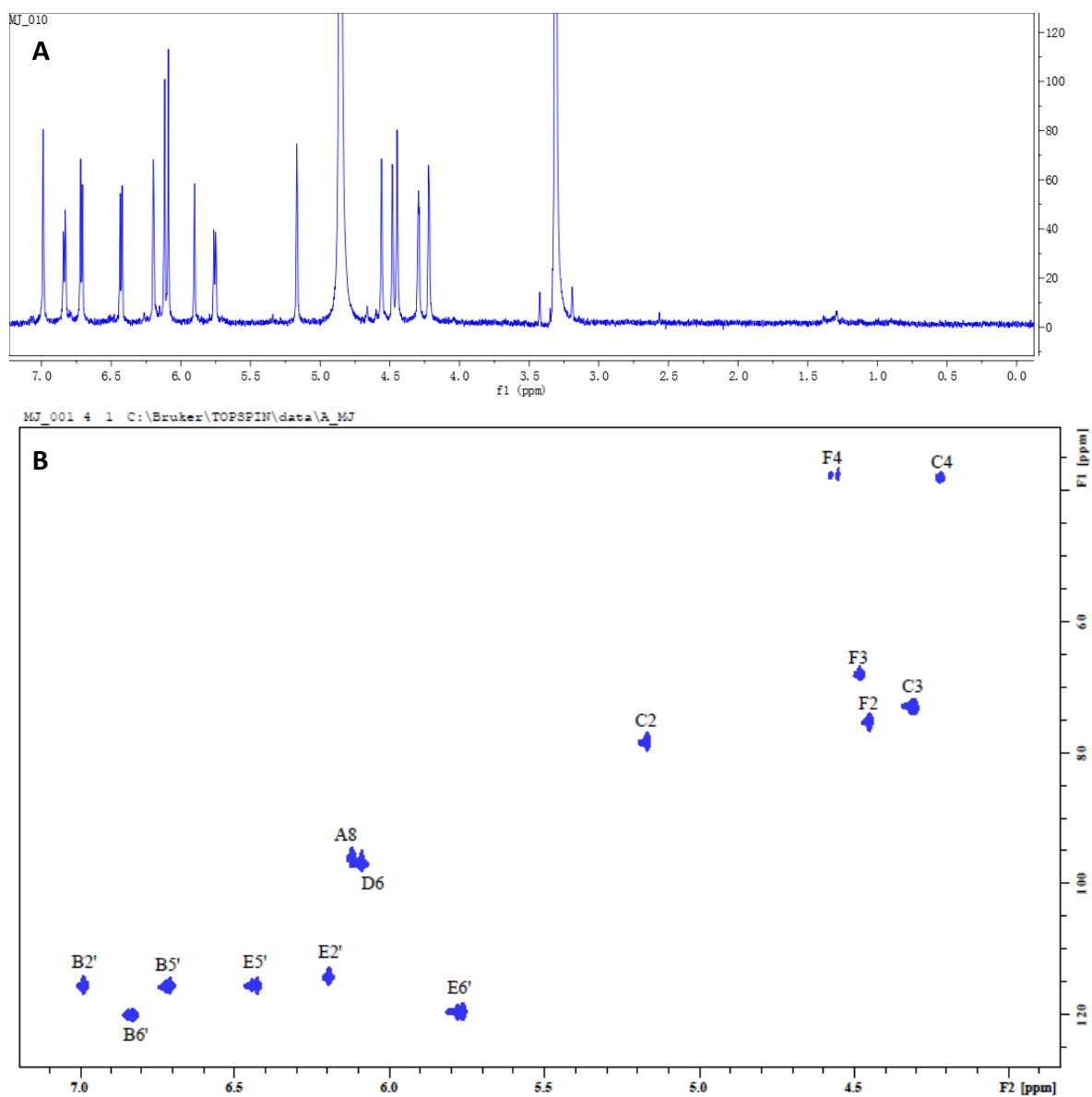
Annexe 6. Des pentamères de type B à la base de l'(épi)catéchine détectés dans le vin rouge (Fragmentor 250 V ; Volume d'injection 2 µL)



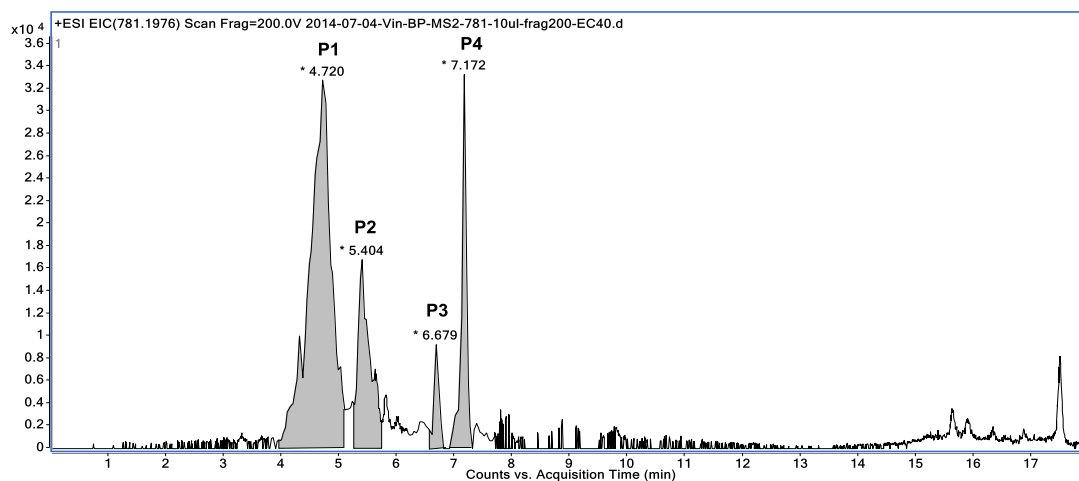
Annexe 7. Deux dimères de type A à la base de l'(épi)catéchine détectés, structures confirmées avec MS/MS et l'élution sur TSK 40S.



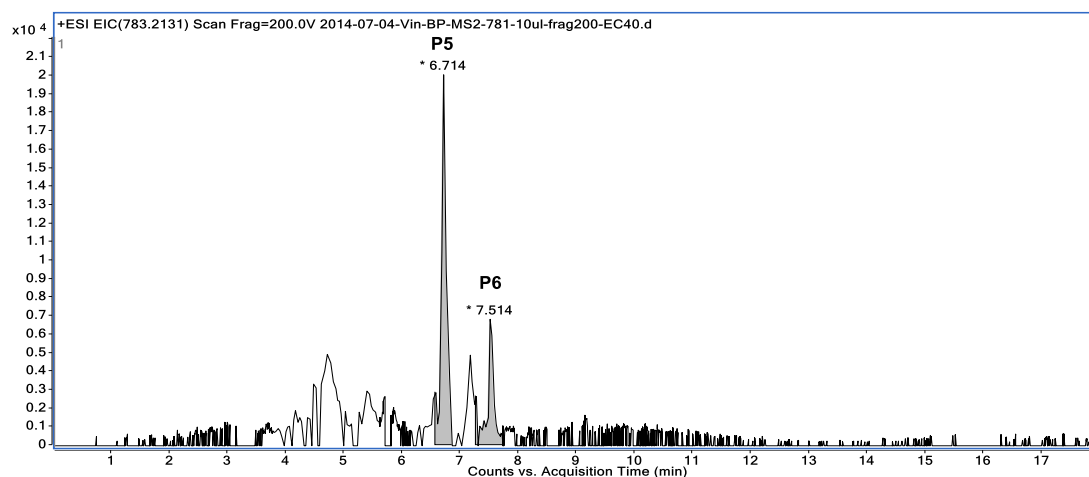
Annexe 8. Le spectre proton (A) et le spectre HSQC (B) du tétramère couronne.



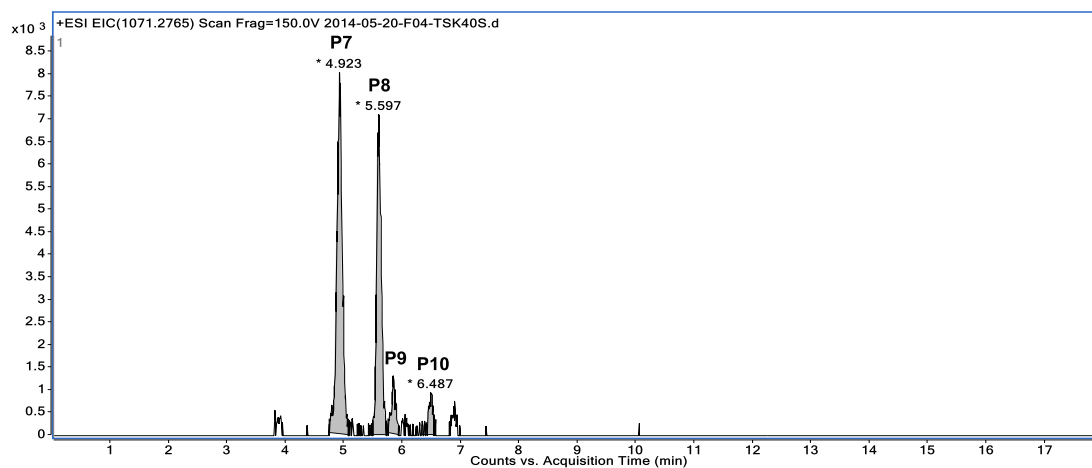
Annexe 9. Les adduits malvidine-3-O-glucoside-(épi)catéchine ($[C_{38}H_{37}O_{18}]^+$ = 781,1974) détectés dans du vin rouge.



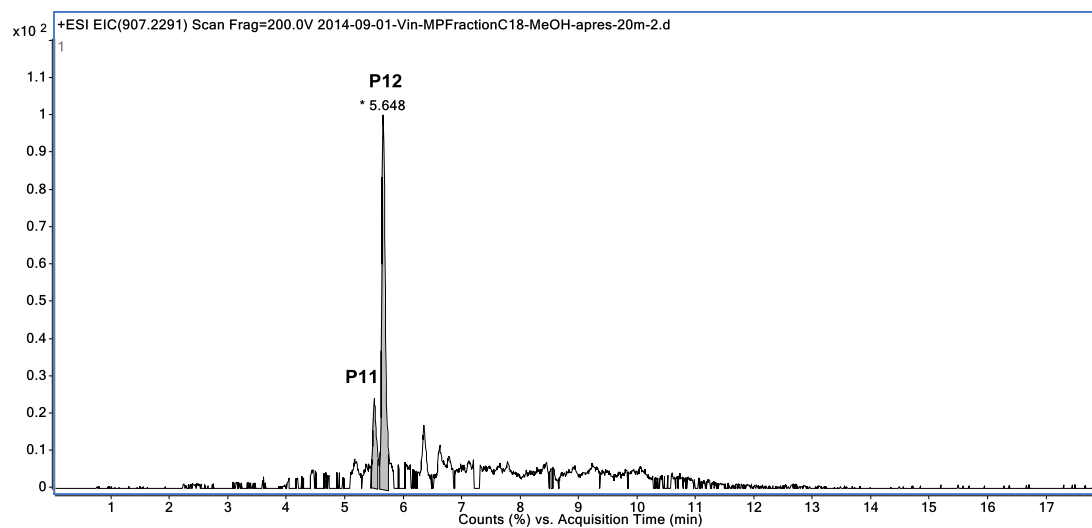
Annexe 10. Les adduits malvidine-3-O-glucoside-(épi)catéchine(type A) détectés dans du vin rouge.



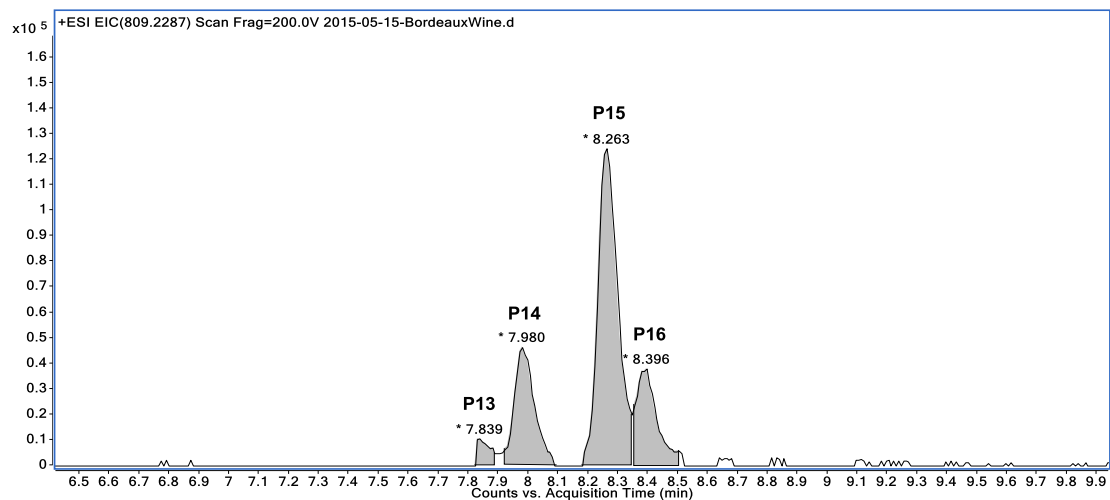
Annexe 11. Les adduits de condensation directe F-A-F(type A) et A-F(type A)-F.



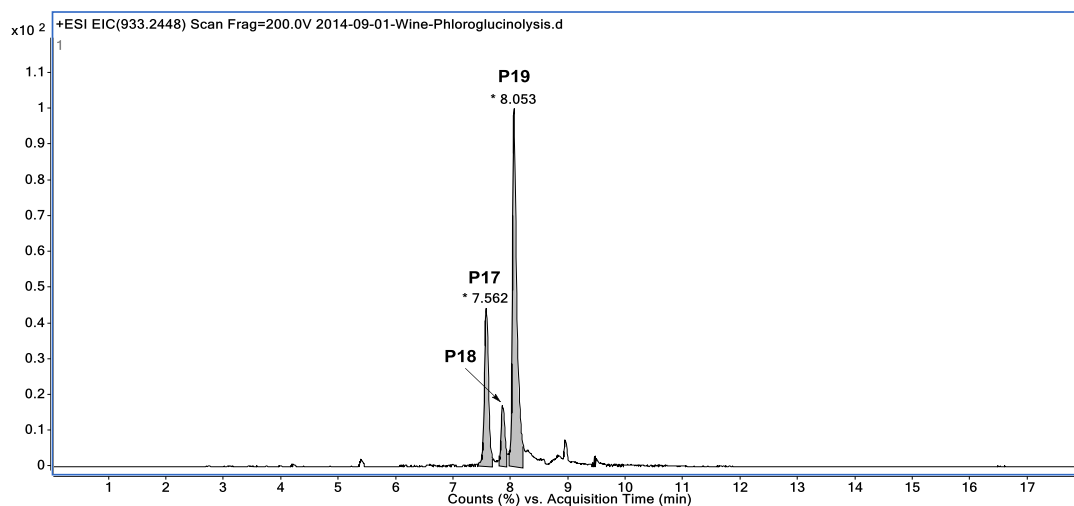
Annexe 12. Les adduits de phloroglucinol A-F(type A)-phloroglucinol détectés.



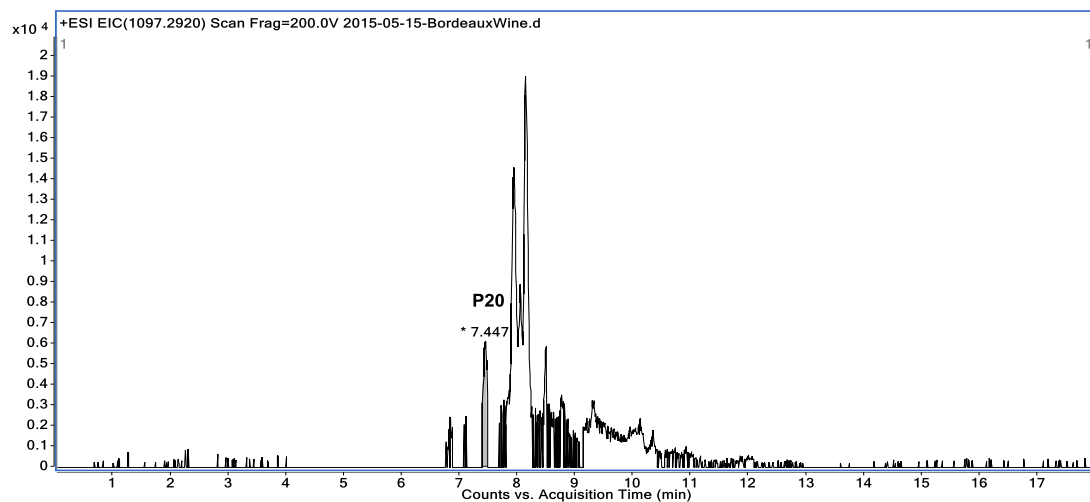
Annexe 13. Quatre isomères de malvidine-3-O-glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine détectés.



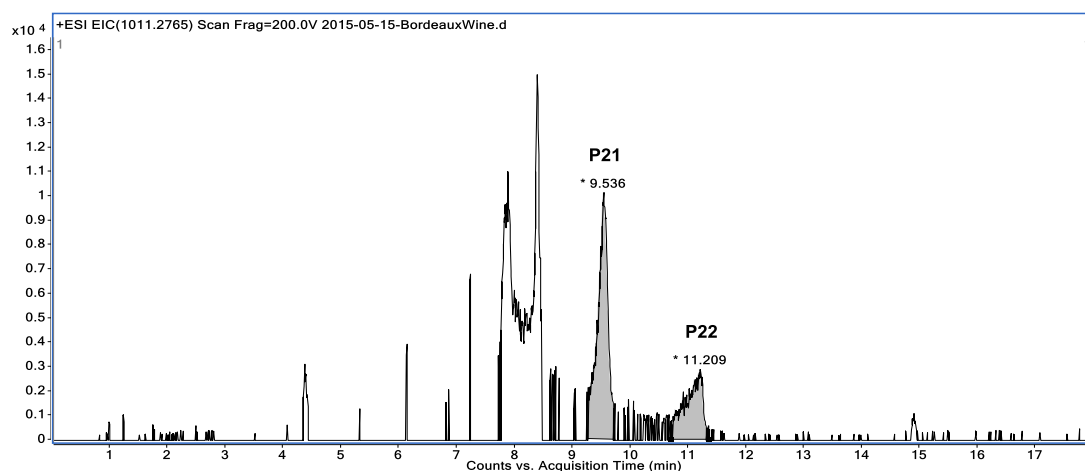
Annexe 14. Trois isomères d'adduit malvidine-3-O-glucoside-pont éthylidène-(épi)catéchine-phloroglucinol détectés.



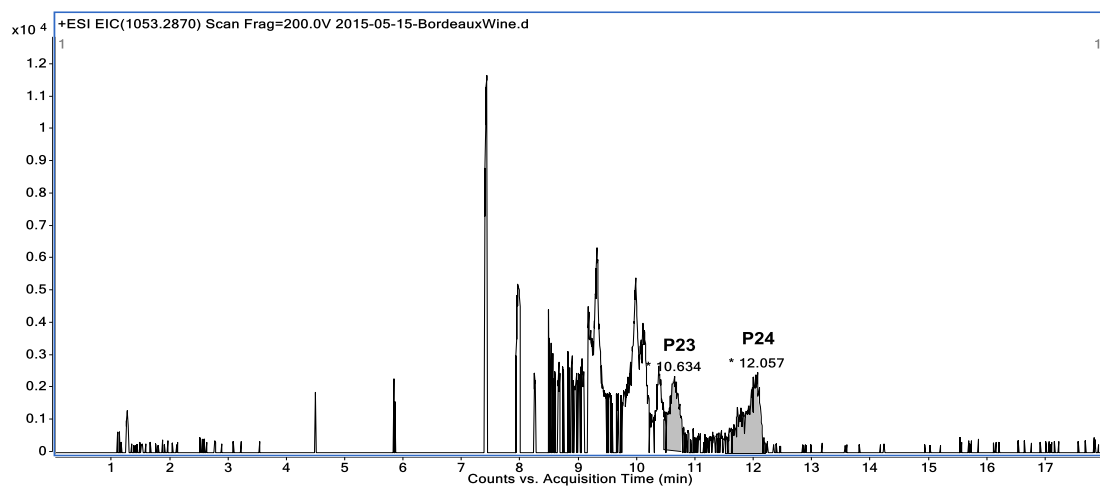
Annexe 15. Un pigment trimérique de type A-pont-éthyl-F-F détecté.



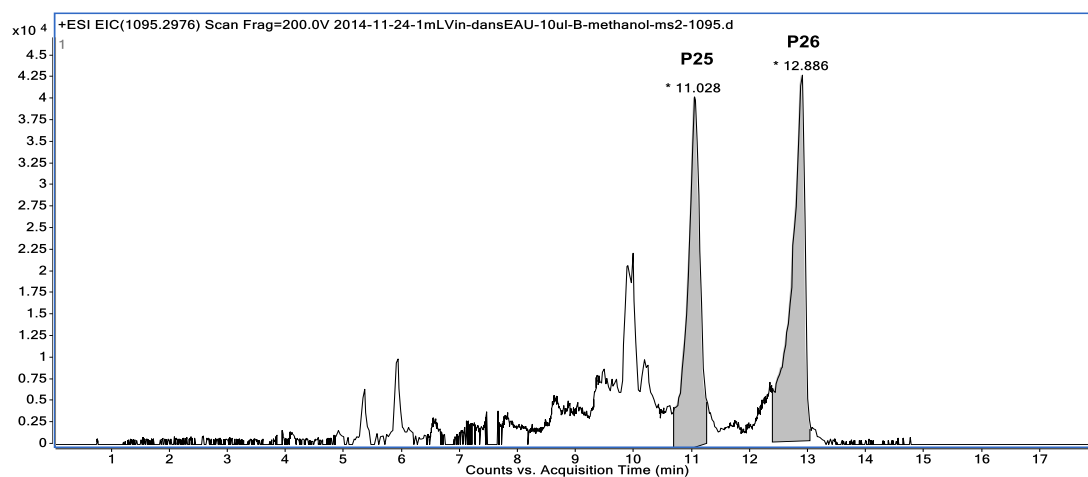
Annexe 16. Deux isomères de la malvidine-3-O-glucoside -pont éthylidène- malvidine-3-O-glucoside détectés.



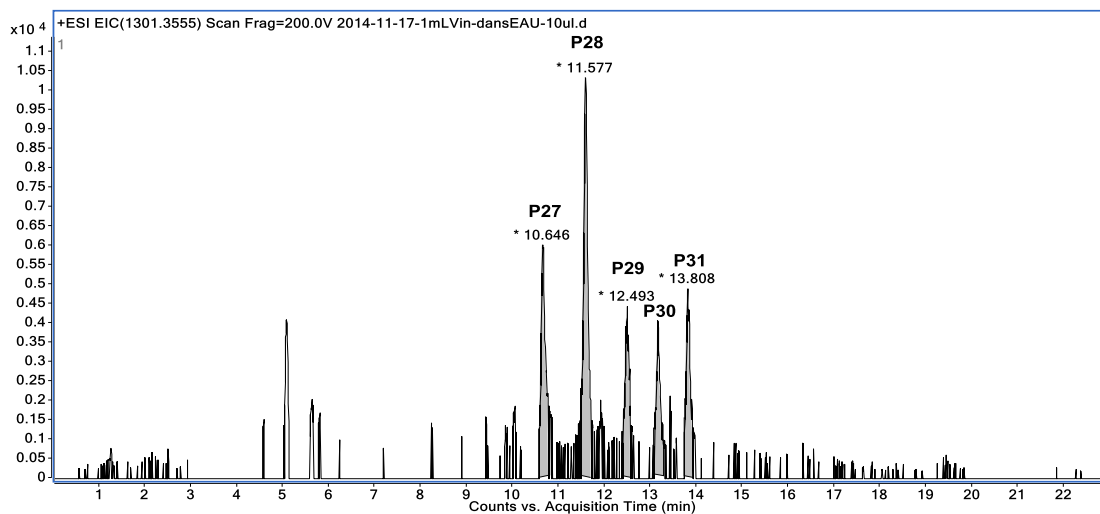
Annexe 17. Deux isomères de la malvidine-3-O-(acétyl)glucoside-pont éthylidène-malvidine-3-O-glucoside détectés.



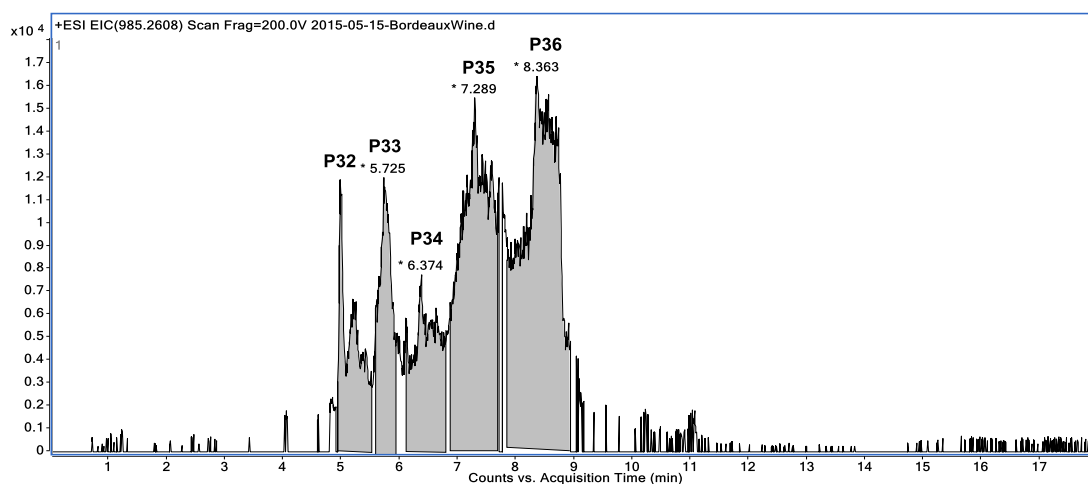
Annexe 18. Deux isomères de la malvidine-3-O-(acétyl)glucoside-pont éthylidène-malvidine-3-O-(acétyl)glucoside détectés.



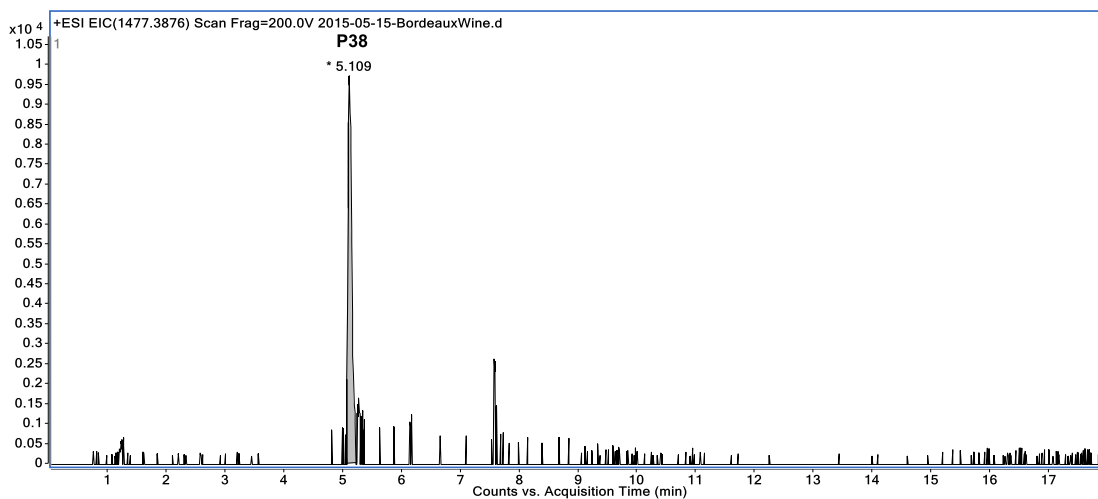
Annexe 19. Cinq isomères de la malvidine-3-O-glucoside-pont éthylidène-malvidine-3-O-glucoside-(épi)catéchine détectés.



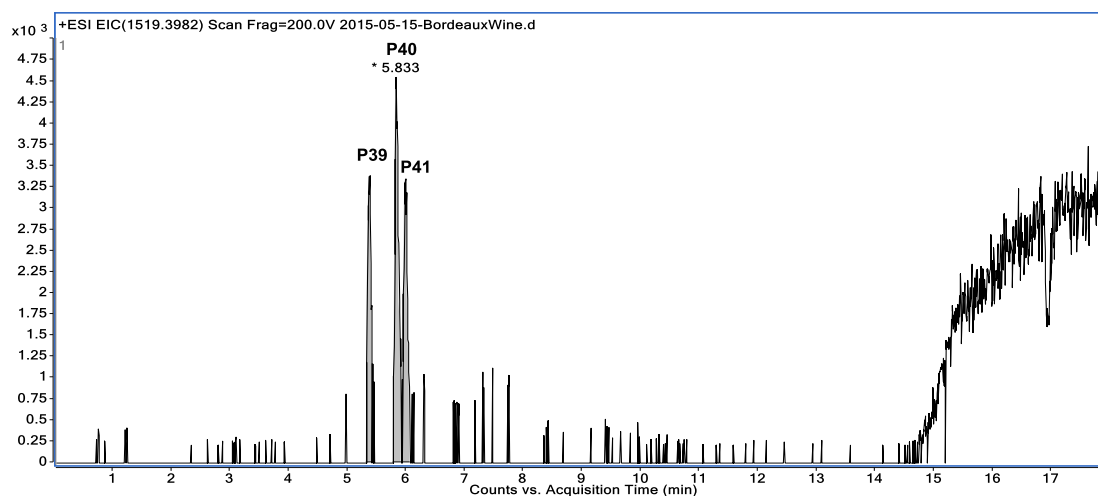
Annexe 20. Des ions de la malvidine-3-O-glucoside dimériques détectés.



Annexe 21. Une anthocyane trimérique détectée.



Annexe 22. Trois anthocyanes trimériques ayant une unité avec le glucose acétylé détectées.



Annexe 23. Les écart-types pour des valeurs des paramètres de la couleur.

Millésime	Age (ans)	Ecart-type		Ecart-type							
		Valeur spectrométrique		Variable CIELAB							
		IC	Teint	L*	a*	b*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}	
2011	3	0,00	0,00	0,00	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	
2010	4	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	
2009	5	0,00	0,00	0,05	0,12	0,06	0,04	0,12	0,06	0,02	
2008	6	0,00	0,00	0,00	0,01	0,07	0,01	0,01	0,07	0,04	
2007	7	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	
2006	8	0,00	0,00	0,04	0,07	0,02	0,03	0,07	0,01	0,04	
2003	11	0,00	0,00	0,02	0,14	0,14	0,01	0,14	0,15	0,19	
2002	12	0,00	0,00	0,01	0,04	0,01	0,01	0,04	0,00	0,02	
2001	13	0,00	0,00	0,01	0,01	0,04	0,01	0,01	0,04	0,03	
2000	14	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	
1999	15	0,00	0,00	0,01	0,06	0,03	0,01	0,06	0,03	0,04	
1998	16	0,01	0,01	0,06	0,13	0,23	0,06	0,13	0,23	0,26	
1994	20	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	
1993	21	0,00	0,00	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	
1992	22	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	
1991	23	0,00	0,02	0,01	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	

Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle

Résumé : Les tanins condensés et les pigments polymérisés sont deux grandes familles de macromolécules qui jouent des rôles importants sur la qualité organoleptique du vin rouge. Leurs structures oligo-polymériques ainsi que leurs évolutions durant le vieillissement du vin rouge sont mal connues. L'objectif de cette étude est d'approfondir notre connaissance sur leurs structures et leurs évolutions durant le vieillissement.

Durant ce travail, nous avons caractérisé, pour la première fois dans le règne végétal, une nouvelle sous-famille de tanins condensés nommés : **les tanins condensés couronnes**, qui ont des propriétés spécifiques. Ils sont plus polaires que des tanins condensés de type B. Durant le vieillissement, les concentrations des tanins de type B diminuent alors que celles des tanins couronnes restent plutôt stables. Leurs concentrations sont plus élevées dans les vins issus de cépage Syrah que dans les vins issus de cépage Cabernet Sauvignon et Merlot. Au niveau sensoriel, une forte corrélation entre la concentration des tanins couronnes et l'intensité d'astringence ressentie par les dégustateurs a été montrée. Un premier test d'activité biologique du tétramère couronne montre une activité inhibitrice intéressante de l'agrégation du peptide β -amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer. En même temps, une nouvelle méthode de quantification des tanins condensés liés par pont éthylidène via un marqueur spécifique en utilisant une détection par fluorescence a été développée.

Concernant les pigments polymérisés avec différents types de liaisons inter-flavonoïdes, leurs mécanismes de dépolymérisation chimique en milieu acide ont été clarifiés et une méthode de quantification sur un système UPLC-Q-TOF a été développée. Les pigments oligo-/polymériques contribuent plus à la couleur du vin vieux que les pigments mono-/dimériques. La concentration des structures oligo-polymériques ayant des liaisons de type A est plus stable que celle des pigments polymérisés par des liaisons de type B ou par le pont éthylidène durant le vieillissement du vin. De plus, durant nos investigations sur les pigments polymérisés, les structures de type A-F(type A)-F(n) et de type F(n)-A-F(type A) ainsi que les formes acétylés d'anthocyane trimère et les formes acétylés des anthocyane dimères liées par pont éthylidène ont été montrées pour la première fois.

Mots clés : Vin rouge, Tanins condensés, Tanins condensés couronnes, Pigments polymérisés, Phloroglucinolyse, Q-TOF

Study of macromolecular composition of grape and wine: impact on sensorial quality

Abstract: Condensed tannins and polymeric pigments are two families of macromolecules which play important roles on the organoleptic quality of red wine. Their oligo-polymeric structures and their evolutions during red wine aging are poorly known. The objective of this study is to deepen our knowledge of their structures and their evolutions during red wine aging.

During our work, we characterized, for the first time in plant kingdom, a new family of condensed tannins named: **crown condensed tannins**, which have specific properties. They are more polar than B-type tannins. During red wine aging, the concentration of B-type tannins decreased while the crown tannins remained stable. Their concentrations are higher in Syrah wines than in wines made from Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. From a sensory point of view, a strong correlation between the concentration of crown tannins and the intensity of astringency rated by the tasters was obtained. The first biologic activity assay of the crown tetramer showed an interesting inhibitory activity on aggregation of β -amyloid peptide involved in Alzheimer's disease. At the same time, a new quantification method of ethylidene bridge linked condensed tannins via a specific marker using fluorescence detection has been developed.

Concerning polymeric pigments with different types of inter-flavonoids linkages, their acidic depolymerization mechanisms have been clarified for the first time and a quantification method using a UPLC-Q-TOF system has been developed. Oligo-/polymeric pigments contributed more to the color of old wine than mono-/dimeric pigments. The concentration of the pigmented oligo-polymers with A type linkages is more stable than that of polymeric pigments by B-type linkages or by ethylidene bridge during red wine aging. In addition, during our study of polymeric pigments, A-F(A type)-F(n) and F(n)-A-F(A type) structures as well as the acetylated form of trimeric anthocyanin and acetylated forms of dimeric anthocyanin linked by ethylidene bridge have been shown for the first time.

Keywords: Red wine, Condensed tannins, Crown condensed tannins, Polymeric pigments, Phloroglucinolysis, Q-TOF

Unité de recherche

Univ Bordeaux, ISVV, EA 4577 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France
INRA, ISVV, USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France