



HAL
open science

Recherches sur les déterminants moléculaires contribuant à l'équilibre gustatif des vins secs

Blandine Cretin

► **To cite this version:**

Blandine Cretin. Recherches sur les déterminants moléculaires contribuant à l'équilibre gustatif des vins secs. Alimentation et Nutrition. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0289 . tel-01699059

HAL Id: tel-01699059

<https://theses.hal.science/tel-01699059>

Submitted on 2 Feb 2018

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 OENOLOGIE

Par

Blandine CRETIN

Née le 13 novembre 1987 à Lagny-sur-Marne (77)

**RECHERCHES SUR LES DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES
CONTRIBUANT À L'ÉQUILIBRE GUSTATIF
DES VINS SECS**

Sous la direction de : Axel MARCHAL

Soutenue le 14 décembre 2016

Membres du jury :

M. Stéphane QUIDEAU, Professeur à l'Université de Bordeaux
Mme Véronique CHEYNIER, Directrice de recherche à l'INRA Montpellier
M. Luigi MOIO, Professeur à l'Université de Naples
Mme Valérie LAVIGNE, Chargée de recherche, Société Seguin Moreau
M. Christian ROLANDO, Directeur de recherche au CNRS Lille
M. Axel MARCHAL, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux
M. Philippe DARRIET, Professeur à l'Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Membre invité

Recherches sur les déterminants moléculaires contribuant à l'équilibre gustatif des vins secs

L'équilibre gustatif des vins secs repose notamment sur les saveurs amère et sucrée, dont les déterminants moléculaires n'ont été que partiellement élucidés. Un premier axe a consisté en l'étude de la contribution gustative des lignanes du chêne et neuf composés ont été observés pour la première fois dans le vin. Le (\pm)-lyonirésinol a été établi comme le plus amer et le plus abondant des lignanes isolés. Ses deux énantiomères ont été séparés, caractérisés par VCD et leur dégustation a révélé que seul le (+)-lyonirésinol possède une amertume modifiant le goût du vin. Dans un second axe, la saveur sucrée conférée par les raisins aux vins secs a été étudiée. Des expérimentations de vinification combinées à des outils sensoriels ont montré un gain de saveur sucrée au cours de la macération post-fermentaire à chaud et un effet des pépins de raisin sur le moelleux des vins secs. La mise en place d'un protocole de fractionnement d'extrait de pépins et de vin, par des techniques séparatives couplées à la gustatométrie, a permis la purification de six composés sapides. Plusieurs marqueurs de la sucrosité des vins secs ont ainsi été identifiés par FTMS et RMN : le mélange de deux nouvelles molécules, les acides 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside et 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside ; l'acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside et l'acide *epi*-DPA-3'-*O*- β -glucopyranoside, identifiés pour la première fois dans les vins, ainsi que l'ILA-Glc et l'astilbine. Ces nouveaux marqueurs ont été quantifiés dans les vins ainsi que dans les différentes parties de la baie pour préciser leur localisation et établir leur contribution gustative.

Mots clés : sucrosité, amertume, macération post-fermentaire à chaud, pépins de raisin, vinification, bois de chêne, lignanes

Research on taste active compounds responsible for wine taste balance

Dry wines taste balance is mainly based on bitter and sweet tastes, whose molecular determinants have been only partially explained. The first key objective was the study of the gustatory contribution of oak lignans. Nine compounds were identified in wines for the first time. (\pm)-lyoniresinol has been established as the bitterest and the most abundant of the isolated lignans. Its two enantiomers have been resolved, characterized by VCD and their tasting revealed that only (+)-lyoniresinol is bitter and modifies wine taste. In the second part of this work, the contribution of grapes to wine sweet taste has been studied. The combination between vinification experimentations and sensorial tools showed a gain of sweetness during a warm post-fermentative maceration as well as an influence of grape seeds on dry wine sweetness. A fractionation protocol of grape seeds macerates and wines has been established. Separation techniques coupled with gustatometry allowed the isolation of six taste active compounds. Several markers of dry wines sweetness have been identified by FTMS and NMR: the mix of two new compounds, 2-hydroxy-3-methylpentanoic-2-*O*- β -glucopyranoside and 2-hydroxy-4-methylpentanoic-2-*O*- β -glucopyranoside acids; gallic-4-*O*- β -glucopyranoside acid and *epi*-DPA-3'-*O*- β -glucopyranoside acid, identified for the first time in wines, ILA-Glc and astilbin. These new markers have been quantified in wines and in different parts of grape berry in order to refine their localization and to establish their gustatory contribution.

Keywords: sweetness, bitterness, warm post-fermentative maceration, grape seeds, vinification, oak wood, lignans

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à rendre hommage au Professeur Denis Dubourdiou, sans qui cette thèse n'aurait pu être réalisée. Son implication professionnelle et son soutien ont été décisifs pour le succès de mes travaux de thèse.

Monsieur Axel Marchal, Maître de conférences à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, m'a confié ce sujet de recherche passionnant. Je le remercie de la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce projet. Il m'a guidée et conseillée pendant ces trois années tout en me laissant une grande liberté et a ainsi su me pousser à donner le meilleur de moi-même. Ses connaissances et compétences, tant œnologiques que analytiques, ainsi que sa disponibilité ont été des éléments déterminants dans l'accomplissement de ce travail. Qu'il soit assuré de mon entière reconnaissance.

Monsieur Stéphane Quideau, Professeur à l'Institut Européen de Chimie et Biologie et l'Institut des Sciences Moléculaires de l'université de Bordeaux, m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je lui exprime ma plus grande gratitude.

Madame Véronique Cheynier, directrice de recherche à l'INRA de Montpellier, et Monsieur Luigi Moio, Professeur à l'université de Naples (Italie), ont accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. J'en suis très honorée et les remercie vivement.

Madame Valérie Lavigne, chercheuse détachée de la société Seguin Moreau, et Monsieur Christian Rolando, directeur de recherche du CNRS de Lille, ont accepté de participer à l'évaluation de ce travail de thèse en tant qu'examineur. Je les remercie vivement.

Monsieur Philippe Darriet, Directeur de l'Unité de Recherche Œnologie, m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie des membres du jury de ce travail. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de l'unité de recherche d'œnologie et de m'avoir encouragée tout au long de ce travail de thèse.

La fondation Jean Poupelain a permis le financement de cette thèse. Je remercie tous les membres de la fondation et tout particulièrement son président Monsieur Jack Drounau.

Je remercie également tous les partenaires financiers de ce travail, notamment FranceAgriMer, le Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux, la société Rémy Martin et la tonnellerie Seguin Moreau.

Le Professeur Jean-Michel Mérillon, m'a accueillie dans le laboratoire de l'axe Molécule d'Intérêt Biologique de l'ISVV. Je le remercie pour cette collaboration. Je remercie particulièrement le Professeur Pierre Waffo-Téguo avec qui nous avons réalisé les expérimentations de Résonance Magnétique Nucléaire. Je le remercie également pour sa disponibilité, ses encouragements et sa gentillesse. Je tiens également à remercier le Docteur Grégory Da Costa et Eric Pedro pour leur aide.

Le Docteur Thierry Buffeteau et le Docteur Nicolas Daugey, de l'Institut des Sciences Moléculaires de l'université de Bordeaux, ont permis la réalisation d'expérimentations de

Dichroïsme Circulaire Vibrationnel. Je les remercie pour leur collaboration, leurs nombreuses explications sur cette technique ainsi que pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Le Docteur Virginie Moine, directrice scientifique de BioLaffort, et le Docteur Néréa Iturmendi m'ont apporté leur aide et leur expertise au cours des expérimentations au chai et ont réalisé de nombreuses analyses indispensables à ce travail. Je les remercie vivement pour leur implication, pour leur soutien et leur gentillesse.

Je tiens également à remercier les domaines Denis Dubourdiou et le Château Haut Bailly pour nous avoir permis de réaliser et de mener à bien les expérimentations au chai.

Je remercie également Monsieur Christophe Ollivier et tout particulièrement Madame Valérie Lavigne pour leur implication au cours des nombreuses dégustations réalisées au laboratoire. J'ai été extrêmement sensible à leurs encouragements et leur gentillesse.

Le Professeur Laurence GénY et le Docteur Amélie Rabot m'ont apporté leur aide et leurs connaissances en physiologie de la vigne et en biochimie du raisin. Je les remercie vivement.

Le Docteur Marion Favier et le Docteur Philippe Marullo m'ont apporté leur aide en microbiologie du vin. Je leur exprime tout ma gratitude.

Je tiens à remercier le hall technologique de l'ISVV, en particulier Sandra Vanbrabant et Robin Rabagliato pour leur aide technique au cours de mes expériences de microvinifications, mais également pour leur bonne humeur et leur amitié.

Je tiens également à exprimer ma plus profonde reconnaissance à Pascaline Redon et Gérard Fondeville, techniciens de recherche à l'ISVV, pour avoir toujours répondu présent lorsque j'ai dû faire face à certains problèmes techniques, et ce, toujours avec un grand sourire.

Le Docteur Sophie Tempère, Maître de Conférences, et Elodie Guittard m'ont apporté leur aide précieuse sur les différentes techniques d'analyse sensorielle mais également dans la mise en place de celles-ci. Je les remercie vivement pour leur aide ainsi que pour leurs encouragements et leur amitié.

Je n'oublie pas les dégustateurs, indispensables à la réalisation des études sensorielles, et les remercie pour le temps qu'ils m'ont accordé.

Je remercie également chaleureusement tous les membres de l'ISVV qu'ils soient permanents ou de passage et que j'ai eu beaucoup de plaisir à côtoyer pendant ces trois années.

Lauriane Sindt, Quentin Sallembien, Xiaotong Yao, Chloé Papin, Justine Laboyrie, Valentin Pothier et Florian Pillier se sont investis dans l'avancement de mes travaux en y consacrant plus ou moins de temps dans leurs études. Ces échanges m'ont beaucoup apportés et je leur en suis extrêmement reconnaissante.

Je tiens à présent à remercier ces personnes qui ont rendu ces trois années plus légères.

Je pense tout d'abord à tous les membres du laboratoire, qui ont partagé mon quotidien de thésarde et qui m'ont encouragée et soutenue d'une certaine manière. Merci à Jacques, Xavier, Rakusa, Lémia, Cécile et Alexandre. Merci à Pascaline pour ton naturel et ta gentillesse. Merci à Takis d'avoir partagé ton bureau et d'avoir supporté malgré toi de nombreuses discussions de filles...

Merci également à Isa, Julien, Reyes, Wen, Kleo, Alex, Liming, Zuri, Adeline, Alicia, Léa et Amélie pour avoir partagé tous ces bons moments au quotidien avec moi. Merci pour votre bonne humeur, nos discussions pendant nos nombreuses pauses déjeuner et surtout pour votre soutien indispensable pendant ces trois années. Merci également à Marie, Rémy et Alice pour votre amitié, votre bonne humeur et votre soutien.

Un immense merci à Lucile qui a partagé ces trois années avec moi. Merci pour ton soutien et ton écoute. Merci pour toutes ces soirées à refaire le monde avec un verre de vin ! Et que serait ces soirées sans nos acolytes Caroline, Claire, Vincent et Lauriane ?! Merci à vous d'avoir embelli ces trois années.

Un grand merci à Nicolas, Delphine, Ariane, Fannie et Marine pour votre aide indispensable et votre soutien durant ces deux dernières années. Merci pour tous les bons moments passés ensemble. Un merci tout particulier à Delphine. Merci pour ton écoute et ton réconfort. Je te passe le relai et te souhaite tout le meilleur pour la suite !

Marie, Benoit et Sylvestre, la team coloc, sans oublier Pierre et Fabrice, je les remercie chaleureusement pour les nombreuses parties de rigolades, les diners et les week ends « ski et chutes » passés ensemble.

Leatitia et Florent, votre amitié et votre soutien ainsi que ces trois derniers mois passés ensemble ont été indispensables à la bonne réussite de ce travail. Un énorme merci à tous les deux !

Je souhaite également remercier tous mes amis parisiens, lillois et angevins m'ayant soutenu pendant ces trois années.

Mes remerciements ne seraient pas complets sans exprimer toute ma reconnaissance à mes parents et mon frère pour leur soutien inconditionnel et pour m'avoir permis d'aboutir à la réussite de ce travail.

Je tiens également à remercier mes beaux-parents et ma belle famille pour leur soutien, leur gentillesse et à leur intérêt porté à mon travail.

Enfin, merci Benoît, ces trois années de thèse n'auraient définitivement pas été les mêmes sans ton amour, ton amitié, ton soutien, ta patience et ton réconfort.

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS.....	i
LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ANNEXES.....	xi
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....	4
I. Diversité structurale des composés à saveur amère	4
II. Diversité structurale des composés à saveur sucrée.....	6
III. Les récepteurs du goût.....	8
A. Récepteurs au goût sucré	9
B. Récepteurs à l'amertume	10
IV. Les approches variées de l'étude du goût du vin.....	11
PARTIE EXPÉRIMENTALE GÉNÉRALE.....	13
I. Dispositifs expérimentaux et techniques utilisées.....	13
A. Caractéristiques des solvants utilisés.....	13
B. Techniques analytiques de fractionnement et de purification	13
1. Extraction liquide/liquide (L/L)	13
2. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).....	14
a) <i>Principe</i>	14
b) <i>Avantages et limites de la technique</i>	16
c) <i>Appareillage</i>	17
3. Extraction sur phase solide (SPE).....	17
4. Chromatographie Flash.....	18
a) <i>Principe</i>	18
b) <i>Appareillage</i>	18
5. Chromatographie Liquide à Haute Performance à l'échelle semi-préparative (HPLC-semi-préparative).....	18
a) <i>Principe</i>	18
b) <i>Appareillage</i>	19
C. Techniques analytiques d'identification	19
1. Spectrométrie de Masse à Transformée de Fourier-Orbitrap.....	19
a) <i>Principe de l'Orbitrap</i>	19

b) Système Exactive™ (Thermo Fischer Scientific)	21
c) Appareillage U-HPLC-FTMS	22
2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	22
a) Principe général.....	22
(1) Expériences monodimensionnelles (¹ H, ¹³ C).....	23
(2) Expériences bidimensionnelles (¹ H- ¹ H, ¹ H- ¹³ C).....	23
b) Appareillage.....	24
3. Polarimétrie.....	24
a) Principe.....	24
b) Appareillage.....	25
4. Dichroïsme Circulaire Vibrationnel (VCD).....	25
a) Principe.....	25
b) Appareillage.....	26
II. Techniques d'analyse sensorielle	26
A. Conditions de la dégustation.....	26
B. Tests d'analyse sensorielle et traitements statistiques utilisés pour leur interprétation.....	26
1. Test de classement par rangs.....	26
2. Test triangulaire	27
3. Profil sensoriel conventionnel.....	28

PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES LIGNANES DU BOIS DE CHÊNE AU GOÛT DU VIN.....30

CHAPITRE 1 - ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES PROPRIÉTÉS GUSTATIVES DE L'ÉTHANOL EN VUE DU CHOIX D'UNE MATRICE DE DÉGUSTATION31

I. Impact de l'éthanol sur les qualités organoleptiques des vins secs : état de l'art.....	31
II. Étude de l'impact de l'éthanol sur la perception amère d'un vin blanc sec.....	32
A. Conditions d'organisation des séances d'analyse sensorielle.....	32
B. Entraînement et validation du panel de dégustateurs	33
1. Matériel et méthodes.....	33
a) Première session d'entraînement	33
b) Deuxième session d'entraînement	33
2. Résultats.....	34
C. Mise en place de l'essai sensoriel.....	34
1. Matériel et méthodes.....	34
2. Résultats.....	36
3. Discussion.....	37

CHAPITRE 2 - ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LES COMPOSÉS DU BOIS DE CHÊNE INFLUENÇANT LES PROPRIÉTÉS SENSORIELLES DU VIN.....38

I. Influence de l'élevage sous bois de chêne sur la couleur des vins rouges.....	38
--	----

II.	Influence de l'élevage sous bois de chêne sur l'arôme des vins	39
III.	Influence de l'élevage sous bois de chêne sur l'astringence des vins	39
IV.	Influence de l'élevage sous bois de chêne sur le goût des vins.....	41
A.	Effet sur la sucrosité	41
B.	Effet sur l'amertume	41

CHAPITRE 3 - ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ CHIMIQUE DES LIGNANES DU BOIS DE CHÊNE ET ÉTUDE DE LEURS PROPRIÉTÉS SENSORIELLES.....43

I.	Recherche de lignanes par criblage LC-FTMS du bois de chêne	43
A.	Matériel et méthodes	43
B.	Résultats et discussion	45
II.	Purification des composés cibles du bois de chêne	47
A.	Matériel et méthodes	47
1.	Extraction liquide/liquide.....	47
2.	Chromatographie de Partage Centrifuge.....	48
3.	Chromatographie sur phase solide (SPE).....	52
4.	HPLC semi-préparative	52
B.	Résultats et discussion	53
III.	Identification structurale des composés 1 à 9.....	57
A.	Matériel et méthodes	57
1.	Fragmentation en cellule de collision	57
2.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	57
3.	Polarimétrie.....	57
B.	Résultats.....	57
IV.	Caractérisation sensorielle des lignanes identifiés et criblage dans un vin blanc sec ...	61
A.	Matériel et méthodes	61
1.	Analyses sensorielles	61
2.	Criblage LC-FTMS des lignanes 1 à 9 dans un vin blanc boisé.....	61
B.	Résultats.....	61
1.	Caractérisation sensorielle des lignanes du bois de chêne.....	61
2.	Criblage LC-FTMS des lignanes 1 à 9 dans un vin blanc sec boisé.....	62
C.	Discussion.....	64

CHAPITRE 4 - ÉTUDE STRUCTURALE ET SENSORIELLE DES STÉRÉOISOMÈRES DU LYONIRÉSINOL.....66

I.	Étude des diastéréoisomères du lyonirésinol dans le bois de chêne et les vins boisés.....	66
A.	Mise en évidence et purification d'un diastéréoisomère du lyonirésinol	67
1.	Matériel et méthodes	67
a)	Criblage par LC-FTMS.....	67
b)	Purification.....	67
2.	Résultats et discussion	67

B.	Analyses structurale et sensorielle du diastéréoisomère du lyonirésinol	69
1.	Matériel et méthodes	69
a)	<i>Caractérisation structurale</i>	69
b)	<i>Caractérisation sensorielle</i>	70
2.	Résultats et discussion	70
II.	Étude des énantiomères du lyonirésinol	73
A.	Résolution chirale des énantiomères du lyonirésinol	73
1.	Description de la stratégie employée	73
2.	Matériel et méthodes	74
a)	<i>Conditions de l'hydrolyse</i>	74
b)	<i>Purification par HPLC semi-préparative</i>	74
3.	Résultats et discussion	74
B.	Détermination de la configuration absolue des énantiomères du lyonirésinol	76
1.	Matériel et méthodes	76
	<i>Calculs de chimie quantique : Théorie de la Fonctionnelle Densité (DFT)</i>	76
2.	Résultats et discussion	77
C.	Caractérisation sensorielle des énantiomères du lyonirésinol	79
1.	Matériel et méthodes	79
a)	<i>Analyse sensorielle</i>	79
b)	<i>Détermination du seuil de détection du (+)-lyonirésinol</i>	79
2.	Résultats et discussion	80
III.	Quantification du (+)-lyonirésinol dans les vins et les eaux-de-vie ; étude de l'influence des paramètres de tonnellerie	81
A.	Développement d'une méthode de dosage des énantiomères du lyonirésinol	81
1.	Principe de la méthode	81
2.	Méthodologie	82
a)	<i>Préparation des échantillons</i>	82
(1)	Préparation d'échantillons pour la quantification du (\pm)-lyonirésinol	82
(2)	Préparation d'échantillons pour la détermination du rapport énantiomérique	82
b)	<i>Préparation des solutions de calibration</i>	82
c)	<i>Analyse en LC-FTMS et traitement des résultats</i>	83
3.	Validation de la méthode de quantification sur colonne C18	83
a)	<i>Sensibilité</i>	83
b)	<i>Linéarité</i>	85
c)	<i>Répétabilité</i>	85
d)	<i>Justesse</i>	85
e)	<i>Spécificité</i>	85
4.	Validation de la méthode de détermination du rapport énantiomérique sur colonne chirale	86
a)	<i>Conditions chromatographiques et spectrométriques</i>	86
b)	<i>Validation de la méthode de détermination du rapport énantiomérique sur colonne chirale</i>	87
(1)	Reproductibilité de la SPE	87
(2)	Préservation du rapport énantiomérique lors de la SPE	88
(3)	Répétabilité	88
(4)	Spécificité	88

B.	Dosage des énantiomères du lyonirésinol dans les vins	89
1.	Origine des vins analysés	89
2.	Résultats du dosage du (+)-lyonirésinol dans les vins	90
3.	Discussion	91
C.	Dosage des énantiomères du lyonirésinol dans des eaux-de-vie	92
1.	Nature et origine des eaux-de-vie analysées	92
2.	Résultats du dosage du (+)-lyonirésinol dans les eaux-de-vie et discussion	92
D.	Dosage des énantiomères du lyonirésinol dans des macérats de bois de chêne	93
1.	Nature et origine des macérats de bois analysés	93
2.	Résultats du dosage du (+)-lyonirésinol dans les macérats de bois et discussion	94
a)	<i>Influence des espèces de chêne</i>	94
b)	<i>Influence de la température de chauffe</i>	95

DEUXIÈME PARTIE : INFLUENCE SENSORIELLE DE LA CUIVISON DES VINS ROUGES SUR LEUR ÉQUILIBRE GUSTATIF.....99

CHAPITRE 5 - ÉTUDE DE L'EFFET DE LA MACÉRATION POST-FERMENTAIRE À CHAUD SUR LE GOÛT DES VINS ROUGES.....100

I.	Étude bibliographique de l'effet de la macération post-fermentaire à chaud (MPFC) sur la qualité du vin	101
A.	Principe et rôle de la MPFC	101
B.	Phénomènes physiques associés à la macération	101
C.	Phénomènes chimiques et sensoriels observés pendant la MPFC et décrits dans la littérature	102
D.	Effets des principaux paramètres de la MPFC sur la composition du vin.....	103
1.	Influence du temps de macération	103
2.	Influence de la température.....	105
3.	Pigeage et Remontage.....	105
II.	Matériel et méthodes des expérimentations de MPFC.....	106
1.	Mise en place des essais.....	106
a)	<i>Expérimentation 1</i>	106
(1)	Origine et caractéristiques des raisins utilisés	106
(2)	Caractéristiques des millésimes 2014 et 2015 à Bordeaux.....	106
(3)	Protocole de vinification mis en place au chai	108
(4)	Expériences d'autolyse des levures au laboratoire	108
b)	<i>Expérimentation 2</i>	110
(1)	Origine et caractéristiques des raisins utilisés	110
(2)	Protocole de vinification.....	110
(3)	Modalités étudiées	111
2.	Mise en place des analyses chimiques et sensorielles.....	112
a)	<i>Analyse des caractéristiques chimiques de base</i>	112
b)	<i>Indice des Polyphénols Totaux (IPT)</i>	113
c)	<i>Dosage des mannoprotéines libérées par les levures dans le vin rouge</i>	113

d) Analyses sensorielles et traitements statistiques	113
(1) Expérimentation 1	113
(2) Expérimentation 2	114
(3) Traitements statistiques	114
III. Mise en évidence de la contribution sensorielle de la MPFC	115
A. Étude de l'apport gustatif de la MPFC : résultats de l'expérimentation 1	115
1. Analyses chimiques des vins après six mois d'élevage	115
2. Effet de la MPFC sur le goût du vin	116
3. Discussion	119
B. Étude de la contribution de l'autolyse des levures au gain de douceur observé lors de la MPFC	119
1. Réalisation de l'autolyse des levures au laboratoire dans la modalité FA.....	119
2. Vérification du déroulement de l'autolyse des levures dans les modalités MPF et FA+L	120
3. Comparaison sensorielle des modalités MPF et FA+L.....	120
C. Discussion.....	122
IV. Étude de l'effet de la durée de MPFC sur le goût ; cas d'une propriété de Pessac-Léognan dans le millésime 2015	123
A. Résultats de l'expérimentation 2	123
1. Analyses chimiques des vins après FML.....	123
2. Analyses sensorielles	124
B. Discussion.....	129
CHAPITRE 6 - ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES PÉPINS A LA SUCROSITÉ DES VINS ROUGES.....	131
I. Étude bibliographique de l'apport du pépin à la qualité organoleptique du vin	131
A. Le pépin de raisin	131
1. Morphologie.....	131
2. Physiologie.....	132
3. Composition biochimique	133
4. Localisation tissulaire des composés majoritaires	135
B. Facteurs influençant la composition et la qualité organoleptique du vin	136
1. Niveau de maturité des pépins	136
2. Terroir et cépage	136
3. Extractibilité des composés phénoliques du pépin	137
C. Apport organoleptique du pépin au vin	138
II. Étude de l'apport gustatif des pépins lors de la cuvaison.....	139
A. Matériel et méthodes	139
1. Mise en place des essais de microvinification	139
a) Origine des raisins utilisés	139
b) Caractéristiques du millésime 2014	139
c) Protocole de vinification	140
2. Mise en place des analyses chimiques et sensorielles.....	142

B.	Résultats.....	142
1.	Suivi de la vinification et analyses chimiques des vins après FML.....	142
2.	Comparaison sensorielle des modalités T et E	143
C.	Discussion.....	146

TROISIÈME PARTIE : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE COMPOSÉS DU RAISIN POSSÉDANT UNE ACTIVITÉ GUSTATIVE.....148

CHAPITRE 7 - EXTRACTION ET IDENTIFICATION DE COMPOSÉS SAPIDES DU PÉPIN149

I.	Développement d'une technique d'extraction des composés du pépin.....	149
A.	Sélection de la matière première	149
B.	Protocole d'extraction des pépins.....	149
C.	Détermination des conditions d'extraction des composés du pépin.....	150
II.	Mise en place d'un protocole de fractionnement de l'extrait de pépins guidé par la gustatométrie	150
A.	Présentation de la stratégie mise en œuvre	150
1.	Principe	150
2.	Suivi du fractionnement de l'extrait de pépins	151
3.	Organisation des dégustations des fractions	152
B.	Extractions liquide/liquide.....	153
1.	Choix des solvants et mise en œuvre	153
2.	Résultats.....	154
a)	<i>Extractions liquide/liquide</i>	154
b)	<i>Dégustation</i>	155
3.	Discussion.....	155
C.	Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge-Gustatométrie (CPC-G) 156	
1.	Matériel et méthodes.....	156
a)	<i>Choix du système de CPC</i>	156
b)	<i>Déroulement des expériences de CPC</i>	157
2.	Résultats du fractionnement par CPC-Gustatométrie	159
3.	Discussion	161
D.	Purification par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) semi-préparative	162
1.	Matériel et méthodes.....	162
2.	Résultats.....	163
a)	<i>Résultats des purifications</i>	163
b)	<i>Résultats de la dégustation</i>	164
3.	Discussion	165
E.	Optimisation des méthodes de fractionnement en vue de la purification des composés de la fraction F3 et F9.....	166

1.	Stratégie	166
2.	Optimisation des étapes de fractionnement et de purification	167
a)	<i>Extraction liquide/liquide de l'extrait de pépins</i>	167
b)	<i>Optimisation du fractionnement par CPC</i>	167
c)	<i>Optimisation de la purification par HPLC semi-préparative</i>	168
III.	Caractérisation structurale et sensorielle des composés purifiés	170
A.	Détermination des caractéristiques gustatives des composés purifiés.....	170
B.	Caractérisation structurale des composés purifiés	171
1.	Identification des composés <i>m/z</i> 293-1 et -2	172
2.	Identification du composé <i>m/z</i> 331	177
3.	Identification du composé <i>m/z</i> 347	179
4.	Identification du composé <i>m/z</i> 366	179
5.	Identification du composé <i>m/z</i> 443	181
6.	Identification du composé <i>m/z</i> 521	183
IV.	Validation de la méthode de fractionnement et des choix de fractions d'intérêt	185
A.	Validation du choix de l'extrait ϕ -aqueuse	185
1.	Stratégie	185
a)	<i>Matériel et méthodes</i>	186
b)	<i>Résultats des fractionnements et des dégustations</i>	186
2.	Discussion	188
B.	Fractionnement de l'extrait ϕ -aqueuse par chromatographie Flash-Gustatométrie	189
1.	Stratégie	189
2.	Matériel et méthodes	189
3.	Résultats et discussion	190

CHAPITRE 8 - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE COMPOSÉS SAPIDES DU VIN APRÈS MPFC.....193

I.	Description de la stratégie employée	193
A.	Principe	193
B.	Nature et origine des vins utilisés.....	193
C.	Contraintes lors du fractionnement d'un vin	193
D.	Organisation des dégustations des fractions	194
II.	Mise en place d'un protocole de fractionnement et de purification de vin	194
A.	Extractions du vin sur phase solide (SPE).....	194
1.	Matériel et méthodes	194
2.	Résultats	195
3.	Discussion	197
B.	Étude de la fraction SPE-F1/F2	198
1.	Fractionnement par CPC	199
a)	<i>Matériel et méthodes</i>	199
b)	<i>Résultats</i>	199
c)	<i>Discussion</i>	200
2.	Purification des fractions SPE-F1/F2-CPC-F ₈ par HPLC semi-préparative.....	200

a) Matériel et méthodes	200
b) Résultats	201
3. Identification des composés purifiés	202
C. Étude de la fraction SPE-F3	204
1. Purification par HPLC semi-préparative	204
a) Matériel et méthodes	204
b) Résultats	205
2. Identification du composé purifié	205
D. Étude de la fraction SPE-F5	205
1. Fractionnement par CPC	205
a) Matériel et méthodes	205
b) Résultats	206
c) Discussion	207
2. Étude de la fraction SPE-F5-CPC-F ₈	208
a) Matériel et méthodes	208
b) Résultats	208
3. Purification du composé de masse nominale m/z 449	209
a) Criblage LC-FTMS	209
b) Purification de l'extrait SPE-F6 par HPLC semi-préparative	209
(1) Matériel et méthodes	209
(2) Résultats	210
c) Caractérisations structurale et sensorielle du composé m/z 449-1	210

CHAPITRE 9 - QUANTIFICATION DES PRINCIPAUX COMPOSÉS IDENTIFIÉS DANS LA BAIE DE RAISIN ET LES VINS

I. Développement d'une méthode de quantification des composés identifiés	215
A. Méthodologie	215
1. Composés quantifiés	215
2. Préparation des échantillons et des solutions de calibration	216
3. Conditions chromatographiques et spectrométriques	216
4. Traitement des résultats	218
5. Validation de la méthode de quantification	219
a) Sensibilité	219
b) Linéarité	220
c) Répétabilité	220
d) Justesse	220
e) Spécificité	221
II. Application de la méthode à l'analyse des composés identifiés dans la baie de raisin ..	223
A. Origine et préparation des macérats de raisins analysés	224
B. Résultats et discussion	224
III. Application de la méthode à l'analyse des vins	228
A. Origine des vins analysés	228
B. Quantification des composés purifiés dans les vins commerciaux	229
1. Résultats du dosage de l'AG-Glc (m/z 331)	229

2.	Résultats du dosage des isomères H3MP-Glc* (m/z 293-1) et H4MP-Glc* (m/z 293-2)	229
3.	Résultats du dosage de l'ILA-Glc (m/z 366).....	230
4.	Résultats du dosage de l' <i>epi</i> -DPA-Glc (m/z 443)	230
5.	Résultats du dosage de l'astilbine (m/z 449-1)	231
C.	Quantification des composés purifiés dans les vins issus des expérimentations.....	231
D.	Discussion.....	232
CONCLUSION GÉNÉRALE.....		236
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		240
VALORISATION SCIENTIFIQUE.....		266
ANNEXES.....		267

ABRÉVIATIONS

^1H	Proton
^{13}C	Carbone 13
$[\alpha]^D$	Pouvoir rotatoire spécifique (en degré Celsius)
μg , mg, g	Microgramme, milligramme, gramme
μL , mL, L	Microlitre, millilitre, litre
m/z	Rapport masse/charge
ppm	Partie par million
CV	Coefficient de Variation
IDL	Limite de Détection Instrumentale
IQL	Limite de Quantification Instrumentale
LOD	Limite de Détection
LOQ	Limite de Quantification

Solvants

AcOET	Acétate d'éthyle
BuOH	<i>n</i> -Butanol
BuOHsat	<i>n</i> -Butanol saturé en eau
EtOH	Ethanol
H ₂ O	Eau
HCOOH	Acide formique
Hept	<i>n</i> -Heptane
iPrOH	Iso-propanol
MeOH	Méthanol
TFA	Acide trifluoro-acétique

Techniques analytiques

C18	Silice à polarité de phase inversée (greffé C18)
CID	Dissociation induite par collision
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
CPC-G	Chromatographie de partage centrifuge couplée à la gustatométrie
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière

ESI	Ionisation par électro-nébulisation
HCD	Dissociation induite par collision de haute énergie
HRMS	Spectrométrie de Masse à Haute Résolution
Kd	Coefficient de partage
L/L	Extraction liquide/liquide
HPLC ou LC	Chromatographie liquide à haute performance
CSP	Phase stationnaire chirale
RMN 1D et 2D	Résonance magnétique nucléaire mono- et bi-dimensionnelle
ROESY	Spectroscopie de l'effet Overhauser tournant-Frame
TIC	Chromatogramme des ions totaux en LC-FTMS
U-HPLC-FTMS	Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse à Transformée de Fourier
UV	Ultraviolet
VCD	Dichroïsme circulaire vibrationnel
XIC	Chromatogramme des ions extraits en LC-FTMS

Nomenclature

SPE-F5-CPC-F₂_FA : Cette abréviation désigne la fraction **F₂** obtenue après une expérience de **CPC** réalisée par injection de la fraction **F5** issue d'une première séparation par **SPE** de la modalité **FA**.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structures chimiques de quelques composés amers.....	5
Figure 2. Structures chimiques de quelques composés sucrés.	7
Figure 3. Description de l'appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge et schématisation de son fonctionnement (d'après Kromaton, Annonay, France et Armen Instrument, Saint Avé, France).....	15
Figure 4. Schématisation des deux modes d'introduction des solvants dans la colonne (d'après Toribio, 2007).	15
Figure 5. Vue externe d'un analyseur Orbitrap (à gauche) et coupe schématique d'un analyseur Orbitrap (à droite), décrivant le mouvement des ions autour de l'électrode centrale (d'après Hu et al., 2005).....	20
Figure 6. Présentation schématique de la géométrie du spectromètre de masse Exactive™ (d'après Wiegand <i>et al.</i> , 2006).....	21
Figure 7. Intensité des modalités et appartenance aux groupes « a » et « b ».....	36
Figure 8. Quelques composés d'impact extraits du bois de chêne.	40
Figure 9. Structures théoriques de lignanes dérivés du lyonirésinol et masses des ions moléculaires recherchées par LC-FTMS dans l'extrait de bois de chêne.	46
Figure 10. XIC en ionisation négative correspondant aux ions $[M-H]^-$ des composés 1 à 9 (de haut en bas) dans un extrait de bois de chêne ($m/z \pm 5$ ppm).	47
Figure 11. TIC en ionisation négative des extraits AcOEt (à gauche) et BuOH (à droite).	54
Figure 12. Chromatogrammes UV à 280 nm des extraits AcOEt-3 et -4 et BuOH-3 _{SPE} et -4 _{SPE} en HPLC semi-préparative.	56
Figure 13. Structure chimique des lignanes 1 à 9.....	60
Figure 14. XIC en ionisation négative du lyonirésinol et des lignanes 1 à 9 dans un extrait de bois de chêne (à gauche) et dans un vin blanc sec (à droite).....	63
Figure 15. Teneurs du lyonirésinol et des lignanes 1 à 9 exprimées en équivalent de lyonirésinol dans un extrait de bois de chêne et dans un vin blanc sec.....	64
Figure 16. XIC en ionisation négative d'un extrait de bois de chêne correspondant à l'ion $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm).	68
Figure 17. Structures chimiques du lyonirésinol et de l' <i>epi</i> -lyonirésinol 10 (configurations relatives).....	71
Figure 18. XIC en ionisation négative de l' <i>epi</i> -lyonirésinol 10, correspondant à l'ion $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm), sur colonne chirale.....	71
Figure 19. TIC en ionisation négative d'un vin rouge boisé et XIC en ionisation négative correspondant à l'ion déprotoné $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm).	72
Figure 20. Structures chimiques des énantiomères du lyonirésinol a et b.....	73
Figure 21. Hydrolyse acide du lyoniside 3 et du nudiposide 4 et libération des énantiomères du lyonirésinol a et b.	75
Figure 22. XIC en ionisation négative du (\pm)-lyonirésinol, du lyonirésinol a et du lyonirésinol b , correspondant à l'ion déprotoné $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm), sur colonne chirale.	76

Figure 23. Comparaison des spectres VCD expérimentaux du (+)-lyonirésinol a et (-)-lyonirésinol b avec le spectre VCD calculé pour l'isomère (8 <i>R</i> , 8' <i>R</i> , 7' <i>S</i>)-lyonirésinol.	78
Figure 24. Conformations des molécules du (8 <i>R</i> , 8' <i>R</i> , 7' <i>S</i>)-(+)-lyonirésinol 1a représentant 50 % des conformations les plus stables prises en compte dans le calcul du spectre théorique. ...	79
Figure 25. XIC en ionisation négative correspondant à l'ion déprotoné C ₂₂ H ₂₇ O ₈ ⁻ (<i>m/z</i> 419,1712, précision à 5 ppm) de l'échantillon EDV-8, sur colonne chirale.	87
Figure 26. TIC et XIC en ionisation négative correspondant à l'ion déprotoné C ₂₂ H ₂₇ O ₈ ⁻ (<i>m/z</i> 419,1712 ; précision à 5 ppm) de l'échantillon EDV-8.	89
Figure 27. Variations des concentrations en (+)-lyonirésinol et en (-)-lyonirésinol dans différents millésimes du Médoc (1911 à 2004) A et de Graves (1998 à 2006) B. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.	90
Figure 28. Variations des concentrations en énantiomères du lyonirésinol dans les eaux-de-vie élevées en barriques pendant 4, 6, 10 et 20 ans. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.	93
Figure 29. Concentrations en (+)-lyonirésinol et en (-)-lyonirésinol pour les échantillons de bois des espèces sessile et pédonculé. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.	95
Figure 30. Variations des concentrations en (+)-lyonirésinol et en (-)-lyonirésinol à différentes températures de chauffe (de 140 °C à 250 °C). Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.	96
Figure 31. Concentrations en (+)-lyonirésinol et en (-)-lyonirésinol d'échantillons provenant des faces interne (chauffée) et externe (non chauffée) de douelles de bois de chêne. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.	97
Figure 32. Protocole de vinification de l'expérimentation 1.	109
Figure 33. Protocole de vinification de l'expérimentation 2.	112
Figure 34. Schéma de la face ventrale a et dorsale b d'un pépin de raisin à maturité. Coupe centrale transversale c et longitudinale d (Ristic <i>et al.</i> , 2005).	132
Figure 35. Squelettes des structures chimiques des acides phénoliques (a), des flavan-3-ols (b) et des tanins condensés (exemple d'un dimère de type B) (c).	134
Figure 36. Protocole mis en place pour les microvinifications du millésime 2014.	141
Figure 37. Schéma du protocole d'extractions L/L appliquées à l'extrait brut de pépins.	153
Figure 38. TIC en ionisation négative des extraits pré-purifiés de pépins.	154
Figure 39. Fractionnement de l'extrait φ-aqueuse par CPC-G et HPLC semi-préparative... ..	158
Figure 40. Profil chromatographique UV de la CPC-1.	159
Figure 41. Profil chromatographique UV de la CPC-2.	160
Figure 42. TIC en ionisation négative des fractions F3, F4, F8 et F9 de la CPC-2 (gradient LC : A).	162
Figure 43. TIC en ionisation négative de la fraction Elution-F9 après purification par HPLC semi-préparative (gradient LC : B).	166
Figure 44. TIC en ionisation négative des isomères <i>m/z</i> 293-1 (a) et <i>m/z</i> 293-2 (b) et de leur spectre FTMS (b).	173
Figure 45. Structure chimique de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- <i>O</i> -β-glucopyranoside (H3MP-Glc) (a) et acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- <i>O</i> -β-glucopyranoside (H4MP-Glc) (b).	175

Figure 46. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 331 (a) et de son spectre FTMS (b).	178
Figure 47. Structure moléculaire de l'acide gallique-4- O - β -glucopyranoside.	178
Figure 48. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 366 (a) et de son spectre FTMS (b).	180
Figure 49. Structure chimique de l'acide 3-indolyl-(2 <i>R</i>)- O - β -D-glucopyranoside lactique.	180
Figure 50. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 443 (a) et de son spectre FTMS (b).	181
Figure 51. Structure chimique de l'acide (1' <i>R</i> , 3' <i>R</i> , 5' <i>R</i> , 8' <i>S</i>)- <i>epi</i> -dihydrophaséique-3'- O - β -glucopyranoside.	182
Figure 52. Corrélations observées sur le spectre ROESY ^1H - ^1H de l'acide (1' <i>R</i> , 3' <i>R</i> , 5' <i>R</i> , 8' <i>S</i>)- <i>epi</i> -dihydrophaséique-3'- O - β -glucopyranoside.	182
Figure 53. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 521 (a) et de son spectre FTMS (b).	184
Figure 54. Structure chimique de l'isolaricirésinol-4'- O - β -glucopyranoside.	184
Figure 55. Chromatogrammes des CPC-3, -4 et -5 (absorbance à 280 nm).	187
Figure 56. Fractionnement d'un vin de la modalité MPF par SPE, CPC-G et HPLC semi-préparative (Le même fractionnement a également été réalisé sur un vin de la modalité FA).	196
Figure 57. TIC en ionisation négative des fractions sucrées (SPE-F1, -F2, -F3 et -F5) obtenues après SPE pour la modalité FA (à gauche) et pour la modalité MPF (à droite).	198
Figure 58. TIC en ionisation négative de la fraction SPE-F1/F2-CPC-F ₈ (chromatogrammes identiques pour les modalités FA et MPF).	200
Figure 59. TIC en ionisation négative des composés purifiés m/z 443 A (a) et m/z 401-1, -2 et -3 B (a)-1, -2 et -3 et leur spectre FTMS A (b) et B (b).	202
Figure 60. Structures moléculaires du benzyl 6'- O - α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside (a), du benzyl 6'- O - α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside (b) et du benzyl 6'- O - α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside (c).	203
Figure 61. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 366 (a) et de son spectre FTMS (b).	205
Figure 62. TIC en ionisation négative de la fraction SPE-F5-CPC-F ₈	207
Figure 63. TIC en ionisation négative de la fraction SPE-F5-CPC-F ₂	207
Figure 64. Haut : TIC de la fraction SPE-F6. Bas : XIC en ionisation négative de l'ion quasi-moléculaire m/z 449,1091 (± 5 ppm) (les chromatogrammes sont identiques pour les modalités FA et MPF).	209
Figure 65. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 449-1 (a) et de son spectre FTMS (b).	210
Figure 66. Structure chimique de l'astilbine (configuration relative).	211
Figure 67. Structures moléculaires des diastéréoisomères de l'astilbine.	213
Figure 68. TIC et XIC des ions quasi-moléculaires des composés m/z 331, 366, 443 et 449-1 (de haut en bas), en ionisation négative, dans un échantillon de vin rouge et dans les macérats de pépins, de pulpe, de pellicules et de rafles (de gauche à droite).	222
Figure 69. Concentrations totales des composés sucrés dans les macérations, exprimées en $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de grappe (pellicules, pépins, pulpe et rafles).	225

Figure 70. Localisation des composés sucrés dans les parties de la grappe de raisin (pellicules, pépins, pulpe, rafles), exprimée en pourcentage.	226
Figure 71. Concentrations totales des composés sucrés dans les macérations, exprimées en $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de grappe (pellicules, pépins, pulpe).	227
Figure 72. Localisation des composés dans les différentes parties de la grappe de raisin (pellicules, pépins, pulpe), exprimée en pourcentage.	228
Figure 73. Comparaison des proportions relatives des composés d'intérêt dans le raisin et dans les vins rouges.	232

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Seuils de détection de quelques composés amers.	6
Tableau 2. Type de récepteurs associé à chaque goût.	9
Tableau 3. Modalités des solutions présentées lors de la première session d'entraînement. ..	33
Tableau 4. Modalités des solutions présentées lors de la seconde session d'entraînement.	33
Tableau 5. Résultats de l'évaluation du panel à l'amertume interprétés par le test de Page.	34
Tableau 6. Caractéristiques analytiques des vins de base utilisés pour l'analyse sensorielle (mesures réalisées à l'OenoFoss TM).	34
Tableau 7. Titre alcoométrique volumique du rétentat et du distillat du <i>Vin 1</i> et du <i>Vin 2</i>	35
Tableau 8. Modalités (M) de la session d'analyse sensorielle.	35
Tableau 9. Conditions chromatographiques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne. ...	44
Tableau 10. Conditions spectrométriques et d'ionisations utilisées pour le criblage de l'extrait de bois de chêne.	44
Tableau 11. Systèmes testés de la gamme Arizona et Arizona modifiée et coefficients de partage des composés 1, 2 et 8.	49
Tableau 12. Systèmes testés de type « pont » et coefficients de partage des composés 3, 4, 5, 6, 7 et 9.	50
Tableau 13. Méthode d'analyse <i>I</i> utilisée en CPC pour les extraits pré-purifiés AcOEt et BuOH.	51
Tableau 14. Gradient d'élution des SPE réalisées sur les fractions BuOH-3 et -4 avant purification.	52
Tableau 15. Gradients utilisés en HPLC semi-préparative pour la purification des composés cibles.	53
Tableau 16. Fractions d'intérêt après CPC des extraits pré-purifiés AcOEt et BuOH.	54
Tableau 17. Enrichissement des fractions par SPE avant purification.	55
Tableau 18. Masses obtenues des composés 1 à 9.	56
Tableau 19. Fragmentation HCD (30 eV) et pouvoir rotatoire spécifique des composés 1 à 9.	60
Tableau 20. Caractérisation sensorielle des lignanes 1 à 10.	62
Tableau 21. Gradient <i>I</i> utilisé en HPLC semi-préparative pour la purification du diastéréoisomère du lyonirésinol.	67
Tableau 22. Conditions chromatographiques pour les analyses analytiques sur colonne chirale.	69
Tableau 23. Conditions spectrométriques pour les analyses sur colonne chirale.	70
Tableau 24. Paramètres de validation de la méthode de quantification du (\pm)-lyonirésinol dans le bois de chêne et les eaux-de-vie.	84
Tableau 25. Présence du (+)-lyonirésinol et du (-)-lyonirésinol dans 59 vins rouges et 10 vins blancs.	91
Tableau 26. Caractéristiques des parcelles sélectionnées pour l'expérimentation 1.	106
Tableau 27. Caractéristiques des parcelles sélectionnées pour l'expérience 2.	110
Tableau 28. Plan d'analyses sensorielles mis en place pour l'expérimentation 1.	114
Tableau 29. Plan d'analyses sensorielles mis en place pour l'expérimentation 2.	114

Tableau 30. Analyses chimiques des vins des séries M1, M2, M3, CS1, CS2 et CS3 de l'expérimentation 1 après 6 mois d'élevage.....	116
Tableau 31. Résultats des tests triangulaires de l'expérimentation 1 ; étude de l'effet de la MPFC sur le goût du vin.	117
Tableau 32. Résultats des profils sensoriels de l'expérimentation 1 ; étude de l'effet de la MPFC sur le goût du vin.	118
Tableau 33. Résultats des tests triangulaires de l'expérimentation 1 ; Étude de la contribution de l'autolyse des levures au gain de douceur observé lors de la MPFC.	121
Tableau 34. Résultats des profils sensoriels de l'expérimentation 1 ; Étude de la contribution de l'autolyse des levures au gain de douceur observé lors de la MPFC	121
Tableau 35. Analyses chimiques des vins des séries M4, M5, CS4 et CS5 de l'expérimentation 2 après FML.....	124
Tableau 36. Résultats des profils sensoriels de l'expérimentation 2, <i>Jour 1</i>	127
Tableau 37. Résultats des profils sensoriels de l'expérimentation 2, <i>Jour 2 et 3</i>	128
Tableau 38. Composition biochimique des pépins en pourcentage de poids frais (Cabanis <i>et al.</i> , 1998).	133
Tableau 39. Concentrations en composés phénoliques reportées par Fuleki <i>et al.</i> dans des pépins à maturité de plusieurs cépages (Fuleki <i>et al.</i> , 1997).....	135
Tableau 40. Analyses chimiques des vins après FML des microvinifications 2014.	143
Tableau 41. Résultats des tests triangulaires des microvinifications 2014.	144
Tableau 42. Résultats des profils sensoriels des microvinifications 2014.	145
Tableau 43. Conditions chromatographiques utilisées au cours du fractionnement des extraits de pépins.....	151
Tableau 44. Conditions spectrométriques et d'ionisations utilisées au cours du fractionnement des extraits de pépins.....	152
Tableau 45. Extraits obtenus après extraction L/L de l'extrait brut de pépins ; quantités extraites pour une macération de 70 g de pépins dans un litre de solution hydro-éthanolique.	155
Tableau 46. Systèmes testés pour le fractionnement par CPC de l'extrait pré-purifiés ϕ -aqueuse.	157
Tableau 47. Méthodes d'analyse 2 et 3 du fractionnement par CPC.	157
Tableau 48. Gustatogramme de la CPC-2. Les fractions retenues pour la suite du fractionnement sont indiquées en caractères gras.	161
Tableau 49. Gradients utilisés pour la purification par HPLC semi-préparative des composés présents dans les fractions F3, F4, F8 et F9.	163
Tableau 50. Purifications des fractions F3, F4, F8 et F9 par HPLC semi-préparative.	164
Tableau 51. Résultats de la dégustation après purification par HPLC semi-préparative.....	165
Tableau 52. Masses précises m/z des ions quasi-moléculaires $[M-H]^+$ des composés d'intérêt (précision à ± 5 ppm).....	166
Tableau 53. Systèmes de CPC sélectionnés pour la purification des composés cibles.....	168
Tableau 54. Spécificité des colonnes à disposition au laboratoire pour l'optimisation des méthodes en HPLC semi-préparative.....	169
Tableau 55. Masses totales des composés purifiés.	170
Tableau 56. Caractéristiques gustatives des composés d'intérêt.	170

Tableau 57. Données FTMS et pouvoir rotatoire des composés purifiés à partir de l'extrait de pépins.	172
Tableau 58. Données RMN ¹ H et ¹³ C du composé <i>m/z</i> 293-1, l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- <i>O</i> -β-glucopyranoside (H3MP-Glc).	175
Tableau 59. Données RMN ¹ H et ¹³ C du composé <i>m/z</i> 293-2, l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- <i>O</i> -β-glucopyranoside (H4MP-Glc).	176
Tableau 60. Méthode d'analyse 4 utilisée pour le fractionnement par CPC des extraits φ-Hept, φ-AcOEt, et φ-BuOHsat.	186
Tableau 61. Résultats des fractionnements et gustatogrammes des CPC-3, -4 et -5.	188
Tableau 62. Méthode de chromatographie Flash utilisée pour le fractionnement de l'extrait aqueuse de pépins.	190
Tableau 63. Gustatogramme de la chromatographie Flash.	191
Tableau 64. Méthode d'élution du fractionnement comparatif des modalités FA et MPF du vin M2 par SPE.	195
Tableau 65. Gustatogramme du fractionnement par SPE des modalités FA et MPF de la série M2.	197
Tableau 66. Gustatogramme du fractionnement de l'extrait SPE-F1/F2-CPC_FA.	199
Tableau 67. Gradient d'élution utilisé pour la purification des fractions SPE-F1/F2-CPC-F ₈ par HPLC semi-préparative.	201
Tableau 68. Composés purifiés par HPLC semi-préparative à partir des fractions SPE-F1/F2-CPC-F ₈ (modalités FA et MPF).	201
Tableau 69. Gradient d'élution utilisé pour la purification de la fraction SPE-F3 de la modalité FA par HPLC semi-préparative.	205
Tableau 70. Gustatogramme de la fraction SPE-F5_FA après CPC.	206
Tableau 71. Gustatogramme du fractionnement de l'extrait SPE-F5-CPC-F ₈ (modalité FA) par CPC.	208
Tableau 72. Gradient d'élution utilisé pour la purification des fractions SPE-F6 des modalités FA et MPF par HPLC semi-préparative.	210
Tableau 73. Résultats de la dégustation des composés astilbine et <i>epi</i> -DPA-Glc.	212
Tableau 74. Conditions chromatographiques utilisées pour la quantification des composés d'intérêt.	217
Tableau 75. Conditions d'ionisation et paramètres spectrométriques utilisées pour la quantification des composés d'intérêt.	218
Tableau 76. Caractéristiques des ions utilisés pour la quantification des composés d'intérêt.	219
Tableau 77. Paramètres de validation de la sensibilité de la méthode de quantification pour les quatre composés d'intérêt, dans les vins et le raisin.	220
Tableau 78. Paramètres de validation de la méthode de quantification des composés d'intérêt dans les vins et dans les macérats des parties du raisin (linéarité, spécificité, répétabilité et justesse).	223
Tableau 79. Masses d'extrait sec des différentes parties de la grappe après lyophilisation.	224
Tableau 80. Concentrations en AG-Glc dans des vins rouges commerciaux (μg/L).	229
Tableau 81. Concentrations en H3MP-Glc et H4MP-Glc dans des vins rouges et blancs commerciaux.	229

Tableau 82. Concentrations en ILA-Glc dans des vins rouges et blancs commerciaux (mg/L).	230
Tableau 83. Concentrations en <i>epi</i> -DPA-Glc dans des vins rouges et blancs commerciaux (mg/L).	231
Tableau 84. Concentrations en astilbine dans les vins rouges et blancs commerciaux (mg/L).	231
Tableau 85. Concentrations des composés sucrés dans les vins issus des expérimentations de microvinification de la partie II.	231

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1-A : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des lignanes non glycosylés, **lyonirésinol, 1, 2, 9 et 10.**

ANNEXE 1-B : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des lignanes glycosylés **3, 4, 5, 6, 7 et 9.**

ANNEXE 2-A : Spectres ^1H de l'*épi*-lyonirésinol **10 (A)**, lyonirésinol **(B)**, et des énantiomères **a (C)** et **b (D)** du lyonirésinol dans CD_3OD à 300°K .

ANNEXE 2-B : Spectres ^1H - ^1H ROESY du lyonirésinol dans CD_3OD .

ANNEXE 2-C : Spectres ^1H - ^1H ROESY de l'*épi*-lyonirésinol **10** dans CD_3OD .

ANNEXE 3 : Récapitulatif des résultats des calculs d'optimisation des 28 conformations les plus stables.

ANNEXE 4 : Données brutes de quantification du (\pm)-lyonirésinol et de ses énantiomères (+)-lyonirésinol et (-)-lyonirésinol dans les vins et eaux-de-vie.

ANNEXE 5 : Exemple d'une fiche d'analyse sensorielle ; test triangulaire et profil sensoriel.

ANNEXE 6-A : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 293-1, acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside dans D_2O .

ANNEXE 6-B : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 293-2, acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside dans D_2O .

ANNEXE 6-C : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 331, acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside dans D_2O .

ANNEXE 6-D : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 366, acide 3-indolyl-(2*R*)-*O*- β -D-glycoside lactique dans CD_3OD .

ANNEXE 6-E : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 443, acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséïque-3'-*O*- β -glucopyranoside dans CD_3OD .

ANNEXE 6-F : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 521, (\pm)-isolaricirésinol 4'-*O*- β -glucopyranoside dans CD_3OD .

ANNEXE 6-G : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 401-1 benzyl 6'-*O*- α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside dans CD_3OD .

ANNEXE 6-H : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 401-2, benzyl 6'-*O*- α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside dans CD_3OD .

ANNEXE 6-I : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 401-3, benzyl 6'-*O*- α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside dans CD_3OD .

ANNEXE 6-J : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 449, astilbine ou (2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside dans CD_3OD .

ANNEXE 7-A : Spectre ^1H de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .

ANNEXE 7-B : Spectre ^1H - ^1H COSY de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .

ANNEXE 7-C : Spectre ^1H - ^1H ROESY de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .

ANNEXE 7-D : Spectre ^1H - ^{13}C HSQC de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .

ANNEXE 7-E : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .

ANNEXE 8-A : Spectre ^1H de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .

ANNEXE 8-B : Spectre ^1H - ^1H COSY de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .

ANNEXE 8-C : Spectre ^1H - ^1H ROESY de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .

ANNEXE 8-D : Spectre ^1H - ^{13}C HSQC de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .

ANNEXE 8-E : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .

ANNEXE 9-A : Spectre ^1H de l'acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside (m/z 331) dans D_2O

ANNEXE 9-B : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside (m/z 331) dans D_2O .

ANNEXE 10-A : Spectre ^1H de l'acide 3-indolyl-(2*R*)-*O*- β -D-glucopyranoside lactique (m/z 366) dans CD_3OD .

ANNEXE 10-B : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide 3-indolyl-(2*R*)-*O*- β -D-glucopyranoside lactique (m/z 366) dans CD_3OD .

ANNEXE 11-A : Spectre ^1H de l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 443) dans CD_3OD .

ANNEXE 11-B : Spectre ^1H - ^1H ROESY de l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 443) dans CD_3OD .

ANNEXE 11-C : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 443) dans CD_3OD .

ANNEXE 12-A : Spectre ^1H de l'isolaricirésinol-4'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 521) dans CD_3OD .

ANNEXE 12-B : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'isolaricirésinol-4'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 521) dans CD_3OD .

ANNEXE 13-A : Spectre ^1H du benzyl 6'-*O*- α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-1) dans CD_3OD .

ANNEXE 13-B : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC du benzyl 6'-*O*- α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-1) dans CD_3OD .

ANNEXE 14-A : Spectre ^1H du benzyl 6'-*O*- α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-2) dans CD_3OD .

ANNEXE 14-B : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC du benzyl 6'-*O*- α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-2) dans CD_3OD .

ANNEXE 15-A : Spectre ^1H du benzyl 6'-*O*- α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-3) dans CD_3OD .

ANNEXE 15-B : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC du benzyl 6'-*O*- α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-3) dans CD_3OD .

ANNEXE 16-A : Spectre ^1H de l'astilbine, (2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -*L*-rhamnopyranoside (m/z 449-1) dans CD_3OD .

ANNEXE 16-B : Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'astilbine, (2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -*L*-rhamnopyranoside (m/z 449-1) dans CD_3OD .

ANNEXE 17-A : Concentration des composés sucrés dans les macérations de chaque partie de la grappe de raisin, exprimées en $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de la grappe ($\pm \sigma$).

ANNEXE 17-B : Localisation des composés identifiés dans les différentes parties de la grappe de raisin (pellicules, pépins, pulpe, rafles), exprimée en pourcentage de la masse totale extraite pour chaque composé.

ANNEXE 17-C : Concentrations de composés sucrés en $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de grappe ($\pm \sigma$).

ANNEXE 17-D : Localisation des composés identifiés dans les différentes parties de la grappe de raisin (pellicules, pépins, pulpe), exprimée en pourcentage.

ANNEXE 18 : Données brutes de quantification de l'H3MP-Glc (m/z 293-1), l'H4MP-Glc (m/z 293-2), l'AG-Glc (m/z 331), l'ILA-Glc (m/z 366), l'épi-DPA-Glc (m/z 443), et de l'astilbine (m/z 449-1), dans les vins et les macérats de rafles, pellicules, pulpes et pépins.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La qualité sensorielle d'un vin est fortement reliée à la composition du raisin et elle est révélée grâce au savoir-faire des vinificateurs. La recherche œnologique porte sur l'étude de l'élaboration, de la composition et de la dégustation des vins. Elle vise à comprendre les mécanismes chimiques et biologiques impliqués dans la transformation du raisin, afin de donner aux vinificateurs les moyens de maîtriser l'élaboration de vins de qualité.

Depuis de nombreuses années, les recherches sur les arômes ont conduit à la caractérisation moléculaire de composés volatils appartenant à des familles chimiques très diverses et intervenant dans la qualité comme dans les défauts des vins (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Les composés non-volatils ont également été l'objet de nombreuses études afin de préciser leur rôle dans la perception des sensations tactiles ainsi que des saveurs.

En effet, la qualité d'un vin repose non seulement sur son profil aromatique mais également sur son équilibre gustatif. Ce dernier s'articule autour des saveurs acide, amère et sucrée (Peynaud, 1981) et sa perception peut être modulée, dans le cas des vins rouges, par la structure tannique. De nombreuses études ont en effet permis de caractériser les molécules responsables de la sensation d'astringence ainsi que les mécanismes impliqués (Sarni-Manchado *et al.*, 1999 ; Simon *et al.*, 2003 ; Cheynier *et al.*, 2006 ; Rinaldi *et al.*, 2012). Par ailleurs, le rôle des principaux acides organiques du vin (tartrique, malique et lactique) dans la perception de l'acidité a été clairement établi depuis longtemps (Peynaud, 1971 ; Belitz *et al.*, 2009). L'amertume des vins rouges peut quant à elle être en partie expliquée par certains polyphénols du raisin (Peleg *et al.*, 1999 ; Brossaud *et al.*, 2001 ; Hufnagel *et al.*, 2008a) et ellagitanins du bois de chêne (Glabasnia *et al.*, 2006). Plus récemment, l'amertume du lyonirésinol, un lignane libéré lors de l'élevage sous bois, a également été révélée (Marchal *et al.*, 2015a). Enfin, la saveur sucrée des vins secs - ou « sucrosité » - demeure le goût le moins expliqué au niveau moléculaire, en dépit de sa contribution majeure à la complexité des grands vins.

Dans les vins moelleux et liquoreux, la saveur sucrée est directement liée à la présence de sucres résiduels, alors que dans les vins secs, ces sucres sont présents à des concentrations bien inférieures à leur seuil de détection. Ainsi, la saveur sucrée perçue provient de composés non-volatils autres que des hydrates de carbone ; on parle alors de « sucrosité sans sucre » ou de douceur. Récemment, plusieurs déterminants moléculaires de cette douceur ont été caractérisés. En particulier, le gain de saveur sucrée observé lors de l'autolyse des levures

Saccharomyces cerevisiae a été attribué à la protéine Hsp12, libérée dans le vin après l'achèvement de la fermentation alcoolique (Marchal *et al.*, 2011a). Par ailleurs, l'identification de nouveaux composés sucrés du bois de chêne, les Quercotriterpénosides, a permis d'interpréter l'effet édulcorant de l'élevage en barriques (Marchal *et al.*, 2011b ; Marchal *et al.*, 2013). Cependant, des différences de saveur sucrée sont parfois perçues en fonction des terroirs et des cépages, à techniques de vinification et d'élevage identiques. Ces observations suggèrent la présence, dans les vins secs, de composés non-volatils à saveur sucrée provenant du raisin. Empiriquement, certains vinificateurs observent un accroissement de la « sucrosité » du vin pendant la macération post-fermentaire à chaud. Au cours de cette étape consistant à prolonger la cuvaison pendant une dizaine de jours après la fin de la fermentation alcoolique, le vin est maintenu au contact du marc de raisin. La libération de molécules édulcorantes par les parties solides du raisin (pellicules et pépins) peut donc être envisagée. Par ailleurs, des écrits anciens relatent l'effet bénéfique de la cuvaison d'un vin lorsque celui-ci macère avec les parties solides (pellicules et pépins) et suggèrent le rôle des pépins dans la douceur des vins (Pacottet, 1908 ; Peynaud, 1981).

L'objectif de ce travail est d'améliorer la connaissance des molécules sapides du vin ainsi que des conditions influençant leurs teneurs. En utilisant conjointement des techniques d'analyses chimique et sensorielle, il s'articule autour de deux grands axes de recherche, liés par leur contribution antagoniste à l'équilibre des saveurs.

La première partie s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés antérieurement au laboratoire sur l'influence gustative du bois de chêne. En particulier, le rôle des lignanes du chêne dans l'amertume des vins est étudié, en recherchant des dérivés du lyonirésinol par une démarche de criblage ciblé d'un extrait de chêne. L'influence de la stéréochimie du lyonirésinol sur son goût est également observée et donne lieu à un développement analytique pouvant être adapté à d'autres molécules chirales naturelles possédant une activité gustative.

Le second axe du travail, plus prospectif, est consacré à la saveur sucrée des vins secs conférée par le raisin, de la démonstration de sa réalité sensorielle à la recherche de ses déterminants moléculaires. Dans la deuxième partie de cette thèse, une approche sensorielle est en effet utilisée afin d'étudier les effets de la macération post-fermentaire à chaud sur le goût du vin et ainsi de confirmer les observations empiriques décrites précédemment. L'influence gustative de la cuvaison en présence de pépins est également précisée par la mise en place d'expérimentations de microvinifications réalisées au laboratoire.

Enfin, la troisième partie de ce travail présente le développement d'une démarche inductive de fractionnements de macérats de pépins et de vin, guidée par la dégustation afin

d'isoler des composés à saveur sucrée provenant du raisin. L'élucidation structurale et la caractérisation sensorielle des composés purifiés sont détaillées, ainsi que leur quantification dans les raisins et les vins.

Si les deux axes de cette thèse traitent de matrices et de composés différents, l'approche mise en œuvre est similaire et utilise les mêmes techniques séparatives (extraction sur phase solide, chromatographie de partage centrifuge, HPLC semi-préparative) et spectroscopiques (FTMS, RMN, polarimétrie). Le principe général et la description des équipements utilisés sont donc détaillés dans une partie expérimentale générale. En revanche, par souci de cohérence dans la présentation de la démarche employée, les méthodes développées et les conditions de chaque expérience sont décrites dans les parties dédiées à leur utilisation, avant la présentation des résultats.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

Le goût est le facteur prédominant influençant le choix des aliments (Scott, 2005). L'homme peut percevoir et discriminer cinq saveurs : salé, acide, amer, sucré et umami (Y.-P. Zhang *et al.*, 2003 ; Upadhyaya *et al.*, 2010). Cette perception des saveurs a été un élément clé de sa survie. En effet, si la saveur sucrée est associée à une nourriture riche en nutriments et au goût agréable (Schlienger *et al.*, 2014), les composés fortement amers ou acides sont souvent signes de toxicité ou de poison pour l'organisme (Chandrashekar *et al.*, 2000 ; Y.-P. Zhang *et al.*, 2003). La perception amère est donc un véritable rempart contre l'ingestion de molécules toxiques ou dangereuses pour l'organisme (Adler *et al.*, 2000 ; Lindemann, 2001 ; Scott, 2005 ; Mueller *et al.*, 2007). Même si certains processus de transformation alimentaire cherchent à éliminer les composés amers (Sun-Waterhouse *et al.*, 2013), ces derniers sont tout de même nécessaires à l'équilibre gustatif des aliments comme des boissons, et leur appréciation implique un apprentissage.

La connaissance de la diversité moléculaire des composés du goût, de leurs interactions et, plus récemment, des mécanismes de transduction de leurs récepteurs jusqu'au cerveau, ainsi que des différences de perception et de sensibilité inter-individuelles liées à la génétique de l'homme, permettent de rendre compte de la complexité de la réalité sensorielle.

I. Diversité structurale des composés à saveur amère

Les molécules amères reportées jusqu'à présent appartiennent à des familles chimiques très diverses (**Figure 1**). Parmi celles-ci se trouvent les acides aminés (**A**) et les peptides (Desportes *et al.*, 2001 ; Temussi, 2006), les lactones et les terpènes (**B-C**) (Brockhoff *et al.*, 2007), les phénols et les polyphénols (**D**) (Laaksonen *et al.*, 2010 ; Marchal *et al.*, 2015a) dont les flavonoïdes (**E**) (Rouseff *et al.*, 1987 ; Dea *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2014), et les alcaloïdes (**F-G**) (Matissek, 1997 ; Bonvehí *et al.*, 2000).

Plusieurs travaux ont décrit la caractérisation des composés responsables de l'amertume dans de nombreux aliments comme le citron (Dea *et al.*, 2013), la carotte (Czepa *et al.*, 2003 ; Schmiech *et al.*, 2008), l'olive (Kiritsakis, 1998 ; Soler-Rivas *et al.*, 2000 ; Gutierrez-Rosales *et al.*, 2003 ; Mateos *et al.*, 2004), la poudre de cacao (Bonvehí *et al.*, 2000 ; Stark *et al.*, 2006), l'asperge (Dawid *et al.*, 2012) ou encore le chocolat (Matissek, 1997). L'origine moléculaire de l'amertume a également été étudiée dans les boissons telles que le thé et le café (Drewnowski, 2001 ; Scharbert *et al.*, 2004b ; Scharbert *et al.*, 2005), la bière (Haseleu *et al.*, 2010; Intelmann *et al.*, 2009), le cidre (Lea and Arnold, 1978) et le vin

(Thorngate, 1992 ; Peleg *et al.*, 1999 ; Hufnagel *et al.*, 2008a ; Rudnitskaya *et al.*, 2010). Le nombre de composés amers connus à ce jour est estimé à plusieurs centaines (Wiener *et al.*, 2012).

Au-delà des molécules amères d'origine naturelle, certains composés sont obtenus par synthèse, tels que le benzoate de dénatonium **H** (Saroli, 1985) ou encore par réactions de Maillard entre des hydrates de carbone et des acides aminés lors du chauffage des aliments. C'est le cas du quinizolate **I** (O. Frank *et al.*, 2001).

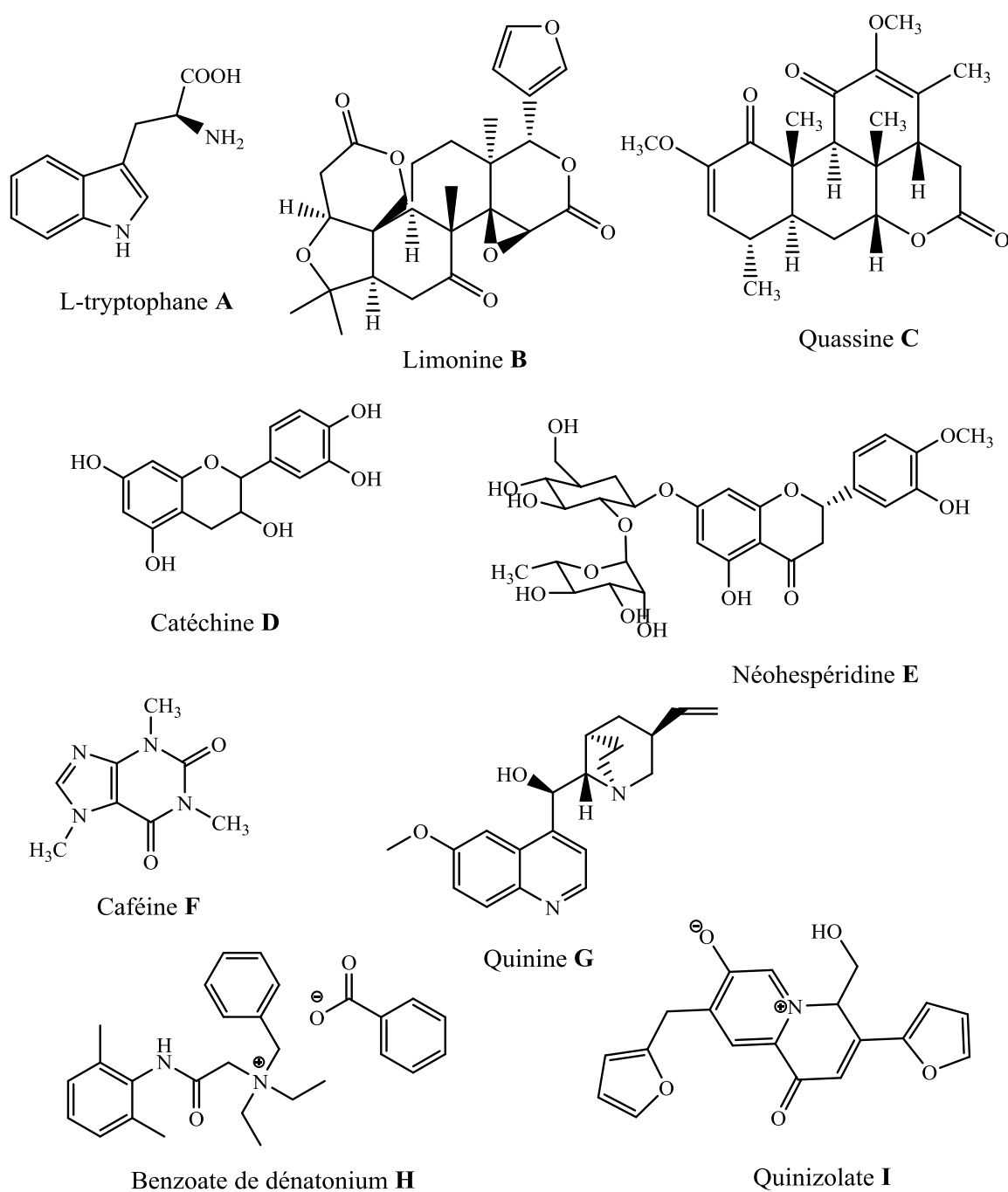


Figure 1. Structures chimiques de quelques composés amers.

Les propriétés amères de ces composés varient fortement en fonction de leur nature chimique, et certains possèdent un seuil de détection particulièrement bas pour des substances non-volatiles, de l'ordre de quelques dizaines ou centaines de µg/L comme le benzoate de dénatonium **H** (Saroli, 1985), le quinizolate **I** (O. Frank *et al.*, 2001) ou encore la quassine **C**, qui à ce jour, est le composé naturel le plus amer connu (Scragg *et al.*, 1994) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Seuils de détection de quelques composés amers.

Composé	Seuil de détection (en µg/L dans l'eau)
Quassine C	60 ^d
Caféine F	97 095 ^b
Quinine G	8 110,4 ^a
Benzoate de dénatonium H	8,9 ^c
Quinizolate I	84,3 ^b

^a (Drewnowski *et al.*, 2000) ^b (O. Frank *et al.*, 2001)
^c (Saroli, 1985) ^d (Scragg *et al.*, 1994)

La perception de l'amertume est dépendante du patrimoine génétique des individus. Des grandes différences de perception au propylthiouracil (PROP) et au phénylthiocarbamide (PTC) entre les individus ont été mises en évidence dans plusieurs travaux (Bauer *et al.*, 2010). Ces composés sont perçus comme intensément amers par certaines personnes alors que d'autres n'y sont pas sensibles. Ces observations ont mené les chercheurs à étudier la génétique de la perception du goût et à identifier les gènes codant pour les récepteurs à l'amertume, situés sur 3 chromosomes chez l'homme (Adler *et al.*, 2000 ; Matsunami *et al.*, 2000 ; P. Shi *et al.*, 2003b). La variabilité des allèles pour chaque gène codant pour un récepteur de l'amertume est responsable des différences de perception que l'on constate d'un individu à l'autre (Adler *et al.*, 2000 ; Chandrashekar *et al.*, 2000). Ce polymorphisme est souvent héréditaire et spécifique à chaque composé (Reed *et al.*, 2006).

II. Diversité structurale des composés à saveur sucrée

Les molécules développant un goût sucré présentent également une grande diversité de structures (**Figure 2**). Les plus connues d'entre elles sont les hydrates de carbone **J** (Lindemann, 2001). Parmi les autres composés non-volatils à saveur sucrée, qualifiés d'édulcorants, on trouve notamment des polyols **K** (Hufnagel *et al.*, 2008b), des acides aminés **L** (Hufnagel *et al.*, 2008b ; Sáenz-Navajas *et al.*, 2012), des protéines (Gibbs *et al.*,

1996 ; Assadi-Porter *et al.*, 2000), des glycosides de diterpènes **M** (Geuns, 2003 ; Mogra *et al.*, 2009) ou bien encore des composés phénoliques, dont des flavonoïdes **N-O** (Zehnter *et al.*, 1995 ; Kinghorn *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2016) et des proanthocyanidines **P** (Baek *et al.*, 1993). Certains de ces composés édulcorants sont obtenus exclusivement par synthèse chimique, comme l'aspartame, tandis que d'autres sont naturellement présents dans les plantes, comme les steviosides.

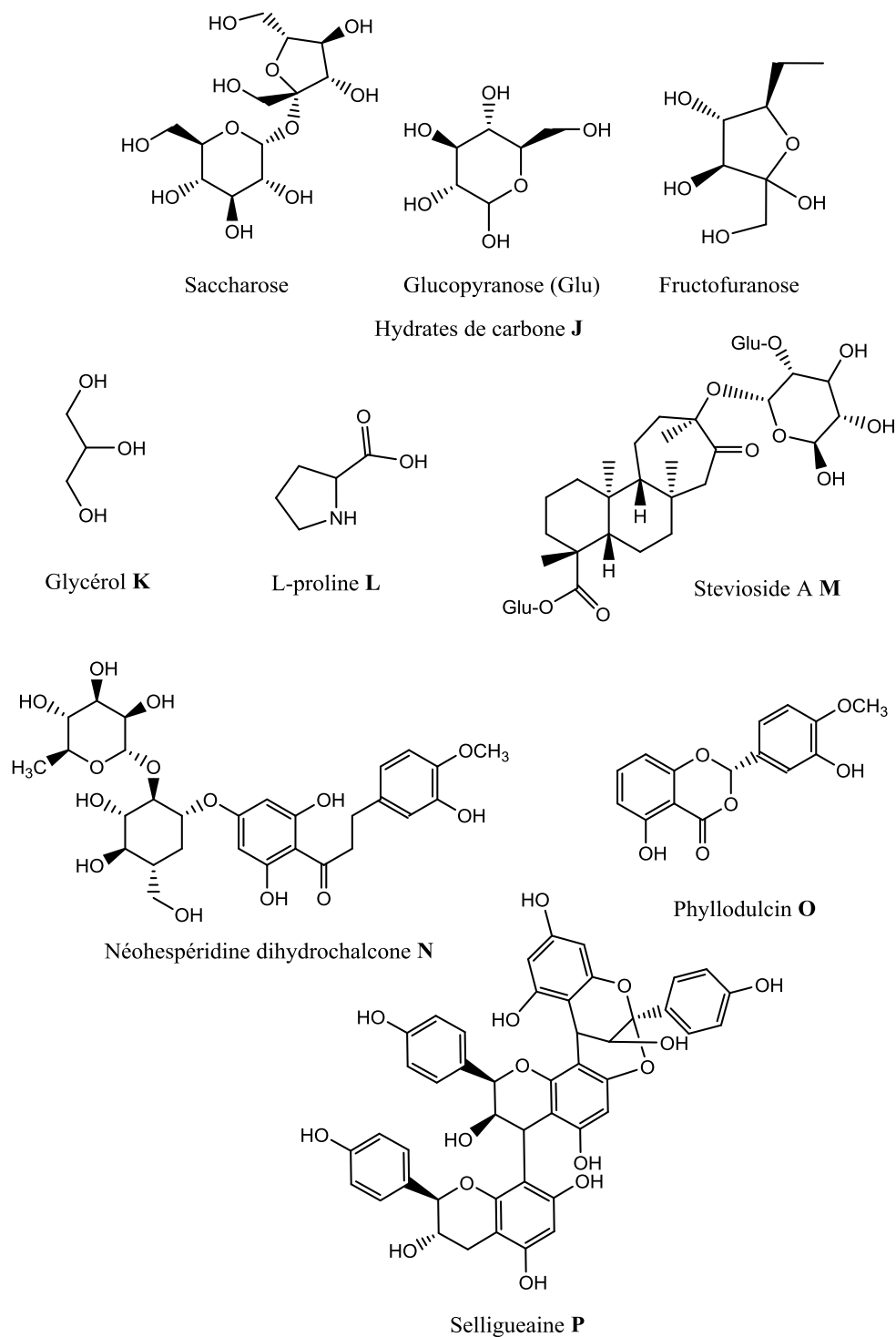


Figure 2. Structures chimiques de quelques composés sucrés.

La perception de la saveur sucrée est aussi très largement influencée par le patrimoine génétique de chaque individu. Le polymorphisme des allèles codant pour les récepteurs contribue à leur variabilité mais agit également sur la modification des mécanismes de transduction des signaux (Reed *et al.*, 2006 ; Bachmanov *et al.*, 2011).

Le goût est par ailleurs modulé par certains composés qui ne présentent pas nécessairement une saveur particulière mais peuvent interagir avec les récepteurs et d'autres composés sapides. C'est le cas de certaines protéines comme la miraculine, qui, en se fixant sur les récepteurs du sucré et en interagissant avec des acides, confèrent une saveur sucrée à tous les aliments consommés (Gibbs *et al.*, 1996). Plus récemment, l'activité d'un des énantiomères de l'alapyridaine, issus des réactions de Maillard, a été mise en évidence. Seule sa forme dextrogyre provoque une perception sucrée alors que la (-)-alapyridaine ne possède pas cette activité (Ottinger *et al.*, 2003). Il existe également des composés qui permettent la suppression de l'arrière-goût amer non désiré d'édulcorants commerciaux. C'est le cas du cyclamate qui élimine l'arrière-goût métallique et amer de la saccharine (Wiet *et al.*, 1992 ; DuBois *et al.*, 2012).

Par ailleurs, bien que certaines études montrent des liens entre la structure et le goût des molécules (Esaki *et al.*, 1979 ; Saroli, 1986, 1987 ; Shin *et al.*, 1995 ; Bufe *et al.*, 2002 ; Roland *et al.*, 2013), ces relations demeurent complexes et un changement structural peut induire une grande modification du goût. En effet, on peut citer l'exemple de la naringine, une flavanone néohespéridoside, et de la néohespéridine **D** qui présentent une forte amertume alors que l'hespéridine, structurellement proche, est sans goût et la néohespéridine dihydrochalcone **N** est intensément douce (Rouseff *et al.*, 1987 ; Castillo *et al.*, 1993 ; Winnig *et al.*, 2007). En outre, la stéréo-isomérisation des molécules semble influencer sur leurs propriétés organoleptiques. Par exemple, l'énantiomère dextrogyre de la phyllodulcine **O** est sucré, alors que sa forme lévogyre n'a pas de goût (Zehnter *et al.*, 1995). On peut également citer la D-asparagine (Piutti, 1886) ou D-alapyridaine (Ottinger *et al.*, 2003) qui possèdent une saveur sucrée alors que leur énantiomère lévogyre est insipide.

III. Les récepteurs du goût

La perception du goût a lieu dans la bouche, lors de la consommation des aliments et des boissons. Les composés sapides, présents dans le bol alimentaire et dissous dans la salive, sont détectés par des récepteurs situés à la surface des cellules gustatives constituant les bourgeons du goût. Ces derniers sont localisés dans les papilles, présentes dans toute la cavité buccale avec une densité plus importante sur la langue. (Adler *et al.*, 2000 ; Montmayeur *et*

al., 2002 ; Scott, 2005). L'activation des récepteurs engendre une cascade de transduction responsable de la perception du goût par le cerveau.

Chaque saveur possède des récepteurs (**Tableau 2**) et un mécanisme de transduction propre. Toutefois, deux grands groupes peuvent être décrits. Pour les saveurs acide et salée, la perception du goût s'effectue par une interaction directe entre les composés et des canaux ioniques membranaires. L'entrée d'un ion (H^+ ou Na^+) dans la cellule grâce à un canal ionique (Lindemann, 2001 ; Chandrashekar *et al.*, 2006), provoque une dépolarisation de la membrane cellule, d'où une entrée d'ions Ca^{2+} puis une libération de neurotransmetteur dans la synapse sous-jacente. En ce qui concerne les saveurs amère, sucré et umami, la perception est induite par l'activation d'un récepteur de type T1R ou T2R couplé à des protéines G (GPCR Protéine G Couplée à un Récepteur) (Lindemann, 2001 ; Y.-P. Zhang *et al.*, 2003 ; Chandrashekar *et al.*, 2006).

Tableau 2. Type de récepteurs associé à chaque goût.

Goût	Récepteurs
Acide	Canal ionique (Na^+)
Salé	Canal ionique (H^+)
Sucré	Dimère T1R2/T1R3
Umami	Dimère T1R1/T1R3
Amer	Famille des T2R

L'activation des récepteurs T1R et T2R entraîne la même cascade de transduction (Chandrashekar *et al.*, 2006). Selon certains auteurs, même si l'amer, le sucré et l'umami partagent la même voie de transduction, celle-ci s'effectue dans différentes cellules gustatives (Scott, 2005). En effet, certaines d'entre elles expriment des T2R et sont sensibles à l'amertume, et d'autres expriment des T1R et sont sensibles au sucré et à l'umami. Pour autant, il n'existe pas de cartographie stricte de la langue, contrairement à certaines fausses idées, et la sensibilité aux saveurs des différentes parties de la bouche dépend des individus (Faurion, 2000).

A. Récepteurs au goût sucré

Les récepteurs T1R et T2R sont des GPCR à sept hélices transmembranaires avec un domaine N-terminal extracellulaire impliqué dans la reconnaissance et la liaison du ligand (Chandrashekar *et al.*, 2006). Plusieurs mécanismes de transduction ont été décrits, soit par

l'intermédiaire de la dégradation de la phosphatidylinositol-tri-phosphate en inositol-tri-phosphate par la phospholipase C β 2 (Chandrashekar *et al.*, 2006), soit par l'activation de l'enzyme adénylate cyclase, qui entrainerait la hausse d'AMPc dans la cellule (Gilbertson *et al.*, 2000). Ces deux mécanismes conduisent à une dépolarisation et la libération de neurotransmetteur.

Bien qu'il n'existe qu'un seul dimère de récepteur pour le sucré et un autre pour l'umami, la multitude de sites de liaison sur leur partie extracellulaire permet de reconnaître de nombreuses molécules et d'expliquer la diversité chimique des composés sapides (Zhao *et al.*, 2003 ; Temussi, 2009). Par ailleurs, il a été montré que certains composés, tels que la protéine brazzéine, se fixent sur le récepteur au niveau de plusieurs points d'attache (Assadi-Porter *et al.*, 2010).

B. Récepteurs à l'amertume

La perception de l'amertume est assurée par une famille multigène de récepteurs, les T2R. Chez l'homme, on en dénombre 25 (Adler *et al.*, 2000 ; Lindemann, 2001 ; Montmayeur *et al.*, 2002 ; Singh *et al.*, 2011). C'est cette multiplicité de récepteurs qui permet d'expliquer la grande diversité des composés amers.

Les T2R sont également des GPCR à sept hélices transmembranaires (Adler *et al.*, 2000 ; Matsunami *et al.*, 2000 ; Scott, 2005 ; Singh *et al.*, 2011), longs de 290 à 333 acides aminés (Singh *et al.*, 2011), avec une courte extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (Adler *et al.*, 2000 ; Singh *et al.*, 2011). La grande multitude de récepteurs amers est liée aux grandes disparités sur les portions extracellulaires, alors que les boucles intracellulaires sont très similaires (Singh *et al.*, 2011). De plus, certains de ces récepteurs sont très sélectifs selon les composés sapides alors que d'autres peuvent en reconnaître plusieurs (Meyerhof *et al.*, 2010). Sur les 25 récepteurs, 5 n'ont pas encore été attribués à leurs ligands alors que les 20 autres ont été associés à la reconnaissance d'un ou plusieurs composés sapides (Behrens *et al.*, 2004 ; Meyerhof *et al.*, 2010).

Ainsi, la diversité moléculaire des composés sucrés et amers, s'explique respectivement par la multiplicité des sites de fixation des récepteurs au sucré et par la diversité des récepteurs de l'amertume. Pour ces raisons, il demeure difficile de prévoir à coup sûr le goût d'une molécule à partir de sa structure et, plus encore, de rechercher des molécules sapides *in silico*. Cela constitue un frein à la mise en œuvre d'approches déductives (« top-down »).

IV. Les approches variées de l'étude du goût du vin

Les études sur le goût du vin réalisées jusqu'à présent ont eu recours à plusieurs méthodes. Une des techniques les plus largement utilisées, « l'analyse par dilution du goût » ou Taste Dilution Analysis (TDA) (O. Frank *et al.*, 2001), est utilisée pour comparer deux ou plusieurs vins. Ces derniers sont dans un premier temps évaporés à 20 °C afin d'obtenir un rétentat désaromatisé, puis, ils sont fractionnés par HPLC semi-préparative équipée d'une colonne C18. Après évaporation des solvants, les fractions sont diluées successivement en solution et goûtées par un panel afin de déterminer pour chacune d'elles un seuil de détection. Les fractions sont également analysées par HPLC-MS afin de cibler les composés connus du vin. Cette technique, développée par l'équipe du Pr. Hofmann à Munich, a largement fait ses preuves pour la caractérisation de composés sapides dans les aliments et les boissons (O. Frank *et al.*, 2001 ; Ottinger *et al.*, 2003 ; Scharbert *et al.*, 2004b ; Scharbert *et al.*, 2005). Cependant son application à l'étude des vins reste difficile en raison de la complexité de la matrice. La méthode du TDA est régulièrement associée au « half-tongue test », utilisé afin de déterminer le seuil de détection d'un composé ou d'une fraction par son application sur une moitié de la langue. La perception générée est comparée à celle procurée par une solution témoin déposée simultanément sur l'autre moitié de la langue. Le dégustateur doit ainsi déterminer le côté de la langue sur laquelle la fraction test a été déposée (Scharbert *et al.*, 2004a ; Hufnagel *et al.*, 2008a). Cette technique est bien adaptée à l'étude des composés sapides, puisqu'elle limite la quantité d'échantillon nécessaire à l'analyse gustative qui, contrairement à l'olfaction, est destructrice. Néanmoins, la perception d'une seule goutte déposée sur une partie limitée de la langue ne saurait reproduire correctement les saveurs et sensations procurées par un liquide au contact de toute la cavité buccale.

Quel que soit le test gustatif choisi, l'évaluation sensorielle des vins ou des aliments nécessite un panel de dégustateurs entraînés. Ces derniers ont la capacité d'évaluer avec plus ou moins de précision des échantillons, dont le nombre reste fatalement limité en raison de la fatigue et de la saturation gustative. Le remplacement des panels par des techniques analytiques capables d'effectuer des analyses gustatives de routine serait donc intéressant. La « langue électronique » ou Electronic Tongue (ET) (Latha *et al.*, 2012) est depuis peu utilisée en tant qu'instrument de mesure du goût. Cette technique utilise des capteurs chimiques basés sur la potentiométrie ou la voltamétrie et est capable de mesurer les composés connus en utilisant des seuils de détection similaires voire meilleurs que ceux des récepteurs humains. De cette manière, une étude a prédit l'amertume de certains vins à l'aide de l'ET et d'analyses chimiques classiques (Rudnitskaya *et al.*, 2010). Cette technique est également très largement

utilisée dans l'industrie pharmaceutique afin d'établir des formulations en adéquation avec l'acceptation du patient (Legin *et al.*, 2004). Cependant, cette technique s'applique essentiellement à des composés dont les propriétés gustatives ont déjà été établies et son utilisation apparaît peu pertinente pour rechercher de nouveaux effecteurs du goût.

D'autres travaux ont également tenté d'évaluer la perception sensorielle par des analyses chimiques. Pour cela, ils ont établi statistiquement des corrélations entre les teneurs de certains composés et les perceptions aromatiques et gustatives (Blackman *et al.*, 2010). Cependant cette technique montre certaines limites puisque les interactions entre composés ne peuvent pas être mesurées (Piggott, 1990).

La recherche de composés sapides est donc intéressante non seulement d'un point de vue gustatif, pour une meilleure compréhension du goût mais également pour son implication dans l'industrie agroalimentaire. La diversité moléculaire des substances actives, la multiplicité des récepteurs du goût ainsi que des mécanismes de transduction expliquent en partie la complexité de la recherche de ces molécules sapides. Plus récemment, ces recherches ont été orientées vers l'utilisation de protocoles de fractionnement basés sur une démarche inductive guidée par la gustométrie. De cette manière, la purification de composés sapides, orientée par la dégustation des fractions, a été appliquée à de nombreuses matrices, telles que des extraits de plantes, des aliments ou encore le vin (Marchal *et al.*, 2011b).

PARTIE EXPÉRIMENTALE GÉNÉRALE

Au cours de cette thèse, de nombreuses techniques analytiques ont été utilisées dans le but de fractionner des extraits, purifier des molécules et de les identifier. En parallèle, diverses techniques d'analyse sensorielle ont permis l'évaluation organoleptique de ces échantillons (extraits, molécules, vins). Cette partie expérimentale s'applique, dans un premier temps, à détailler les principes généraux des techniques employées et de décrire les équipements présents au sein du laboratoire de l'axe Qualité et Identité du Vin de l'unité de recherche œnologie. Dans un second temps, les techniques d'analyse sensorielle et les traitements statistiques permettant leur interprétation sont décrits.

I. Dispositifs expérimentaux et techniques utilisées

A. Caractéristiques des solvants utilisés

L'eau ultra-pure utilisée au cours des expérimentations de ce travail provient d'un système de purification *milli-Q* et possède une résistivité de 18,2 M Ω .cm (Millipore, France). L'acétonitrile, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le *n*-heptane, le méthanol et l'iso-propanol sont tous de qualité HPLC et possèdent une pureté supérieure à 99 % (VWR International, Pessac, France). L'acidification des voies en HPLC semi-préparative a été réalisée à l'aide d'acide formique ou d'acide trifluoroacétique de qualité HPLC possédant une pureté supérieure à 99 % (VWR International, Pessac, France). L'acétonitrile et l'eau utilisée pour la séparation chromatographique en U-HPLC-MS, ainsi que l'acide formique permettant l'acidification des voies, sont de qualité LC-MS avec une pureté supérieure ou égale à 99,9 % (FischerScientific, Illkirch, France).

B. Techniques analytiques de fractionnement et de purification

1. Extraction liquide/liquide (L/L)

Cette technique de fractionnement consiste en un partage de matière entre deux phases liquides non miscibles en fonction de l'affinité des molécules pour chacune des phases. En général, l'une des phases est aqueuse et l'autre est organique. La réussite de cette étape repose sur le choix des solvants d'extraction pour extraire les composés ciblés dans l'une des deux phases. Il est en effet nécessaire que les deux liquides forment un système binaire stable et que leur différence de densité permette leur séparation par décantation, dans une ampoule à décanter.

Chaque soluté X du mélange possède sa propre constante de partage (ou constante de distribution). La constante de partage d'un soluté X, notée K_{DX} , entre les deux phases utilisées, se calcule selon cette équation :

$$K_{DX} = \frac{[X]_{\text{inf}}}{[X]_{\text{sup}}}$$

où $[X]_{\text{inf}}$ et $[X]_{\text{sup}}$ désignent les concentrations de X respectivement dans les phases inférieure et supérieure.

2. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

a) Principe

La CPC est une méthode de chromatographie liquide/liquide sans support solide, mise au point par Nunogaki (Murayama *et al.*, 1982). Elle est basée sur les différences de partage de divers solutés entre deux phases liquides non miscibles, préparées par mélange d'au moins deux solvants. L'appareil consiste en une colonne (rotor), constituée par la superposition de disques contenant de nombreuses cellules interconnectées. Cette colonne est mise en rotation autour d'un axe fixe, ce qui génère un champ de force centrifuge constant (**Figure 3**). Pour mettre en œuvre une expérience de CPC, les cellules sont d'abord remplies avec une première phase liquide (dite stationnaire). Puis la seconde phase liquide (mobile) est pompée avec un débit constant. Elle traverse la phase stationnaire de chaque cellule jusqu'à ce qu'un équilibre stable soit atteint entre les deux phases, sous l'effet du champ de force centrifuge. Les volumes totaux de phase stationnaire V_{stat} et de phase mobile V_{mob} restent constants dans la colonne au cours de l'expérience. L'échantillon est alors injecté et les solutés sont distribués entre les deux phases en fonction de leur affinité pour chacune d'entre elles. La différence de partage entre les divers solutés est à l'origine de leur séparation (Foucault *et al.*, 1998).

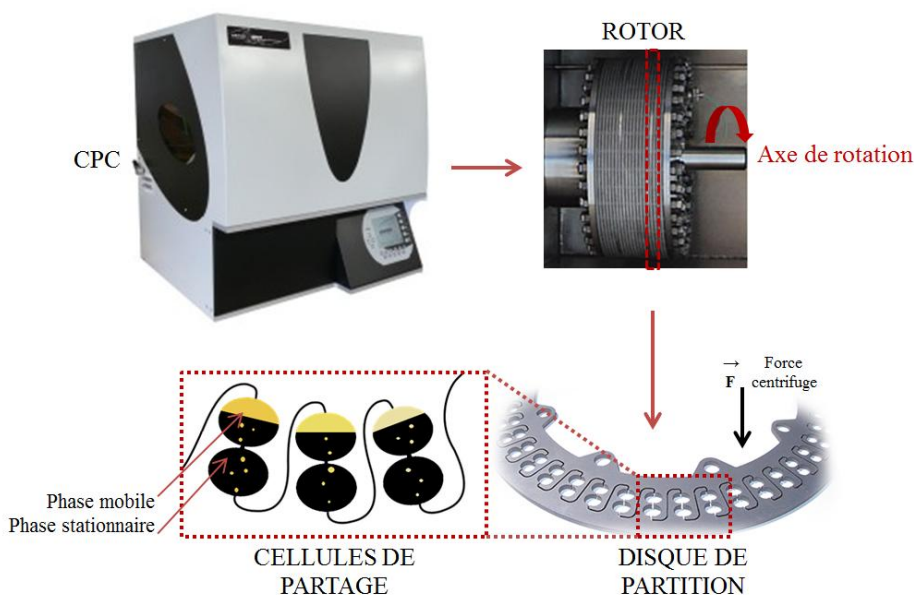


Figure 3. Description de l'appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge et schématisation de son fonctionnement (d'après Kromaton, Annonay, France et Armen Instrument, Saint Avé, France).

Le rotor de la CPC peut être utilisé en deux modes : le mode est dit ascendant, lorsque la phase mobile est introduite dans la cellule en sens inverse de la force centrifuge, ou descendant dans le cas opposé (**Figure 4**).

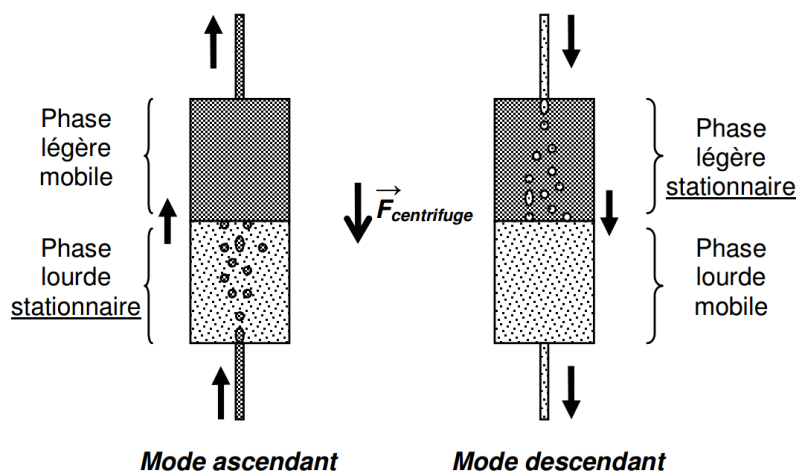


Figure 4. Schématisation des deux modes d'introduction des solvants dans la colonne (d'après Toribio, 2007).

Afin d'optimiser le contact entre les deux phases et ainsi la séparation des solutés, le fractionnement débute en mode ascendant lorsque la phase stationnaire est plus dense que la phase mobile ou en mode descendant lorsque la phase stationnaire est la moins dense.

Le choix du système de solvants est un facteur déterminant de la qualité de la séparation en CPC. La polarité, la proticité et la permittivité des phases influencent notablement la distribution des molécules et leur répartition entre les phases. Chaque soluté X du mélange possède en effet sa propre constante de partage, notée K_{DX} . Elle se calcule selon l'équation suivante :

$$K_{DX} = \frac{[X]_{\text{stat}}}{[X]_{\text{mob}}}$$

où $[X]_{\text{stat}}$ et $[X]_{\text{mob}}$ désignent les concentrations de X respectivement dans la phase stationnaire et la phase mobile.

Par ailleurs, le système choisi doit être stable, solubiliser correctement l'échantillon injecté et ne doit pas former d'émulsion au contact de ce dernier, car l'injection entraînerait alors une déstabilisation du système nuisible à la séparation. Parmi l'infinité de systèmes de CPC pouvant être formés par mélange de solvants, ceux qui ont été utilisés dans ce travail appartiennent à deux grandes catégories.

Les systèmes « ponts » sont formés de deux solvants non miscibles tandis que le troisième est miscible avec les deux autres : il se répartit dans les deux phases et assure le transfert des molécules de l'une vers l'autre. Le système acétate d'éthyle/isopropanol/eau en est un exemple.

Les systèmes de la gamme Arizona (Renault *et al.*, 2002 ; Maciuk, 2005) sont formés par 4 solvants (H_2O , MeOH, AcOEt, Hept). Les proportions relatives de ces solvants définissent différents systèmes biphasiques stables au sein de cette gamme et déterminent la polarité des deux phases. Des systèmes dérivés peuvent être obtenus par substitution partielle du MeOH par l'ACN (Bisson, 2012) ou bien encore du MeOH par l'EtOH (Wu *et al.*, 2012).

Les deux phases peuvent être préparées dans une ampoule à décanter avant le fractionnement : le mélange des solvants conduit à un état d'équilibre thermodynamique, chaque phase étant saturée l'une en l'autre.

b) Avantages et limites de la technique

La CPC présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques chromatographiques préparatives, et notamment la HPLC. En effet, la capacité de charge est élevée, jusqu'à 10 g d'échantillon pouvant être injectés dans le rotor de 1 L. En outre, l'absence de support solide permet de récupérer intégralement l'échantillon injecté, en évitant les phénomènes d'adsorption irréversible rencontrés en HPLC. Le temps de manipulation est également assez réduit : une séparation par CPC dure généralement de 1 à 3 heures. La

quantité de solvant ramenée à la masse d'échantillon injectée est ainsi 5 à 10 fois plus faible qu'en HPLC (Maciuk, 2005), ce qui constitue des enjeux économiques et environnementaux non négligeables. Un nombre quasi infini de systèmes de solvants peuvent être générés : on dispose ainsi d'une variabilité de la phase stationnaire largement supérieure à celle disponible en HPLC. Bien que reposant sur des phénomènes d'interactions moléculaires, le principe de la CPC est différent de la HPLC et conduit à une séparation différente des solutés. Il s'agit d'une technique complémentaire à la HPLC et les deux peuvent donc être utilisées successivement dans un protocole de purification.

Cependant, l'utilisation de la CPC nécessite une optimisation importante, au niveau notamment du choix des solvants, afin d'obtenir une séparation maximale des solutés. Par ailleurs, la résolution chromatographique est généralement plus basse qu'en HPLC. L'utilisation de la CPC est donc à privilégier en amont des cascades de purification.

c) Appareillage

Le laboratoire est équipé d'un système Spot prep II LC connecté à un module SCPC-100+1000 (Armen Instrument, Saint-Avé, France). Ainsi le fractionnement peut être réalisé sur un rotor de 100 mL (11 disques, 90 cellules « twin cells » de 0,101 mL par disque) ou un rotor de 1 L (21 disques, 72 cellules « twin cells » de 0,555 mL). Les phases liquides sont pompées dans la colonne par une pompe 4 voies haute pression. L'injection est manuelle et les échantillons sont introduits dans la colonne par l'intermédiaire d'une valve automatique haute pression. Toutes les expérimentations sont conduites à température ambiante, avec une détection UV à 2 longueurs d'onde. La sortie du détecteur est connectée au collecteur de fractions du Spot prep II LC. Le système est entièrement contrôlé par le logiciel Glider Prep V5.0 (Armen Instrument, Saint-Avé, France).

3. Extraction sur phase solide (SPE)

Cette technique chromatographique liquide sur phase solide est une méthode de préparation d'échantillon, souvent utilisée avant la purification par HPLC-semi-préparative. Elle permet l'enrichissement des fractions en composés d'intérêt tout en éliminant des molécules non recherchées. Elle consiste à charger une colonne chromatographique avec un échantillon préalablement solubilisé. Les constituants de l'échantillon qui ont été adsorbés sur la phase stationnaire peuvent alors être séparés au cours de l'élution par la phase mobile, grâce à leur affinité différentielle pour les deux phases. La séparation est donc dépendante du

type de phase stationnaire et des solvants utilisés (purs ou en mélange, avec une composition de la phase mobile pouvant évoluer au cours de l'élution).

4. Chromatographie Flash

a) Principe

La chromatographie Flash est une technique de chromatographie liquide sur phase solide utilisée à basse pression. Elle peut être analytique, afin d'identifier des composés présents, ou préparative quand il s'agit de purifier des composés. Son principe est le même que celui de la SPE. Cependant, le système de chromatographie Flash permet de réaliser des séparations et purifications de façon automatisée, ce qui apporte à l'utilisateur un gain de temps, une économie de solvant et une meilleure reproductibilité.

b) Appareillage

Au laboratoire, la colonne de chromatographie Flash est connectée au système Spot prep II LC (Armen Instrument, Saint-Avé, France). Le fractionnement est ainsi entièrement automatisé, du chargement de la colonne par le pompage de l'échantillon par l'une des voies, jusqu'à la collecte en sortie du détecteur UV (2 longueurs d'ondes). Toutes les expérimentations sont conduites à température ambiante. Le système est contrôlé par le logiciel Glider Prep V5.0 (Armen Instrument, Saint-Avé, France).

5. Chromatographie Liquide à Haute Performance à l'échelle semi-préparative (HPLC-semi-préparative)

a) Principe

Cette technique chromatographique liquide sur phase solide est utilisée généralement en dernière étape de purification d'échantillons.

La chromatographie liquide haute performance présente un nombre élevé de plateaux théoriques, ce qui lui confère un grand pouvoir de séparation et une meilleure résolution que la CPC. Cette technique chromatographique de séparation à l'échelle semi-préparative, permet la purification totale de molécules. Elle nécessite la mise au point de gradients de phase mobile adaptés afin d'obtenir une séparation satisfaisante des composés en un temps minimum. L'optimisation des gradients est réalisée à l'aide de la LC-FTMS sur des colonnes analytiques composées de phases identiques aux colonnes de taille semi-préparative utilisées pour les purifications (technique du « scale-up »).

b) Appareillage

Le laboratoire est équipé d'un appareil Waters Prep 150 LC associé à une pompe quaternaire 2545 et un collecteur de fraction III. L'appareil est connecté à deux types de détecteur : un détecteur UV/Visible 2489 et un détecteur DEDL (Waters, Guyancourt, France). Plusieurs colonnes sont disponibles, ce qui permet de tester différents types de phase stationnaire et de choisir celle qui est la plus adaptée à la séparation considérée. La phase mobile liquide est quant à elle composée d'un mélange d'eau milliQ (phase A) et d'ACN (phase B), selon des gradients optimisés en fonction des échantillons à traiter. Les phases A et B peuvent également être acidifiées avec du TFA ou de l'acide formique afin d'améliorer la résolution chromatographique et la forme des pics. Le détecteur UV, non destructeur, est utilisé par défaut. Lorsque l'absorbance des molécules est nulle ou insuffisante aux longueurs d'ondes choisies, le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) peut être ajouté à la chaîne, avec une déviation du flux chromatographique dans un ratio 1/10. Les principaux avantages de ce détecteur résident dans son caractère universel et dans la quasi-linéarité de sa réponse. En revanche, il est destructeur, nécessite des phases mobiles facilement évaporables et ne procure aucune information sur la nature chimique des composés.

Le système est contrôlé par le logiciel Chromscope (Waters, Guyancourt, France).

C. Techniques analytiques d'identification

1. Spectrométrie de Masse à Transformée de Fourier-Orbitrap

La spectrométrie de masse est une méthode analytique permettant de déterminer la masse moléculaire d'un composé chimique en mesurant les rapports masse sur charge (m/z) des ions qu'il génère. Un spectromètre de masse est généralement composé de trois parties : une source d'ionisation, un analyseur de masse et un détecteur de courant d'ions. Différents types d'analyseurs de masse sont disponibles sur le marché et leur champ d'utilisation varie avec leurs spécificités. Le laboratoire est équipé d'une chaîne de chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de Masse à Haute Résolution (LC-HRMS), dont l'analyseur de masse est un Orbitrap.

a) Principe de l'Orbitrap

L'analyseur Orbitrap est le plus récent des analyseurs de masse équipant des instruments commerciaux. Il a été inventé par Makarov (Makarov, 1999, 2000 ; Hardman *et al.*, 2003) sur la base de la théorie développée par Kingdon en 1923 décrivant un piégeage électronique induit uniquement par un champ électrostatique (Kingdon, 1923).

Cet analyseur est constitué d'une électrode interne, en forme de fuseau, contenue dans une électrode coaxiale, en forme de tonneau (**Figure 5**). Un champ électrostatique est généré entre ces deux électrodes, piégeant ainsi les ions introduits, avec une vitesse initiale, autour de l'électrode centrale.

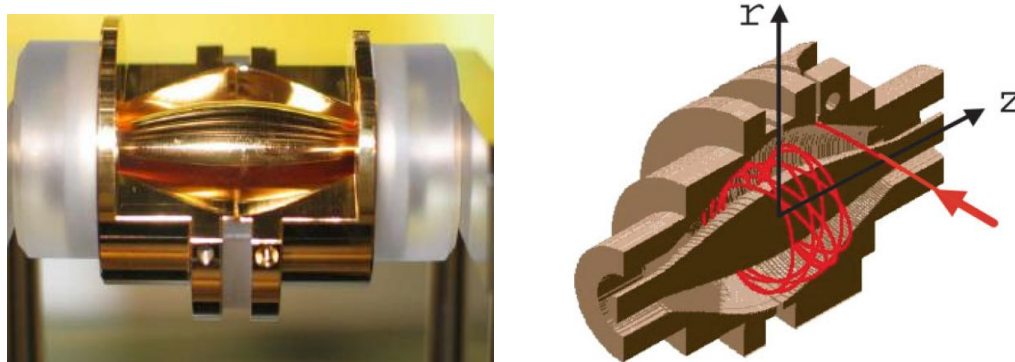


Figure 5. Vue externe d'un analyseur Orbitrap (à gauche) et coupe schématique d'un analyseur Orbitrap (à droite), décrivant le mouvement des ions autour de l'électrode centrale (d'après Hu et al., 2005).

Les ions effectuent un mouvement harmonique oscillatoire auto-entretenu (composition d'une rotation autour de l'axe central et d'une oscillation longitudinale). Un paquet d'ions de même rapport m/z constitue un anneau se déplaçant le long de l'électrode centrale. Les fréquences de rotation des ions dépendent de l'énergie interne, des angles de l'injection, et de la diffusion spatiale, ils ne peuvent donc pas être utilisés pour la détermination du rapport m/z . En revanche, la fréquence d'oscillation axiale ω_z , définie ci-dessous, ne dépend que du rapport m/z des ions (k étant une constante instrumentale).

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

La mesure du courant induit par les oscillations permet, après application d'une opération de transformée de Fourier (Makarov, 2000), d'obtenir les rapports m/z caractéristiques des différents ions. L'indépendance des oscillations axiales caractéristiques de chaque ion constitue l'élément clé de l'analyseur Orbitrap. C'est cette spécificité qui permet une mesure très précise des fréquences, à l'origine de la haute résolution (supérieure à 100 000 pour un rapport $m/z = 400$ Th ; ce pouvoir résolutif est proportionnel au temps de mesure des fréquences dans l'analyseur), et de la grande précision de mesure masse (< 5 ppm). Ces caractéristiques permettent l'utilisation de l'analyseur Orbitrap pour des

applications qualitatives (détermination de formules brutes ou criblage d'extraits complexes par exemple).

Par ailleurs, l'Orbitrap se distingue par la conservation de la précision de mesure de masse sur une vaste gamme dynamique intra-scan (supérieure à 3 décades) et pour une large gamme de rapports m/z (50 à 4000 Th). En raison de ces spécificités, l'analyseur Orbitrap peut être employé pour des applications quantitatives (dosage de molécules d'intérêt dans une matrice complexe).

b) *Système Exactive™ (Thermo Fischer Scientific)*

Le laboratoire est équipé d'un système Exactive™ (Thermo Fischer Scientific, Les Ulis, France). Celui-ci est composé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique, d'une optique de transfert d'ions, d'un analyseur Orbitrap et d'une cellule de collision HCD (Higher Energy Collision Induced Dissociation), comme représenté sur la Figure 6.

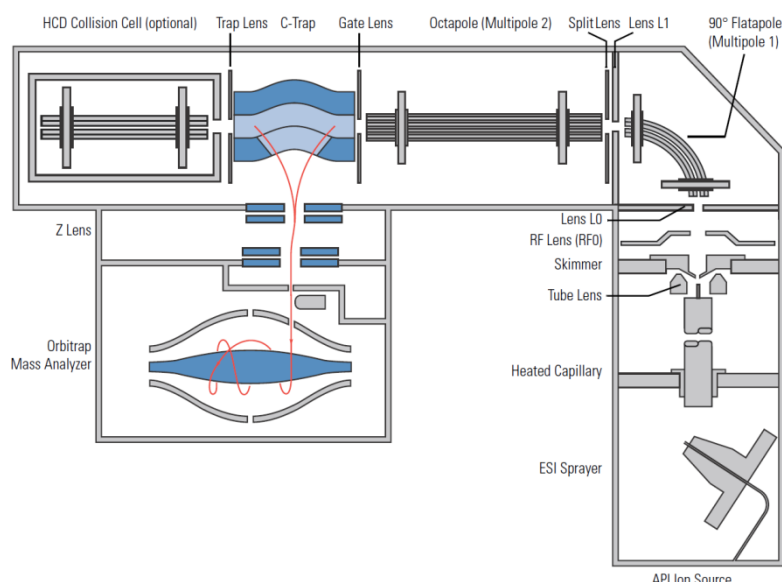


Figure 6. Présentation schématique de la géométrie du spectromètre de masse Exactive™ (d'après Wiegand *et al.*, 2006).

La source d'ionisation à pression atmosphérique permet l'ionisation négative ou positive des molécules en les transférant d'une phase liquide vers une phase gazeuse. C'est une étape indispensable pour l'analyse en spectrométrie de masse. Cette ionisation peut se faire par électro-nébulisation (Electrospray, ESI) ou par ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Les ions sont ensuite transmis vers la C-trap par une optique de transfert, constituée de lentilles et guides quadrupolaires, au cours de laquelle un vide croissant est exercé par une pompe primaire. Les ions sont piégés dans la C-trap par un champ

radio-fréquence et une pressurisation à l'azote (10^{-5} mbar) qui de par sa forme permet la focalisation et le transfert des ions vers l'Orbitrap. Le système de contrôle de gain automatique (AGC) permet la régulation du nombre d'ions pour atteindre une quantité fixe, prédéterminée par l'utilisateur. L'Orbitrap est maintenu à un niveau de vide très élevé de l'ordre de 10^{-10} mbar afin d'éviter les collisions pouvant perturber le système. Enfin, la cellule HCD permet d'effectuer, de façon facultative, une fragmentation des ions provenant de la C-trap. Ces ions sont fragmentés via un processus de dissociation induite par collision (CID) sur des atomes d'azote présents dans la cellule. Puis, les ions sont à nouveau piégés dans la C-trap et analysés dans l'Orbitrap. Après la détection dans l'Orbitrap, un système informatique effectue le traitement des données et génère un spectre de masse qui reflète la variation du courant ionique observé en fonction du rapport m/z et permet de déterminer la masse moléculaire des espèces ionisées.

c) Appareillage U-HPLC-FTMS

Au laboratoire, le spectromètre de masse Exactive™ est couplé à un appareil chromatographique analytique de type U-HPLC permettant la séparation des échantillons en amont de l'analyse spectrométrique.

L'ensemble U-HPLC-FTMS est composé d'un passeur d'échantillons HTC PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suisse) permettant l'automatisation des injections, d'un système Accela U-HPLC (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) composé de pompes quaternaires, d'une détection UV (Accela PDA), d'une source d'ionisation par électro-nébulisation chauffée « HESI-I » (Heated ElectroSpray Ionisation) et d'un analyseur Exactive™ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

Les données sont traitées à l'aide des applications Qualbrowser et Quanbrowser de la version 2.1 du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

Ce couplage est adapté à l'étude des matrices complexes, tant pour des applications qualitatives que quantitatives.

2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

a) Principe général

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique analytique permettant la détermination structurale des molécules purifiées. Elle consiste à observer les transitions entre deux niveaux d'énergie très proches d'un noyau soumis à un champ magnétique. Tout d'abord, l'échantillon est placé dans un champ magnétique statique

intense et constant \vec{B}_0 . Les noyaux possédant un spin I (non nul, $1/2$ dans le cas du proton) soumis à ce champ magnétique vont se comporter comme des petits aimants et se répartir en 2 niveaux d'énergie distincts en décrivant un mouvement de rotation. L'apparition de ce mouvement de rotation des spins est appelé mouvement de précession. L'application d'un champ magnétique \vec{B}_1 perpendiculaire à \vec{B}_0 tournant à la fréquence de précession des spins appelée fréquence de Larmor va entraîner le basculement des spins. L'aimantation générée va revenir à l'équilibre par un phénomène dit de « relaxation ». Une bobine réceptrice enregistre la variation de cette aimantation par induction électromagnétique.

Cela se traduit par la création d'un courant électrique induit dans la bobine dont la mesure représente le signal RMN en fonction du temps. Ce signal est appelé signal de décroissance libre ou plus communément signal de précession libre ou FID (Free Induction Decay). La transformée de Fourier permet de passer du signal temporel au signal fréquentiel et d'obtenir ainsi les spectres RMN.

Plusieurs séquences d'impulsions peuvent être mises en œuvre pour fournir des informations sur la structure de la molécule analysée.

(1) Expériences monodimensionnelles (^1H , ^{13}C)

Les spectres 1D du proton ^1H permettent d'estimer le nombre de ces atomes dans la molécule. Le déplacement chimique des noyaux (noté δ et exprimé en ppm), l'intensité des signaux et leur multiplicité permettent de renseigner sur le nombre de protons chimiquement équivalents et sur leur environnement chimique.

(2) Expériences bidimensionnelles (^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C)

Les expériences COSY (COrelated SpectroscopY) et ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY) permettent l'étude des corrélations homonucléaires, respectivement, entre protons voisins dans le squelette de la molécule (couplage scalaire) et entre protons voisins dans l'espace (couplage dipolaire).

Les expériences HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) sont basées sur l'étude des corrélations hétéronucléaires entre ^1H et ^{13}C . Les spectres HSQC permettent d'associer un proton à l'atome de carbone auquel il est directement lié (couplage ^1J). Les spectres HMBC permettent quant à eux de déterminer les carbones voisins du carbone portant le proton considéré (couplages ^2J et ^3J). Ainsi, l'utilisation des spectres enregistrés au cours de ces différentes expériences permet de reconstituer la structure d'une molécule de proche en proche, à la manière d'un puzzle. Tandis que la formule brute d'un composé inconnu peut être aisément

déterminée par HRMS, la RMN est généralement indispensable pour établir sa structure semi-développée, et notamment sa configuration relative.

b) Appareillage

Les expérimentations de RMN sont réalisées en collaboration avec les chercheurs de l'axe Molécules d'Intérêt Biologique de l'unité de recherche œnologie EA 4577 et en particulier avec le Pr. Pierre Waffo-Téguo.

Les analyses RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker Avance 600 NMR (^1H à 600 MHz et ^{13}C à 150 MHz) équipé d'une sonde TXI de 5 mm. Les spectres sont enregistrés, sauf indication contraire, à 300 K dans du méthanol-*d*4. Au laboratoire, seuls les spectres mono-dimensionnels ^1H et bi-dimensionnels ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC et ^1H - ^{13}C HMBC sont réalisés. Les données des déplacements chimiques du ^{13}C sont déduites grâce à l'interprétation des spectres ^1H - ^{13}C HSQC et ^1H - ^{13}C HMBC.

Les données sont traitées avec le logiciel TOPSPIN (Bruker, Massachusetts, United States).

Sauf mention contraire, les représentations des structures moléculaires des composés identifiés dans ce travail sont des configurations relatives.

3. Polarimétrie

a) Principe

Les composés chiraux sont optiquement actifs et présentent une biréfringence circulaire, ce qui cause la rotation du plan de polarisation de la lumière quand elle traverse l'échantillon. On mesure alors la rotation optique $\alpha(\lambda)$ qui dépend de la concentration de la solution traversée par la lumière polarisée. Cette grandeur est linéairement proportionnelle à la concentration C de ces molécules (exprimée en g/mL) et à la longueur l de la cellule dans laquelle elles sont contenues. Ce pouvoir rotatoire $\alpha(\lambda)$, défini comme l'angle de rotation (en degrés) du plan de polarisation de la lumière incidente, est donné par la loi de Biot :

$$\alpha = [\alpha]_{\text{T}}^{\lambda} \cdot l \cdot C$$

La grandeur $[\alpha]_{\text{T}}^{\lambda}$ est le pouvoir rotatoire spécifique, exprimée en $\text{deg} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$ (ou plus couramment en $10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), définie à une température T et mesurée pour une longueur d'onde λ .

- Si, $\alpha = 0$, alors l'échantillon est sous forme de mélange racémique
 $\alpha < 0$, alors l'échantillon contient plus de forme lévogyre (-)
 $\alpha > 0$, alors l'échantillon contient plus de forme dextrogyre (+)

b) Appareillage

La mesure du pouvoir rotatoire spécifique est réalisée sur un polarimètre P2000 (Jasco, Easton, États Unis). La mesure précise de la concentration est requise pour le calcul du pouvoir rotatoire. Les expériences sont généralement menées à 25 °C. Les données sont traitées sur le logiciel Spectra Manager II (Jasco).

4. Dichroïsme Circulaire Vibrationnel (VCD)

a) Principe

Le Dichroïsme Circulaire Vibrationnel est une technique chiroptique spectroscopique. Le VCD repose sur l'aptitude d'une molécule chirale à absorber différemment une lumière infra-rouge polarisée circulairement gauche ou droite. Cette technique a été mise au point au cours des années 1970 (Holzwarth *et al.*, 1974 ; Nafie *et al.*, 1976) puis s'est développée au cours des quatre dernières décennies jusqu'à devenir décisive pour la détermination de la configuration absolue et la conformation de petites molécules chirales (Buffeteau *et al.*, 2007 ; Stephens *et al.*, 2008). Elle doit son efficacité à son association à des calculs de chimie quantique (DFT), permettant de simuler les spectres théoriques des différents énantiomères et conformères afin de les comparer aux données expérimentales.

Le calcul du spectre théorique comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, l'ensemble des conformères envisageables pour une molécule donnée est modélisé. Puis, plusieurs étapes d'optimisation permettent de sélectionner les conformères les plus stables. Cette optimisation s'appuie sur le calcul des énergies de la mécanique moléculaire et sur l'utilisation des méthodes de calculs théoriques semi-empiriques et de calculs quantiques de la théorie de la densité fonctionnelle (DFT). Le calcul de l'énergie dite de Gibbs de chaque conformère permet ensuite l'élimination des conformations identiques, puis, la conformation la plus stable (d'énergie la plus basse) est déterminée. Enfin, la distribution de Maxwell-Boltzmann est utilisée afin de calculer la probabilité de chaque conformation par rapport à la conformation de plus basse énergie. Ainsi, le « nombre d'états » de chaque conformation est calculé par rapport à la conformation d'énergie la plus basse. Puis, le pourcentage d'état est calculé. Celui-ci s'exprime par le ratio du « nombre d'états » sur la somme des états. Afin de calculer le spectre théorique, 50 %, 90 % ou plus, des conformations les plus probables peuvent être

pris en compte. Ainsi le spectre calculé pour une configuration absolue pourra être comparé aux spectres expérimentaux mesurés afin de déduire la configuration absolue des énantiomères.

b) Appareillage

Les expérimentations de VCD ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Pr. Thierry Buffeteau de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM) de l'Université de Bordeaux. Les spectres IR et VCD sont enregistrés avec un spectromètre ThermoNicolet Nexus 670 équipé d'un dispositif d'interférométrie suivi d'une transformée de Fourier (FTIR) (Buffeteau *et al.*, 2005). Les calculs sont réalisés à l'aide du logiciel ThermoNicolet.

II. Techniques d'analyse sensorielle

A. Conditions de la dégustation

Les dégustations se sont déroulées dans la salle d'analyse sensorielle de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), climatisée à 20 °C (NF EN ISO 8589 : 2010) et équipée de postes individuels informatisés permettant l'automatisation de la collecte des réponses (logiciel FIZZ). Les solutions d'entraînement et les vins sont dégustés dans des verres AFNOR noirs (ISO 3591 : 1977). Sauf indication contraire, les tests ont été réalisés en fin de matinée, qui constitue le moment le plus propice à la dégustation. Les panels utilisés étaient constitués de chercheurs en œnologie, d'œnologues et de vinificateurs, ayant tous suivi une formation à la dégustation de vin. La composition exacte des panels varie d'une analyse sensorielle à une autre et sera ainsi, pour la suite de ce travail, précisée dans la partie consacrée à chaque expérience.

B. Tests d'analyse sensorielle et traitements statistiques utilisés pour leur interprétation

1. Test de classement par rangs

Selon l'organisation internationale de normalisation (ISO 8587 : 2007), le test de classement est une épreuve descriptive simple qui consiste à classer des échantillons selon l'intensité d'une caractéristique sensorielle.

Le protocole du test de classement par rangs consiste à présenter simultanément des échantillons anonymes et codés à un panel. Il est alors demandé aux dégustateurs de classer les échantillons par ordre croissant d'intensité pour un critère. Lorsqu'il existe un ordre prévisible entre les modalités, les résultats de ce test sont interprétés par le test de Page,

comme préconisé par les normes. Il s'agit d'un test non paramétrique. Les p modalités sont dégustées par les n sujets, qui les classent en fonction de l'intensité perçue. Un rang reflétant leur classement leur est ainsi attribué et la somme des rangs R_i est ensuite calculée pour chaque échantillon. Les variables L et L' sont calculées comme défini ci-dessous :

$$L = \sum_{i=1}^p i \cdot R_i$$

La notion d'ordre prédéterminé est en effet prise en compte dans le calcul de L (pondération de R_i par i , reflétant l'ordre présumé des modalités).

$$L' = \frac{12L - 3n \cdot p \cdot (p + 1)^2}{p \cdot (p + 1) \cdot \sqrt{n \cdot (p - 1)}}$$

La significativité du test est déterminée par la valeur de L' . Le test est considéré comme significatif :

- au risque de 5 % si $L' \geq 1,645$
- au risque de 1 % si $L' \geq 2,326$
- au risque de 0,1 % si $L' \geq 3,090$

Si le test est significatif, alors le panel a su classer les échantillons en fonction de l'intensité de la caractéristique sensorielle donnée. Dans le cas de l'existence d'un ordre prédéterminé des échantillons, le classement réalisé par le panel est alors comparé au classement attendu. Cela permet d'évaluer l'efficacité du panel à percevoir les différences d'intensité du descripteur sensoriel demandé dans les échantillons et ensuite de les hiérarchiser.

2. Test triangulaire

Selon l'organisation internationale de normalisation, le test triangulaire (ISO 4120 : 2007) est une épreuve discriminative ayant pour but de comparer deux modalités dont on cherche à évaluer si elles présentent ou non des différences sensorielles (Martin et de Revel, 1999).

Pour ce faire, trois échantillons, dont deux sont identiques, sont présentés simultanément aux juges qui doivent désigner l'échantillon différent. Six présentations sont possibles suivant la nature du produit répété (A ou B) et la position de l'échantillon unique : AAB, ABA, BAA, BBA, BAB, ABB. L'ordre de présentation des verres est équilibré sur l'ensemble des individus afin d'éviter le biais de l'ordre de dégustation des verres.

Le traitement statistique de ce test est basé sur la loi binomiale : l'hypothèse initiale est l'identité entre les deux produits (hypothèse nulle H_0 , probabilité de réponse correcte $p = 1/3$). La probabilité que l'hypothèse initiale, notée P , soit vraie est calculée comme suit :

$$P = \sum_{i=r}^n C \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

Avec r : nombre de réponses correctes

n : nombre de sujets

q : $1 - p = 2/3$

Plus P est faible, c'est-à-dire proche de 0, moins l'hypothèse d'identité des modalités est vraisemblable. Les valeurs limites de significativité généralement adoptées sont 0,05 ; 0,01 et 0,001. Ainsi, lorsque P est inférieure à ces valeurs, les échantillons sont considérés comme différents au risque de 5 %, 1 % et 0,1 % respectivement. Afin de faciliter l'analyse des résultats, les valeurs limites du nombre de réponses permettant de rejeter l'hypothèse initiale sont disponibles dans des tables (NF EN ISO 4120 : 2007 ; Martin et de Revel, 1999).

3. Profil sensoriel conventionnel

Selon l'organisation internationale de normalisation, l'établissement d'un profil sensoriel (ISO 13299 : 2016) est une méthode d'analyse descriptive. Elle permet de caractériser les propriétés sensorielles d'un échantillon avec l'attribution d'une valeur d'intensité pour des descripteurs sensoriels choisis au préalable. Un profil sensoriel conventionnel consiste à traiter statistiquement des données provenant de plusieurs dégustateurs en utilisant une liste unique de descripteurs. Si un seul descripteur est utilisé, il s'agit alors d'une épreuve de notation simple. Ce test nécessite la sélection d'un panel entraîné. Celui-ci doit être en accord sur la définition sensorielle des descripteurs et être capable d'évaluer leur intensité de manière consensuelle.

Le profil sensoriel consiste à présenter consécutivement les échantillons à évaluer à un panel de dégustateurs. Celui-ci doit alors évaluer et noter sur une échelle l'intensité de chaque descripteur donné pour tous les échantillons. Les notes d'intensité attribuées par le panel sont alors centrées-réduites afin de s'affranchir du facteur de notation des juges puis les résultats sont traités par une analyse de la variance. L'ANOVA à un facteur est un traitement statistique permettant de comparer les moyennes d'une variable quantitative (intensité du

descripteur) en fonction d'une variable nominale catégorielle (les échantillons). L'utilisation de l'ANOVA nécessite la vérification des deux hypothèses suivantes :

- l'hypothèse d'homogénéité des variances des notes attribuées aux différentes modalités (test de Bartlett ou de Levene)
- l'hypothèse de normalité des résidus (test de Shapiro-Wilks)

L'ANOVA teste les hypothèses suivantes :

$$H_0 : m_1 = m_2 = \dots = m_{k1} = m$$

$$H_1 : \exists(i, j) \text{ tel que } m_i \neq m_j$$

Si la *p-value* > α de se tromper en rejetant H_0 , alors on accepte H_0 . Toutes les modalités suivent une même loi normale.

Si la *p-value* < α de se tromper en rejetant H_0 , alors on rejette H_0 . Il existe au moins une modalité dont la moyenne est différente des autres moyennes.

Dans le cas où l'on rejette l'hypothèse nulle, l'ANOVA ne permet pas de savoir quels sont les échantillons qui ne suivent pas cette loi normale et se différencient des autres. Ainsi, pour identifier les échantillons correspondant, des tests « post-hoc » ou test de comparaisons multiples de moyennes telles que le test *post-hoc* de Tukey sont utilisés.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES LIGNANES DU BOIS DE CHÊNE AU GOÛT DU VIN

PREMIÈRE PARTIE :
ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES LIGNANES DU BOIS DE CHÊNE AU GOÛT
DU VIN

CHAPITRE 1 - ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES PROPRIÉTÉS GUSTATIVES DE
L'ÉTHANOL EN VUE DU CHOIX D'UNE MATRICE DE DÉGUSTATION

Introduction

Depuis quelques années, plusieurs études ont adopté une démarche inductive pour rechercher les déterminants moléculaires du goût du vin. Des étapes de fractionnement sont en effet mises en œuvre et à l'issue de chacune d'entre elles, la sélection des fractions pertinentes repose sur la dégustation (Glabasnia *et al.*, 2006 ; Hufnagel *et al.*, 2008a ; Marchal *et al.*, 2011b). Le succès d'une telle approche est en grande partie lié au bon déroulement des séances d'analyse sensorielle et le choix de la matrice utilisée pour déguster les fractions apparait donc comme un paramètre clé. Cette étude préliminaire vise à mieux comprendre l'impact de l'éthanol sur la perception du goût du vin.

I. Impact de l'éthanol sur les qualités organoleptiques des vins secs : état de l'art

L'éthanol est un métabolite primaire de la fermentation alcoolique. Il est généralement retrouvé à des concentrations variant de 12 à 14 % vol. dans la majorité des vins secs (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). La psychophysiologie (Lanier *et al.*, 2005 ; Allen *et al.*, 2014 ; Nolden *et al.*, 2015) et les effets de la prise d'alcool sur la santé (Baum-Baicker, 1985 ; Cao *et al.*, 2015) ont été largement étudiés ces dernières décennies. Les conséquences néfastes d'une prise excessive d'alcool pour la santé humaine justifient les réglementations encadrant la consommation de vin.

L'éthanol est en outre le composé volatil le plus abondant du vin et il peut, selon sa concentration, en modifier la perception aromatique (Guth *et al.*, 2002). En effet, le caractère fruité des vins tend à diminuer lorsque le pourcentage d'éthanol augmente (Escudero *et al.*, 2007 ; Le Berre *et al.*, 2007 ; Goldner *et al.*, 2009).

De nombreuses études ont également traité de l'effet de l'éthanol sur les sensations tactiles perçues par l'homme (DeMiglio *et al.*, 2002 ; Nurgel *et al.*, 2005). L'éthanol interfère en effet sur les interactions hydrophobes entre les tanins des vins rouges et les protéines salivaires, ce qui conduit à une réduction de la précipitation protéique et ainsi à une

diminution de la perception de l'astringence (Gawel, 1998 ; Sarni-Manchado *et al.*, 2008 ; McRae *et al.*, 2015).

Enfin, l'éthanol a été largement décrit comme développant un goût sucré en solution aqueuse à faible concentration (0 à 4 % vol.) (Wilson *et al.*, 1973 ; Scinska *et al.*, 2000 ; Blizard, 2007), mais aussi amer et brûlant à des teneurs plus élevées (10 à 22 % vol.) (Wilson *et al.*, 1973 ; Bartoshuk *et al.*, 1993 ; Thorngate, 1997 ; Scinska *et al.*, 2000 ; Mattes *et al.*, 2001 ; Blizard, 2007). Des études neurophysiologiques et génétiques ont montré l'existence d'un lien entre la consommation d'éthanol et la perception du goût sucré, par une réponse similaire des voies neuronales gustatives (Lemon *et al.*, 2004 ; Blednov *et al.*, 2008). Les caractères acide et salé de l'éthanol ont également été décrits, mais ils interviennent de façon négligeable en comparaison de sa sucrosité et de son amertume (Fischer *et al.*, 1994 ; Scinska *et al.*, 2000 ; Mattes *et al.*, 2001).

Dans le vin, deux études réalisées sur des solutions modèles de vin sec et des Riesling australiens ont mis en évidence que l'éthanol n'a pas d'influence sur la douceur de ces vins (Gawel *et al.*, 2007 ; Jones *et al.*, 2008). En outre, une étude plus récente a corroboré ces résultats et montré que l'augmentation du degré alcoolique d'un vin sec, de 12 à 14 % vol., n'entraînait pas de modification de la sucrosité perçue (Marchal *et al.*, 2011a).

Par ailleurs, l'amertume des vins semble croître avec leur teneur en éthanol. Fischer et Noble décrivent en effet le rôle révélateur de l'éthanol entre 8 et 14 % vol. dans une solution modèle de vin contenant 100 mg/L de catéchine (Fischer *et al.*, 1994). D'autres études ont montré le même effet de l'éthanol sur la quinine (Martin *et al.*, 1970), sur l'épi-catéchine et la catéchine (Thorngate, 1992 ; Noble, 1994) ou encore sur les oligomères de tanins des pépins de raisin (Fontoin *et al.*, 2008). Il semble donc, à la lumière de ces résultats, que l'éthanol soit susceptible d'influencer le goût du vin en augmentant son amertume. La nature de cette influence doit toutefois être précisée.

II. Étude de l'impact de l'éthanol sur la perception amère d'un vin blanc sec

A. Conditions d'organisation des séances d'analyse sensorielle

Trois séances sont organisées. Les deux premières sont destinées à l'entraînement du panel à la perception de l'amertume et la dernière à la mise en place de l'essai sensoriel. Le panel est composé de 30 dégustateurs âgés de 25 à 65 ans (15 femmes et 15 hommes). Les dégustations ont lieu dans la salle d'analyse sensorielle de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), climatisée à 20 °C (NF EN ISO 8589 : 2010) et équipée de postes individuels informatisés permettant l'automatisation de la collecte des réponses (logiciel

FIZZ). Les solutions d'entraînement et les vins sont dégustés dans des verres AFNOR transparents (ISO 3591 : 1977).

B. Entraînement et validation du panel de dégustateurs

1. Matériel et méthodes

a) Première session d'entraînement

L'objectif de la première session d'entraînement est de familiariser les dégustateurs avec la perception de l'amertume seule, ou en présence d'autres saveurs. Il est donc présenté aux dégustateurs des solutions amères de sulfate de quinine à différentes concentrations. Certaines d'entre elles contiennent de l'acide tartrique, afin de préparer les sujets à percevoir l'amertume indépendamment de l'acidité (**Tableau 3**). A la fin de la séance, un vin blanc considéré comme très amer par un panel réduit de dégustateurs experts est présenté.

Tableau 3. Modalités des solutions présentées lors de la première session d'entraînement.

	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Concentration en acide tartrique (g/L)	0	0	3	3
Concentration en sulfate de quinine (mg/L)	1,5	12	1,5	12

b) Deuxième session d'entraînement

La deuxième session d'entraînement permet d'évaluer l'aptitude des dégustateurs à percevoir l'amertume de solutions de quinine de différentes concentrations (**Tableau 4**).

Tableau 4. Modalités des solutions présentées lors de la seconde session d'entraînement.

		Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Série 1	Sulfate de quinine (mg/L)	1,5	3	6	12
Série 2	Sulfate de quinine (mg/L) + Acide tartrique (g/L)	1,5 + 3	3 + 3	6 + 3	12 + 3

Un test de classement est alors réalisé ; il est demandé au panel de classer les modalités par intensité croissante de la saveur amère, pour les deux séries.

2. Résultats

Conformément à la norme AFNOR (ISO 8587 : 2007) , les résultats sont interprétés par le test de Page (**Tableau 5**), puisque l'ordre des échantillons présentés est prédéterminé par l'ajout de quantités croissantes de sulfate de quinine.

Tableau 5. Résultats de l'évaluation du panel à l'amertume interprétés par le test de Page.

Facteur étudié	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>L</i>	<i>L'</i>	Résultat
Sulfate de quinine	42	61	83	114	869	7,53	< 0,0001 Significatif
Sulfate de quinine + Acide tartrique	57	69	76	98	815	4,11	< 0,0001 Significatif

Pour les deux séries, les sommes des rangs sont croissantes de *R1* à *R4*, bien qu'en présence d'acide tartrique les écarts soient un peu plus faibles notamment entre les rangs 2 et 3. Les valeurs de *L'* sont nettement supérieures à la valeur critique de 3,090 pour un risque de 0,1 %. La statistique de Page permet ainsi de conclure que le test est significatif à 0,1 % pour les deux postes étudiés.

Ce résultat indique que les dégustateurs ont réussi à classer de manière significative les modalités en fonction de l'intensité de la perception amère. Ce classement est cohérent avec les ajouts de sulfate de quinine effectués, ce qui valide l'aptitude du panel à détecter l'amertume.

C. Mise en place de l'essai sensoriel

1. Matériel et méthodes

Deux vins blancs secs sont sélectionnés par trois dégustateurs experts selon l'intensité de leur amertume. Le premier vin, à l'amertume considérée imperceptible, est un Bordeaux blanc 2011 (noté *Vin 1*), et le second vin, jugé représentatif d'un vin blanc très amer, est un Pessac-Léognan 2012 (noté *Vin 2*). Les caractéristiques analytiques des vins utilisés sont mentionnées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Caractéristiques analytiques des vins de base utilisés pour l'analyse sensorielle (mesures réalisées à l'OenoFossTM).

	<i>Vin 1</i>	<i>Vin 2</i>
Titre alcoométrique volumique	12,2 %	12,5 %
Concentration en D-glucose + D-fructose	< 2 g/L	< 2 g/L
pH	3,1	3,1

Première partie : Étude de la contribution des lignanes du bois de chêne au goût du vin

Dans un premier temps, le *Vin 1* (2250 mL), est désalcoolisé par évaporation rotative sous vide jusqu'à obtenir un rétentat possédant un titre alcoométrique volumique de 4,9 %. Le distillat obtenu possède alors une teneur en alcool de 45,7 %. Le titre alcoométrique volumique est d'abord estimé par un FOSS Winescan puis déterminé précisément par séparation de l'alcool par distillation automatique (type Gibertini) et mesure du titre du distillat par balance hydrostatique (méthode officielle recommandée par l'OIV).

Dans un second temps, des modalités à 4, 7, 10 et 12,5 % vol. sont préparées à partir du rétentat par ajout de distillat et d'une eau pure et peu minéralisée (eau de Montagne Laqueuille).

Ces deux étapes sont également effectuées à partir du *Vin 2*.

Les volumes et les teneurs en alcool du rétentat et du distillat obtenus pour les deux vins sélectionnés sont récapitulés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Titre alcoométrique volumique du rétentat et du distillat du *Vin 1* et du *Vin 2*.

	Rétentat		Distillat	
	TAV % vol.	Volume obtenu mL	TAV % vol.	Volume obtenu mL
<i>Vin 1</i>	4,9	1800	45,7	450
<i>Vin 2</i>	4,9	1810	46,6	440

La session d'analyse sensorielle comporte un poste avec les modalités récapitulées dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Modalités (M) de la session d'analyse sensorielle.

Modalités	<i>Vin 1</i>				<i>Vin 2</i>			
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Titre alcoométrique (% vol.)	4	7	10	12,5	4	7	10	12,5

La session d'analyse sensorielle consiste en une épreuve de notation simple. Il est demandé aux dégustateurs de noter l'intensité de l'amertume perçue pour chaque modalité sur une échelle linéaire non structurée de 0 à 7.

Les modalités sont rendues anonymes par un code à 3 chiffres et sont proposées simultanément aux dégustateurs dans un ordre aléatoire et variable, généré par le logiciel FIZZ, afin de minimiser l'influence de l'ordre de la dégustation. Il est demandé aux

dégustateurs de se rincer la bouche et de patienter 30 secondes entre chaque verre en raison de la rémanence caractéristique de la saveur amère.

2. Résultats

Afin d'étudier l'effet de la teneur en éthanol sur la perception de l'amertume, deux vins blancs sont sélectionnés pour leur caractère amer très différent. Ces deux vins ont été ramenés à des teneurs en alcool de 4 % (M1 ; M5) et 12,5 % vol. (M4 ; M8) et l'intensité de leur amertume est évaluée par les dégustateurs.

Les hypothèses d'homogénéité des variances et de normalité des résidus sont confirmées, respectivement par les tests de Levene ($p\text{-value} = 0,551$) et de Shapiro-Wilks ($p\text{-value} = 0,768$) ; l'ANOVA peut donc être appliquée. Les résultats de la dégustation montrent un effet « modalité » significatif au seuil de 0,1 % ($p\text{-value} = 5,7 \times 10^{-13}$), ce qui signifie qu'au moins une des modalités est perçue différemment des autres.

Le test *post-hoc* de Tukey vise à classer les modalités par groupes significativement différents. La comparaison multiple des moyennes (**Figure 7**) montre que les modalités M1, M2, M3, M4, M5 et M6 sont significativement différentes de la modalité M7 au risque de 5 %, mais également significativement différentes de la modalité M8 au risque de 0,1 %.

Cette comparaison multiple de moyenne montre l'existence de deux groupes significativement distincts : le groupe « a », caractérisé par une faible amertume, comporte les modalités M1 à M6 et le groupe « b » plus amer, est constitué des modalités M7 et M8 (**Figure 7**). Ainsi, l'amertume de la modalité à 12,5 % vol. du *Vin 2* est perçue plus intense que celle de la modalité équivalente du *Vin 1*, ce qui confirme le choix initial des deux vins. La perception amère n'augmente pas avec la teneur en alcool pour le *Vin 1* (amertume faible), tandis que pour le *Vin 2*, les deux modalités les plus riches en éthanol sont perçues plus amères.

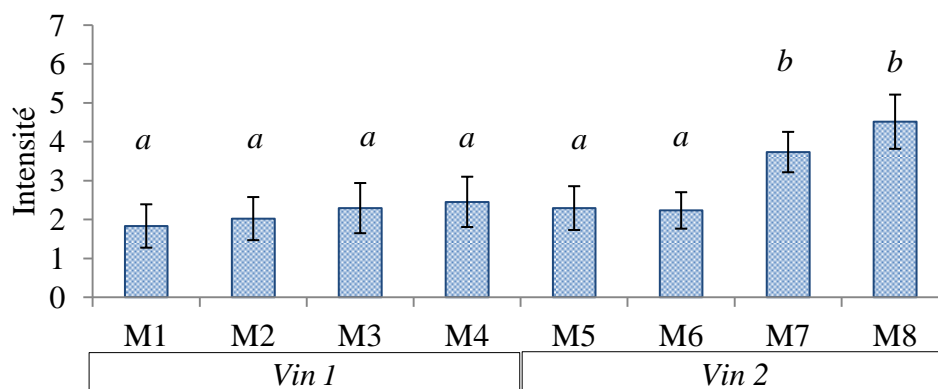


Figure 7. Intensité des modalités et appartenance aux groupes « a » et « b ».

3. Discussion

Cette expérience d'analyse sensorielle permet de préciser l'effet de l'éthanol sur la perception de l'amertume. Dans le *Vin 1*, la saveur amère n'est pas modifiée par l'augmentation de la concentration en éthanol, contrairement au *Vin 2*. En effet, à une teneur en alcool de 10 % et de 12,5 % on distingue le vin amer de celui qui ne l'est pas, alors qu'à 4 % et à 7 % aucune différence n'est perçue. Cela suggère que l'éthanol n'augmente pas directement l'amertume mais qu'il permet de la révéler.

En outre, un effet seuil est mis en évidence pour le *Vin 2*, dont l'amertume n'est perçue qu'à partir de 10 % vol..

Ces résultats corroborent les études de Fontoin *et al.* (Fontoin *et al.*, 2008) et de Fischer et Noble (Fischer *et al.*, 1994) qui rapportent l'effet révélateur de l'éthanol sur l'amertume de composés phénoliques, bien que ces travaux n'utilisent pas les mêmes matrices et qualité d'éthanol. L'analyse sensorielle a donc permis de mettre en évidence l'effet indirect de l'éthanol sur le goût d'un vin, dont l'amertume est révélée à partir de 10 %.

Conclusion

S'il apparaît que l'éthanol n'a pas d'incidence significative sur la perception de la saveur sucrée, cette étude préliminaire démontre sa contribution à l'amertume des vins. Or, le goût d'un vin résulte d'un équilibre entre les différentes substances sapides. La recherche de tels composés nécessite l'utilisation d'une matrice permettant la révélation de leurs propriétés sensorielles. Suite à cette étude préliminaire, une solution hydro-alcoolique à 12 % vol. a donc été sélectionnée pour réaliser les dégustations des protocoles de purification mis en œuvre dans l'ensemble de ce travail.

CHAPITRE 2 - ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LES COMPOSÉS DU BOIS DE CHÊNE INFLUENCANT LES PROPRIÉTÉS SENSORIELLES DU VIN

Introduction

Le vin évolue tout au long de sa vinification, mais également lors de son élevage en barriques. Cette étape est essentielle à l'élaboration des grands vins rouges et de certains vins blancs. Au cours de ce vieillissement, les vins subissent des modifications de leur composition chimique et de leurs qualités organoleptiques. En pratique, on observe un apport aromatique par des notes de vanille, de noix de coco et d'épices ainsi qu'un gain de saveur, notamment de sucrosité et parfois d'amertume. Plusieurs essences de bois peuvent être utilisées par les tonneliers au cours de l'élaboration des barriques, mais les meilleurs fûts sont constitués de chêne sessile (*Quercus petraea* L.) et, dans une moindre mesure, de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.).

Les modifications au cours de l'élevage en barriques se traduisent chimiquement par l'apport de composés volatils et non-volatils (**Figure 8**). Ces molécules peuvent soit être présentes dans le bois à l'état natif, soit résulter de transformations lors de la fabrication des barriques, soit être formées par réaction avec des composés du vin. Les travaux menés sur le bois de chêne depuis plusieurs décennies ont contribué à interpréter certaines modifications de couleur, d'arômes, de goût ou de sensations tactiles subies par le vin au cours de son élevage.

I. Influence de l'élevage sous bois de chêne sur la couleur des vins rouges

Les anthocyanes, les tanins (pigments rouges) et leurs produits de réaction sont les principaux composés responsables de la couleur des vins (Ribéreau-Gayon, 1973). L'élevage en barriques permet l'oxydation du vin par la pénétration d'oxygène qui, en présence d'éthanol, d'ions métalliques et de composés phénoliques, mène à la formation d'acétaldéhyde (Wildenradt *et al.*, 1974). Cela provoque des réactions de copolymérisation entre anthocyanes et tanins. Ainsi, il en résulte une augmentation et une stabilisation de la couleur des vins (Somers, 1971 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1983). Cependant, l'oxygénation n'est pas le seul phénomène qui contribue aux modifications de la couleur des vins lors de l'élevage en barriques.

Plus récemment, Chassaing *et al.* (2010) ont en effet interprété la modification de la couleur, du rouge au violet, observée au cours de l'élevage des vins en barriques. La substitution nucléophile d'un ellagitanin libéré par le bois de chêne, la vescalagine, sur le carbone C₁ d'une anthocyane du raisin, l'oenine (ou malvidin-3-O-glucoside) en milieu acide

(Chassaing *et al.*, 2010) conduit à la formation d'un composé dont la longueur d'onde d'absorption diffère de celle de l'oénine. Cette réaction participe ainsi à la modification chromatique des vins et à la stabilisation de sa couleur.

II. Influence de l'élevage sous bois de chêne sur l'arôme des vins

L'apport aromatique du bois de chêne lors du vieillissement des vins a été largement étudié. Ces derniers expriment des notes de vanille, de noix de coco, d'épices mais également de café. Les déterminants moléculaires volatils (**Figure 8**) responsables de ces odeurs ont été respectivement identifiés comme étant la vanilline (**Q**), la β -méthyl- γ -octalactone (**R**) (ou whisky-lactone), des phénols volatils comme l'eugénol (**S**) et le 2-furanéméthanethiol (**T**) (Chatonnet, 1995b ; Tominaga *et al.*, 2000).

Plusieurs paramètres peuvent influencer leur teneurs dans le bois et dans les vins, tels que les origines botanique et géographique du chêne, les conditions de maturation du bois mais également des paramètres de tonnellerie comme le type de chauffe utilisé (durée et température) (Chatonnet *et al.*, 1989 ; Sarni *et al.*, 1990 ; Chatonnet, 1995a ; Masson *et al.*, 1995 ; Doussot *et al.*, 2002 ; Prida *et al.*, 2006).

III. Influence de l'élevage sous bois de chêne sur l'astringence des vins

La majorité des travaux sur les composés non-volatils du bois de chêne ont porté sur les ellagitanins (Vivas *et al.*, 1996 ; Saucier *et al.*, 2006 ; Quideau *et al.*, 2010 ; Jourdes *et al.*, 2011 ; Chira *et al.*, 2015 ; B. Zhang *et al.*, 2015). Quinn et Singleton (1985) ont montré que cette famille de molécules pourrait participer à l'astringence des vins (Quinn *et al.*, 1985). Des études plus récentes ont confirmé ces résultats. La dégustation d'ellagitanins purifiés du bois de chêne, la grandinine, les roburines A à E, la castalagine (**U**), la vescalagine (**V**) et la 33-déoxy-33-carboxyvescalagine, a permis, conjointement à leur analyses quantitatives dans les vins rouges, d'établir leur contribution à l'astringence (Glabasnia *et al.*, 2006 ; Stark *et al.*, 2010). Une autre étude récente met en évidence une corrélation positive entre les teneurs en ellagitanins et la sensation d'astringence dans des vins élevés en barriques (Chira *et al.*, 2013 ; Michel *et al.*, 2016). Cependant, d'autres travaux tendent à montrer que l'impact direct de ces ellagitanins demeure limité (Herve Du Penhoat *et al.*, 1991 ; Masson *et al.*, 1995 ; Puech *et al.*, 1999 ; Chira *et al.*, 2015).

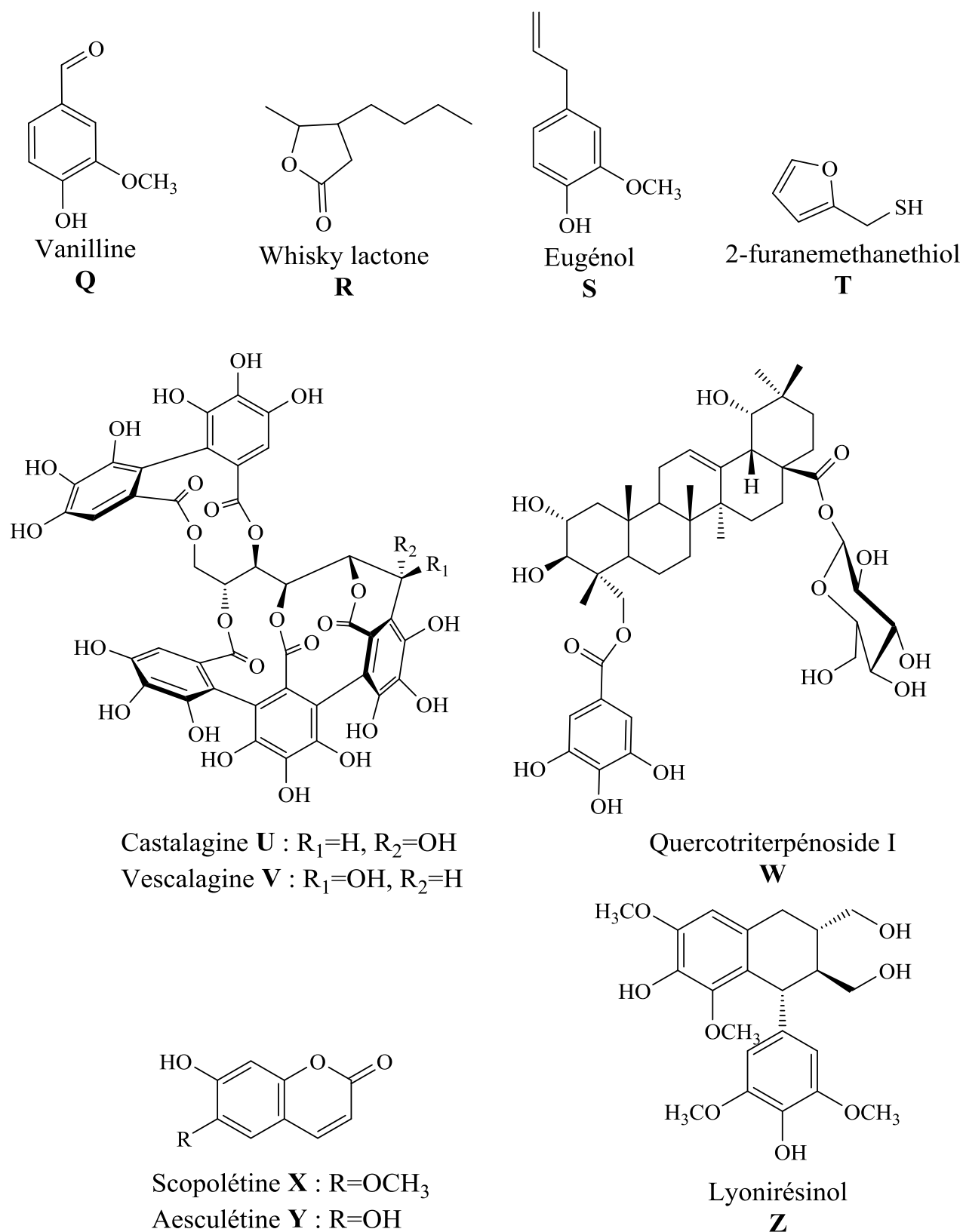


Figure 8. Quelques composés d'impact extraits du bois de chêne.

IV. Influence de l'élevage sous bois de chêne sur le goût des vins

A. Effet sur la sucrosité

Le gain de douceur au cours de l'élevage du vin en barriques, observé empiriquement par les vinificateurs, n'a été démontré et élucidé que récemment (Marchal *et al.*, 2013). Cette sucrosité perçue lors du vieillissement du vin n'est pas due à l'extraction de sucres, puisque le bois de chêne n'en libère que de très faibles teneurs, non significatives d'un point de vue sensoriel. En revanche, de nouveaux triterpènes du bois de chêne, les Quercotriterpénosides I (**W**), II, III et VI, ont été découverts par Marchal *et al.* en 2010 (Marchal, 2010 ; Marchal *et al.*, 2011b ; Marchal *et al.*, 2013). Ces molécules possèdent une saveur sucrée intense, avec un seuil de détection estimé à 590 µg/L pour le QTT I et permettent d'explicitier la contribution de l'élevage à la perception de la douceur des vins boisés. Elles sont plus abondantes dans le chêne sessile que dans le chêne pédonculé, ce qui peut être relié à l'utilisation privilégiée du bois de *Q. petraea* pour la fabrication des barriques destinées à l'élevage des vins (Marchal *et al.*, 2015d).

B. Effet sur l'amertume

Une utilisation excessive ou mal adaptée du bois de chêne peut conduire à une dépréciation gustative des vins par une perception exacerbée de la saveur amère. Glabasia et Hofmann ont mis en évidence le caractère amer de certains ellagitanins, tels que la roburine E, la grandinine, la 33-déoxy-33-carboxyvescalagine, la castalagine (**U**) et la vescalagine (**V**). Cependant, les concentrations de ces ellagitanins retrouvés dans les vins demeurent inférieures à leur seuil de détection (Glabasia *et al.*, 2006 ; Stark *et al.*, 2010 ; S. Frank *et al.*, 2011), ce qui nuance leur importance gustative.

De la même manière, l'apport des coumarines (scopolétine **X** et aesculétine **Y**) à l'amertume des vins boisés apparaît négligeable. En effet, ces molécules présentent certes une forte amertume (Vivas, 1997), mais leurs concentrations dans les vins boisés sont bien inférieures à leur seuil de détection et dépendent du type de séchage du bois (Chatonnet *et al.*, 1994).

Enfin, plus récemment, la contribution amère du lyonirésinol (**Z**) (Marchal *et al.*, 2013) a été étudiée. Ce lignane, présent notamment dans le genre *Quercus* (Seikel *et al.*, 1971 ; Nabeta *et al.*, 1987 ; Vivas *et al.*, 1998), a été décrit comme l'un des constituants des vins élevés sous bois (Moutounet *et al.*, 1989). Son seuil de détection a été établi à 1,5 mg/L dans un vin blanc sec. Dans les vins boisés, il est présent à des concentrations supérieures à cette valeur, ce qui établit clairement sa contribution à l'amertume des vins (Marchal *et al.*, 2014).

CHAPITRE 3 - ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ CHIMIQUE DES LIGNANES DU BOIS DE CHÊNE ET ÉTUDE DE LEURS PROPRIÉTÉS SENSORIELLES

Introduction

Si les propriétés amères du lyonirésinol n'ont été décrites que très récemment (Marchal *et al.*, 2013), sa présence était connue depuis quelques dizaines d'années dans le bois de chêne (Nabeta *et al.*, 1987 ; Arramon, 2001), les eaux-de-vie (Nabeta *et al.*, 1987 ; Arramon, 2001 ; Koga *et al.*, 2007), mais également les vins (Moutounet *et al.*, 1989). D'autres lignanes ont par ailleurs été identifiés dans le bois de chêne, comme le lyonirésinol 3- α -O- β -D-glucopyranoside (Arramon, 2001), l'isolaricirésinol et le secoisolaricirésinol (Nonier *et al.*, 2009). Toutefois, cette famille de composés phénoliques a fait l'objet d'assez peu d'études dans le vin et le bois.

Les lignanes constituent une classe de métabolites secondaires produits dans les plantes par la voie des phénylpropanoïdes via l'acide shikimique. On les trouve dans les racines, les pépins, les fruits et les parties lignifiées des plantes vasculaires (Ayles *et al.*, 1990). Les fonctions biologiques des lignanes ne sont pas encore totalement comprises. Toutefois, leurs propriétés anti-fongiques (Ayles *et al.*, 1990), anti-virales (MacRae *et al.*, 1989), insecticides et anti-appétantes (Harmatha *et al.*, 2003) indiquent qu'ils sont impliqués dans les défenses des plantes contre les maladies et les insectes nuisibles. Ils peuvent également participer à la croissance et au développement de la plante (Ayles *et al.*, 1990). De plus, ils possèdent des activités biologiques susceptibles d'être intéressantes pour la santé humaine, telles que des propriétés cardiovasculaires (Ghisalberti, 1997 ; Tibiriçá, 2001), des activités anti-cancéreuses, anti-inflammatoires, anti-microbiennes, anti-oxydantes et immunosuppressives (Saleem *et al.*, 2005).

Les lignanes sont présents dans de nombreux aliments et boissons (Nesbitt *et al.*, 1997 ; W. Mazur, 1998 ; W. M. Mazur *et al.*, 1998 ; Liggins *et al.*, 2000). En particulier, certains lignanes et néolignanes, dérivés du laricirésinol, de l'isolaricirésinol et du secoisolaricirésinol ont été identifiés dans les vins de Riesling (Marinos *et al.*, 1992 ; Baderschneider *et al.*, 2001) et dans les vins rouges (Nurmi *et al.*, 2003). En outre, selon une étude de Milder *et al.* (2005), le vin constitue la boisson courante la plus riche en lignanes (Milder *et al.*, 2005), avec une quantité totale de secoisolaricirésinol, matairésinol, laricirésinol, syringarésinol et d'isolaricirésinol variant de 354 μ g/L à 1,4 mg/L.

Parmi les lignanes observés dans le vin, seul le lyonirésinol a fait l'objet d'études sensorielles et sa contribution à l'amertume des vins boisés a été établie. Or, la perception du

goût étant provoquée par l'interaction entre des molécules sapides et leur récepteur, il a donc semblé pertinent d'étudier des composés chimiques de structures proches du lyonirésinol, susceptibles de développer des goûts similaires. A cette fin, de nouveaux lignanes du bois de chêne ont été recherchés par une approche ciblée, dans le cadre du stage de Master 2 de Lauriane Sindt. Dans un premier temps, la présence d'analogues structuraux du lyonirésinol a été étudiée par criblage (« screening ») d'un extrait de bois de chêne. Puis, la mise en œuvre de techniques séparatives a permis de fractionner cet extrait et d'isoler les molécules cibles afin de les identifier et de caractériser leurs propriétés gustatives.

I. Recherche de lignanes par criblage LC-FTMS du bois de chêne

A. Matériel et méthodes

Une extraction solide/liquide du duramen de *Quercus petraea* (1,5 kg) a été réalisée en solution hydro-alcoolique (H₂O/EtOH : 50/50, 6 L), à température ambiante, pendant deux semaines.

Puis, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à Transformée de Fourier (LC-FTMS) de type Exactive™, a été utilisée dans le cadre du criblage de l'extrait de bois de chêne. Une liste de dérivés du lyonirésinol potentiellement présents dans l'extrait a été établie, puis les masses exactes théoriques des ions quasi-moléculaires associées à ces composés ont été calculées et recherchées à l'aide de l'application Qualbrowser du logiciel Xcalibur.

La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne de type C18 et un gradient H₂O/ACN a été sélectionné afin d'avoir une séparation optimale des composés présents dans l'extrait de bois (**Tableau 9**).

Tableau 9. Conditions chromatographiques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne.

Appareil :	U-HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific)									
Logiciel :	Xcalibur 2.1 pour Exactive									
Détecteur UV :	Accela PDA 1 cm LightPipe Flow cell									
Colonne :	Hypersil Gold C18 (Thermo Fischer Scientific)									
	100 x 2,1 mm									
	Taille des particules 1,9 µm									
Phase mobile :	Débit : 600 µL/min									
	Solvant A : H ₂ O ultrapure									
	Solvant B : ACN LC-MS Optima (Thermo Fischer Scientific)									
Gradient :										
	Temps (min) :	0	0,5	1,5	2	4,5	4,6	6,9	7	8,6
	% de B :	14	14	19	19	38	98	98	14	14
Injection :	5 µL à l'aide d'un passeur automatique HTC0 Pal équipé de « racks » réfrigérés									

Comme les composés cibles sont des dérivés du lyonirésinol, les conditions d'ionisation sont optimisées à partir de ce composé (**Tableau 10**).

Tableau 10. Conditions spectrométriques et d'ionisations utilisées pour le criblage de l'extrait de bois de chêne.

Paramètre	Mode négatif
Débit du « sheath gas » ^a	75
Débit du gaz auxiliaire ^a	18
Débit du « sweep gas »	0
Tension du spray	-3 kV
Température du capillaire	350 °C
Tension du capillaire	-60 V
Tension du tube lens	-135 V
Tension du skimmer	-26 V
Température de la source	320 °C
Résolution ^b	25 000
AGC	5.10 ⁵
Gamme masses	200-800 Th

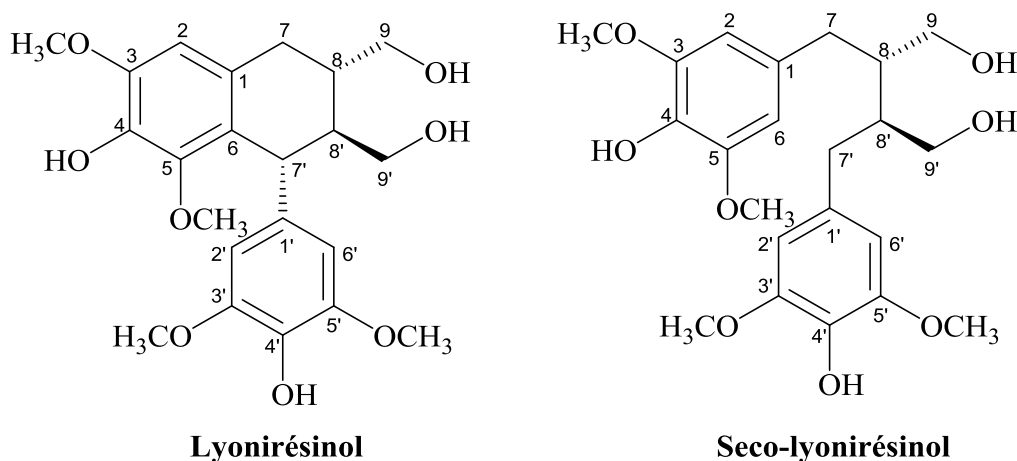
^a Le débit du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) est exprimé en unités arbitraires.

^b Résolution $m/\Delta m$, fwhm à m/z 200 Th.

B. Résultats et discussion

La recherche de molécules, dont certaines peuvent être présentes à faible concentration, dans une matrice complexe, requiert une méthode analytique spécifique, résolutive et sensible. Le couplage U-HPLC-FTMS est utilisé dans cette étude. Une colonne analytique chromatographique possédant une taille de particules inférieure à 2 µm permet de séparer un grand nombre de molécules dans un temps court (ici 8,6 min), ce qui répond au critère de résolution. La grande précision de mesure de masse de l'analyseur Orbitrap (< 5 ppm) permet de rechercher des rapports m/z associés aux formules brutes des ions quasi-moléculaires retenus, assurant ainsi la spécificité de l'appareil. Enfin, des limites de détection de l'ordre du microgramme par litre sont fréquemment observées avec cet instrument, notamment pour le lyonirésinol (Marchal *et al.*, 2015a). Le critère de sensibilité est également satisfait.

La LC-FTMS est donc retenue pour réaliser le criblage à partir d'une macération hydro-alcoolique de copeaux de bois mûré et non chauffé. Pour cela, une liste non exhaustive de lignanes dérivés du lyonirésinol est établie après une étude bibliographique des groupements fonctionnels fréquemment observés dans les molécules du bois de chêne. Des précurseurs du lyonirésinol dans sa voie de biosynthèse (Rahman *et al.*, 2007) sont également recherchés. Puis, la masse exacte théorique de leur ion quasi-moléculaire est calculée sur la base de leur formule brute (**Figure 9**). L'analyse en LC-FTMS cible ces ions afin de confirmer ou non leur présence et, dans le premier cas, de déterminer leur abondance.



Lyonirésinol	formule	m/z [M-H] ⁻	Seco-lyonirésinol	formule	m/z [M-H] ⁻
- CH ₂ O	C ₂₁ H ₂₆ O ₇	389,1606	- CH ₂ O	C ₂₁ H ₂₈ O ₇	391,1762
+ C ₄ H ₆ O ₃	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	521,2028	+ C ₄ H ₆ O ₃	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁	523,2184
+ C ₅ H ₈ O ₄	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	551,2133	+ C ₅ H ₈ O ₄	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₂	553,2290
+ C ₆ H ₂ O ₃	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₁	541,1715	+ C ₆ H ₂ O ₃	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₁	543,1871
/	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	419,1712	/	C ₂₂ H ₃₀ O ₈	421,1869
+ C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	581,2241	+ C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₂₈ H ₄₀ O ₁₃	583,2396
+ C ₇ H ₄ O ₄	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₂	571,1820	+ C ₇ H ₄ O ₄	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₂	573,1977
+ C ₁₁ H ₁₈ O ₉	C ₃₃ H ₄₆ O ₁₇	713,2662	+ C ₁₁ H ₁₈ O ₉	C ₃₃ H ₄₈ O ₁₇	715,2818
+ C ₁₃ H ₁₄ O ₉	C ₃₅ H ₄₂ O ₁₇	733,2349	+ C ₁₃ H ₁₄ O ₉	C ₃₅ H ₄₄ O ₁₇	735,2505
+ C ₁₀ H ₁₆ O ₈	C ₃₄ H ₄₀ O ₁₆	703,2243	+ C ₁₀ H ₁₆ O ₈	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₆	705,2400

Figure 9. Structures théoriques de lignanes dérivés du lyonirésinol et masses des ions moléculaires recherchées par LC-FTMS dans l'extrait de bois de chêne.

L'analyse des chromatogrammes d'ions extraits correspondants aux masses théoriques des analogues structuraux du lyonirésinol révèle la présence de 9 pics chromatographiques bien résolus, dont 7 correspondent à des formules brutes différentes (2 séries de 2 isomères). Chacun d'entre eux peut donc correspondre à un lignane : ils constituent des composés cibles (**Figure 10**) et un protocole de purification est développé afin de les isoler et d'étudier leurs caractéristiques structurales et sensorielles.

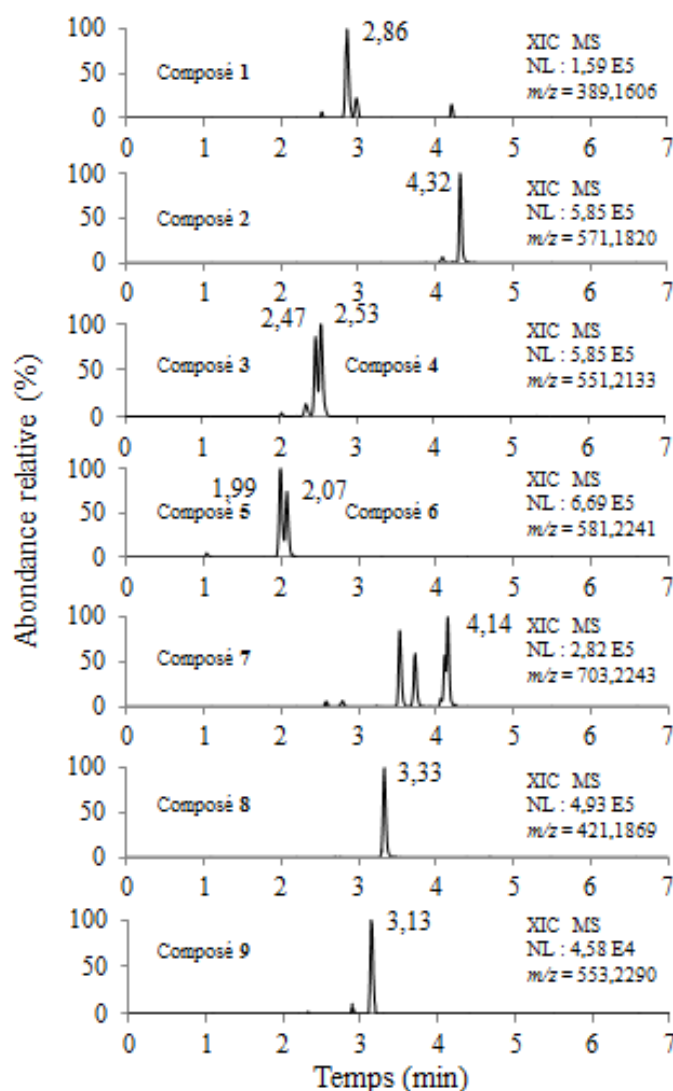


Figure 10. XIC en ionisation négative correspondant aux ions $[M-H]^-$ des composés 1 à 9 (de haut en bas) dans un extrait de bois de chêne ($m/z \pm 5$ ppm).

II. Purification des composés cibles du bois de chêne

A. Matériel et méthodes

1. Extraction liquide/liquide

Un premier fractionnement de l'extrait a été réalisé par extractions L/L à l'aide de solvants de polarité croissante (AcOEt et BuOH). Une ampoule à décanter de 2 L a été remplie avec les 800 mL de phase aqueuse et 400 mL d'AcOEt de qualité HPLC. Après agitation et dégazage, les deux phases ont été séparées par décantation. Cette opération est répétée 2 fois. La phase aqueuse résiduelle a alors été extraite au BuOH, selon le même processus, avec 5 extractions. Les phases organiques ont été regroupées en fonction du solvant d'extraction, évaporées à sec, suspendues dans de l'eau avant d'être lyophilisées. Les

lyophilisats ont été obtenus sous forme de poudres brun foncé : 9,342 g de fraction **AcOEt** et 9,462 g de fraction **BuOH**. L'analyse LC-FTMS des extraits pré-purifiés a permis de vérifier la présence des composés cibles **1** à **9**.

2. Chromatographie de Partage Centrifuge

Les extraits pré-purifiés **AcOEt** et **BuOH** ont été fractionnés par CPC afin d'obtenir des fractions enrichies en lignanes. Due à une large disparité de polarité des composés cibles, deux systèmes de solvants ont été utilisés pour les composés non-glycosylés (présents dans l'extrait pré-purifié **AcOEt**) et les composés glycosylés (présents dans l'extrait pré-purifié **BuOH**). Le choix des systèmes a été basé sur l'étude des coefficients de partage des composés cibles dans les deux phases. Pour cela, divers systèmes ont été préparés en faible quantité (quelques mL) à partir des solvants considérés. Parallèlement, des piluliers ont été remplis avec chacun 1 mg de l'échantillon à fractionner. Chaque pilulier a été complété avec 1 mL de phase supérieure et 1 mL de phase inférieure d'un système donné. Après agitation, 100 µL de chaque phase ont été prélevés, évaporés à l'aide d'un évaporateur sous vide RapidVap, repris dans 1 mL de solution H₂O/MeOH : 50/50. Les divers échantillons ont alors été injectés en LC-FTMS et la partition des composés dans les deux phases a été estimée à l'aide de l'aire des pics enregistrés sur les chromatogrammes. Le **Tableau 11** et le **Tableau 12** récapitulent les systèmes testés et les coefficients de partages des composés cibles, respectivement, pour l'extrait pré-purifié **AcOEt** et pour l'extrait pré-purifié **BuOH**.

Tableau 11. Systèmes testés de la gamme Arizona et Arizona modifiée et coefficients de partage des composés **1**, **2** et **8**.

		Gamme Arizona															Gamme Arizona modifiée														
		A	B	C	D	F	G	D _{1/2A}	D _{1A}	F _{1/2A}	F _{1A}	G _{1/2A}	G _{1A}	D _{1/2M}	D _{1M}	F _{1/2M}	F _{1M}	G _{1/2M}	G _{1M}												
Solvants	Hept	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1											
	AcOEt	1	19	9	6	5	4	6	6	5	5	4	4	3	0	2,5	0	2	2	0											
	MtBE							-	-	-	-	-	-	3,63	7,27	3,03	6,06	2,42	4,84												
	MeOH	0	1	1	1	1	1	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0											
	ACN							0,64	1,29	0,64	1,29	0,64	1,29	-	-	-	-	-	-	-											
K ₂	H ₂ O	1	19	9	6	5	4	6	6	5	5	4	4	6	6	5	5	4	4	4											
	1	0,3	0,4	0,7	1,1	1,3	1,7	0,7	0,6	1,1	0,7	1,4	1,1	1,9	4,8	3,6	4,1	2,3	6,3												
	2	0	0,1	0,2	0,3	0,4	1,3	0,2	0,1	0,3	0,3	0,6	0,4	0,6	2,0	1,3	1,7	1,2	3,4												
K ₃	8	0,6	0,8	1,3	1,9	2,2	2,8	1,2	1,0	1,8	1,1	2,1	1,6	4,2	14,5	7,1	11,5	4,0	16,6												

Tableau 12. Systèmes testés de type « pont » et coefficients de partage des composés **3, 4, 5, 6, 7** et **9**.

Systèmes Pont														
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	P ₈	P ₁₀	P ₁₁	P ₁₂	P ₁₃	P ₁₄
AcOEt	50	25	10	5	4	5	4	50	25	10	5	4	3	2
ACN	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
iPrOH	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O	50	25	10	5	4	5	4	50	25	10	5	4	3	2
3/4	11,5	11,3	9,3	7,2	6,4	9,1	7,8	11,8	10,2	7,3	4,7	3,6	2,5	1,7
5/6	66,1	57,7	44,7	31,8	26,2	31,1	24,7	56,6	47,2	30,9	14,7	10,6	6,0	3,3
7	81,1	72,5	54,9	45,4	34,6	47,6	31,2	69,5	57,7	43,0	21,5	11,3	7,2	4,2
9	20,4	19,1	14,8	10,4	9,6	11,8	9,59	21	16,8	11,3	5,7	4,7	2,9	1,7

Afin que les composés soient élués à des temps de rétention différents et que leur séparation soit réussie, il est nécessaire que leurs coefficients de partage d'un système donné présentent des écarts. Ainsi, le système de la gamme Arizona modifié G_{1A} (Hept/AcOEt/ACN/H₂O : 1/4/1,29/4) et le système « pont » P₁₄ (AcOEt/iPrOH/H₂O : 2/1/2) ont été respectivement choisis pour les extraits pré-purifiés **AcOEt** et **BuOH**. Les systèmes ont été préparés dans une ampoule à décanter par mélange des solvants dans les proportions adéquates des systèmes. Après agitation, les deux phases sont séparées par décantation et dégazées dans un bain à ultrasons.

La CPC est utilisée en mode ascendant, la phase inférieure constitue donc la phase stationnaire **A** et la phase supérieure constitue la phase mobile **B**. Dans un premier temps, la phase **A** est pompée dans le rotor, dont la vitesse de rotation est fixée à 1250 rpm. Puis la phase **B** est pompée afin de procéder à l'équilibration de la colonne. Pour le fractionnement par CPC des extraits **AcOEt** et **BuOH**, les volumes de phase stationnaire rejetées, correspondant aux volumes de phase mobile dans la colonne, sont respectivement de 320 mL et 350 mL, et les pressions à l'équilibre de 48 bar et 49 bar. La méthode d'analyse *I* utilisée est présentée dans le **Tableau 13**.

Tableau 13. Méthode d'analyse *I* utilisée en CPC pour les extraits pré-purifiés **AcOEt** et **BuOH**.

	Méthode d'analyse <i>I</i> Rotor 1L		Mode ascendant			
	Début (min)	Fin (min)	Débit (mL/min)	Rotor (rpm)	% A	% B
Équilibration	0	20	40	0	100	0
	20	60	25	500	100	0
	60	65	25	1250	100	0
	65	100	25	1250	0	100
Élution	0	120	25	1250	0	100
Extrusion	120	165	40	1250	100	0

La totalité de chaque extrait, **AcOEt** et **BuOH**, a été solubilisée dans 30 mL du mélange biphasique puis filtrée à 0,45 µm. Le filtrat, dont les deux phases étaient bien séparées, a été injecté dans le système chromatographique avant le début de l'élution. La détection UV a été fixée à 254 et 280 nm et le collecteur de fraction a été réglé à 1 tube/min.

A la fin de l'expérience, 192 tubes ont été collectés et une aliquote de 100 µL a été prélevée tous les 10 tubes, évaporée à sec au RapidVap, puis dissoute dans 1 mL d'un mélange H₂O/MeOH : 95/5 et analysée par LC-FTMS. L'analyse des profils

chromatographiques a permis de regrouper les tubes contenant les composés cibles afin de former respectivement 9 et 4 fractions pour les extraits **AcOEt** et **BuOH**.

3. Chromatographie sur phase solide (SPE)

Cette étape de préparation d'échantillons a permis l'enrichissement des fractions en composés d'intérêt tout en diminuant leurs masses totales. Seules les fractions **BuOH-3** et **-4** ont été traitées par SPE.

Après plusieurs essais de cartouches SPE, la cartouche chromatographique de type Oasis HLB 1 g (Waters, France) a été choisie. Cette cartouche, en comparaison avec une cartouche silice-C18 classique, présente l'avantage de posséder une plus grande capacité de charge et une meilleure rétention des composés polaires. Aussi, en termes d'utilisation pratique, le conditionnement de la colonne est simplifié puisque l'assèchement de la colonne n'est pas destructif.

L'échantillon à traiter a été repris dans 20 mL d'eau ultra-pure et chargé sur la colonne avant de procéder à des éluions selon les volumes présentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14. Gradient d'éluion des SPE réalisées sur les fractions **BuOH-3** et **-4** avant purification.

Volume (mL)	40	40	40	40	20	20	40	60
% MeOH	15	20	25	30	35	40	45	100

L'éluion a été réalisée à un débit constant (environ 1 mL/min) grâce à une pompe à vide et un manifold. Chaque éluat a été analysé en LC-FTMS afin de sélectionner les fractions contenant les composés cibles qui sont ensuite lyophilisées.

4. HPLC semi-préparative

La dernière étape de purification des composés cibles a été réalisée par HPLC semi-préparative. Elle a nécessité la mise au point de gradients adaptés. Celle-ci a été réalisée à l'aide de la LC-FTMS, en utilisant des colonnes analytiques de phase identique aux colonnes de taille semi-préparative disponibles pour les purifications.

La colonne semi-préparative Atlantis T3 Prep OBD (19 x 250 mm, 5 µm, Waters) a été choisie ici. La phase mobile était constituée d'un mélange H₂O + 0,05 % de TFA (phase **A**) et d'ACN + 0,05 % de TFA (phase **B**). Le débit a été fixé à 20 mL/min et deux gradients optimisés ont été utilisés afin de séparer au mieux les composés de la fraction **AcOEt**

(Gradient I) et ceux de la fraction **BuOH** (Gradient II). Les conditions chromatographiques utilisées sont détaillées dans le **Tableau 15**.

Tableau 15. Gradients utilisés en HPLC semi-préparative pour la purification des composés cibles.

Gradient I	Temps (min)	0	5	15	19	30	35	36	48	49	60
	% B	17	17	23	23	38	80	100	100	17	17
Gradient II	Temps (min)	0	5	30	40	45	46	54	56	60	
	% B	15	15	20	30	80	100	100	15	15	

Les échantillons ont été préparés dans 500 μL de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$: 50/50, filtrés à 0,45 μm puis injectés. Une première injection de 5 mg a permis de contrôler l'efficacité de la séparation et de déterminer les temps de rétention des composés. Puis, le reste des échantillons a été injecté par des aliquotes successives de 20 mg. La détection UV a permis de suivre l'élution des composés et de les collecter manuellement à la sortie du système. Une aliquote de 50 μL de chaque tube a été prélevée, diluée 10 fois avec de l'eau ultra-pure, et injectée en LC-FTMS afin de vérifier la pureté des composés. Les tubes de composés purs de chaque injection ont ensuite été regroupés et lyophilisés.

B. Résultats et discussion

La première étape d'évaporation du macérat est indispensable pour éliminer l'éthanol susceptible de perturber la partition des composés dans le système biphasique $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOEt}$. Elle réduit également le volume initial de la phase aqueuse, et donc les quantités de solvant nécessaires pour les extractions L/L.

L'extraction L/L permet un premier fractionnement de l'extrait ainsi que l'élimination de composés non recherchés. L'analyse LC-FTMS met en évidence la présence des composés non-glycosylés dans l'extrait **AcOEt** et des composés glycosylés dans l'extrait **BuOH** (**Figure 11**).

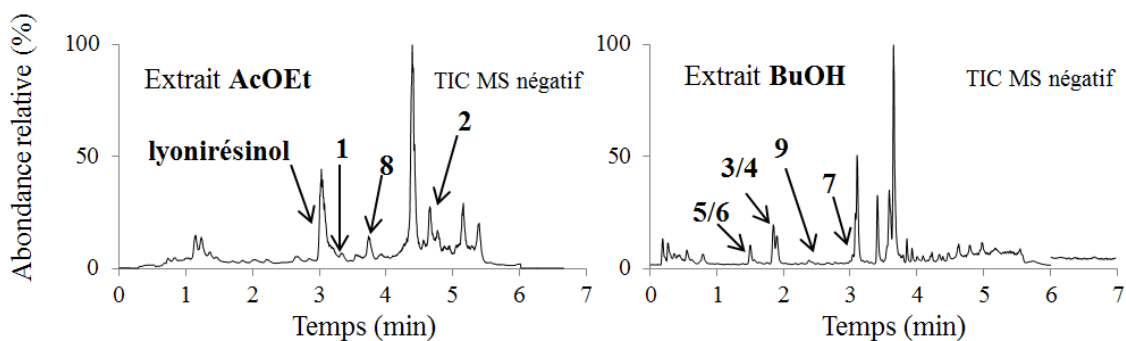


Figure 11. TIC en ionisation négative des extraits **AcOEt** (à gauche) et **BuOH** (à droite).

Au vu des profils chromatographiques complexes et des masses conséquentes obtenues pour les extraits pré-purifiés **AcOEt** et **BuOH**, la CPC apparaît bien adaptée à un second fractionnement. Les tests de partage effectués au préalable permettent de choisir les systèmes de solvants adaptés pour une séparation optimale des molécules, avec une consommation de solvants et une durée de purification minimales. Les systèmes testés sont choisis en fonction de la polarité du type d'extrait à fractionner après l'extraction L/L. Les critères déterminants dans le choix des systèmes sont : la solubilisation de l'échantillon et l'obtention d'un K_D relativement proche de 1 (Maciuk, 2005). Ainsi les systèmes G_{1A} et « pont » P_{14} sont choisis pour traiter, respectivement, les extraits **AcOEt** et **BuOH**.

Chaque expérience de CPC a permis le fractionnement de la totalité de chaque extrait en 4 heures avec la consommation d'un minimum de solvant en comparaison à d'autres techniques classiques de chromatographie liquide. La détection UV permet de suivre l'évolution de l'absorption à 254 et 280 nm au cours de la séparation. Les fractions enrichies en lignanes sont constituées par rassemblement des tubes de CPC après analyse en LC-FTMS. Ainsi, 2 fractions d'intérêt pour chaque expérimentation de CPC sont obtenues (**Tableau 16**).

Tableau 16. Fractions d'intérêt après CPC des extraits pré-purifiés **AcOEt** et **BuOH**.

Extrait Pré-purifié	Fractions de CPC	Tubes	Masses obtenues (mg)	Composés
AcOEt	AcOEt-3	41 à 50	144	1, 2
	AcOEt-4	51 à 71	812	8
BuOH	BuOH-3	72 à 108	574	3, 4, 7, 9
	BuOH-4	109 à 151	442	5, 6

Afin de réduire la masse des fractions **BuOH-3** et **-4** et d'enrichir les fractions en composés cibles, une étape supplémentaire par SPE est réalisée avant la purification par HPLC semi-préparative.

De cette manière, le **Tableau 17** présente les masses des fractions enrichies en composés cible obtenues après SPE. On observe une élimination de plus de 50 % de la masse totale de chaque fraction sans perte significative de composés cibles. Cela met en évidence la grande quantité de molécules non recherchées dans les fractions **BuOH-3** et **-4** et la pertinence de cette étape. Le rendement global de la SPE correspond au rapport de la somme des masses des fractions obtenues après SPE sur la masse totale de la fraction de CPC de départ.

Tableau 17. Enrichissement des fractions par SPE avant purification.

Fractions CPC	Masses	Rendement	Fractions SPE	Masses	Lignanes
	Fractions CPC (mg)	SPE (%)		Fractions SPE (mg)	
BuOH-3	574	85	BuOH-3_{SPE}	202,6	3, 4, 7, 9
BuOH-4	442	90	BuOH-4_{SPE}	123,8	5, 6

Enfin, la dernière étape de purification par HPLC semi-préparative est réalisée sur une colonne en phase inverse greffée C18. L'acidification des solvants A et B permet d'améliorer la résolution chromatographique à l'échelle semi-préparative et le TFA est facilement éliminé par évaporation.

Les composés de chaque fraction sont bien séparés avec les gradients choisis (**Figure 12**).

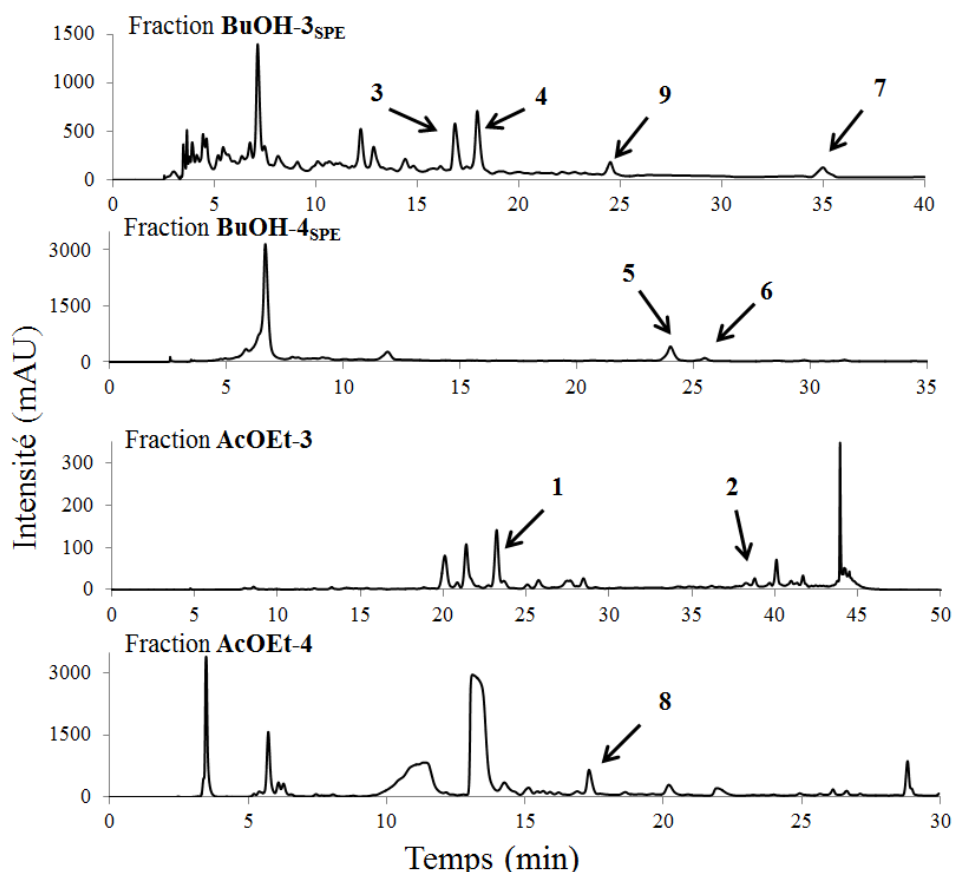


Figure 12. Chromatogrammes UV à 280 nm des extraits **AcOEt-3** et **-4** et **BuOH-3_{SPE}** et **-4_{SPE}** en HPLC semi-préparative.

La collecte manuelle à la sortie du détecteur UV doit être réalisée avec précaution afin d’assurer la pureté des composés récupérés tout en limitant les pertes. Le niveau de pureté est vérifié en LC-FTMS. Les tubes pour lesquels la pureté est supérieure à 95 % sont regroupés et leur contenu est lyophilisé. Neuf composés sont ainsi obtenus sous forme de poudre blanche amorphe. Les masses obtenues des composés **1** à **9** sont présentés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Masses obtenues des composés **1** à **9**.

Composé	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Masse obtenue (mg)	6,7	6,5	7,8	7,9	15	2,5	3,2	9	3

Le développement du protocole de purification guidé par LC-FTMS a permis d’isoler 9 composés, d’une pureté chromatographique supérieure à 95 %. Les quantités obtenues sont suffisantes pour leur caractérisation structurale par RMN et l’étude de leurs propriétés sensorielles.

III. Identification structurale des composés 1 à 9

Les molécules **1** à **9** ont été isolées par une approche ciblée. Leur composition est pressentie mais doit être confirmée par FTMS HCD. En outre, il reste à déterminer leur formule semi-développée par des analyses de RMN 1D et 2D.

A. Matériel et méthodes

1. Fragmentation en cellule de collision

La fragmentation HCD a été utilisée ici pour vérifier la présence de groupements fonctionnels des composés cibles. Les molécules pures à une concentration de 10 mg/L ont été injectées dans le spectromètre de masse en infusion avec un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Une énergie de collision de 30 eV a été appliquée dans la cellule HCD.

2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres mono-dimensionnels ^1H et bi-dimensionnels ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC et ^1H - ^{13}C HMBC ont été réalisés dans du méthanol-*d*4. Les données ont été traitées et comparées à celles de la littérature. Leur interprétation a permis de déterminer la structure moléculaire des composés cibles.

3. Polarimétrie

La mesure du pouvoir rotatoire spécifique est réalisée à 25 °C. Les composés purs sont pesés précisément et solubilisés dans du MeOH pour atteindre une concentration de 0,5 mg/mL.

B. Résultats

Les attributions des signaux RMN ^1H et ^{13}C des composés **1** à **9** sont présentés dans l'ANNEXE 1. À partir des spectres RMN, la structure et la stéréochimie des composés étudiés peuvent être déterminées avec certitude. Ces données viennent confirmer les hypothèses émises sur la base des spectres de fragmentation (**Tableau 19**).

Ainsi, tous les composés isolés sont caractérisés :

Le composé **1** présente un ion quasi-moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 389,1606, qui confirme sa formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_7$. Cette composition diffère de celle du lyonirésinol par l'absence d'un atome de carbone, de deux hydrogènes et d'un oxygène. Il est possible que le composé **1** soit une molécule similaire au lyonirésinol, avec un groupement méthoxy en

moins. L'interprétation des spectres RMN et leur comparaison avec la littérature permet d'établir qu'il s'agit du 5'-méthoxyisolaricirésinol. Ce lignane a déjà été identifié dans de nombreuses espèces (Jutiviboonsuk *et al.*, 2005) mais jamais dans le genre *Quercus*.

Le composé **2**, d'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ m/z 571,1823 et de formule brute $C_{29}H_{32}O_{12}$ possède un ion fragment de $C_{22}H_{29}O_8^-$ ce qui correspond à une perte de neutre de 152,0113 ($C_7H_4O_4$). Ces informations suggèrent que **2** serait un dérivé galloylé du lyonirésinol. Un tel composé n'a jamais été décrit auparavant. Les données RMN 1H et ^{13}C montrent la présence d'une série de signaux correspondant au lyonirésinol, mais également d'un singulet intégrant pour deux protons, à δ_H 7,04 ppm. Ce signal est caractéristique des atomes H-2'' et H-6'' d'une unité gallate, ce qui tend à renforcer l'hypothèse initiale. L'exploitation des spectres bidimensionnels confirme que la molécule **2** possède le lyonirésinol pour génine. Le spectre HMBC montre une corrélation entre les protons en position δ_H 4,36 (H_a-9), 4,17 (H_b-9) et le carbone C-7'' à δ_C 166,9 de l'unité gallate, ce qui établit la position du groupement galloyle sur le carbone 9. Par ailleurs, la configuration relative des carbones stéréogènes du composé **2** a été déduite des constantes de couplage $J_{H-8/H8'}$ = 5,4 Hz caractéristiques d'un couplage $J_{Hax/Heq}$ (Pretsch *et al.*, 2009) et par les spectres ROESY. La présence d'une corrélation NOE entre les protons H-8 et H-7' indiquent que ces protons sont co-faciaux. En conséquence, le composé **2** est le lyonirésinol 9-O-gallate. Ce nouveau lignane est nommé quercorésinol.

Les composés **3** et **4** présentent le même ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ m/z 551,2136. Ce sont donc des isomères de formule brute $C_{27}H_{36}O_{12}$. Leur spectre HCD montre un fragment de formule brute $C_{22}H_{27}O_8^-$, ce qui correspond à une perte de neutre de 132,0423 ($C_5H_8O_4$) par rapport à l'ion quasi-moléculaire. Ces composés pourraient donc être des dérivés du lyonirésinol, portant un groupement pentosyle. L'interprétation des spectres RMN et la comparaison avec la littérature permet de confirmer les hypothèses de structure. Les composés **3** et **4** sont identifiés comme étant le lyoniside ((+)-lyonirésinol 9'-O- β -xylopyranoside) et le nudiposide ((-)-lyonirésinol 9'-O- β -xylopyranoside). Les deux lignanes ont déjà été identifiés dans le bois de *Quercus petraea* (Inoshiri *et al.*, 1987 ; Dadá *et al.*, 1989). Il s'agit de deux diastéréoisomères, qui diffèrent par la configuration absolue de leur génine. En effet, l'étude des cartes ROESY et la comparaison du pouvoir rotatoire mesuré avec les valeurs reportées dans la littérature établissent que les lignanes **3** et **4** ont respectivement pour génine, le (+) et le (-)-lyonirésinol.

Les composés **5** et **6** sont également des isomères d'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ m/z 581,2241, de formule brute $C_{28}H_{38}O_{13}$. La présence de l'ion de formule brute $C_{22}H_{27}O_8^-$ et la

perte de neutre associée de 162,0530 (C₆H₁₀O₅) suggèrent que les composés **6** et **7** pourraient être des dérivés du lyonirésinol portant un groupement hexosyle. L'interprétation des spectres RMN et la comparaison avec la littérature permettent de confirmer cette hypothèse. Les composés **5** et **6** ont été identifiés comme étant le (+)-lyonirésinol 9'-O-β-glucopyranoside et le (-)-lyonirésinol 9'-O-β-glucopyranoside. Ces molécules ont déjà été décrites dans le bois *Quercus petraea* (Dadá *et al.*, 1989). Il s'agit également de deux diastéréoisomères, différant par la configuration absolue de leur génine.

Le composé **7**, d'ion quasi-moléculaire [M-H]⁻ *m/z* 703,2248 et de formule brute C₃₄H₄₀O₁₆ possède des ions fragments de C₂₉H₃₁O₁₂⁻ (*m/z* 571,1812) correspondant à une perte de neutre de 132,0422 (C₅H₈O₄), et de C₇H₅O₅⁻ (*m/z* 169,0138). Cela suggère que le composé **7** pourrait contenir un groupement pentosyle et un galloyl sur une génine de type lyonirésinol. L'interprétation des spectres RMN et la comparaison avec la littérature permettent de confirmer cette hypothèse et ont établi le composé **7** comme étant le (-)-lyonirésinol 9-O-gallate 9'-O-β-xylopyranoside. Une telle structure a récemment été décrite dans *Quercus mongolica* (Omar *et al.*, 2013) avec un pouvoir rotatoire spécifique positif. Or le lignane **7** est lévogyre ([α]_D²⁵ = - 47,3). Il s'agit donc de la première identification de cet isomère.

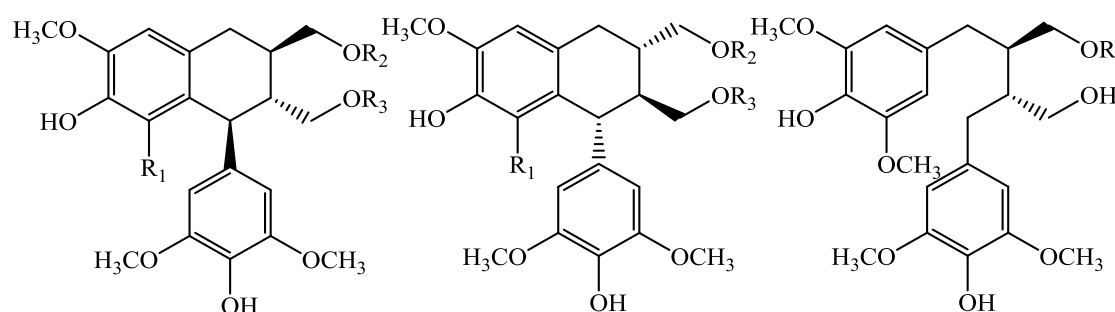
Le composé **8**, d'ion quasi-moléculaire [M-H]⁻ *m/z* 421,1869 et de formule brute C₂₂H₃₀O₈ possède deux hydrogènes supplémentaires par rapport au lyonirésinol (soit une insaturation en moins). L'interprétation des spectres RMN et la comparaison avec les données de la littérature montrent que le composé **8** est le 5,5'-diméthoxysecoisolaricirésinol. Ce lignane a déjà été identifié dans diverses espèces végétales (Pérez *et al.*, 1995 ; Rahman *et al.*, 2007) mais jamais dans le genre *Quercus*.

Le composé **9**, d'ion quasi-moléculaire [M-H]⁻ *m/z* 553,2292 et de formule brute C₂₇H₃₈O₁₂ présente un ion fragment de C₂₂H₂₉O₈⁻ (*m/z* 421,1870), ce qui correspond à une perte de neutre de 132,0422 (C₅H₈O₄). Il comprend donc probablement un groupement pentosyle fixé à une génine de même composition que le lignane **8**. L'interprétation des spectres RMN et la comparaison avec les données de la littérature confirment cette hypothèse et établi le composé **9** comme étant un dérivé xylosylé du lignane **8** appelé ssioriside (5,5'-diméthoxysecoisolaricirésinol 9-O-β-xylopyranoside) (Yoshinari *et al.*, 1989). Ce lignane a déjà été reporté dans de nombreuses plantes (Pan *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2010) mais jamais dans le genre *Quercus*.

Tableau 19. Fragmentation HCD (30 eV) et pouvoir rotatoire spécifique des composés **1** à **9**.

	Ion quasi-moléculaire		Ion fragment		Perte de neutre		[α] ²⁵
	[M-H] ⁻	Formule	[M-H] ⁻	formule	[M-H] ⁻	formule	
1	389,1606	C ₂₁ H ₂₅ O ₇ ⁻					-3,6
2	571,1823	C ₂₉ H ₃₁ O ₁₂ ⁻	419,1711	C ₂₂ H ₂₇ O ₈ ⁻	152,0113	C ₇ H ₄ O ₄	+5
3/4	551,2136	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₂ ⁻	419,1713	C ₂₂ H ₂₇ O ₈ ⁻	132,0423	C ₅ H ₈ O ₄	+37,5 ; -64,2
5/6	581,2241	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₃ ⁻	419,1711	C ₂₂ H ₂₇ O ₈ ⁻	162,0530	C ₆ H ₁₀ O ₅	+38,4 ; -66,1
7	703,2248	C ₃₄ H ₃₉ O ₁₆ ⁻	419,1711 169,0136	C ₂₂ H ₂₇ O ₈ ⁻ C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	132,0422	C ₅ H ₈ O ₄	-47,3
8	421,1869	C ₂₂ H ₂₉ O ₈ ⁻					+27,3
9	553,2292	C ₂₇ H ₃₇ O ₁₂ ⁻	421,1870	C ₂₂ H ₂₉ O ₈ ⁻	132,0422	C ₅ H ₈ O ₄	-9,2

Ainsi, la stratégie mise en œuvre a permis d'identifier trois lignanes non-glycosylés : le 5'-méthoxyisolaricirésinol (**1**), le lyonirésinol 9-O-gallate (**2**) et le 5,5'-diméthoxysecoisolaricirésinol (**8**) et cinq lignanes glycosylés : le lyoniside (**3**), le nudiposide (**4**), le (+)-lyonirésinol 9'-O- β -glucopyranoside (**5**), le (-)-lyonirésinol 9'-O- β -glucopyranoside (**6**), le lyonirésinol 9-O-gallate 9'-O- β -xylopyranoside (**7**) et le 5,5'-diméthoxysecoisolaricirésinol 9-O- β -xylopyranoside (**9**) (**Figure 13**).



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃	R
(+)-lyonirésinol	OCH ₃	H	H	(-)-lyonirésinol	OCH ₃	H	H	8 H
(+)-1	H	H	H	(-)-1	H	H	H	9 Xyl
(+)-2	OCH ₃	Gall	H	(-)-2	OCH ₃	Gall	H	
(+)-3	OCH ₃	H	Xyl	(-)-4	OCH ₃	H	Xyl	
(+)-5	OCH ₃	H	Glu	(-)-6	OCH ₃	H	Glu	
				(-)-7	OCH ₃	Gall	Xyl	

Figure 13. Structure chimique des lignanes **1** à **9**.

Parmi ces composés, le lyonirésinol 9-*O*-gallate est découvert pour la première fois, nous l'avons nommé quercorésinol (**2**). Quatre autres lignanes sont identifiés pour la première fois dans *Quercus petraea* (**1**, **7**, **8** et **9**). Cette étude permet ainsi de préciser la diversité structurale des lignanes présents dans le bois de chêne, en mettant à jour de nouvelles molécules. Leur proximité structurale avec le lyonirésinol, intensément amer, soulève la question de leur contribution à la modification des qualités organoleptiques du vin consécutive à l'élevage en barriques.

IV. Caractérisation sensorielle des lignanes identifiés et criblage dans un vin blanc sec

A. Matériel et méthodes

1. Analyses sensorielles

La caractérisation gustative des 10 lignanes purifiés est réalisée à 20 °C dans des verres AFNOR transparents. Chaque composé a été goûté en solution hydro-éthanolique à 12 % vol. et dans un vin blanc sec (Bordeaux 2011 ; 12,2 % vol. ; G/F < 2 g/L), à raison de 10 mg/L. La solution hydro-éthanolique était composée d'une eau pure et peu minéralisée, choisie en raison de son goût neutre (eau de source de Montagne, Laqueuille, France) et d'éthanol distillé. En raison des quantités limitées des composés purifiés le panel de dégustateurs était composé de cinq experts. Il leur a été demandé de déguster les verres les uns après les autres en comparaison avec un verre témoin sans ajout, de décrire leurs perceptions gustatives et d'évaluer l'intensité de l'amertume sur une échelle de 0 (non détecté) à 7 (forte intensité).

2. Criblage LC-FTMS des lignanes 1 à 9 dans un vin blanc boisé

La LC-FTMS a été utilisée pour réaliser le criblage d'un vin blanc sec élevé 7 mois en barriques neuves (Pessac Léognan 2013), dilué par trois avec de l'eau ultra-pure puis filtré à 0,45 µm. Pour chacun des lignanes recherchés, un chromatogramme d'ions extraits (XIC) a été obtenu grâce au logiciel XCalibur, avec une précision de 5 ppm autour de la masse théorique de l'ion [M-H]⁻.

B. Résultats

1. Caractérisation sensorielle des lignanes du bois de chêne

La matrice de dégustation des composés influence considérablement la perception sensorielle. Chaque lignane est goûté individuellement à une concentration standard de 10

mg/L en solution hydro-alcoolique (12 % vol.) et dans un vin blanc sec par cinq experts. Ces derniers ont évalué la perception gustative associée à chaque composé, par comparaison avec la solution contrôle. Lorsqu'une molécule développe une sensation amère supérieure à celle du témoin, l'intensité de cette perception est évaluée sur une échelle de 1 à 7. Le lyonirésinol, aux propriétés amères déjà établies, est également dégusté à titre de comparaison. Le **Tableau 20** récapitule les résultats de la dégustation.

Tableau 20. Caractérisation sensorielle des lignanes **1** à **10**.

Composés	Goût dans l'eau	Intensité de l'amertume dans l'H ₂ O/EtOH ^a	Intensité de l'amertume dans le vin ^a
Lyonirésinol	Amer	7	7
1	-	-	-
2	Légèrement doux	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	Amer	4	3
6	Amer	5	4
7	-	-	-
8	Amer	3	3
9	Amer	7	7

^a L'intensité est évaluée sur une échelle de 0 (non détecté) à 7 (forte intensité).

Quatre des lignanes isolés développent de l'amertume lorsqu'ils sont dégustés en solution modèle ainsi que dans un vin blanc. Le lignane **9** est le plus intense d'entre eux et son caractère amer est similaire à celui du lyonirésinol, les composés **5**, **6** et **8** sont moins intenses. Les cinq autres ne présentent pas de goût, voire une légère douceur pour l'un d'entre eux.

2. Criblage LC-FTMS des lignanes **1** à **9** dans un vin blanc sec boisé

Les chromatogrammes obtenus dans le vin présentent des signaux au même temps de rétention que dans un extrait de bois de chêne, pour chacun des ions [M-H]⁻ recherchés (**Figure 14**). En outre, l'analyse des spectres de fragmentation HCD montre, pour ces temps de rétention, les mêmes ions fragments dans le vin boisé et dans l'extrait de bois. La spécificité de la détection FTMS, la similitude des temps de rétention et des spectres de fragmentation enregistrés démontrent ainsi que les lignanes **1** à **9** sont présents dans le vin blanc élevé sous bois de chêne.

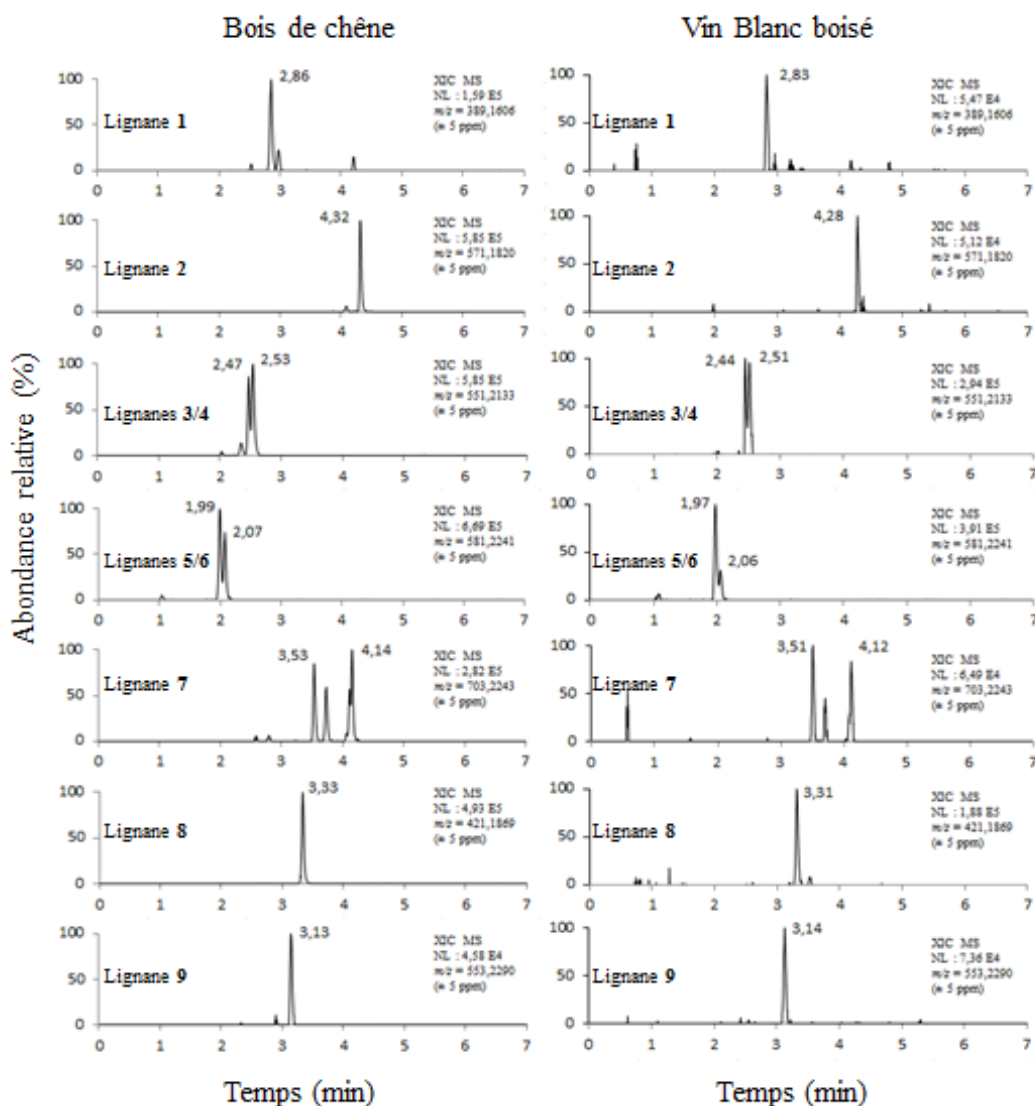


Figure 14. XIC en ionisation négative du lyonirésinol et des lignanes 1 à 9 dans un extrait de bois de chêne (à gauche) et dans un vin blanc sec (à droite).

Les teneurs en différents lignanes sont estimées par semi-quantification et exprimées en équivalent de lyonirésinol, selon la méthode décrite par Marchal *et al.* (Marchal *et al.*, 2015a). Les résultats présentés à la **Figure 15** suggèrent que le lyonirésinol est le plus abondant des lignanes, tant dans le bois de chêne que dans les vins boisés. Cette conclusion est à nuancer à la lumière de la méthode appliquée. En effet, la spectrométrie de masse n'est pas une technique de quantification universelle, l'intensité de la réponse dépendant du coefficient d'ionisation qui peut varier d'une molécule à l'autre. La quantification absolue de chacun des composés permettrait de préciser ces résultats, mais elle requiert la préparation de solutions de calibration à partir de chacune des molécules pures. Les faibles quantités obtenues pour certaines d'entre elles n'a pas permis de réaliser cette étude. Toutefois, les

composés disponibles présentent un rendement d'ionisation similaire à celui du lyonirésinol dans les conditions utilisées. Compte tenu des écarts importants observés, la prédominance du lyonirésinol parmi les lignanes isolés apparaît donc robuste.

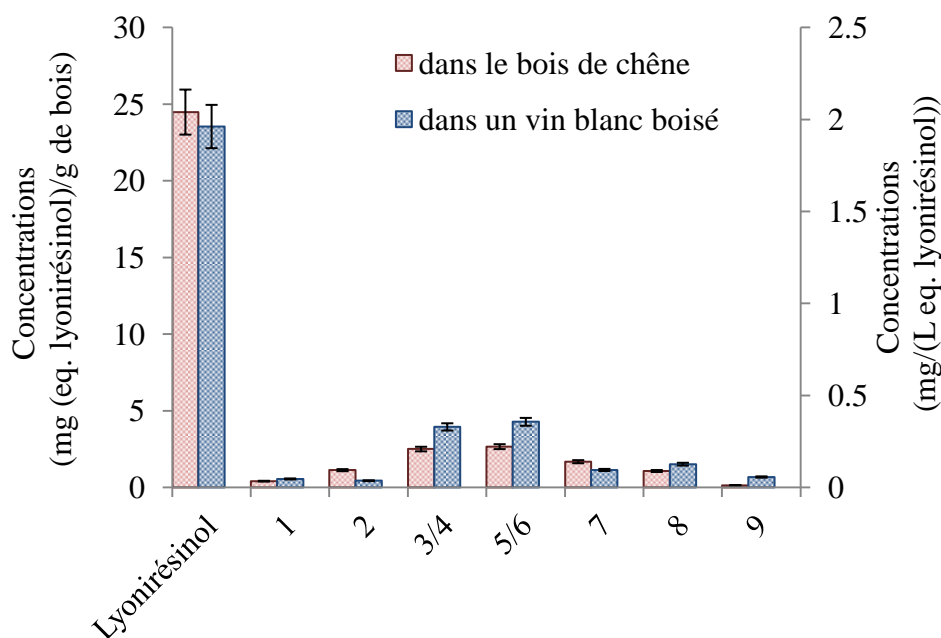


Figure 15. Teneurs du lyonirésinol et des lignanes **1** à **9** exprimées en équivalent de lyonirésinol dans un extrait de bois de chêne et dans un vin blanc sec.

C. Discussion

Neufs lignanes de structure proche du lyonirésinol ont été mis à jour dans le bois de chêne par une purification guidée par la LC-FTMS. Leur dégustation en solution modèle et dans un vin blanc a établi l'amertume de quatre lignanes. Les propriétés amères du lyonirésinol (Marchal *et al.*, 2011b) et du ssioriside (Yoshinari *et al.*, 1989) avaient déjà été observées. Ce travail a confirmé qu'il s'agissait des deux composés les plus actifs au niveau sensoriel. Par ailleurs, ces résultats ne permettent pas d'établir une relation évidente entre la structure et le goût. En particulier, la glycosylation ne montre pas d'impact direct sur les propriétés sensorielles du composé. Parmi les deux lignanes les plus amers, l'un est xylosylé, l'autre ne l'est pas. En outre, les dérivés xylosylés **3** et **4** ne présentent pas d'amertume alors que les dérivés glucosylés **5** et **6** sont amers, avec une variation de leur intensité en fonction de la configuration absolue de leur génine. Même si cette étude n'a pas permis de mettre en évidence une relation directe entre la structure et le goût, la découverte de nouveaux lignanes sapides dans le chêne confirme la pertinence de rechercher des analogues structuraux à un

composé sapide déjà connu. Ces lignanes ont été isolés à partir du bois de chêne. L'étude de leur contribution gustative nécessite l'étude de leur présence dans des vins élevés sous bois.

L'analyse quantitative a révélé que le lyonirésinol est de loin le lignane le plus abondant dans le bois de chêne et, par conséquent, dans un vin boisé. Il est possible que les autres lignanes contribuent au goût du vin, mais le lyonirésinol apparaît comme la molécule la plus active de cette famille au niveau sensoriel.

Conclusion

Dans les végétaux, les voies de biosynthèse offrent naturellement une grande diversité de molécules possédant des structures similaires. Ce travail a mis en œuvre une approche ciblée pour isoler des analogues structuraux au lyonirésinol, un lignane dont la contribution amère au goût des vins boisés avait déjà été établie. Neuf molécules ont ainsi pu être identifiées : l'une d'entre elles est un nouveau composé, il s'agit du quercorésinol (**2**) correspondant au lyonirésinol 9-*O*-gallate. Quatre lignanes ont été identifiés pour la première fois dans le genre *Quercus* (**1**, **7**, **8** et **9**), et, au total, neuf molécules ont été décrites pour la première fois dans le vin (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8** et **9**).

Le recours à l'analyse sensorielle a permis de montrer que l'intensité amère des composés varie fortement avec leur structure chimique. Toutefois, aucune relation claire ne peut être établie entre le goût et la structure. En outre, la confrontation des données quantitatives et des résultats de la caractérisation sensorielle a suggéré que le lyonirésinol demeure le lignane du bois de chêne le plus amer dans le vin. Si aucun analogue structural à fort potentiel gustatif n'a pu être identifié, les résultats de cette étude ont permis de mieux connaître la diversité chimique des lignanes du bois de chêne.

CHAPITRE 4 - ÉTUDE STRUCTURALE ET SENSORIELLE DES STÉRÉOISOMÈRES DU LYONIRÉSINOL

Introduction

Les propriétés organoleptiques d'une molécule sont susceptibles d'être modifiées par ses groupes fonctionnels (Marchal *et al.*, 2015a) mais également par sa stéréochimie. En effet, il est connu, pour de nombreuses molécules volatiles, que la configuration influe non seulement sur l'intensité mais également sur la nature de l'arôme. Par exemple, les formes S et R du limonène possèdent respectivement une odeur de citron et d'orange (Clarín *et al.*, 2010). Cependant, la stéréochimie peut également moduler les caractéristiques gustatives des composés non-volatils. En effet, en 1886, Piutti isole pour la première fois la D-asparagine, l'énantiomère de la L-asparagine, et met en évidence, respectivement, la sucosité et l'insipidité de ces composés (Piutti, 1886). Par la suite, il a également été montré que d'autres composés sapides possèdent des caractéristiques sensorielles différentes en fonction de leur stéréochimie, comme les diastéréoisomères de la naringine, dont l'intensité de l'amertume varie avec la configuration (Gaffield *et al.*, 1975a), ou comme les énantiomères de l'alapyridaine, dont la forme dextrogyre développe un goût sucré alors que la forme lévogyre est insipide (Ottinger *et al.*, 2003).

Le Lyonirésinol possède trois centres stéréogènes ; huit stéréoisomères sont donc possibles pour sa structure plane. Dans les diverses plantes contenant du Lyonirésinol, cette molécule est observée en mélange de deux énantiomères (Rahman *et al.*, 2007) en proportions variables. La mesure du pouvoir rotatoire spécifique, proche de zéro, indique que les deux énantiomères sont présents à des concentrations similaires dans le genre *Quercus* (Nabeta *et al.*, 1987). Néanmoins, les propriétés gustatives des énantiomères n'ont jamais été comparées. Par ailleurs, certains diastéréoisomères du Lyonirésinol ont été identifiés dans diverses plantes (Ohashi *et al.*, 1994 ; Sadhu *et al.*, 2006 ; Jeong *et al.*, 2011 ; Zhu *et al.*, 2012), mais jamais dans le bois de chêne. La forte amertume développée par le Lyonirésinol racémique justifie la purification, la caractérisation et l'étude sensorielle des stéréoisomères naturellement présents dans le bois de chêne.

I. Étude des diastéréoisomères du Lyonirésinol dans le bois de chêne et les vins boisés

La recherche des diastéréoisomères du Lyonirésinol a été effectuée dans un extrait de bois de chêne grâce à un criblage par LC-FTMS.

A. Mise en évidence et purification d'un diastéréoisomère du lyonirésinol

1. Matériel et méthodes

a) Criblage par LC-FTMS

La présence d'isomères du lyonirésinol dans un extrait de bois de chêne a été recherchée par criblage en LC-FTMS des ions de masse m/z 419,1712 correspondant à l'ion déprotoné $C_{22}H_{27}O_8^-$.

La préparation de l'échantillon, les conditions chromatographiques et les paramètres spectrométriques utilisés sont identiques à ceux décrits dans le Chapitre 3-I.A.

b) Purification

La purification des diastéréoisomères du lyonirésinol a été réalisée grâce aux mêmes étapes de fractionnement utilisées pour la purification des lignanes dérivés du lyonirésinol et décrites au Chapitre 3-I.B.

Une première étape d'extraction L/L a été effectuée avec deux solvants de polarité croissante, AcOEt et BuOH. L'extrait **AcOEt** a ensuite été traité par CPC avec la méthode d'analyse 1 en utilisant le système Arizona modifié G_{1A} (Hept/AcOEt/ACN/H₂O : 1/4/1,29/4). De cette manière, 9 fractions ont été obtenues. Puis, la fraction **AcOEt-3** a été traitée par HPLC semi-préparative à l'aide de la colonne Atlantis T3 Prep OBD (19 x 250 mm, 5 μ m, Waters). La phase mobile était constituée d'un mélange H₂O + 0,05 % de TFA (phase **A**) et d'ACN + 0,05 % de TFA (phase **B**). Le débit a été fixé à 20 mL/min et le Gradient I (**Tableau 21**) a été utilisé.

Tableau 21. Gradient I utilisé en HPLC semi-préparative pour la purification du diastéréoisomère du lyonirésinol.

Gradient I	Temps (min)	0	5	15	19	30	35	36	48	49	60
	% B		17	17	23	23	38	80	100	100	17

2. Résultats et discussion

En raison de leurs propriétés physico-chimiques différentes, les diastéréoisomères peuvent être séparés dans un environnement non-chiral. Une colonne classique C18 a donc été utilisée pour la séparation chromatographique. Les isomères du lyonirésinol sont recherchés par criblage en LC-FTMS des ions de masse m/z 419,1712 correspondant à l'ion déprotoné $C_{22}H_{27}O_8^-$. L'analyse d'un extrait hydro-alcoolique de bois de chêne met en évidence deux

pics, à des temps de rétention de 2,69 et 2,86 min, sur le chromatogramme des ions extraits enregistré dans une fenêtre de 5 ppm autour de la masse m/z 419,1712 (**Figure 16**).

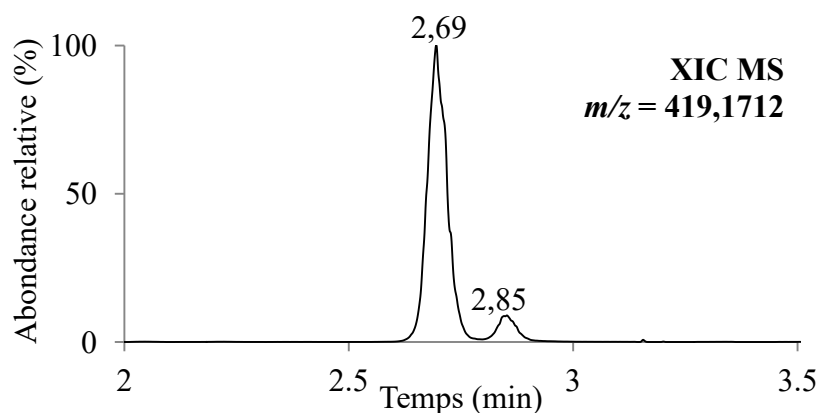


Figure 16. XIC en ionisation négative d'un extrait de bois de chêne correspondant à l'ion $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm).

Le dopage de cet extrait avec du lyonirésinol pur montre une augmentation de l'intensité du pic au temps de rétention de 2,69 min. Cela permet de confirmer que le premier pic correspond au lyonirésinol. La présence d'un second pic suggère l'existence d'un isomère du lyonirésinol **10** dans cet extrait de bois de chêne. Un tel composé n'a jamais été observé dans le genre *Quercus*. Un protocole de purification guidé par LC-FTMS a été développé afin de purifier le composé **10**.

Une première étape d'extraction L/L a permis de récupérer les diastéréoisomères du lyonirésinol dans l'extrait **AcOEt**. Celui-ci a été traité par CPC afin d'enrichir la fraction en composés d'intérêt recherchés et 9 fractions ont été obtenues. Seule la fraction **AcOEt-3**, contenant la majorité des diastéréoisomères du lyonirésinol, a été conservée pour être traitée par HPLC semi-préparative suivant un gradient optimisé.

De cette manière, 3,6 mg de l'isomère **10** ont pu être purifiés sous forme de poudre amorphe blanche. La pureté chromatographique (pureté > 95 %) est vérifiée en LC-MS. La quantité était suffisante pour procéder à sa caractérisation structurale et sensorielle.

B. Analyses structurale et sensorielle du diastéréoisomère du lyonirésinol

1. Matériel et méthodes

a) Caractérisation structurale

L'identification de l'isomère du lyonirésinol **10** a été réalisée par RMN mono- et bi-dimensionnelle ainsi que par mesure de son pouvoir rotatoire spécifique par le polarimètre.

Une analyse LC-FTMS sur colonne chirale a été réalisée dans les conditions chromatographiques décrites dans le **Tableau 22** et les conditions spectrométriques et d'ionisation détaillées dans le **Tableau 23**.

Tableau 22. Conditions chromatographiques pour les analyses analytiques sur colonne chirale.

Appareil :	U-HPLC Accela (Thermo Fisher Scientific)
Logiciel :	Xcalibur 2.1 pour Exactive
Détecteur UV :	Accela PDA 1 cm LightPipe Flow cell
Colonne :	Chiralpak® IB-3 (ChiralTechnologies, Illkirch, France) 150 x 2,1 mm Taille des particules 3 µm
Phase mobile :	Débit : 300 µL/min Solvant A : eau ultra-pure Solvant B : ACN LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) Gradient : élution isocratique 12 min ; H ₂ O/ACN : 80/20
Injection :	5 µL à l'aide d'un passeur automatique HTC0 Pal équipé de « racks » réfrigérés

Tableau 23. Conditions spectrométriques pour les analyses sur colonne chirale.

Paramètre	Mode négatif
Débit du « sheath gas » ^a	62
Débit du gaz auxiliaire ^a	12
Débit du « sweep gas »	0
Tension du spray	-3,5 kV
Température du capillaire	330 °C
Tension du capillaire	-60 V
Tension du tube lens	-135 V
Tension du skimmer	-26 V
Température de la source	300 °C
Résolution ^b	100 000
AGC	10 ⁶
Gamme masses	200-800 Th

^a Le débit du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires.

^b Résolution $m/\Delta m$, fwhm à m/z 200 Th.

b) Caractérisation sensorielle

La caractérisation gustative du composé **10** a été réalisée à 20 °C dans des verres INAO normalisés. Il a été goûté par le panel expert de 5 dégustateurs, en solution hydro-éthanolique à 12 % vol. et dans un vin blanc sec (Bordeaux 2011 ; 12,2 % vol. ; G/F < 2 g/L), à une concentration de 5 mg/L. En comparaison, un verre témoin contenant la matrice de dégustation sans ajout et un verre contenant une solution de lyonirésinol à 5 mg/L ont été présentés aux dégustateurs. Il a été demandé au panel d'évaluer l'intensité de leur amertume sur une échelle de 0 (non détecté) à 7 (forte intensité).

2. Résultats et discussion

L'interprétation des spectres RMN ¹H et ¹³C du composé purifié et leur comparaison avec les données reportées dans la littérature montrent une forte similarité avec l'*epi*-lyonirésinol décrit par Ohashi *et al.* (Ohashi *et al.*, 1994). L'analyse de la carte ROESY permet d'établir la configuration relative *trans* - *cis* de l'isomère isolé **10** (ANNEXE 2). Il s'agit bien d'un diastéréoisomère du lyonirésinol *trans* – *trans* (**Figure 17**). Sa configuration relative diffère ainsi de celle du lyonirésinol par une épimérisation en position C-7'. Ce diastéréoisomère a été identifié dans l'espèce *Aegle marmelos* par Ohashi *et al.* (Ohashi *et al.*, 1994), mais n'a jamais été décrit dans le genre *Quercus*.

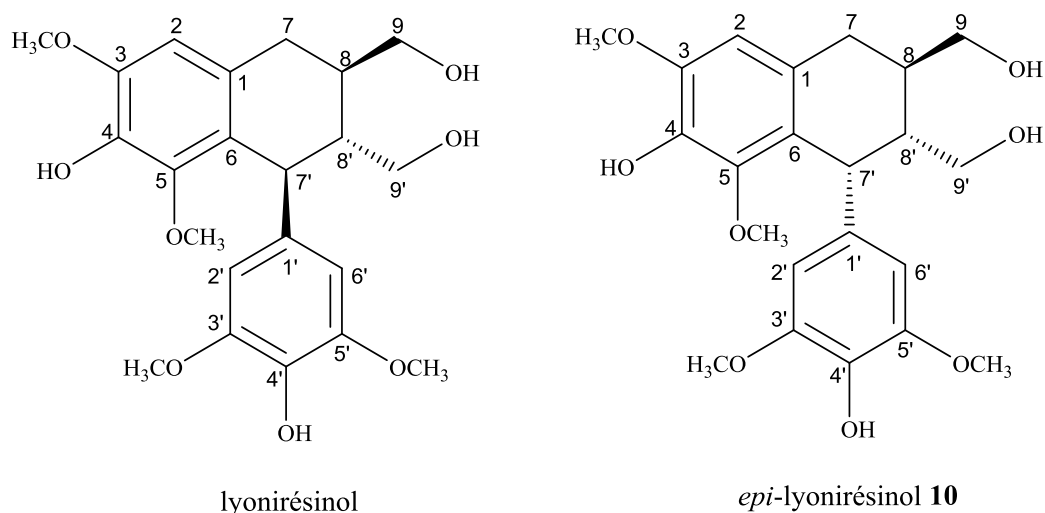


Figure 17. Structures chimiques du lyonirésinol et de l'*epi*-lyonirésinol **10** (configurations relatives).

Le pouvoir rotatoire spécifique de l'*epi*-lyonirésinol **10** est mesuré à -39 et son analyse par LC-FTMS sur colonne chirale révèle la présence de deux pics chromatographiques (**Figure 18**). Il semble donc être présent dans le bois de chêne sous forme de mélange de ses deux énantiomères, avec un excès de la forme lévogyre. Les travaux d'Ohashi *et al.* (Ohashi *et al.*, 1994) reportent un pouvoir rotatoire de -140 pour la forme lévogyre pure, ce qui confirme ces résultats.

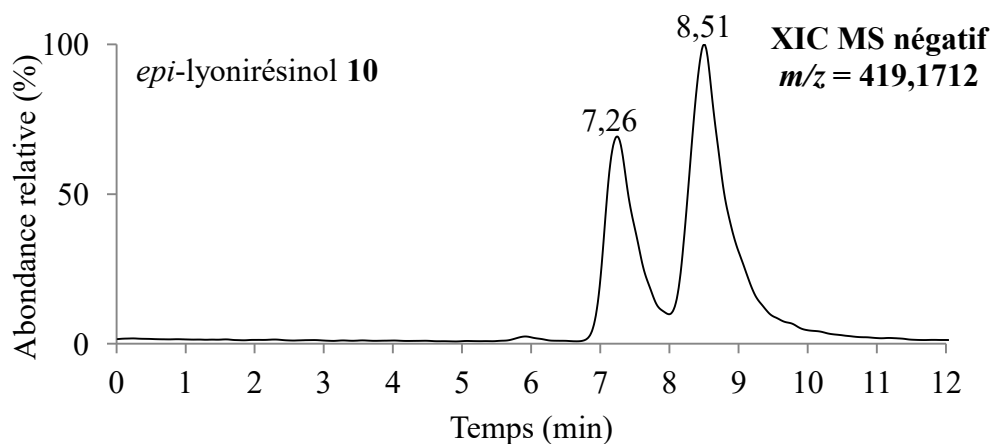


Figure 18. XIC en ionisation négative de l'*epi*-lyonirésinol **10**, correspondant à l'ion $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm), sur colonne chirale.

Contrairement au lyonirésinol (Moutounet *et al.*, 1989), l'*epi*-lyonirésinol n'a jamais été identifié dans le vin. Un criblage de l'ion de m/z 419,1712 permet de mettre en évidence pour la première fois la présence de ce diastéréoisomère **10** dans le vin ($t_R = 2,80$ min)

(Figure 19), mais son abondance reste cependant faible en comparaison de celle du lyonirésinol.

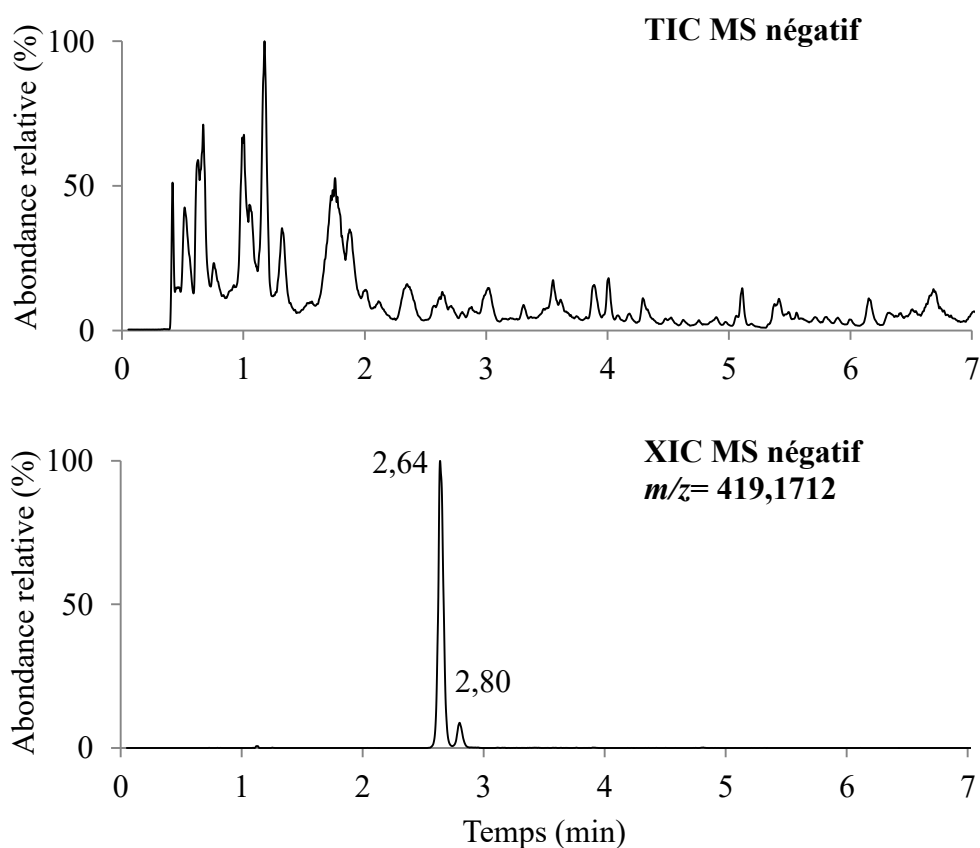


Figure 19. TIC en ionisation négative d'un vin rouge boisé et XIC en ionisation négative correspondant à l'ion déprotoné $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm).

L'*epi*-lyonirésinol est ensuite dégusté dans une solution hydro-alcoolique à 12 % vol., ainsi que dans un vin blanc sec non boisé. Dans les deux matrices, les experts le décrivent comme dénué d'amertume et même légèrement doux en comparaison de la solution de contrôle.

Compte tenu de ses caractéristiques sensorielles et de sa faible abondance dans le vin, l'*epi*-lyonirésinol ne semble pas influencer significativement le goût du vin. Par conséquent, aucune étude complémentaire ne sera réalisée sur les formes énantiomériques de ce composé.

II. Étude des énantiomères du lyonirésinol

A. Résolution chirale des énantiomères du lyonirésinol

1. Description de la stratégie employée

Le pouvoir rotatoire du lyonirésinol purifié à partir de bois de chêne est proche de zéro (Marchal *et al.*, 2014). Cette valeur est caractéristique d'un mélange racémique de deux énantiomères **a** et **b** (Figure 20). Or, toutes les caractérisations sensorielles ont été menées à partir du mélange racémique du lyonirésinol et les propriétés gustatives individuelles de chaque énantiomère n'ont jamais été étudiées.

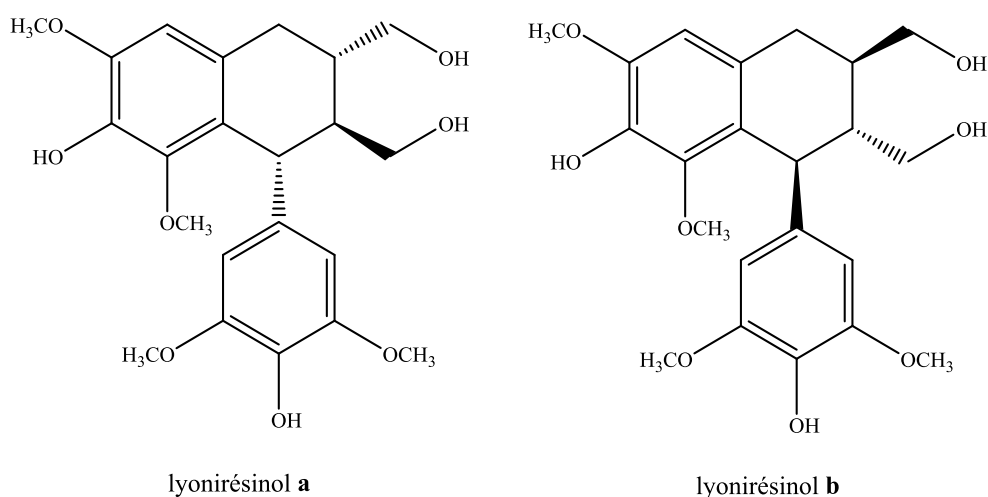


Figure 20. Structures chimiques des énantiomères du lyonirésinol **a** et **b**.

Généralement, une séparation racémique s'effectue par chromatographie liquide équipée d'une colonne chirale préparative, mais une telle colonne reste très couteuse. Une autre approche consiste en la dérivatisation des énantiomères par un groupement chiral afin d'obtenir des diastéréoisomères, alors séparables par chromatographie sur colonne non chirale. Une fois séparés, les diastéréoisomères sont hydrolysés afin d'obtenir les énantiomères désirés.

Ici, il a été décidé de dédoubler les énantiomères du lyonirésinol via la séparation et l'hydrolyse de deux dérivés diastéréoisomériques présents naturellement dans le bois de chêne. En effet, comme mentionné précédemment, le lyoniside **3** et le nudiposide **4** sont deux dérivés xylopyranoside du lyonirésinol, différant par la configuration absolue de leur génine (**a** et **b** respectivement).

2. Matériel et méthodes

La purification des énantiomères du lyonirésinol a été réalisée dans le cadre du stage de licence de chimie de Quentin Sallembien.

a) Conditions de l'hydrolyse

Le lyoniside **3** (57,4 mg) et le nudiposide **4** (58,6 mg), préalablement purifiés comme décrit au Chapitre 3-**II.B.**, ont été solubilisés séparément dans une solution aqueuse de TFA à 4 mol.L⁻¹. Les milieux réactionnels ont été placés sous reflux à 80 °C, sous atmosphère inerte de diazote. Le suivi de la réaction a été réalisé par analyse en LC-FTMS. Après 14 heures, les milieux réactionnels ont été évaporés à sec pour éliminer les traces de TFA, puis solubilisés dans de l'eau ultra-pure et lyophilisés.

b) Purification par HPLC semi-préparative

Les lyophilisats obtenus après hydrolyse ont ensuite été purifiés par HPLC semi-préparative. Les conditions utilisées pour la purification des énantiomères du lyonirésinol étaient les mêmes que celles présentées au Chapitre 3-**II.4**. Le Gradient II a été utilisé (**Tableau 15**). Des aliquotes de 20 mg ont été reprises dans 500 µL d'une solution H₂O/MeOH : 50/50 puis injectées successivement afin de traiter l'ensemble des échantillons. La détection UV à 280 nm a permis de suivre l'élution et la collecte manuelle des pics chromatographiques en sortie du détecteur. Après lyophilisation, la pureté des énantiomères du lyonirésinol **a** et **b** a été vérifiée par une analyse LC-FTMS sur colonne chirale, dans les conditions décrites au Chapitre 4-**I.B.1.a**).

3. Résultats et discussion

Le lyoniside **3** et le nudiposide **4** purifiés sont chauffés séparément en condition acide (TFA) afin d'hydrolyser l'acétal formé entre l'aldéhyde du xylose et l'alcool primaire (C9') du lyonirésinol (**Figure 21**).

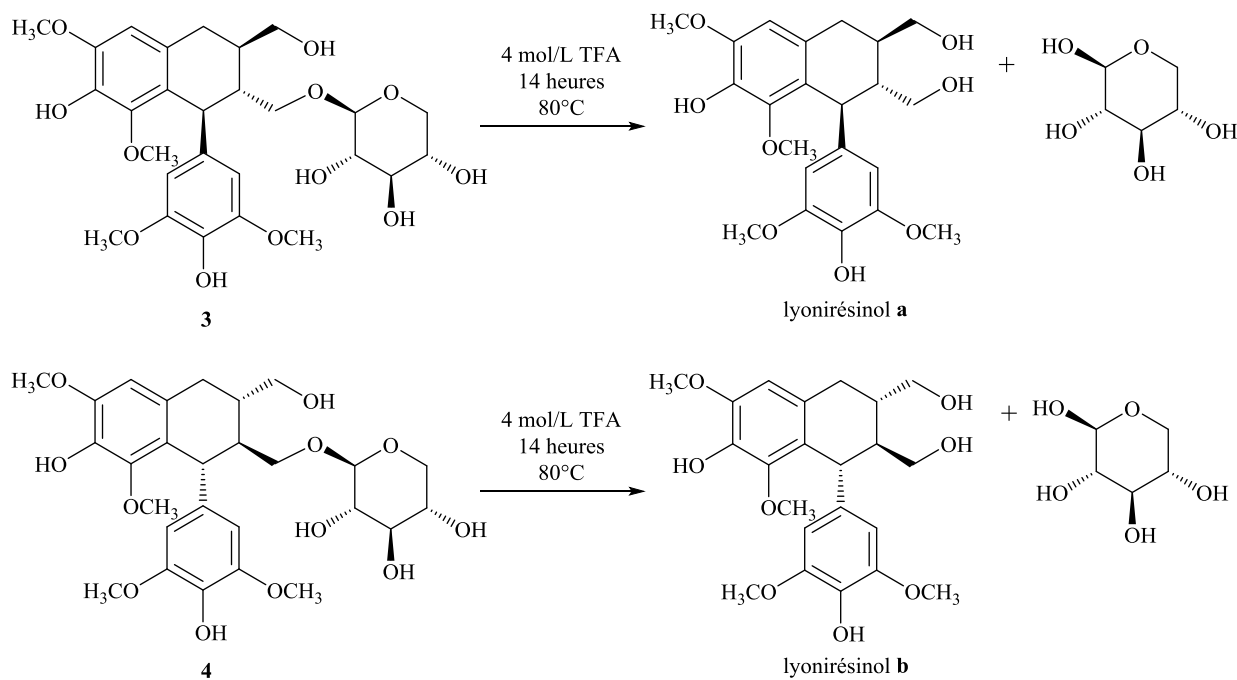


Figure 21. Hydrolyse acide du lyoniside **3** et du nudiposide **4** et libération des énantiomères du lyonirésinol **a** et **b**.

Après hydrolyse et lyophilisation, les milieux réactionnels bruts sont purifiés par HPLC semi-préparative afin d'éliminer les produits secondaires de la réaction. De cette manière, les énantiomères sont obtenus sous forme de poudre amorphe blanche : 19,5 mg de lyonirésinol **a** et 19 mg de lyonirésinol **b**. Le rendement du dédoublement s'élève, respectivement, à 44,6 % et 43,5 % pour les composés **a** et **b**. Chaque énantiomère est analysé par LC-FTMS sur colonne chirale analytique. Comme présenté à la **Figure 22**, l'injection du lyonirésinol racémique révèle deux pics à 5,88 min et 7,16 min. L'analyse des énantiomères purifiés montre un seul pic par chromatogramme, respectivement à 5,92 min et 7,17 min pour les énantiomères **a** et **b** du lyonirésinol. Ces résultats confirment ainsi l'efficacité de la séparation du mélange racémique.

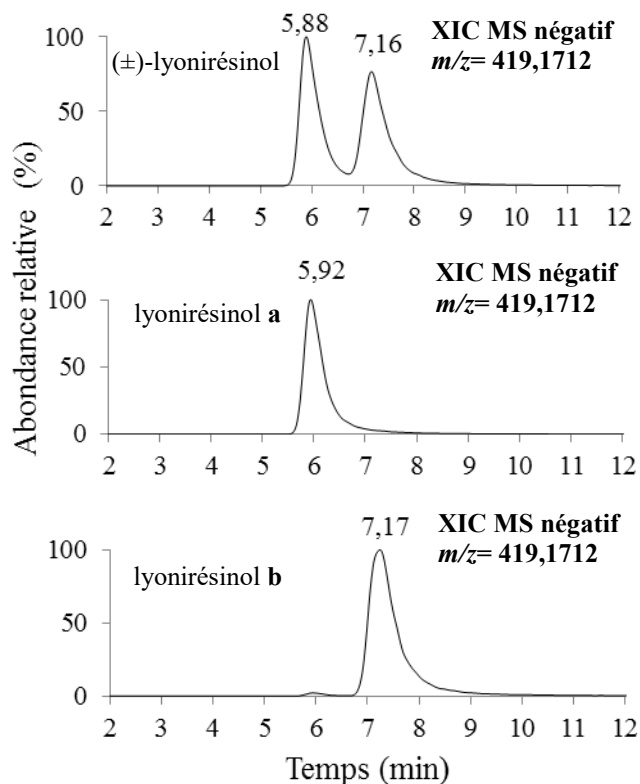


Figure 22. XIC en ionisation négative du (±)-lyonirésinol, du lyonirésinol **a** et du lyonirésinol **b**, correspondant à l'ion déprotoné $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm), sur colonne chirale.

B. Détermination de la configuration absolue des énantiomères du lyonirésinol

1. Matériel et méthodes

Les travaux présentés dans cette partie ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Thierry Buffeteau et le Dr. Nicolas Daugey, de l'UMR 5255 (Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux).

Afin de déterminer sans ambiguïté la configuration absolue des énantiomères, une technique chiroptique spectroscopique appelée Dichroïsme Circulaire Vibrationnel (VCD) a été utilisée.

Les spectres IR et VCD des énantiomères du lyonirésinol **a** et **b** ont été mesurés dans du DMSO- d_6 à une concentration de 50 mM.

Calculs de chimie quantique : Théorie de la Fonctionnelle Densité (DFT)

Le calcul théorique des spectres IR et VCD commence par une analyse conformationnelle détaillée de la molécule de lyonirésinol. Cette analyse a nécessité

d'explorer la surface d'énergie potentielle (SEP) de l'énantiomère (8*R*, 8'*R*, 7'*S*) (**a**). Puis, des calculs semi-empiriques au niveau RM1 (Rocha, Freire et al. 2006) ont été réalisés en utilisant la technique du recuit simulé (Bockisch, Liotard et al. 1992) implémentée dans le logiciel AMPAC (Semichem 2004), afin de déterminer les énergies relatives des conformères trouvés dans les minima locaux de la SEP. Les minima d'énergie ont été obtenus en deux étapes : (i) une recherche non-locale basée sur la modification des principaux angles dièdres et (ii) un relâchement de l'énergie locale de l'ensemble des degrés de liberté pour chacun des minima collectés à l'étape précédente. Soixante-douze conformères, à moins de 3 kcal/mole du conformère de plus basse énergie, ont été conservés pour des calculs plus précis grâce à la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT).

L'optimisation des géométries, le calcul des fréquences vibrationnelles et des spectres IR et VCD ont été réalisés à partir du programme Gaussian 09 (Frisch, *et al.*, 2009) sur le cluster DELL du centre de calcul MCIA de l'université de Bordeaux. Pour chacun des 72 conformères du (8*R*, 8'*R*, 7'*S*)-lyonirésinol, la géométrie optimisée a été calculée par la DFT en utilisant la fonctionnelle B3PW91 et la base 6-311G**. Les fréquences vibrationnelles et les spectres IR et VCD ont été calculés au même niveau de théorie, en considérant la molécule isolée dans le vide. Pour comparer les spectres théoriques et expérimentaux, les fréquences calculées ont été multipliées par 0,968 et les intensités calculées ont été converties en lorentziennes avec une demi-largeur de 7 cm⁻¹.

2. Résultats et discussion

La RMN mono- et bi-dimensionnelle (expérience de ROESY) a permis de confirmer la configuration relative de chacun des énantiomères. En effet, les spectres RMN ¹H des composés **a** et **b** sont superposables au spectre du (±)-lyonirésinol et les données RMN sont identiques à celles reportées dans la littérature pour le lyonirésinol (Kato, 1963 ; Dadá *et al.*, 1989 ; X.-Y. Zhang *et al.*, 2006 ; Imai *et al.*, 2013) (**ANNEXE 2**).

En outre, le pouvoir rotatoire spécifique des composés **a** et **b** est mesuré à + 43 et - 45, respectivement. Ces deux valeurs sont similaires et de signe opposé, ce qui confirme leur relation d'énantiomérisation. On peut associer le (+)-lyonirésinol **a** au premier pic $t_R = 5,92$ min et le (-)-lyonirésinol **b** au second pic $t_R = 7,17$ min.

La configuration absolue du (+)-lyonirésinol a été proposée de façon empirique comme étant (8*R*, 8'*R*, 7'*S*)-(+)-lyonirésinol, par la mise en œuvre de réactions de dégradation de dérivés et par comparaison avec des composés connus (Kato, 1963). La configuration absolue des énantiomères du lyonirésinol n'a jamais été confirmée par des techniques

spectroscopiques chiroptiques (Dichroïsme Circulaire Electronique (ECD) ou Vibrationnel (VCD)) associées à des calculs théoriques. Dans ce chapitre, la technique du VCD (Freedman *et al.*, 2003) est utilisée afin de déterminer sans ambiguïté la stéréochimie absolue des molécules. Cette méthode consiste dans un premier temps à enregistrer le spectre VCD des deux énantiomères. Les énantiomères présentent des bandes VCD de signe opposé pour chaque mode vibrationnel, ainsi le spectre du VCD fournit une signature unique et riche de la configuration absolue du composé. En parallèle, le spectre théorique de l'une des deux configurations est calculé, à l'aide de méthodes de chimie quantique. La contribution des différents conformères est définie par leur répartition statistique. Enfin, les données expérimentales et théoriques sont comparées : la configuration absolue utilisée pour le calcul est associée au composé dont le spectre expérimental correspond au spectre théorique (Stephens *et al.*, 2000).

Le spectre VCD expérimental des deux énantiomères du lyonirésinol est reporté en **Figure 23**. Les deux spectres sont bien symétriques par rapport à la ligne de base et les bandes présentent des signes opposés pour les deux molécules, ce qui apporte une nouvelle confirmation de leur relation d'énantiomérisation.

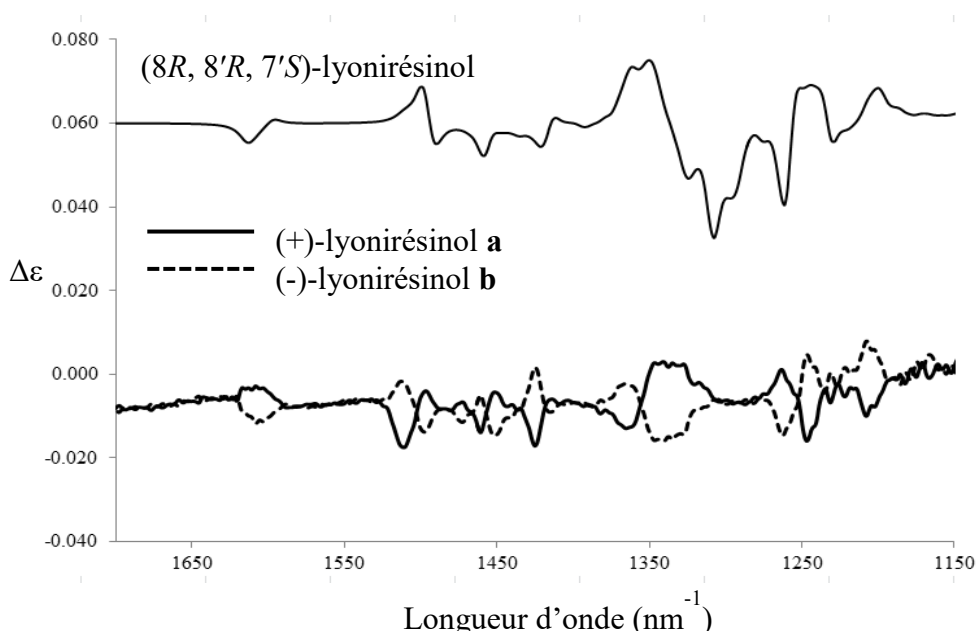


Figure 23. Comparaison des spectres VCD expérimentaux du (+)-lyonirésinol **a** et (-)-lyonirésinol **b** avec le spectre VCD calculé pour l'isomère (8R, 8'R, 7'S)-lyonirésinol.

Le spectre VCD calculé pour la forme (8*R*, 8'*R*, 7'*S*)-lyonirésinol est représenté également sur la **Figure 23**. Celui-ci a été optimisé par les calculs quantiques en tenant compte des conformations les plus stables. L'**ANNEXE 3** présente un récapitulatif des résultats des calculs d'optimisation des 28 conformations les plus stables. Les cinq conformations les plus stables, représentant 50 % des conformations les plus probables, sont prises en compte dans le calcul du spectre théorique. Elles sont présentées en **Figure 24**.

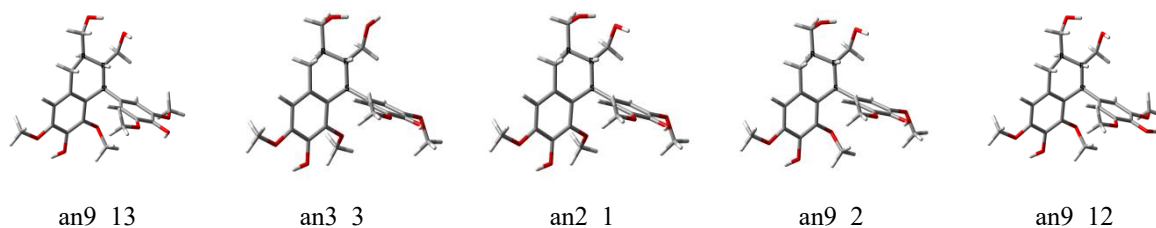


Figure 24. Conformations des molécules du (8*R*, 8'*R*, 7'*S*)-(+)-lyonirésinol **1a** représentant 50 % des conformations les plus stables prises en compte dans le calcul du spectre théorique.

Ainsi, le spectre théorique calculé est comparé aux spectres expérimentaux. On voit que le spectre VCD prédit pour l'isomère (8*R*, 8'*R*, 7'*S*)-lyonirésinol reproduit bien l'intensité et le signe de chacune des bandes du spectre expérimental du (+)-lyonirésinol **a**. Cela établit sans ambiguïté la configuration absolue (8*R*, 8'*R*, 7'*S*) pour le (+)-lyonirésinol **a**.

C. Caractérisation sensorielle des énantiomères du lyonirésinol

1. Matériel et méthodes

a) Analyse sensorielle

La caractérisation gustative des énantiomères **a** et **b** du lyonirésinol a été réalisée à 20 °C dans des verres INAO normalisés. Ils ont été dégustés par le panel expert de cinq dégustateurs, en solution hydro-éthanolique à 12 % vol. et dans un vin blanc sec (Bordeaux 2011 ; 12,2 % vol. ; G/F < 2 g/L), à une concentration de 2 mg/L. Une solution de (±)-lyonirésinol a été présentée en comparaison. L'intensité de l'amertume des différents composés a été évaluée sur une échelle de 0 (non détecté) à 7 (forte intensité).

b) Détermination du seuil de détection du (+)-lyonirésinol

Le seuil de détection du (+)-lyonirésinol **a** a été déterminé dans un vin blanc de Bordeaux 2013 (12,6 % vol. ; 5,9 g de glycérol ; G+F = 1,3 g/L ; pH 3,1). Afin d'éviter

d'éventuels phénomènes de saturation ou de rémanence, deux sessions ont été organisées, une le matin et l'autre l'après-midi.

Pour chaque concentration, trois verres sont présentés aux dégustateurs, l'un d'entre eux contenant le vin additionné du composé étudié, les deux autres contenant le vin témoin. Il a été demandé à chaque individu de désigner l'échantillon différent. Le matin, trois concentrations ont été présentées, par ordre croissant : 0,25, 0,5 et 1 mg/L. Pour chaque dégustateur, les concentrations proposées à la session de l'après-midi dépendent des résultats du matin. Il dégustera en effet à nouveau la concentration la plus basse pour laquelle il a donné une bonne réponse, afin de confirmer son jugement, ainsi que les 2 concentrations inférieures (0,125 et 0,0625 mg/L). Si le dégustateur ne trouve aucune bonne réponse le matin, les trois concentrations supérieures lui seront présentées l'après-midi (2, 4 et 8 mg/L).

Cette méthode permet de limiter la fatigue des dégustateurs en adaptant au mieux les concentrations présentées à leur propre sensibilité. Vingt-trois personnes appartenant au personnel des laboratoires de l'ISVV et entraînées à la dégustation des vins ont participé à ce test sensoriel. Les échantillons ont été présentés dans des verres AFNOR, à une température de 12 °C, dans une salle de dégustation équipée de boxes individuels. Chaque seuil individuel correspond à la moyenne géométrique entre la concentration correcte la plus basse et la précédente. Le seuil collectif est obtenu en calculant la moyenne géométrique de tous les seuils individuels.

2. Résultats et discussion

Afin de mesurer la contribution relative des énantiomères à la perception amère de leur mélange racémique, chaque composé est dégusté à 2 mg/L dans une solution hydro-alcoolique à 12 % vol., en comparaison d'une solution modèle de contrôle. Les mêmes concentrations sont testées dans un vin blanc non boisé. Les experts perçoivent une forte amertume (7/7) à la dégustation de l'énantiomère **a** du lyonirésinol, dont l'intensité est comparable à celle d'une solution du mélange racémique à 4 mg/L. A l'inverse, l'énantiomère **b** ne développe presque aucun goût, si ce n'est une légère douceur. On peut donc conclure que l'amertume du mélange racémique ne provient que de l'amertume de l'énantiomère **a** du lyonirésinol.

Le seuil de détection du (+)-lyonirésinol **a** est déterminé et s'élève à 0,46 mg/L (seuils de détection individuels s'étalant de 43 µg/L à 4 mg/L.). On observe que le seuil de détection du (+)-lyonirésinol **a** est inférieur à la moitié du seuil de détection du lyonirésinol en mélange

racémique, ce qui laisse supposer que l'énantiomère (-)-lyonirésinol **b** pourrait moduler l'amertume du (+)-lyonirésinol **a** grâce à sa légère douceur.

Afin de déterminer l'impact du (+)-lyonirésinol **a** sur l'amertume des vins, il est nécessaire de mesurer les concentrations de ce dernier dans les vins et de les comparer à son seuil de détection. Le dosage du (+)-lyonirésinol dans les eaux-de-vie est également réalisé afin d'étudier l'impact du temps d'élevage sur sa concentration.

III. Quantification du (+)-lyonirésinol dans les vins et les eaux-de-vie ; étude de l'influence des paramètres de tonnellerie

A. Développement d'une méthode de dosage des énantiomères du lyonirésinol

1. Principe de la méthode

La quantification des énantiomères du lyonirésinol nécessite leur séparation chromatographique. Celle-ci n'est pas réalisable dans un environnement symétrique ; les conditions chromatographiques classiques en LC-FTMS, c'est-à-dire l'utilisation d'une colonne C18 classique avec des solvants non chiraux (H₂O et ACN), ne permettent pas cette séparation. Pour effectuer la résolution chirale du (±)-lyonirésinol, il est donc nécessaire d'utiliser une colonne avec phase stationnaire chirale (CSP). Cependant, la nature polymérique de ce type de colonne ne permet pas son lavage avec des pourcentages élevés en ACN après chaque échantillon, puisqu'elle ne résiste pas aux fortes variations de pression et de polarité de la phase mobile. Ainsi, le vin, les eaux-de-vie et les macérats de bois, qui sont des matrices complexes, ne peuvent pas être directement injectés sur ce type de colonne de façon durable. Il est donc préférable d'analyser des fractions pré-purifiées afin d'éviter l'encrassement de la colonne. Pour cette raison, une étape de pré-purification par SPE a été réalisée en amont des analyses sur colonne CSP. Néanmoins, ce prétraitement pourrait diminuer la précision et la robustesse de la technique de quantification. Le (±)-lyonirésinol a ainsi d'abord été dosé par des analyses LC-FTMS sur colonne C18, selon la méthode de dosage développée par Marchal *et al.* dans le vin (Marchal *et al.*, 2015a) et adaptée ici pour les eaux-de-vie et les macérats de bois. Puis, les analyses LC-FTMS sur colonne CSP ont été utilisées après pré-purification par SPE afin d'effectuer la résolution chirale du (±)-lyonirésinol et de déterminer son rapport énantiomérique. Cette méthode en deux étapes vise à déterminer pour la première fois les concentrations en énantiomères du lyonirésinol dans les vins, les eaux-de-vie et les macérats de bois.

2. Méthodologie

a) Préparation des échantillons

- (1) Préparation d'échantillons pour la quantification du (\pm)-lyonirésinol

Avant de procéder au dosage du (\pm)-lyonirésinol dans les vins, les eaux-de-vie et les macérats de bois, ces derniers ont été dilués, respectivement, par 3, 8 et 25 avec de l'eau ultra-pure. Après une filtration à 0,45 μm , les échantillons ont été injectés directement en LC-FTMS dans les conditions chromatographiques et spectrométriques décrites au préalable dans le Chapitre 3-I.A.

- (2) Préparation d'échantillons pour la détermination du rapport énantiomérique

Avant la pré-purification par SPE, les échantillons de vin, d'eau-de-vie et de macérat de bois ont été, respectivement, dilués par 3, 8 et 4 afin de réduire le niveau d'éthanol. Puis, des aliquotes de vin (3 mL), d'eau-de-vie (8 mL) et de macérat de bois (8 mL) ont été filtrées à 0,45 μm et déposées sur une colonne apolaire (Bond Elut ENV, polymère PS/DVB, 200 mg, particules sphériques de 125 μm , Agilent). Les éluions ont été réalisées successivement avec 2 mL d'une solution à 20 % d'ACN puis 2 mL d'une solution à 40 % d'ACN dans de l'eau ultra-pure acidifiée à 0,05 % de TFA. Des aliquotes de la fraction à 40 % d'ACN, contenant le lyonirésinol, ont été prélevées, évaporées à sec au RapidVap puis resolubilisées dans une solution H₂O/MeOH : 95/5 avant d'être injectées en LC-FTMS sur colonne CSP dans les conditions chromatographiques et spectrométriques décrites dans le Chapitre 4-I.B.1.a).

b) Préparation des solutions de calibration

La méthode utilisée pour la quantification du (\pm)-lyonirésinol dans les vins a été décrite par Marchal *et al.* (Marchal *et al.*, 2015a). Pour la quantification du (\pm)-lyonirésinol dans les eaux-de-vie et les macérats de bois, deux séries de solutions de calibration ont été préparées par dilutions successives d'une solution mère de lyonirésinol à 1 g/L dans une solution modèle utilisée pour la préparation des macérats de bois et dans une eau-de-vie non boisée diluée par 8. Ainsi les concentrations des solutions de calibration sont les suivantes : 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 500 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$, 2 $\mu\text{g/L}$.

c) Analyse en LC-FTMS et traitement des résultats

Les conditions chromatographiques et spectrométriques utilisées au cours des analyses de quantification par LC-FTMS étaient les mêmes que celles décrites dans les Chapitres 3-I.A. et 4-I.B.1.a). Le volume d'injection était fixé à 5 µL. La seringue et la boucle d'injection ont été lavées deux fois avant et après chaque injection avec une solution d'ACN et une solution de H₂O/MeOH : 50/50. Les résultats ont été traités automatiquement par l'application Quanbrowser du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Le lyonirésinol a été détecté à partir de la masse exacte de son ion déprotoné C₂₂H₂₇O₈⁻ (*m/z* 419,1712) et son temps de rétention (2,16 min). Les aires des pics ont été intégrées automatiquement.

3. Validation de la méthode de quantification sur colonne C18

Si la méthode de dosage du (±)-lyonirésinol avait déjà été validée dans les vins (Marchal *et al.*, 2015a), la validation doit être effectuée dans les eaux-de-vie et les macérats de bois en étudiant sa sensibilité, sa linéarité, sa spécificité, sa répétabilité et sa justesse.

a) Sensibilité

La précision de mesure de masse de l'analyseur Orbitrap, inférieure à 3 ppm, assure la sélectivité de la détection, avec un bruit de fond quasi inexistant dans les chromatogrammes d'ions extraits. Ainsi, l'approche classique de détermination de la sensibilité d'un appareil LC-MS, dépendant de l'évaluation du rapport signal/bruit, n'est pas pertinente. Afin de déterminer la sensibilité de la méthode LC-FTMS, l'approche décrite par De Paepe *et al.* (De Paepe *et al.*, 2013) a été utilisée. Les cinq niveaux les plus bas de la gamme de calibration (de 2 µg/L à 50 µg/L) ont été injectés cinq fois, et la précision (% Coefficient de Variation (CV)) et la justesse (ratio de recouvrement) ont été calculées pour chaque niveau. La plus basse concentration avec une précision inférieure à 10 % et une justesse supérieure à 90 % a été définie comme l'IDL (Limite de Détection Instrumentale), exprimée en µg/L. Elle est établie à 5 µg/L dans cette étude, pour les macérats de bois comme pour les eaux-de-vie. De Paepe *et al.* (De Paepe *et al.*, 2013) ont défini la Limite de Quantification Instrumentale (IQL) comme s'élevant à deux fois la valeur de l'IDL. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été calculées en considérant les concentrations des macérats (50 g/L de copeaux de bois) et le facteur de dilution utilisé pour la préparation des échantillons de chaque matrice (8 et 25 pour les eaux-de-vie et les macérats de bois respectivement). Elles sont exprimées en µg/g de bois. Ces données sont présentées dans le **Tableau 24**.

Tableau 24. Paramètres de validation de la méthode de quantification du (±)-lyonirésinol dans le bois de chêne et les eaux-de-vie.

Matrices	Sensibilité			Linéarité		Spécificité		Répétabilité et justesse					
	IDL (µg/L)	IQL (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Gamme de linéarité	R ²	Variation tr	Exactitude de la masse ^a	Répétabilité intra-journalière	Recouvrement			
Bois de chêne	5	10	2,5 µg/g	5 µg/g	10 µg/L- 5 mg/L	0,997	0,02 min	1,5 ppm	2,6 %	3,6 %	97 %	98 %	96 %
Eaux- de-vie	5	10	40 µg/L	80 µg/L	10 µg/L- 5 mg/L	0,996	0,01 min	1,5 ppm	4 %	1,5 %	94 %	97 %	95 %

^a La masse expérimentale utilisée pour la détermination de l'exactitude de la masse correspond à la masse mesurée sur toute la largeur du pic chromatographique du lyonirésinol. La valeur donnée dans le tableau correspond à la déviation maximum observée sur l'ensemble des concentrations de la gamme de calibration.

b) Linéarité

Compte tenu des concentrations en lyonirésinol estimées dans des études précédentes (Marchal *et al.*, 2015a), la gamme de travail a été choisie de l'IQL à 5 mg/L. Pour chaque solution de calibration, l'aire du pic du lyonirésinol a été reportée en fonction de la concentration nominale. Une régression linéaire a été réalisée avec une pondération en 1/x. La linéarité a été évaluée par le coefficient de corrélation (R^2) de la droite de calibration ainsi que par les déviations entre les concentrations standards calculées et les valeurs nominales.

Une droite a ainsi été obtenue avec des coefficients de corrélation corrects pour les macérats de bois comme pour les eaux-de-vie (0,997 et 0,996 respectivement) et la justesse est calculée à plus de 90 % à partir de la courbe de calibration.

c) Répétabilité

Pour évaluer la répétabilité, cinq réplicats de deux solutions de calibration (50 µg/L et 500 µg/L) ont été successivement injectés. Pour chaque concentration, le CV est inférieur à 4 %, ce qui valide la répétabilité de la méthode.

d) Justesse

La justesse a été évaluée en calculant le rapport de recouvrement entre la concentration mesurée et la concentration attendue en théorie pour un échantillon de macérat de bois, une eau-de-vie (S-8), un vin rouge (VR-1) et un vin blanc (VB-2) dans lesquels un ajout de 100 µg/L, 500 µg/L et 1 mg/L de lyonirésinol a été réalisé. Les ratios de recouvrement sont supérieurs à 94 % pour les trois ajouts de lyonirésinol dans les eaux-de-vie et les macérats de chêne, ce qui suggère que les effets de la matrice sont négligeables. En outre, les ratios de recouvrement ont également été mesurés à plus de 92 % pour les vins blancs et rouges. Ainsi, ces résultats démontrent la justesse de la méthode.

e) Spécificité

La spécificité a été évaluée par la précision de mesure de masse et la répétabilité des temps de rétention. Ces paramètres ont été vérifiés pour chaque injection des solutions de calibration. De très faibles variations de temps de rétention (< 0,02 min) et une précision de

mesure de masse inférieure à 1,5 ppm ont été observées pour les différentes concentrations en lyonirésinol, ce qui garantit la spécificité de la méthode.

La méthode de quantification du lyonirésinol par LC-FTMS a donc été validée, sans recourir à l'ajout d'un étalon interne, ce qui facilite sa mise en œuvre. Afin de pallier à d'éventuels défauts de reproductibilité, la gamme de calibration a été injectée chaque jour d'analyse, ce qui est rendu possible par la faible durée des séparations par U-HPLC.

4. Validation de la méthode de détermination du rapport énantiomérique sur colonne chirale

a) Conditions chromatographiques et spectrométriques

Une étape de SPE a été réalisée pour pré-purifier les échantillons avant les analyses LC-FTMS sur colonne CSP. Des injections LC-FTMS des fractions de SPE sur la colonne C18 ont montré que la majorité du lyonirésinol est élué dans la fraction à 40 % d'ACN, avec un ratio de recouvrement compris entre 50 et 80 %, alors que de nombreux composés sont élués dans la fraction à 20 % d'ACN. Cette étape ne vise pas à mesurer la quantité totale du lyonirésinol dans les échantillons mais à déterminer son rapport énantiomérique. Or, l'analyse sur colonne à phase stationnaire chirale a révélé que ce rapport énantiomérique est identique dans toutes les fractions de SPE contenant du lyonirésinol. Ainsi, seule la fraction à 40 % d'ACN peut être injectée par chromatographie sur colonne CSP pour déterminer le rapport énantiomérique du lyonirésinol, ce qui évite la détérioration de la colonne. Les conditions chromatographiques ont été choisies pour optimiser la séparation des énantiomères du lyonirésinol, comme le montre la **Figure 25**. L'éluion est réalisée en mode isocratique, favorable à l'équilibre entre la phase mobile et les dérivés polysaccharidiques de la phase stationnaire. Cette condition permet d'améliorer la résolution des pics chromatographiques.

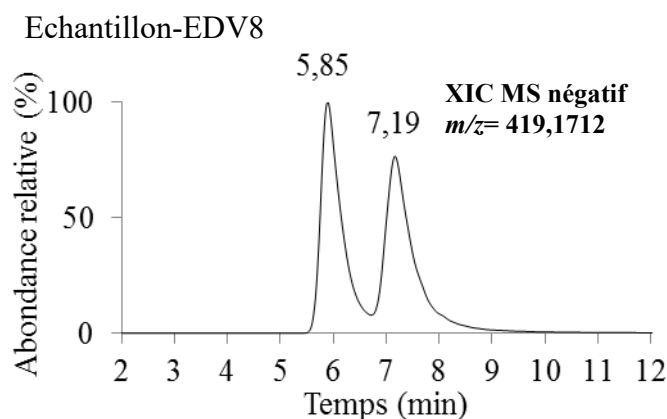


Figure 25. XIC en ionisation négative correspondant à l'ion déprotoné $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712, précision à 5 ppm) de l'échantillon EDV-8, sur colonne chirale.

Le débit du flux chromatographique et la composition de la phase mobile utilisés pour la séparation sur colonne CSP diffèrent de ceux mis en œuvre pour l'analyse sur colonne C18. Les paramètres d'ionisation ont donc été modifiés (**Tableau 22** du Chapitre 4-**I.B.1.a**)).

Lors de l'ionisation, la phase mobile constitue un environnement symétrique, dans lequel les deux énantiomères possèdent des propriétés physico-chimiques identiques. En outre, l'élution est réalisée en mode isocratique. Par conséquent, le (+)-lyonirésinol et le (-)-lyonirésinol présentent, dans ces conditions, le même rendement d'ionisation. Le rapport énantiomérique (r) peut ainsi être calculé directement en faisant le rapport entre les aires des pics correspondant aux deux énantiomères. Il est défini tel que :

$$r = \text{aire du pic du (+)-lyonirésinol} / \text{aire du pic du (-)-lyonirésinol}$$

b) Validation de la méthode de détermination du rapport énantiomérique sur colonne chirale

Avant l'injection LC-FTMS sur colonne CSP, la méthode de prétraitement des échantillons par SPE doit être validée.

(1) Reproductibilité de la SPE

Tout d'abord, la reproductibilité de la méthode de SPE est testée par l'injection d'un échantillon de vin sur trois cartouches de SPE différentes. Le CV, calculé à partir de l'aire du pic du (\pm)-lyonirésinol pour les trois cartouches de SPE, est inférieur à 4 %. Ainsi, cette étape de prétraitement par SPE se révèle reproductible.

(2) Préservation du rapport énantiomérique lors de la SPE

Afin d'étudier la préservation du rapport énantiomérique lors de la pré-purification par SPE, trois répliquats d'une solution de (\pm)-lyonirésinol à 1 mg/L sont traités par SPE. La fraction à 40 % d'ACN a ensuite été injectée en LC-FTMS sur colonne CSP. En parallèle, trois injections directes de la solution de lyonirésinol en LC-FTMS ont été réalisées.

(3) Répétabilité

Trois répliquats d'un échantillon de macérat de bois et d'un échantillon de vin sont injectés sur la colonne CSP. Le CV de r est inférieur à 2 % pour les deux types de matrice. La répétabilité de l'analyse sur colonne CSP est donc vérifiée.

(4) Spécificité

La spécificité de la méthode est évaluée par la répétabilité des temps de rétention et par la précision de la mesure de masse. Ces dernières ont été évaluées tout au long des expériences précédentes et au cours des injections des échantillons.

De faibles variations des temps de rétention des deux énantiomères ($< 0,12$ min) et une précision de masse inférieure à 3 ppm ont été observées pour tous les échantillons analysés (**Figure 26**).

Ces résultats démontrent ainsi une bonne spécificité de la méthode LC-FTMS avec colonne CSP.

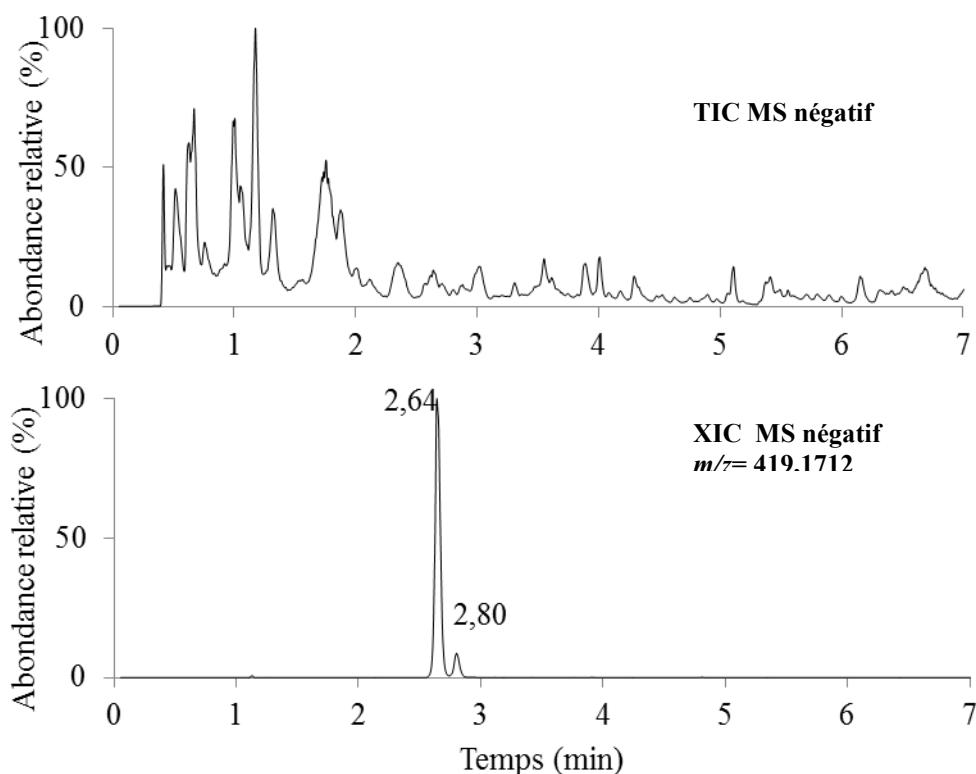


Figure 26. TIC et XIC en ionisation négative correspondant à l'ion déprotoné $C_{22}H_{27}O_8^-$ (m/z 419,1712 ; précision à 5 ppm) de l'échantillon EDV-8.

La concentration en énantiomères du lyonirésinol dans les vins et les eaux-de-vie est déterminée en deux étapes : d'abord le (\pm)-lyonirésinol est dosé sur colonne C18 puis le rapport énantiomérique est mesuré sur colonne CSP. La validation de cette méthode permet son application à des échantillons de vins et d'eaux-de-vie afin d'étudier l'impact sensoriel du (+)-lyonirésinol.

B. Dosage des énantiomères du lyonirésinol dans les vins

1. Origine des vins analysés

Le lyonirésinol a été dosé dans 59 vins rouges commerciaux (29 de diverses appellations de la rive gauche de Bordeaux, 23 originaires du vignoble de la rive droite de Bordeaux, 3 de Californie, 3 d'Australie et 1 d'Italie ainsi que dans 10 vins blancs commerciaux (appellation Graves). Les millésimes s'étendent sur plus d'une centaine d'années, de 1911 à 2013. Tous ces vins ont été élevés en barriques, avec des durées d'élevage et des pourcentages de barriques neuves non précisés mais vraisemblablement variables.

2. Résultats du dosage du (+)-lyonirésinol dans les vins

Dans les vins rouges, le (\pm)-lyonirésinol a été observé à des concentrations allant de 0,6 mg/L à 10 mg/L, avec une valeur moyenne de 3,3 mg/L. Les vins blancs analysés présentaient une teneur moyenne de 1,4 mg/L en (\pm)-lyonirésinol (de 1,2 à 2,3 mg/L) (ANNEXE 4). Ces résultats sont en accord avec les concentrations précédemment mesurées par Marchal (Marchal, 2010), entre 1,3 et 2,4 mg/L dans divers millésimes d'un vin blanc commercial.

Les vins rouges sont généralement élevés pendant plus longtemps et avec un pourcentage plus important de barriques neuves que les vins blancs, ce qui pourrait expliquer leurs valeurs moyennes en lyonirésinol plus élevées.

Tandis qu'une forte variabilité des teneurs en lyonirésinol est observée dans les vins rouges (de 0,6 à 10 mg/L), les valeurs mesurées dans les vins blancs sont plus homogènes. Cela peut s'expliquer par le plus faible nombre d'échantillons analysés mais également par leur origine commune : les dix vins blancs provenaient de la même propriété et ont donc été élevés dans des conditions proches. Par ailleurs, on observe également des teneurs en (\pm)-lyonirésinol similaires entre des vins issus de vieux millésimes et de millésimes plus récents d'une même propriété (Figure 27). Ces résultats suggèrent une certaine stabilité du lyonirésinol dans le temps. Les variations observées entre les différents échantillons semblent donc plutôt être liées aux pratiques œnologiques qu'au temps de vieillissement en bouteille.

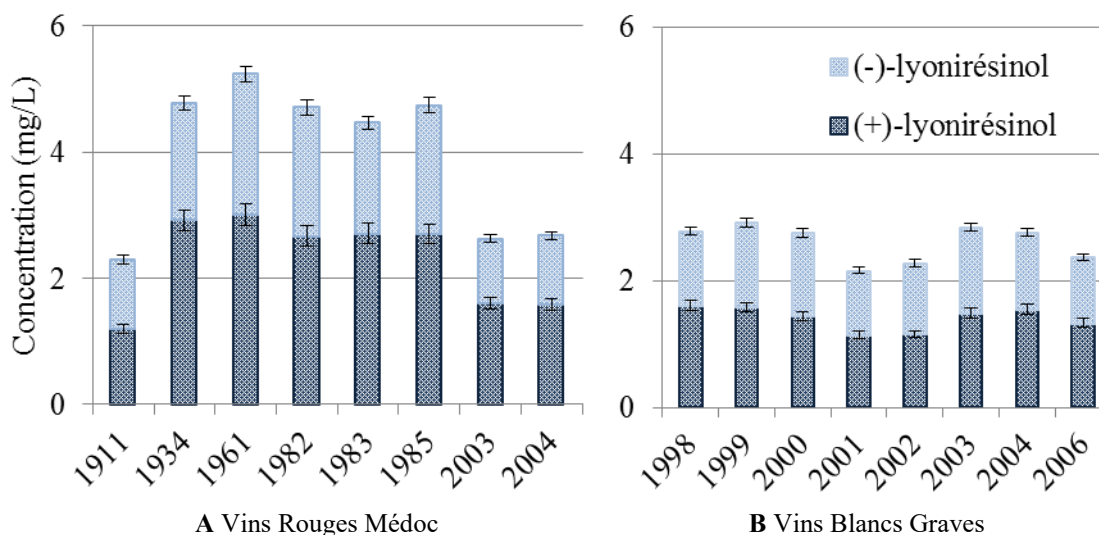


Figure 27. Variations des concentrations en (+)-lyonirésinol et en (-)-lyonirésinol dans différents millésimes du Médoc (1911 à 2004) **A** et de Graves (1998 à 2006) **B**. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

L'analyse sur colonne à phase stationnaire chirale révèle des valeurs similaires pour les moyennes des rapports énantiomériques obtenues dans les vins rouges (1,27) et blancs (1,19). En outre, la **Figure 27** suggère que le vieillissement en bouteille n'affecte pas les proportions relatives de chaque énantiomère.

Les concentrations en énantiomères du lyonirésinol dans les vins rouges et blancs sont présentées dans le **Tableau 25**. Les concentrations moyennes en (+)-lyonirésinol s'élèvent à 1,9 mg/L dans les vins rouges (de 0,3 à 5,5 mg/L) et 0,8 mg/L dans les vins blancs (de 0,6 à 1,3 mg/L).

Tableau 25. Présence du (+)-lyonirésinol et du (-)-lyonirésinol dans 59 vins rouges et 10 vins blancs.

		Moyenne (mg/L)	1 ^{er} quartile (mg/L)	Médiane (mg/L)	3 ^{ème} quartile (mg/L)
Vins Rouges	(+)-lyonirésinol	1,9	1,0	1,6	2,5
	(-)-lyonirésinol	1,5	0,7	1,1	2,1
Vins Blancs	(+)-lyonirésinol	0,8	0,7	0,8	0,8
	(-)-lyonirésinol	0,7	0,6	0,6	0,7

3. Discussion

Le seuil de détection du (+)-lyonirésinol a été établi à 0,46 mg/L. Le **Tableau 25** montre que ses concentrations moyennes dans les vins sont 4,1 et 1,7 fois plus élevées, respectivement dans les vins rouges et blancs, que cette valeur. Les concentrations en (+)-lyonirésinol sont en effet supérieures à son seuil de détection dans la quasi-totalité des vins dosés au cours de cette étude (**Tableau 25** et **ANNEXE 4**), sauf pour trois échantillons dans lesquels les concentrations en sont très proches.

Ces résultats démontrent clairement l'impact du (+)-lyonirésinol sur l'amertume des vins blancs. Faute de quantité disponible suffisante, le seuil de détection du (+)-lyonirésinol n'a pas été déterminé dans le vin rouge ; l'effet de la matrice pourrait en moduler la valeur. Cependant, l'ampleur des écarts mesurés entre les concentrations en (+)-lyonirésinol dans les vins rouges et son seuil de détection dans les vins blancs suggèrent que le (+)-lyonirésinol doit également avoir un impact sur l'amertume des vins rouges.

C. Dosage des énantiomères du lyonirésinol dans des eaux-de-vie

1. Nature et origine des eaux-de-vie analysées

Les eaux-de-vie utilisées ont été fournies par la maison Rémy-Martin. Parmi leur gamme commerciale, 6 cognacs ont été dosés, ainsi que 4 eaux-de-vie en cours d'élevage.

2. Résultats du dosage du (+)-lyonirésinol dans les eaux-de-vie et discussion

Dans les cognacs commerciaux, la concentration moyenne en (\pm)-lyonirésinol s'élève à 8,8 mg/L avec de fortes variations d'une référence à une autre (3,4 à 17,5 mg/L) (**ANNEXE 4**). Le rapport énantiomérique du lyonirésinol est similaire à celui mesuré dans les vins ($r = 1,18$) et les concentrations en (+)-lyonirésinol varient de 2 à 10 mg/L. Les teneurs plus élevées en lyonirésinol observées dans ces cognacs en comparaison de celles mesurées dans les vins peuvent s'expliquer par les pourcentages en éthanol beaucoup plus élevés des cognacs et la durée supérieure de leur élevage sous bois. Par ailleurs, le cognac résulte d'un assemblage d'eaux-de-vie de différents millésimes, aussi les variations entre références pourraient s'expliquer en partie par l'âge moyen des différents cognacs.

Afin d'étudier l'influence du temps d'élevage sous bois sur la teneur en lyonirésinol, quatre eaux-de-vie élevées en barriques depuis des durées différentes (de 4 à 20 ans) ont été directement prélevées et analysées avant assemblage. Les résultats du dosage montrent que plus l'eau-de-vie a été longtemps au contact du bois, plus la teneur en lyonirésinol total est élevée. En revanche, le rapport énantiomérique est constant, quelle que soit la durée de l'élevage. Ces observations soutiennent l'hypothèse du rôle du temps de contact avec le bois de chêne pour expliquer les teneurs plus élevées observées dans les cognacs en comparaison des vins. (**Figure 28**).

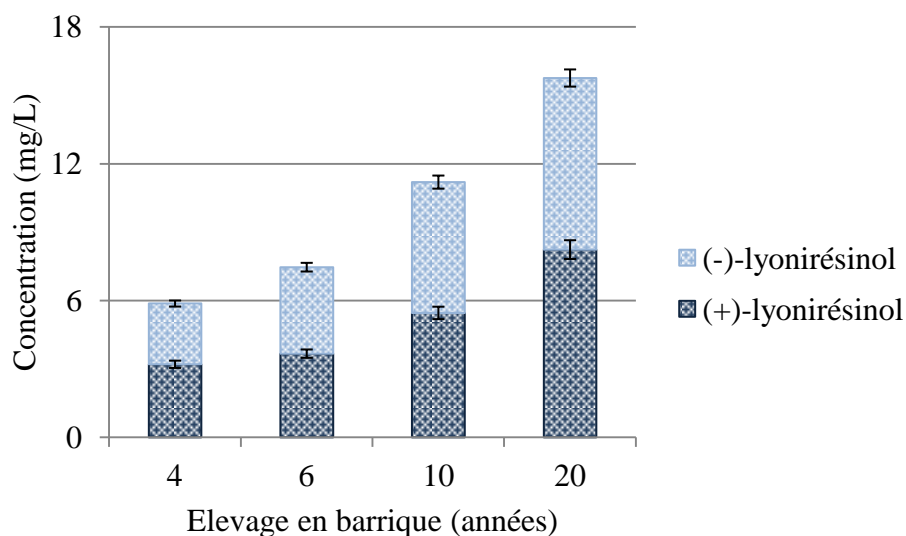


Figure 28. Variations des concentrations en énantiomères du lyonirésinol dans les eaux-de-vie élevées en barriques pendant 4, 6, 10 et 20 ans. Les barres d’erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Par ailleurs, une part du cognac, appelée « la part des anges », est évaporée au cours de l’élevage en barriques, ce qui entraîne une concentration des composés non-volatils. Cependant, ce phénomène est estimé entre 2 et 4 % par an (Lafon *et al.*, 1973). Il ne peut donc expliquer à lui seul les variations des teneurs en (+)-lyonirésinol observées à la **Figure 28**.

Ainsi, les concentrations en (+)-lyonirésinol varient de 3,2 à 8,2 mg/L dans les eaux-de-vie et elles augmentent avec la durée de l’élevage. Malgré la libération du lyonirésinol apportant de l’amertume, l’élevage en barrique du cognac est connu pour améliorer ses qualités organoleptiques. En effet, d’autres composés gustatifs, tels que les quercotriterpénosides à saveur sucrée (Marchal *et al.*, 2011b ; Marchal *et al.*, 2015b) peuvent être libérés de manière concomitante et moduler l’effet du (+)-lyonirésinol sur l’équilibre gustatif des eaux-de-vie. La détermination du seuil de détection du (+)-lyonirésinol dans les eaux-de-vie permettrait la clarification de son impact gustatif dans cette matrice.

D. Dosage des énantiomères du lyonirésinol dans des macérats de bois de chêne

1. Nature et origine des macérats de bois analysés

Les échantillons de bois de chêne sont d’origine française et proviennent de la tonnellerie Seguin Moreau. Deux paramètres de tonnellerie ont été étudiés. Le premier

paramètre est l'influence de l'espèce sur les concentrations en (+)- et (-)-lyonirésinol. Pour cela, 15 échantillons de *Quercus petraea* (chêne sessile) et 15 échantillons de *Quercus robur* (chêne pédonculé) ont été sélectionnés. L'identification des espèces a été effectuée pour chaque échantillon en fonction de sa composition triterpénique, selon la méthode développée par Marchal *et al.* (Marchal *et al.*, 2015d). Le second paramètre étudié est l'effet de la chauffe. Celle-ci est réalisée dans un four à céramique à chaleur tournante. Dans cet essai, cinq douelles sont coupées en cinq fragments (10 cm x 5 cm x 2 cm). Un fragment de chaque douelle est chauffé à 140 °C, un à 180 °C, un à 200 °C et un à 250 °C. Le dernier fragment est conservé comme témoin, non chauffé. Cinq modalités de chauffe sont ainsi obtenues, avec cinq réplicats pour chacune d'entre elles.

Par ailleurs, 13 douelles de chêne sessile ont été extraites de la chaîne de production de Seguin-Moreau après avoir été exposées à une chauffe de cintrage et de bousinage qualifiées de « chauffe moyenne ». Des échantillons (2,5 g) sont collectés par raclage, sur 3 mm d'épaisseur, de la face interne (exposée au feu) et de la face externe (non exposée au feu) de chaque douelle.

Tous ces échantillons ont ensuite été broyés sous forme de poudre et mis à macérer à raison de 50 g/L pendant 48 heures dans une solution modèle de vin (H₂O/EtOH : 88/12, 5 g/L d'acide tartrique, pH 3,5), puis filtrés à 0,45 µm. Les concentrations des échantillons de bois sont exprimées par la suite en mg/g de bois sec.

2. Résultats du dosage du (+)-lyonirésinol dans les macérats de bois et discussion

Compte tenu de l'impact gustatif du (+)-lyonirésinol, il est intéressant de chercher à limiter sa teneur dans le bois afin d'éviter la dépréciation de l'équilibre gustatif des vins que son amertume pourrait provoquer. Des études ont montré l'importance de l'influence des paramètres de tonnellerie, tels que l'origine botanique ou encore l'intensité de la chauffe, sur la composition du bois (Chatonnet *et al.*, 1989 ; Sarni *et al.*, 1990 ; Mosedale *et al.*, 1999). L'espèce de chêne et l'intensité de chauffe constituent ainsi deux paramètres qu'il est possible de contrôler lors de la fabrication des barriques.

a) Influence des espèces de chêne

Les concentrations en (±)-lyonirésinol dans le bois de chêne ont été mesurées à 0,79 et 0,67 mg/g en moyenne, respectivement, pour le chêne sessile et le chêne pédonculé. Une ANOVA à un facteur a mis en évidence l'absence d'effet significatif de l'espèce sur la teneur totale en lyonirésinol (*p-value* = 0,16).

La moyenne des rapports énantiomériques est établie à 1,09 pour le chêne sessile et à 0,99 pour le chêne pédonculé, ce qui suggère que le (+)-lyonirésinol et le (-)-lyonirésinol sont présents dans des proportions similaires dans le bois de chêne, comme l'illustre la **Figure 29**. Des résultats similaires ont été reportés pour *Quercus robur* (Nabeta *et al.*, 1987), ainsi que pour *Quercus petraea* (Cretin *et al.*, 2015).

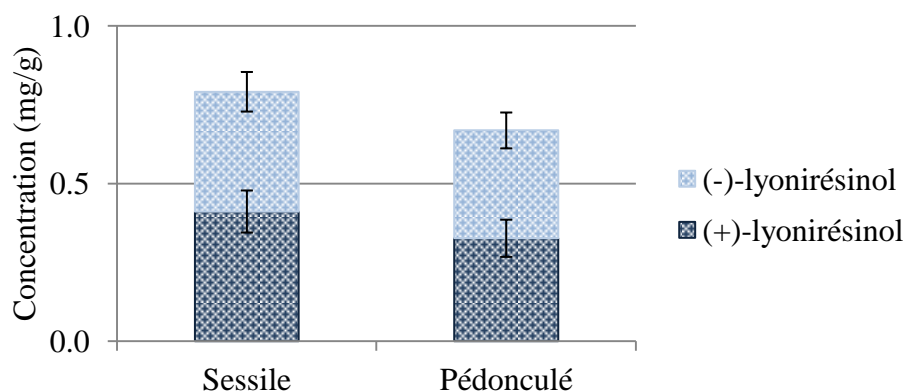


Figure 29. Concentrations en (+)-lyonirésinol et en (-)-lyonirésinol pour les échantillons de bois des espèces sessile et pédonculé. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Par ailleurs, aucun effet significatif de l'espèce n'a été observé pour les concentrations en (+)-lyonirésinol (p -value = 0,07). En effet, le rapport énantiomérique du lyonirésinol met en évidence de fortes variations interindividuelles pour une même espèce, entre 0,56 et 1,43 pour le chêne sessile et entre 0,36 et 1,45 pour le chêne pédonculé. De cette manière, les concentrations en (+)-lyonirésinol s'élèvent de 0,14 à 0,60 mg/L et de 0,12 à 0,52 mg/L, respectivement, pour le chêne sessile et pédonculé. Une telle variabilité interindividuelle a été observée au préalable dans ces deux espèces pour d'autres types de composés, tels que la β -méthyl- γ -octalactone, les ellagitanins (Prida *et al.*, 2006) ou encore les triterpènes (Marchal *et al.*, 2015d). En ce qui concerne le (+)-lyonirésinol, ces fortes variations pourraient contribuer à l'hétérogénéité souvent observée dans les chais entre des barriques de la même origine et fabriquées par le même tonnelier.

b) Influence de la température de chauffe

Les analyses des concentrations en (\pm)-lyonirésinol pour différentes températures de chauffe montrent qu'il reste stable jusqu'à une température de 200 °C, et paraît subir une légère dégradation à 250 °C. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui décrit également une diminution de la concentration en lyonirésinol à partir de 250 °C (Sarni *et al.*, 1990). Cependant, les analyses statistiques ne révèlent aucun écart significatif de la teneur en

(+)-lyonirésinol entre le témoin et les modalités chauffées, de 140 à 250 °C (**Figure 30**). Ce manque de significativité s'explique en partie par la forte variation inter-répliat pour chaque température.

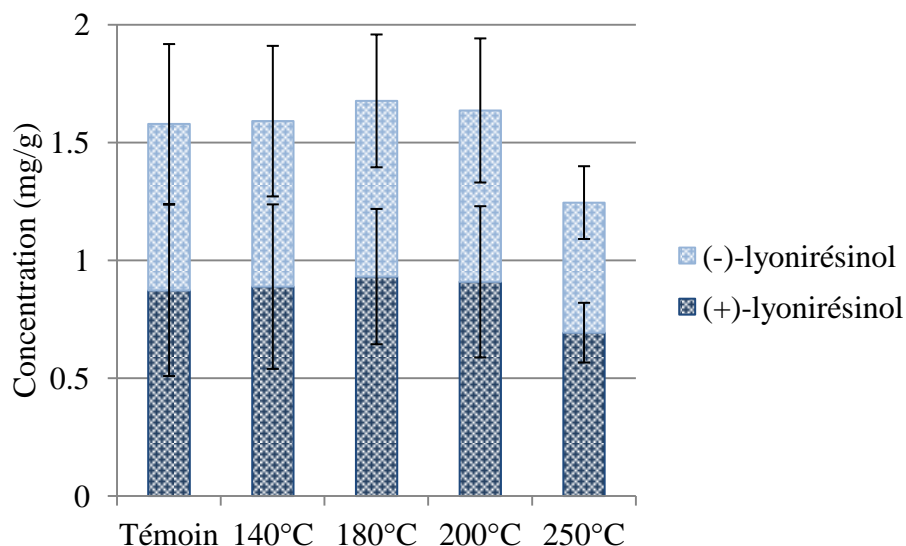


Figure 30. Variations des concentrations en (+)-lyonirésinol et en (-)-lyonirésinol à différentes températures de chauffe (de 140 °C à 250 °C). Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Afin de limiter cette hétérogénéité, des douelles ont été sélectionnées sur la base de leurs teneurs similaires en lyonirésinol et chauffées sur leur face interne, comme c'est le cas lors du processus de fabrication des barriques en tonnellerie. Des échantillons ont été collectés sur la face interne (chauffée) et la face externe (non chauffée) de ces douelles et le lyonirésinol y a été dosé. Les résultats montrent de très faibles écart-types, permettant une interprétation plus juste des résultats. Toutefois, les analyses statistiques ne montrent aucune différence entre les faces interne et externe des douelles, que ce soit en terme de teneur totale de lyonirésinol ($p\text{-value} = 0,62$) ou de concentration moyenne en (+)-lyonirésinol ($p\text{-value} = 0,83$). En effet, les concentrations moyennes en (+)-lyonirésinol s'élèvent à 0,79 mg/g pour la face interne et à 0,80 mg/g pour la face externe des douelles, comme l'illustre la **Figure 31**.

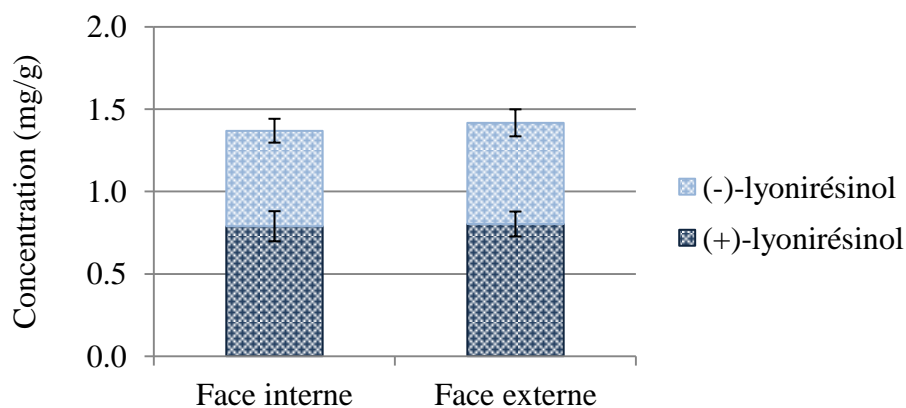


Figure 31. Concentrations en (+)-lyonirésinol et en (-)-lyonirésinol d'échantillons provenant des faces interne (chauffée) et externe (non chauffée) de douelles de bois de chêne. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Ainsi, les paramètres de tonnellerie étudiés ne semblent pas avoir d'impact significatif sur la concentration en (+)-lyonirésinol. La maîtrise de l'espèce de chêne utilisée ou de la chauffe appliquée ne semble donc pas pertinente pour moduler l'apport amer du (+)-lyonirésinol.

Conclusion

Le lyonirésinol est une molécule amère libérée par le bois de chêne au cours de l'élevage en barriques. Il appartient à la famille des lignanes, qui n'avait été que très peu étudiée dans le bois de chêne et les vins. Une approche de criblage ciblée a d'abord été mise en œuvre et décrite au chapitre 3. Plusieurs dérivés et analogues du lyonirésinol ont été isolés et identifiés par résonance magnétique nucléaire. Certains d'entre eux n'avaient jamais été décrits dans le genre *Quercus* et un composé a été caractérisé pour la première fois. L'étude de leurs propriétés sensorielles a révélé plusieurs composés amers, sans toutefois établir de lien évident entre la structure chimique et les propriétés organoleptiques. La confrontation des données sensorielles et quantitatives a établi que le lyonirésinol est à la fois le plus abondant et le plus amer des lignanes observés dans le bois de chêne et les vins.

Des études précédentes avaient montré que le lyonirésinol est présent sous forme racémique dans le bois de chêne. En outre, sa structure comporte trois centres stéréogènes. Lors du dernier chapitre, les stéréoisomères du lyonirésinol présents dans le bois de chêne ont donc été étudiés. Un diastéréoisomère nommé *epi*-lyonirésinol a été observé, sous forme de mélange de deux énantiomères ; il est peu actif au niveau sensoriel. Par ailleurs, les

énantiomères du lyonirésinol ont été séparés et leur configuration absolue a été établie par dichroïsme circulaire vibrationnel. Seule la forme dextrogyre, (8*R*, 8'*R*, 7'*S*)-(+)-lyonirésinol, est responsable de l'amertume du mélange racémique.

La détermination de son seuil de détection et de ses concentrations dans les vins et les eaux-de-vie, a permis de mettre en évidence son impact sur le goût du vin par une augmentation d'amertume. Enfin, l'étude de l'influence de paramètres de tonnellerie a permis de mettre en évidence que la libération du (+)-lyonirésinol n'est pas influencée par l'origine botanique ni par l'intensité de la chauffe du bois. En revanche, une grande variabilité a été observée entre échantillons de la même espèce et l'origine de cette hétérogénéité devra faire l'objet d'études ultérieures afin de mieux maîtriser la contribution amère de l'élevage sous bois.

DEUXIÈME PARTIE

INFLUENCE SENSORIELLE DE LA CUVAISON DES VINS ROUGES SUR LEUR ÉQUILIBRE GUSTATIF

DEUXIÈME PARTIE :
INFLUENCE SENSORIELLE DE LA CUVAISON DES VINS ROUGES SUR LEUR
ÉQUILIBRE GUSTATIF

CHAPITRE 5 - ÉTUDE DE L'EFFET DE LA MACÉRATION POST-FERMENTAIRE À CHAUD SUR LE GOÛT DES VINS ROUGES

Introduction

Tout type de vinification comporte une étape clé au cours de laquelle les composés du raisin sont dissous dans la phase liquide ; ils seront responsables de sa couleur, de son odeur et de son goût. Néanmoins, comme l'écrivait Emile Peynaud, « *le vin n'est pas tout le raisin ; il n'en représente que la meilleure part* » (Peynaud, 1981). Les grands vins procèdent en effet d'une extraction sensible, sélective et partielle des constituants du raisin. Dans le cas de l'élaboration de la plupart des vins rouges, cette extraction a d'abord lieu en phase fermentaire par macération des raisins dans le jus. Le lessivage du chapeau favorise alors la dissolution des constituants de la pellicule, du pépin et, dans certains types de vinification, de la rafle. Il peut être réalisé par remontage, par pigeage ou par délestage, à des fréquences dépendantes des objectifs esthétiques des vinificateurs. Avec l'achèvement de la fermentation alcoolique, l'action humaine se fait plus discrète voire inexistante. Il est fréquent que les cuves soient inertées avec du dioxyde de carbone pour éviter la prolifération de microorganismes aérobies d'altération, puis que le vin soit laissé au contact du marc sans autre intervention ; c'est la macération post-fermentaire. Au cours de cette phase d'infusion, la température du vin est généralement augmentée et l'on parle ainsi de macération post-fermentaire à chaud. Il s'agit d'une variante de la macération finale à chaud qui consistait à augmenter la température de la cuve à 45 °C pendant 12 à 36 heures avant d'écouler les vins. Cette technique ancienne, décrite en 1971 par Emile Peynaud, était appliquée à un « *vin ayant achevé sa fermentation alcoolique [afin d'extraire] les tanins solubles dans l'alcool pour en renforcer la structure et le corps* » (Peynaud, 1971). De nos jours, la macération post-fermentaire des grands vins rouges est généralement effectuée aux alentours de 28-30 °C. Cette température favorise l'infusion du marc mais également l'autolyse des levures, dont les bienfaits sur la stabilité tartrique (Moine-Ledoux *et al.*, 1999) ont été démontrés. Cette phase de cuvaison semble en outre jouer un rôle organoleptique majeur en conférant davantage de structure, de densité et de douceur au vin. Il convient toutefois de ne pas la prolonger de façon excessive afin d'éviter des déviations aromatiques ou une perception de sécheresse tannique. Jusqu'à présent, le

choix de la date d'écoupage est guidé par l'empirisme et les dégustations quotidiennes des vinificateurs.

Si la macération post-fermentaire est ainsi pratiquée dans de nombreux chais (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b), son influence sur la douceur des vins n'a jamais été clairement établie. L'explicitation de sa contribution à l'équilibre gustatif des vins rouges constitue un préalable à la compréhension des phénomènes moléculaires associés.

I. Étude bibliographique de l'effet de la macération post-fermentaire à chaud (MPFC) sur la qualité du vin

A. Principe et rôle de la MPFC

La macération post-fermentaire à chaud s'effectue au cours de la cuvaison après la fermentation alcoolique du vin rouge. Elle confère en partie aux vins leurs caractéristiques sensorielles, telles que la couleur, l'arôme et le goût. D'un point de vue chimique, la MPFC est décrite dans la littérature comme apportant de fortes quantités de catéchine (Sun *et al.*, 1999 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a), de quercétine (Merida *et al.*, 2015) ou encore de *trans*-resvératrol (Pezet *et al.*, 1996). Cette étape a donc un intérêt œnologique, non seulement pour une évolution qualitative du vin mais également pour son apport de composés phénoliques aux propriétés anti-oxydantes (Aust, 1997), bactéricides (Aust, 1997 ; Jayaprakasha *et al.*, 2003) et cardiovasculaires bénéfiques (Auger *et al.*, 2005), renforçant ainsi une perception positive vis-à-vis des consommateurs.

B. Phénomènes physiques associés à la macération

La baie de raisin renferme plusieurs tissus, dont les constituants peuvent posséder des propriétés sensorielles et sont extraits de façon différentielle pendant la macération. De nombreux travaux ont été consacrés à la quantification des composés phénoliques de la pulpe, de la pellicule et des pépins (Kovac *et al.*, 1995 ; Sun *et al.*, 1999 ; Kennedy *et al.*, 2000 ; Waterhouse *et al.*, 2000 ; Kelebek *et al.*, 2006 ; Minana Castello *et al.*, 2006 ; Chira *et al.*, 2008 ; Gonzalo-Diago *et al.*, 2013 ; Di Lecce *et al.*, 2014). Cependant, afin de pouvoir discuter ces teneurs dans le vin fini, il est nécessaire de comprendre les phénomènes d'extraction au cours de la cuvaison. La libération des composants du marc dans le jus est dépendante de plusieurs phénomènes élémentaires dont la résultante constitue la cinétique globale de la macération. Ces facteurs, communs à tous les types de macération, ont été décrits par Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) :

Deuxième partie : Influence sensorielle de la cuvaison des vins rouges sur leur équilibre gustatif

- l'extraction/dissolution, correspond au passage des constituants des vacuoles des cellules des parties solides du marc à la phase liquide. Elle dépend notamment des cépages et de l'état de maturité des raisins, mais elle est également facilitée par la destruction des tissus, soit par voie enzymatique, soit par un foulage intense ou d'autres facteurs favorisant l'éclatement des cellules (sulfitage, éthanol, température, temps de contact),

- la diffusion, qui se produit dans le marc, dont le liquide interstitiel se sature en composants extraits, entraînant ainsi l'arrêt des échanges. Elle dépend principalement du renouvellement du jus qui imprègne le marc, réalisé par le remontage ou le pigeage lors de la macération fermentaire et, plus rarement, post-fermentaire,

- la refixation des substances sur les parties solides du milieu telles que les rafles, le marc ou les levures,

- la modification des substances extraites.

C. Phénomènes chimiques et sensoriels observés pendant la MPFC et décrits dans la littérature

En fin de fermentation alcoolique, l'autolyse des levures survient. Il s'agit de la digestion de la cellule provoquée par des enzymes endogènes. Ce phénomène entraîne une destruction de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique conduisant notamment à la libération de la protéine Hsp12. Il a récemment été montré que la présence de cette protéine confère davantage de sucrosité au vin (Marchal *et al.*, 2011a). Dans le cas des vins blancs, l'autolyse se déroule pendant l'élevage sur lies et dure plusieurs semaines. Lors de la vinification en rouge, la température plus élevée lors de la macération post-fermentaire favorise l'activité enzymatique et l'essentiel de l'autolyse a ainsi lieu pendant cette étape. Ainsi, ces observations ont montré que le gain de sucrosité des vins lors de la MPFC s'expliquait notamment par l'autolyse des levures.

Des mannoprotéines de levures sont également solubilisées au cours de l'autolyse. Si leur impact organoleptique direct sur le gras et le moelleux des vins semble négligeable (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b), en revanche leur rôle indirect sur l'astringence a été mis en évidence (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Escot *et al.*, 2001 ; Poncet-Legrand *et al.*, 2007 ; Diako *et al.*, 2016). En effet, la combinaison des polysaccharides avec les composés phénoliques conduit à une baisse de la perception d'astringence (Riou *et al.*, 2002 ; Carvalho *et al.*, 2006).

Par ailleurs, une diminution des anthocyanes est observée au cours de la macération post-fermentaire (Gambuti *et al.*, 2009). Elle s'explique en partie par leur réaction avec des tanins résultant en la stabilisation de la couleur des vins rouges (Salas *et al.*, 2004 ; Cheynier

et al., 2006 ; Fulcrand *et al.*, 2006), mais également par des réactions de copigmentation avec d'autres anthocyanes, des métaux, des acides phénoliques ou autres flavonoïdes (Boulton, 2001).

Il a également été observé que la quantité de resvératrol augmente fortement au cours des étapes post-fermentaires. Ces résultats ont notamment été expliqués par la libération de picéïde, forme glycosylée du resvératrol, qui est hydrolysée en sa forme libre au cours de la macération post-fermentaire (Pezet *et al.*, 1996 ; Kostadinović *et al.*, 2012).

D. Effets des principaux paramètres de la MPFC sur la composition du vin

Les modifications sensorielles observées au cours de la MPFC dépendent principalement des caractéristiques qualitatives et quantitatives des composés extraits. La plupart des études réalisées jusqu'à présent ont porté conjointement sur les macérations fermentaire et post-fermentaire. Elles ont permis de dégager plusieurs paramètres influençant significativement l'extraction, tels que la durée de macération (Gambutì *et al.*, 2004 ; Francesca *et al.*, 2014), la température (Zimman *et al.*, 2002 ; Merida *et al.*, 2015), les techniques utilisées (remontage ou pigeage) (Bosso *et al.*, 2011) ou le pourcentage d'alcool atteint en fin de fermentation. Par ailleurs, des différences d'extraction des composés phénoliques ont été observées selon les cépages (Gambutì *et al.*, 2009). Les caractéristiques physico-chimiques de la pellicule (Riou *et al.*, 2002 ; Gagné *et al.*, 2006 ; Ortega-Regules *et al.*, 2006 ; Lacampagne, 2010), la localisation des molécules dans la baie (Gény *et al.*, 2003), ou bien encore leur structure chimique (par exemple, degré de polymérisation ou galloylation des tanins) (Fournand *et al.*, 2006) peuvent induire des différences d'extraction des composés du raisin. Les facteurs que le vinificateur peut plus facilement contrôler, mesurer et donc modifier sont ceux relatifs au temps de macération, à la température et aux techniques d'extraction employées.

1. Influence du temps de macération

Les macérations sont généralement modulées en fonction de la qualité du raisin et du style de vin recherché. Il n'existe pas de proportionnalité entre l'extraction des composés et le temps de macération (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Sudraud a montré que l'intensité colorante diminue pendant la MPFC, après avoir atteint un maximum au bout de 8 à 10 jours suivant l'encuvage (Sudraud, 1963). Cette diminution s'explique par la complexation des anthocyanes avec les tanins libérés au cours de la MPFC (Kovac *et al.*, 1995 ; Boulton, 2001 ; Cheynier *et al.*, 2006). Cette réaction de complexation explique également les résultats

Deuxième partie : Influence sensorielle de la cuvaison des vins rouges sur leur équilibre gustatif

obtenus après une addition de pépins effectuée au cours de la macération et résultant en une stabilisation de la couleur (Kovac *et al.*, 1995). En ce qui concerne l'extraction des flavanols et des tanins condensés, le temps de macération fait varier non seulement la quantité extraite mais également le tissu d'origine des principaux composés extraits (González-Manzano *et al.*, 2004). En effet, les tanins de pellicules se solubilisent dès le début de la cuvaison et l'augmentation de la teneur en éthanol favorise leur extraction. Les tanins de pépins sont extraits plus tardivement, à partir du milieu de la fermentation alcoolique et pendant la MPFC, car leur libération nécessite la dissolution des lipides de la cuticule du pépin permise par l'éthanol (González-Manzano *et al.*, 2004).

Kovac *et al.*, ont non seulement décrit l'évolution de la composition des vins en flavanols et en tanins au cours de la MPFC, mais également leur évolution organoleptique (Kovac *et al.*, 1992). Les teneurs en composés phénoliques augmentent de plus de 230 % au cours des 7 premiers jours et de 20 % seulement au cours des 7 jours suivants. Les dégustations qu'ils ont effectuées ont montré que les vins ayant subi 6 et 7 jours de macération étaient les plus appréciés.

De nombreux travaux ont étudié l'effet des temps de macération sur la composition en composés phénoliques au cours de la fermentation alcoolique (Gómez-Plaza *et al.*, 2001 ; Zimman *et al.*, 2002 ; Kelebek *et al.*, 2006), mais peu ont étudié le temps de macération post-fermentaire (Gambutu *et al.*, 2004 ; Ivanova *et al.*, 2011). Parmi ces derniers, del Llaudy *et al.*, ont mis en relation l'effet du temps de macération avec l'état de maturité du raisin et ont montré qu'une macération longue n'est pas favorable en présence de raisin non mature. Une telle cuvaison entraînerait en effet une augmentation de l'astringence, alors qu'en présence de raisins mûrs, elle favorise des vins de garde structurés et tanniques pouvant par la suite effectuer un élevage en barrique. En effet, les macérations courtes produisent des vins contenant principalement des tanins de pellicules, alors que de longues macérations favorisent la diffusion des composés du pépin (González-Manzano *et al.*, 2004 ; Llaudy *et al.*, 2008). Ainsi, si les baies ne sont pas à maturité, les pépins libèrent de plus grande quantité de procyanidines, notamment des procyanidines galloylés, possédant des propriétés astringentes (Joslyn *et al.*, 1964). Le niveau de maturité du raisin est donc à prendre en compte dans le choix du temps de macération post-fermentaire et du type de vin recherché.

De manière générale, les études ayant porté sur des MPFC longues mettent en évidence une augmentation de composés phénoliques (Ivanova *et al.*, 2011), ainsi qu'une amélioration globale de la qualité et de la rondeur des vins (Francesca *et al.*, 2014).

2. Influence de la température

L'augmentation de la température favorise la dissolution des constituants du marc (Gerbaux, 1993 ; Gerbaux *et al.*, 2003 ; Sacchi *et al.*, 2005). Excepté les travaux de Koyama *et al.* (Koyama *et al.*, 2007), la majorité des études réalisées sur l'effet de la température de macération ont mis en évidence qu'une augmentation de température résulte en de plus fortes teneurs en composés phénoliques et notamment en procyanidines polymériques (Zimman *et al.*, 2002 ; Merida *et al.*, 2015), alors que la couleur des vins n'en est pas significativement modifiée (Gao *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'augmentation de la température en fin de macération a prouvé avoir des effets bénéfiques sur la qualité des vins rouges (Ough *et al.*, 1961b, 1961a). Gerbaux *et al.* ont également mis en évidence une augmentation de la qualité des vins, des teneurs en polyphénols et de l'intensité colorante après un chauffage à 40 °C pendant une journée en phase post-fermentaire (Gerbaux, 1993 ; Gerbaux *et al.*, 2003). Les températures de macération post-fermentaire globalement utilisées aujourd'hui s'élèvent en moyenne entre 30 et 35 °C (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). Au-delà de l'extraction des composés du raisin, des températures élevées en phase post-fermentaire favorisent l'autolyse des levures. Il en résulte une plus grande libération de mannoprotéines améliorant la stabilité physico-chimique du vin (Moine-Ledoux *et al.*, 1999) et de peptides contribuant à sa saveur sucrée (Marchal *et al.* 2015).

3. Pigeage et Remontage

Bien que les préconisations encouragent des macérations sous inertage avec le minimum d'intervention possible, certaines pratiques telles que le pigeage et le remontage sont parfois utilisées (Zamora, 2003 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). Ces techniques consistent principalement à homogénéiser le vin et à humidifier le chapeau de marc. Cependant, l'extraction mécanique durant la phase post-fermentaire, dans un milieu riche en alcool, risque d'entraîner une sur-extraction, un déséquilibre tannique et la perception d'une sécheresse dépréciant sa qualité (Bertuccioli *et al.*, 2002).

Ainsi, un grand nombre de travaux ont été consacrés à la libération de composés phénoliques pendant la cuvaison. Cependant, la contribution sensorielle de la MPFC en elle-même n'a été que peu étudiée, en particulier dans les conditions utilisées pour l'élaboration des grands vins rouges de Bordeaux. Bien que couramment noté par les vinificateurs, son effet supposé sur la sensation de sucrosité n'a fait l'objet d'aucune étude scientifique et

demeure une hypothèse. Il convient dès lors de la confronter à l'expérience afin de tester sa validité.

II. Matériel et méthodes des expérimentations de MPFC

1. Mise en place des essais

a) Expérimentation 1

Cette première expérimentation a été mise en place au chai afin d'évaluer, en conditions réelles d'une vinification classique, l'effet de la MPFC sur le goût du vin.

(1) Origine et caractéristiques des raisins utilisés

Les expériences ont été réalisées dans trois propriétés situées en appellation Cadillac-Côtes de Bordeaux (propriété A) et Graves (propriété B et C). Trois parcelles de Merlot et trois autres parcelles de Cabernet-Sauvignon ont été sélectionnées, respectivement, lors des millésimes 2014 et 2015. Les modalités et les types de sols des parcelles sélectionnées sont récapitulés dans le **Tableau 26**.

Tableau 26. Caractéristiques des parcelles sélectionnées pour l'expérimentation 1.

Série	M1	M2	M3	CS1	CS2	CS3
Propriété	B	A	A	C	C	B
Millésime	2014	2014	2014	2015	2015	2015
Cépage	Merlot	Merlot	Merlot	Cabernet-Sauvignon	Cabernet-Sauvignon	Cabernet-Sauvignon
Sol	Calcaire	Sable	Argile	Graves	Graves	Calcaire

(2) Caractéristiques des millésimes 2014 et 2015 à Bordeaux

Le millésime 2014, a connu un hiver doux mais pluvieux, suivi de températures chaudes à la fin mars, provoquant un débourrement précoce et une pousse active jusqu'à la mi-avril. Puis, les températures se sont rafraîchies, provoquant un ralentissement de la croissance végétative. Cette dernière, ainsi que la croissance de la baie a repris au mois de mai grâce à des températures plus chaudes. Cependant, de forts orages accompagnés de grêles au mois de mai, ont retardés l'avance alors prise lors du débourrement, et le temps frais et humide fut peu propice à une bonne fécondation. Le manque d'ensoleillement, provoquant un déficit photosynthétique a eu pour conséquence une floraison hétérogène avec des phénomènes de coulure sur les parcelles précoces de Merlot. Le mois de juin fut sec et chaud,

Deuxième partie : Influence sensorielle de la cuvaison des vins rouges sur leur équilibre gustatif

permettant l'homogénéisation de la floraison et le rendement de l'année a pu être rattrapé grâce aux parcelles tardives de Merlot et de Cabernet-Sauvignon. Les conditions du millésime 2014, sans contrainte hydrique marquée et avec un climat plutôt doux, ont avantagé la croissance végétative et une croissance rapide des baies. Les mois de juillet et d'août, avec une alternance de pics de chaleur, de fraîcheur et d'humidité ont été plus favorables au développement végétatif plutôt qu'à la maturation du raisin. Cette période d'alternance entre les grosses chaleurs et les orages n'a pas permis l'arrêt de croissance, d'où une forte hétérogénéité de la véraison, et une apparition de la couleur assez lente. Les mois de septembre et d'octobre, plus chauds, ont généré un début de contrainte hydrique, mettant fin à la croissance végétative et permettant l'accélération de la maturation des raisins. Les vendanges se sont ensuite déroulées dans de bonnes conditions climatiques. Avec une absence de contrainte hydrique pendant la phase de croissance végétative, les baies ont atteint des tailles bien supérieures aux précédents millésimes. Cependant, les gros volumes des baies n'ont pas empêché l'enrichissement en sucre au cours du mois de septembre. En outre, l'été froid a eu pour conséquence une acidité plus élevée que la normale, caractéristique de ce millésime 2014. « De couleur satisfaisante, élégants et complexes » (Dubourdiu *et al.*, 2014).

Le millésime 2015, a connu un hiver plus frais qu'en 2014 et moins arrosé que la normale, causant un débourrement un peu plus tardif que la moyenne. Ce retard a vite été rattrapé par des conditions climatiques plus sèches et chaudes au mois d'avril permettant un débourrement rapide et homogène. L'été sec et chaud qui a suivi a permis une floraison et une nouaison précoce, rapide et homogène et une bonne croissance de la baie. La contrainte hydrique du mois de juillet a engendré un ralentissement de la phénologie de la vigne et l'arrêt de croissance végétative au début de la véraison. La situation hydrique devenant critique vers la fin juillet, le démarrage de la véraison fut ralenti. Puis, le reste du mois d'août, avec une alternance de pluie et des chaleurs moyennes, a permis de relancer le fonctionnement de la plante et le grossissement des baies, dont la taille fut hétérogène en fonction des secteurs. Les mois de septembre et d'octobre, sans pluie, ensoleillés tout en restant frais, ont permis de regrouper les conditions idéales pour les vendanges. Ainsi, ce millésime est marqué par une acidité relativement basse, en raison de l'été très chaud et sec. Les tailles des baies étaient variables, en fonction de la pluviométrie du mois d'août. Il en a résulté des vins fruités, structurés, et de grande qualité. « Les vins rouges sont délicieux. Ils ont le charme et la grâce inimitables des grands bordeaux » (Dubourdiu *et al.*, 2015).

(3) Protocole de vinification mis en place au chai

Chaque parcelle a été vendangée et vinifiée séparément en cuve inox de 120 hL. La vendange a été sulfitée à 5 g/hL puis ensemencée avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* F33 (Laffort œnologie) à la dose de 10 g/hL. Les cuves ont été maintenues à une température de 26 °C (dans le jus) pendant la durée des fermentations alcooliques. Une extraction douce a été réalisée par le remontage d'environ 1/3 de la fraction du jus, une à deux fois par jour. A la fin de la fermentation alcoolique, les cuves ont été saturées en CO₂. Pour chaque cuve, un premier écoulage a été réalisé directement après la fin de la fermentation alcoolique dans une barrique ayant contenu préalablement deux récoltes (« barrique de 2 ans »), conduisant à la modalité **FA**. Ensuite, les cuves ont été maintenues à 30 °C pour réaliser la MPFC pendant 10 jours. A l'issue de la MPFC, et pour chaque cuve, un second écoulage a été réalisé dans une barrique ayant contenu préalablement deux récoltes, conduisant à la modalité **MPF**. Puis, les modalités **FA** et **MPF** ont été ensemencées avec des bactéries lactiques *Oenococcus oeni* Vitilactic F à 1 g/hL afin de procéder à la fermentation malo-lactique (FML). Les échantillons utilisés dans cette étude ont été prélevés dans les barriques six mois après l'achèvement de la FML.

(4) Expériences d'autolyse des levures au laboratoire

Au laboratoire, une troisième modalité a été préparée en effectuant une autolyse de levures dans la modalité **FA** selon la procédure mise au point par Marchal *et al.* (2011). Pour cela, une culture de souche de levures *Saccharomyces cerevisiae* F33 (Laffort œnologie) a été réalisée selon le protocole décrit ci-dessous.

L'ensemble de la verrerie et des milieux utilisés a été préalablement stérilisé à l'aide d'un autoclave (120 °C, 20 min). Les levures ont été déposées sur une boîte de Pétri contenant du milieu YPD (1 % d'extrait de levures, 2 % de peptone, 2 % de D-glucose) solidifié avec 2 % d'agar. La boîte a été conservée pendant 2 jours dans une étuve à 30 °C. Puis, elle a été utilisée afin d'inoculer un erlenmeyer de 150 mL d'un milieu YPD liquide. Ce levain a été agité pendant 2 jours à 30 °C et a permis d'inoculer 6 erlenmeyers contenant chacun 500 mL d'un milieu YPD liquide afin d'obtenir un maximum de biomasse. Ce levain a de nouveau été agité pendant 2 jours à 30 °C et la densité optique (DO) a été mesurée. A la fin de la période de culture, le milieu a été centrifugé à 2800 g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants ont été éliminés et les culots ont été regroupés et rincés à l'eau ultra-pure. Le culot a ensuite été repris dans quelques millilitres d'eau ultra-pure et la DO a été mesurée à 600 nm. Une unité d'absorbance équivaut à $2,4 \times 10^7$ cellules/mL. Les quantités souhaitées ont donc été

Deuxième partie : Influence sensorielle de la cuvaison des vins rouges sur leur équilibre gustatif

prélevées et les levures ont été ensemencées à 10^8 cellules/mL dans 750 mL de la modalité **FA** après *FML* pour les vins issus des parcelles M1, M2 et M3. Les bouteilles ont ensuite été placées pendant 10 jours dans une étuve à 30 °C afin de mimer les conditions de la MPFC, ce qui conduit à la modalité **FA+L**. La **Figure 32** récapitule le processus de vinification et les modalités étudiées.

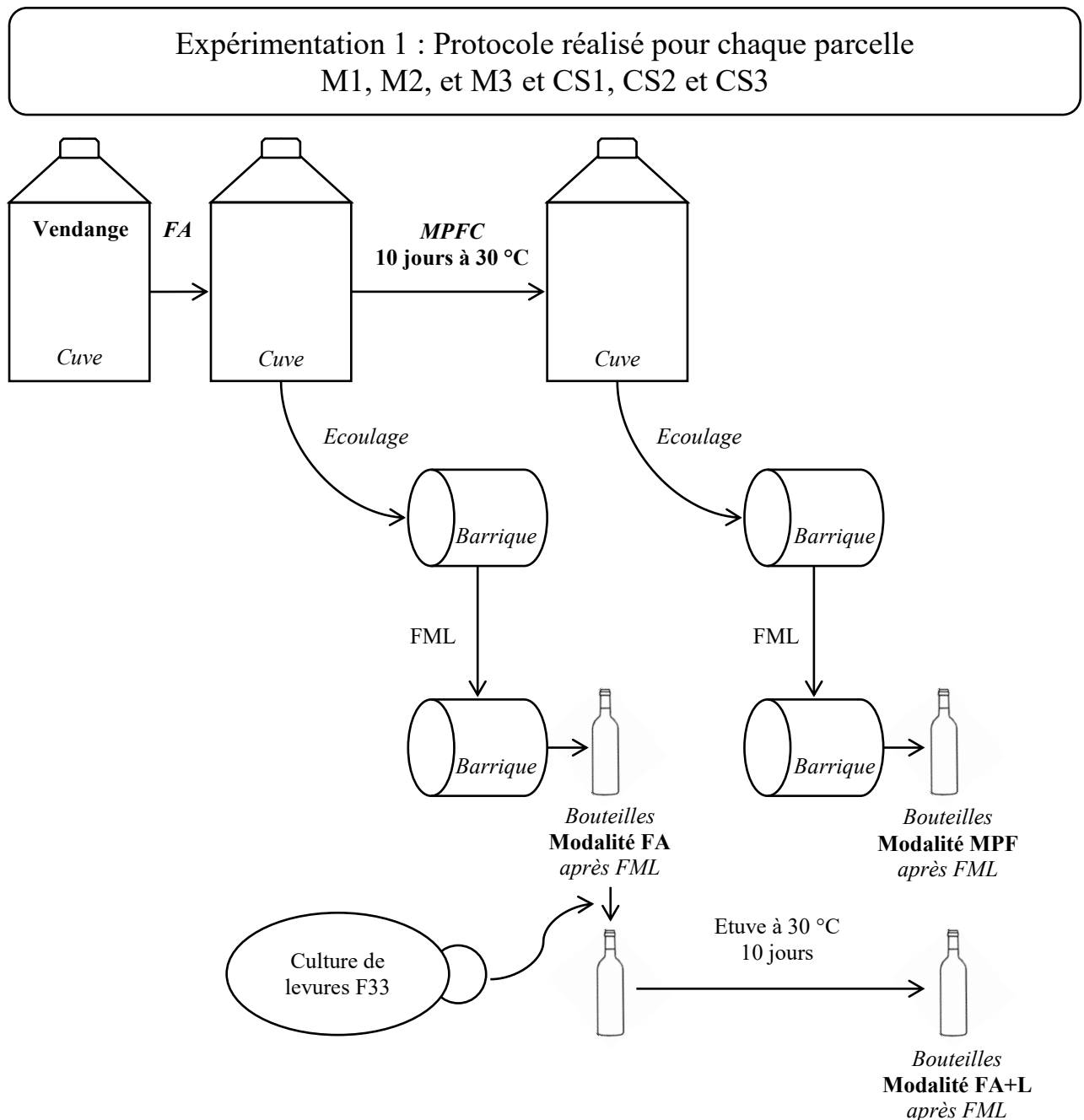


Figure 32. Protocole de vinification de l'expérimentation 1.

b) Expérimentation 2

Une seconde expérimentation a été réalisée afin d'étudier l'évolution gustative des vins au cours de la MPFC en fonction du potentiel qualitatif des raisins.

(1) Origine et caractéristiques des raisins utilisés

Les expériences ont été réalisées dans une propriété de l'appellation Pessac-Léognan au cours du millésime 2015. Deux parcelles de Merlot et deux parcelles de Cabernet-Sauvignon ont été sélectionnées. Pour chaque cépage, une des deux parcelles est issue des meilleurs terroirs de la propriété et produit des vins rentrant quasi systématiquement dans l'assemblage du grand vin. L'autre parcelle est issue d'un terroir plus ordinaire, donnant une qualité hétérogène selon les millésimes et entrant généralement dans la composition du second vin. Le **Tableau 27** récapitule les caractéristiques de l'origine des raisins des parcelles sélectionnées.

Tableau 27. Caractéristiques des parcelles sélectionnées pour l'expérience 2.

Série	M4	M5	CS4	CS5
Cépage	Merlot « Grand Vin »	Merlot « Second Vin »	Cabernet- Sauvignon « Grand Vin »	Cabernet- Sauvignon « Second Vin »
Sol	Sable 50 % Argile 25 % Graves 25 %	Sable 50 % Alluvions 50 %	Sable 50 % Argile 25 % Graves 25 %	Sable 50 % Argile 25 % Graves 25 %

Les caractéristiques du millésime 2015 ont été décrites préalablement au Chapitre 5-II.1.a)(2).

(2) Protocole de vinification

Chaque parcelle a été vendangée et vinifiée séparément en cuve béton. Pour chaque cuve, la vendange a été sulfitée à 5 g/hL puis ensemencée avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* F33 (Laffort œnologie) à la dose de 10 g/hL. Les cuves ont été maintenues à une température de 26 °C pendant la durée des fermentations alcooliques et une extraction douce a été réalisée par le remontage d'environ 1/3 de la fraction du jus, une à deux fois par jour. A la fin de la fermentation alcoolique, les cuves ont été saturées en CO₂ et maintenues à 28 °C. Dès l'achèvement de la fermentation alcoolique et lors de la MPFC, des prélèvements sont

Deuxième partie : Influence sensorielle de la cuvaison des vins rouges sur leur équilibre gustatif

réalisés pour simuler un écoulage à plusieurs dates de macération (voir paragraphe suivant). Les échantillons prélevés à différents temps ont été placés en chambre froide à 4 °C. Ils ont ensuite été réchauffés à 22 °C etensemencés avec des bactéries lactiques (Vitalactic F) à 1 g/hL. En fin de FML, des échantillons ont également été prélevés à partir de chaque cuve.

(3) Modalités étudiées

Au cours de la MPFC, quatre prélèvements ont été effectués à la propriété, pour chaque parcelle : le premier à la fin de la fermentation alcoolique (**FA**), le second après 5 jours de MPFC (**FA+5**), le troisième après 10 jours de MPFC (**FA+10**) et le dernier après 15 jours de MPFC (**FA+15**).

Au cours du premier prélèvement de ces quatre modalités, pour chaque parcelle, plusieurs contenants ont été utilisés :

- Une bouteille de 750 mL, dont le contenu a été sulfité à 6 g/hL avant FML et placé au frais pour une première dégustation de comparaison des quatre modalités.
- Deux magnums de 1500 mL, placés au frais (4 °C) après prélèvement afin que la FML ne démarre pas seule. A la fin des prélèvements, la FML a été réalisée simultanément dans les différentes modalités, comme décrit au paragraphe précédent.

La **Figure 33** récapitule le protocole de vinification et les modalités étudiées au cours de l'expérimentation 2.

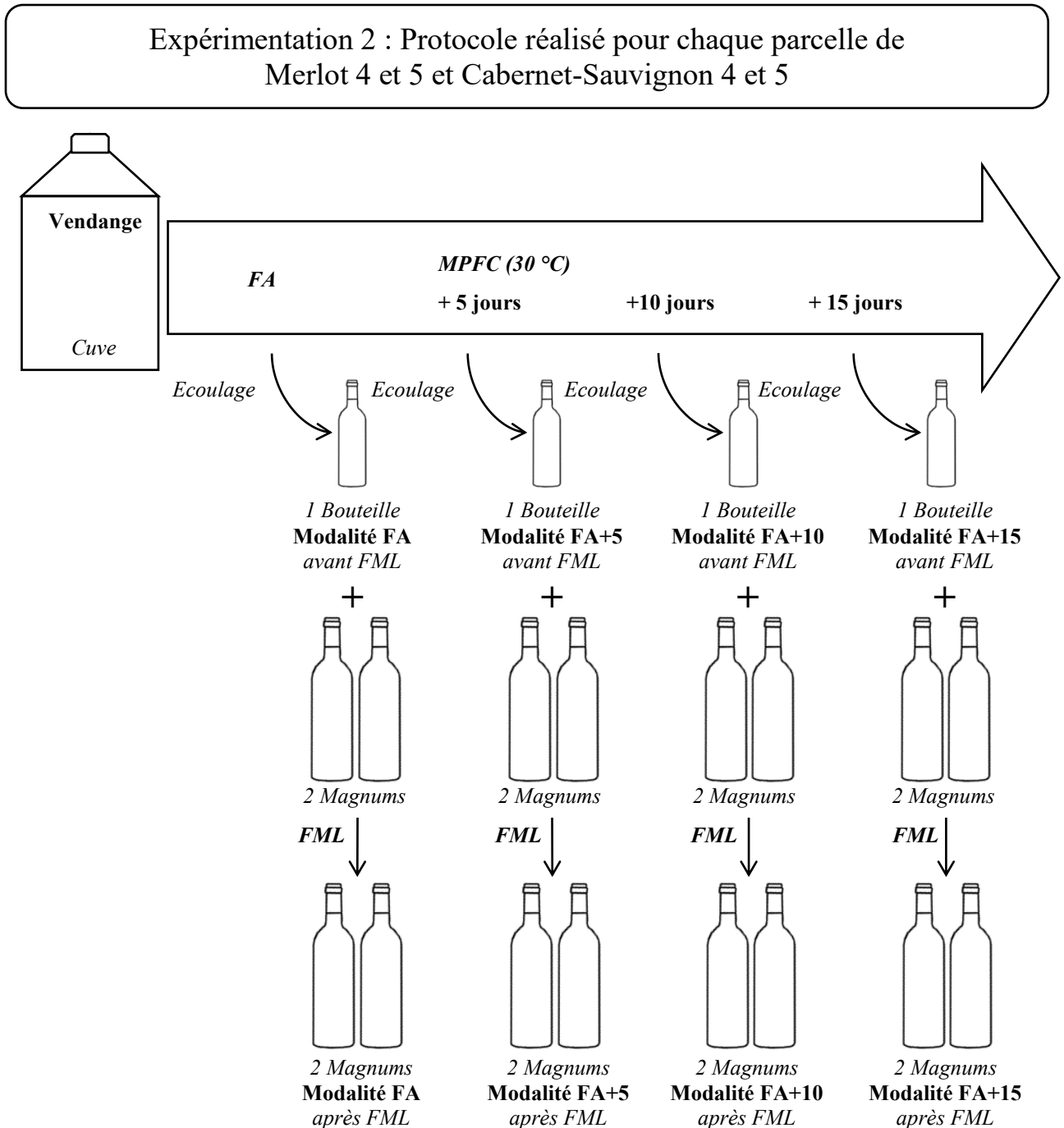


Figure 33. Protocole de vinification de l'expérimentation 2.

2. Mise en place des analyses chimiques et sensorielles

a) Analyse des caractéristiques chimiques de base

Les taux alcoométriques volumiques, les teneurs en glucose+fructose et en acide malique, les valeurs de l'acidité totale et de l'acidité volatile, le pH ainsi que les teneurs en tanins totaux ont été mesurés par le laboratoire Sarco (Floirac, France) en utilisant les méthodes de référence.

b) Indice des Polyphénols Totaux (IPT)

L'indice des polyphénols totaux est une mesure simple permettant d'avoir un dosage global de l'ensemble des composés phénoliques d'un vin, même s'il n'est pas corrélé à la qualité sensorielle. L'IPT correspond à la mesure de la densité optique (DO) à 280 nm. Pour cela, le vin rouge est dilué par 100 avec de l'eau ultra-pure et placé dans une cuve en quartz de 1 cm, puis la densité optique est mesurée à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6305 (Jenway Corporation). Le résultat est ensuite exprimé selon l'indice $I = DO \times 100$. La dilution et les mesures ont été réalisées en triplicat.

c) Dosage des mannoprotéines libérées par les levures dans le vin rouge

Le dosage des mannoprotéines a été réalisé par le Dr. Néréa Iturmendi, au sein du laboratoire de la société Biolaffort. Après une purification préalable, les mannoprotéines sont dosées par HPLC de tamisage moléculaire. Quatre réplicats de chaque échantillon ont été préparés. Les résultats sont exprimés en g/L de mannoprotéines de masse moléculaire comprises entre 73 et 75 kDa correspondant au mannoprotéines libérées par les levures.

d) Analyses sensorielles et traitements statistiques

Les dégustations se sont déroulées dans la salle d'analyse sensorielle de l'ISVV, dans les conditions décrites dans la partie expérimentale générale. Le panel était constitué de 30 dégustateurs (18 femmes et 12 hommes) âgés de 22 à 65 ans.

(1) Expérimentation 1

Les dégustations de l'expérimentation 1 se sont déroulées sur trois jours afin de limiter la fatigue du dégustateur. Les séries M1, M2 et M3 (issues du millésime 2014) ont été dégustées en 2015 et les séries CS1, CS2 et CS3 (issues du millésime 2015) en 2016. Chaque jour était consacré à l'analyse sensorielle des vins d'une série.

Tout d'abord, il a été demandé aux dégustateurs de réaliser, sur un premier poste, un test triangulaire afin d'étudier s'ils perçoivent une différence entre les deux modalités **FA** et **MPF**. Puis, il leur a été demandé, sur un second poste, d'évaluer l'intensité de la douceur et de l'astringence sur une échelle linéaire non structurée de 0 à 7 (profil sensoriel) (**ANNEXE 5**). Pour les séries M1, M2 et M3, trois autres journées ont été organisées dans un second

Deuxième partie : Influence sensorielle de la cuvaison des vins rouges sur leur équilibre gustatif

temps afin de comparer les modalités **FA+L** et **MPF**. Le **Tableau 28** récapitule le plan des analyses sensorielles mises en place pour l'expérimentation 1.

Tableau 28. Plan d'analyses sensorielles mis en place pour l'expérimentation 1.

Séance	Séance 1			Séance 2			Séance 3		
Millésime	2014			2014			2015		
Jour	<i>J 1</i>	<i>J 2</i>	<i>J 3</i>	<i>J 1</i>	<i>J 2</i>	<i>J 3</i>	<i>J 1</i>	<i>J 2</i>	<i>J 3</i>
Série	M1	M2	M3	M1	M2	M3	CS1	CS2	CS3
Modalités	FA/MPF			FA+L/MPF			FA/MPF		
Test sensoriel	Triangulaire (poste 1) et Profil (poste 2)								

J : Jour.

(2) Expérimentation 2

Deux dégustations ont été réalisées pour l'expérimentation 2. Une première avant FML et une seconde après FML. La première dégustation, avant FML, a été réalisée avec un panel restreint (7 personnes) de dégustateurs experts. La seconde dégustation, après FML, a été réalisée avec le panel de l'ISVV composé de 30 dégustateurs (19 femmes et 11 hommes). Cette dégustation a été réalisée deux fois. D'abord, en une seule journée (*J 1*), les quatre modalités (**FA**, **FA+5**, **FA+10**, **FA+15**) des séries M4, M5, CS4 et CS5 ont été présentées au panel. Cette séance a été répétée, sur deux jours : les modalités des vins issus des parcelles M4 et M5, ont été présentées le premier jour (*J 2*) et celles de CS4 et CS5, le deuxième jour (*J 3*). Il a été demandé au panel de réaliser un profil sensoriel et de noter l'intensité de la douceur, de l'amertume et de l'astringence sur une échelle linéaire de 0 à 7. Le **Tableau 29** récapitule le plan d'analyses sensorielles mis en place pour l'expérimentation 2.

Tableau 29. Plan d'analyses sensorielles mis en place pour l'expérimentation 2.

Jour	<i>Avant FML</i>				<i>Après FML</i>							
					<i>J 1</i>		<i>J 2</i>		<i>J 3</i>			
Série	M4	M5	CS4	CS5	M4	M5	CS4	CS5	M4	M5	CS4	CS5
Modalités	FA/FA+5/FA+10/FA+15				FA/FA+5/FA+10/FA+15							
Test sensoriel	Profil				Profil							

(3) Traitements statistiques

Pour chaque test, les traitements statistiques ont été réalisés comme décrit dans la partie expérimentale générale.

III. Mise en évidence de la contribution sensorielle de la MPFC

A. Étude de l'apport gustatif de la MPFC : résultats de l'expérimentation 1

1. Analyses chimiques des vins après six mois d'élevage

Les analyses œnologiques classiques sont effectuées sur les vins après 6 mois d'élevage et les résultats sont présentés dans le **Tableau 30**. Les taux d'alcool sont globalement similaires entre les modalités de chaque série de Merlot et de Cabernet-Sauvignon. Les concentrations en glucose/fructose sont nettement inférieures à 2 g/L (seuil de perception moyen des sucres), ainsi les sucres résiduels n'ont pas d'impact sur le goût des vins. Ces valeurs montrent également que les fermentations alcooliques se sont déroulées dans de bonnes conditions et qu'elles ont été menées à leur terme. L'acidité totale et le pH des vins finis présentent des valeurs moyennes et sont similaires pour les deux modalités d'une même série. L'acidité volatile est faible, preuve que la FA et la FML se sont déroulées dans de bonnes conditions. Les teneurs nulles en acide malique prouvent que la FML a été réalisée jusqu'à son terme. Aucun écart significatif n'est observé entre les IPT des modalités **FA** et **MPF** d'une même série. Les faibles différences peuvent s'expliquer par des erreurs systématiques et des erreurs de mesure de l'opérateur. Cela suggère que la MPFC réalisée sans aucun remontage ne modifie pas profondément la richesse polyphénolique des vins.

Tableau 30. Analyses chimiques des vins des séries M1, M2, M3, CS1, CS2 et CS3 de l'expérimentation 1 après 6 mois d'élevage.

Millésime	Série et Modalité	Ethanol (% vol. alc.)	Glucose/ Fructose (g/L)	Acidité totale (g/L)	pH	Acidité volatile (g/L)	Acide Malique (g/L)	IPT
2014	M1 FA	13,4	2	3,2	3,5	0,1	n.d.	65±4
	M1 MPF	13,4	0,2	3,1	3,5	0,1	n.d.	68±3
	M2 FA	13	0,3	3	3,5	0,2	n.d.	64±5
	M2 MPF	13	0,2	3	3,5	0,1	n.d.	66±4
	M3 FA	13,3	0,1	3,2	3,5	0,1	n.d.	70±2
	M3 MPF	13,5	0,1	3,1	3,5	0,1	n.d.	72±3
2015	CS1 FA	12,7	0,2	3	3,6	0,1	n.d.	62±3
	CS1 MPF	12,8	0,2	2,9	3,7	0,2	n.d.	67±2
	CS2 FA	12,6	0,3	3	3,6	0,1	n.d.	63±6
	CS2 MPF	12,8	0,2	2,9	3,6	0,1	n.d.	65±5
	CS3 FA	13	0,1	3,1	3,6	0,1	n.d.	66±5
	CS3 MPF	13,1	0,2	3,2	3,6	0,2	n.d.	68±4

n.d. : non détecté (< 0,1 g/L).

De manière générale, les vins écoulés directement après la FA présentent des caractéristiques chimiques élémentaires similaires à celles des vins écoulés après la MPFC.

2. Effet de la MPFC sur le goût du vin

Pour évaluer l'effet de la MPFC sur le goût du vin, il est demandé au panel de dégustateurs de réaliser un test triangulaire avec les modalités **FA** et **MPF** de chaque série. Les échantillons leur sont présentés selon les normes ISO. Les résultats sont récapitulés dans le **Tableau 31**. Pour toutes les séries, plus de la moitié du panel identifie correctement le verre différent des deux autres. Ainsi, les résultats sont significatifs et l'on peut affirmer, avec un risque allant de 1 à 5 % en fonction des séries, que les caractéristiques organoleptiques des vins sont modifiées au cours de la MPFC.

Tableau 31. Résultats des tests triangulaires de l'expérimentation 1 ; étude de l'effet de la MPFC sur le goût du vin.

Modalités	FA/MPF					
Série	M1	M2	M3	CS1	CS2	CS3
Nombre de bonnes réponses /30juges	15	17	18	17	15	16
Significativité α	5 %	1 %	1 %	1 %	5 %	1 %

Ensuite, afin de mettre en évidence la nature de la différence perçue, il est demandé au panel de noter l'intensité de la douceur et de l'astringence. Les hypothèses d'homogénéité des variances (test de Levene) et de normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk) sont validées pour toutes les séries. Les résultats sont alors traités par ANOVA, révélant des *p-values* toutes inférieures à 0,05 pour les descripteurs « douceur » et « astringence ». Ainsi, pour toutes les séries, une différence significative de douceur et d'astringence est perçue entre la modalité **FA** et **MPF**. Les notes d'intensité des descripteurs montrent que la modalité **MPF** est perçue avec plus de douceur et moins d'astringence que la modalité **FA** (**Tableau 32**).

Tableau 32. Résultats des profils sensoriels de l'expérimentation 1 ; étude de l'effet de la MPFC sur le goût du vin.

Descripteur		<i>Douceur</i>										
Série	M1	M2	M3	CS1	CS2	CS3						
Modalité	FA	MPF	FA	MPF	FA	MPF	FA	MPF	FA	MPF		
Moyenne des intensités ^a	2,3	4,2	2	2,8	2,2	3,8	2,6	4,3	2,2	3,9	2,4	4,1
ANOVA <i>p-value</i>	<0,001***		0,044*		<0,001***		<0,01**		<0,01**		<0,001***	
Descripteur		<i>Astringence</i>										
Série	M1	M2	M3	CS1	CS2	CS3						
Modalité	FA	MPF	FA	MPF	FA	MPF	FA	MPF	FA	MPF		
Moyenne des intensités ^a	4,1	2,4	3,1	2,6	4	3,2	4,6	3,3	4,2	2,9	4,4	3,1
ANOVA <i>p-value</i>	<0,01**		<0,01**		<0,01**		0,049*		<0,01**		<0,01**	

^a Moyenne des notations des dégustateurs sur une échelle de 0 à 7.

Significatif au risque de 5 % (*), de 1 % (**), de 0,1 % (***)

3. Discussion

Les expérimentations mises en place sur deux millésimes, deux cépages et six parcelles montrent une modification significative des propriétés sensorielles du vin au cours de la MPFC alors que les paramètres chimiques élémentaires n'évoluent pas. Les résultats du profil sensoriel indiquent des différences significatives entre les deux modalités de chaque série, avec un gain de douceur et une diminution d'astringence perçue après le déroulement de la MPFC. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux montrant une astringence moindre après macération, que les auteurs interprètent comme résultant de réactions de polymérisation des tanins ou de complexation avec d'autres composés (Sarni-Manchado *et al.*, 2008 ; Rinaldi *et al.*, 2015). Cependant, c'est la première fois qu'une telle expérimentation met en évidence un gain de douceur au cours de la MPFC. Toutefois, les travaux de Marchal *et al.* ont montré qu'une protéine de la levure Hsp12, était libérée au cours de l'autolyse des levures et entraînait une augmentation de la saveur sucrée (Marchal *et al.*, 2011a). Or, l'autolyse des levures étant concomitante avec la MPFC des vins rouges, il est possible que le gain de sucrosité observé dans l'expérimentation 1 résulte de tels phénomènes biochimiques, et non de la libération de composés du raisin. Il convient dès lors d'étudier la contribution de l'autolyse des levures à l'augmentation de douceur mise en évidence au cours de la MPFC.

B. Étude de la contribution de l'autolyse des levures au gain de douceur observé lors de la MPFC

1. Réalisation de l'autolyse des levures au laboratoire dans la modalité FA

Au cours de la MPFC, deux phénomènes se déroulent de façon simultanée : l'autolyse des levures, essentiellement présente dans le marc, et la diffusion de constituants du raisin. La modalité **MPF** a subi la macération post-fermentaire et a donc bénéficié de ces deux phénomènes, tandis que la modalité **FA**, écoulée dès l'achèvement de la fermentation alcoolique, n'a profité d'aucun d'entre eux. Afin d'établir la contribution de la libération de peptides édulcorants de la levure, une autolyse est réalisée en phase liquide, à partir de la modalité **FA**. Les travaux antérieurs ont montré que des différences significatives étaient observées entre un vin rouge témoin et le même vin enrichi en levures et conservé pendant 10 jours à 30 °C, c'est-à-dire dans les conditions favorables à l'autolyse des levures ; un tel traitement entraîne un gain significatif de sucrosité (Marchal *et al.*, 2015c). Dans le cadre de ce travail, ce protocole d'autolyse a été réalisé au laboratoire sur la modalité **FA** des séries de la première année d'expérimentation (M1, M2, M3). Une modalité **FA+L** a ainsi été obtenue.

Par rapport à la modalité **FA**, elle a bénéficié de la libération de peptides de levure et par rapport à la modalité **MPF**, elle n'a pas été au contact du marc de raisin pendant la MPFC. En comparant les modalités **FA+L** et **MPF**, il est donc possible d'étudier la contribution sensorielle des composés du raisin libérés ou modifiés pendant la MPFC, indépendamment de ceux de la levure.

2. Vérification du déroulement de l'autolyse des levures dans les modalités MPF et FA+L

Il est en effet couramment admis que c'est au cours de la MPFC qu'a lieu l'autolyse des levures dans les vins rouges (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2002) puisque les conditions de température sont favorables à l'activité enzymatique et que l'essentiel de la biomasse, située dans le marc de raisin, est éliminée lors du décuvage. Toutefois, nous avons voulu vérifier que les conditions mises en œuvre dans cette expérimentation 1 vérifiaient cette opinion. Pour cela, des échantillons des trois modalités de la série M1 ont été confiés au Dr. Néréa Iturmendi de la société Biolaffort afin d'y doser les mannoprotéines de la levure. Ces macromolécules constituent en effet un indicateur du déroulement de l'autolyse. Elles peuvent être quantifiées selon un protocole fastidieux nécessitant l'isolement des macromolécules par filtrations et dialyses successives puis leur analyse par HPLC de tamisage moléculaire. Compte tenu de la longueur du protocole et des conditions d'autolyse identiques appliquées aux trois séries, une seule d'entre elles (M1) a été analysée, avec quatre réplicats pour chaque modalité. Les résultats sont traités statistiquement par une ANOVA à un facteur, suivie d'un test *post hoc* de Tukey. L'ANOVA présente une *p-value* inférieure à 0,01 ce qui signifie qu'au moins une des trois modalités présente des teneurs en mannoprotéines significativement différente des deux autres au risque de 1 %. En effet, le test *post hoc* de Tukey, montre la formation de 2 groupes. Le groupe *a*, formé par les modalités **FA+L** et **MPF**, et le groupe *b*, formé par la modalité **FA**. Ainsi, des teneurs en mannoprotéines similaires sont observées dans les modalités **MPF** et **FA+L**, tandis que la modalité **FA** en comporte significativement moins. Ces résultats confirment que l'autolyse des levures a eu lieu au cours de la MPFC (comparaison **FA/MPF**) et lors du traitement au laboratoire (comparaison **FA/FA+L**).

3. Comparaison sensorielle des modalités MPF et FA+L

Dans un premier temps, il est demandé au panel de dégustateurs de réaliser un test triangulaire sur les modalités **FA+L** et **MPF**. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 33**. Pour les trois séries, M1, M2 et M3, des différences significatives sont observées entre les

Deuxième partie : Influence sensorielle de la cuvaision des vins rouges sur leur équilibre gustatif

échantillons, plus de la moitié du panel identifiant correctement le verre différent des deux autres.

Tableau 33. Résultats des tests triangulaires de l'expérimentation 1 ; Étude de la contribution de l'autolyse des levures au gain de douceur observé lors de la MPFC.

Modalités	FA+L/MPF		
Série	M1	M2	M3
Nombre de bonnes réponses /30 juges	17	15	19
Significativité α	1 %	5 %	0,1 %

De la même manière que précédemment, afin de vérifier la nature de cette différence, il est demandé au panel de noter l'intensité de la douceur et de l'astringence perçue. Les résultats sont traités par une ANOVA (**Tableau 34**).

Tableau 34. Résultats des profils sensoriels de l'expérimentation 1 ; Étude de la contribution de l'autolyse des levures au gain de douceur observé lors de la MPFC

Descripteur	<i>Douceur</i>					
Série	M1		M2		M3	
Modalité	FA+L	MPF	FA+L	MPF	FA+L	MPF
Moyenne des intensités ^a	1,5	2,7	1,7	2,9	1,3	2,7
ANOVA <i>p-value</i>	0,0332*		0,013*		0,021*	
Descripteur	<i>Astringence</i>					
Série	M1		M2		M3	
Modalité	FA+L	MPF	FA+L	MPF	FA+L	MPF
Moyenne des intensités ^a	2,6	1,8	3	1,8	2,2	1,9
ANOVA <i>p-value</i>	0,023*		<0,001***		0,404 NS	

^a Moyenne des notations des dégustateurs sur une échelle de 0 à 7.

NS : Non Significatif ; Significatif au risque de 5 % (*), de 1 % (**) et de 0,1 % (***).

Pour le descripteur « douceur », toutes les ANOVA montrent des différences significatives entre les modalités **FA+L** et **MPF** de chaque série, avec une *p-value* inférieure

à 5 %. Les moyennes des notes attribuées sont plus élevées dans les modalités **MPF** que dans les modalités **FA+L**. Pour le descripteur « astringence », les différences observées sont significatives pour les séries M1 et M2 et non significatives pour la série M3. En outre, les notes attribuées par les juges révèlent une astringence moindre dans les modalités **MPF** des séries M1 et M2.

C. Discussion

La mise en œuvre d'une expérimentation en conditions réelles, dans trois propriétés, sur deux millésimes et à partir de six parcelles a permis d'établir un gain de sucrosité et une diminution d'astringence des vins rouges au cours de la MPFC. Or, l'autolyse des levures a lieu au cours de cette étape, et ce phénomène est justement connu pour augmenter la sucrosité et réduire l'astringence, respectivement par la libération de peptides sucrés (Marchal *et al.*, 2011a) et de polysaccharides interagissant avec les composés phénoliques (Escot *et al.*, 2001 ; Carvalho *et al.*, 2006 ; Poncet-Legrand *et al.*, 2007).

Une étude réalisée au laboratoire a permis d'isoler la contribution sensorielle de l'autolyse. Les modalités **FA+L** et **MPF** ont toutes les deux subi ce processus biochimique, mais seule la modalité **MPF** a bénéficié du contact des parties solides du raisin pendant la MPFC. Dans des conditions similaires, une saveur sucrée plus intense avait déjà été observée dans la modalité **FA+L** que dans **FA**. Dans ce travail, la comparaison sensorielle **FA+L/MPF** révèle encore davantage de sucrosité dans la modalité **MPF**. Ce résultat démontre que le gain de sucrosité observé pendant la MPFC résulte d'une part de l'autolyse des levures mais également du contact du vin avec le marc de raisin. Deux hypothèses peuvent expliquer ce fait : la libération de molécules édulcorantes du raisin ou la transformation de composés du vin en substances gustativement actives. Dans les deux cas, ce travail établit la contribution du raisin à la saveur sucrée des vins secs et démontre ainsi une intuition partagée par certains vinificateurs depuis longtemps.

La même étude a également porté sur la perception de l'astringence et les résultats semblent moins nets. En effet, des écarts sont observés entre **FA+L** et **MPF** pour les séries M1 et M2 tandis que pour la série M3, il semblerait que l'autolyse soit essentiellement responsable de la diminution de la perception astringente. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes évoquant le rôle de l'autolyse via la libération de polysaccharides de la levure susceptibles d'interagir avec les composés phénoliques (Escot *et al.*, 2001 ; Carvalho *et al.*, 2006 ; Poncet-Legrand *et al.*, 2007). Ils peuvent également être expliqués par la polymérisation des tanins avancée par certains auteurs (Sarni-Manchado *et al.*, 2008 ; Rinaldi

et al., 2015), qui pourrait avoir lieu dans les deux modalités de notre étude. En revanche, les différences observées pour les séries M1 et M2 semblent suggérer un rôle des parties solides du raisin, éventuellement dans la refixation de tanins du vin ou la libération de composés interagissant avec les substances astringentes.

IV. Étude de l'effet de la durée de MPFC sur le goût ; cas d'une propriété de Pessac-Léognan dans le millésime 2015

A. Résultats de l'expérimentation 2

1. Analyses chimiques des vins après FML

Les analyses œnologiques élémentaires sont effectuées pour les différentes modalités des séries M4, M5, CS4, CS5 et les résultats sont présentés dans le **Tableau 35**. Les taux d'alcool volumique sont globalement similaires pour toutes les modalités d'une même série. Les concentrations en glucose/fructose sont faibles et inférieures au seuil de perception des sucres (< 2 g/L), les sucres résiduels n'ont donc pas d'impact sur le goût des vins. Les fermentations alcooliques se sont déroulées dans de bonnes conditions et ont été menées à terme. L'acidité totale et le pH des vins finis présentent des valeurs moyennes et sont similaires pour toutes les modalités. Les IPT et les teneurs en tanins totaux mesurés des différentes modalités présentent des valeurs très proches, sans différence significative. Comme pour l'expérimentation 1, ces résultats suggèrent que la MPFC ne modifie pas profondément la richesse en composés phénoliques des vins, dans les conditions d'application de cette étude.

Tableau 35. Analyses chimiques des vins des séries M4, M5, CS4 et CS5 de l'expérimentation 2 après FML.

Série	Modalité	Ethanol (% vol. alc.)	Glucose/ Fructose (g/L)	Acidité Totale (g/L)	pH	Acidité Volatile (g/L)	Acide Malique (g/L)	IPT	Tanins*
M4	FA	13,4	0,2	3,1	3,7	0,1	n.d.	63±2	3,2 (±0,3)
	FA+5	13,4	0,2	3,1	3,8	0,1	n.d.	65±2	3,4 (±0,3)
	FA+10	13,3	0,4	3	3,7	0,1	n.d.	64±2	3,8 (±0,4)
	FA+15	13,4	0,2	3	3,7	0,1	n.d.	68±2	3,7 (±0,4)
M5	FA	12,8	0,2	3	3,6	0,1	n.d.	63±2	3,1 (±0,3)
	FA+5	12,7	0,3	2,9	3,7	0,1	n.d.	62±2	3,2 (±0,3)
	FA+10	12,7	0,3	3	3,6	0,1	n.d.	66±2	3,1 (±0,3)
	FA+15	12,8	0,2	2,9	3,6	0,1	n.d.	65±2	3,1 (±0,3)
CS4	FA	13,1	0,2	3	4	0,2	n.d.	67±3	3,9 (±0,4)
	FA+5	13,2	0,1	2,9	3,9	0,2	n.d.	66±3	4,2 (±0,4)
	FA+10	13,1	0,2	3	3,9	0,2	n.d.	68±3	3,7 (±0,4)
	FA+15	13,1	0,1	2,9	4	0,2	n.d.	67±3	4,1 (±0,4)
CS5	FA	13,2	0,2	3	3,8	0,2	n.d.	62±2	3,2 (±0,3)
	FA+5	13,1	0,2	3,2	3,9	0,2	n.d.	61±2	3,9 (±0,4)
	FA+10	12,1	0,2	3,1	3,8	0,2	n.d.	61±2	3,2 (±0,3)
	FA+15	13,1	0,2	3,2	3,9	0,2	n.d.	63±2	3,6 (±0,4)

* Mesures réalisées avant FML.

n.d. : non détecté (< 0,1 g/L).

2. Analyses sensorielles

La dégustation des vins réalisée avant FML n'est pas traitée par des analyses statistiques en raison du faible nombre de dégustateurs (7 experts). A titre indicatif, les résultats semblent mettre en évidence, pour les quatre séries, une évolution qualitative des vins avec la durée de MPFC. Une augmentation de la douceur et une diminution de l'astringence sont observées, alors qu'aucune modification majeure n'est constatée sur la perception de l'amertume ou sur l'intensité colorante des vins. Aussi, les modalités jugées les plus qualitatives par les 7 dégustateurs sont la modalité **FA+10** dans le cas des parcelles de qualité « Second vin » (M5 et CS5), et la modalité **FA+15** pour les parcelles de qualité « Grand vin » (M4 et CS4).

Les dégustations des vins ont été réalisées après FML. Elles permettent ainsi d'évaluer l'influence du temps de cuvaison sur le goût des vins, à l'issue d'un processus complet de vinification. Il est demandé au panel de déguster les différentes modalités des séries M4, M5, CS4 et CS5 et de noter les intensités de la douceur, de l'amertume et de l'astringence perçues. Après vérification des hypothèses d'homogénéité et de normalité des résidus, l'ANOVA est appliquée pour les trois descripteurs et le test *post hoc* de Tukey permet de classer les modalités en plusieurs groupes. Les résultats du *Jour 1* sont présentés dans le **Tableau 36** et mettent en évidence des différences significatives de douceur entre les modalités de chaque vin, mais pas d'écart au niveau de l'amertume ou de l'astringence. Le test *post hoc* de Tukey confirme l'appartenance des modalités à des groupes d'intensité de douceur différents. Le groupe *a* (**FA/FA+5**) est perçu comme moins doux que le groupe *b* (**FA+10/FA+15**). Ces résultats ne sont cependant pas validés pour la série CS5, pour laquelle aucune distinction n'a été faite entre les modalités, en dépit des observations réalisées par les porteurs de l'étude pendant la préparation de la dégustation. Or, pour cette séance d'analyse sensorielle, les seize vins sont dégustés en une seule fois, et la série CS5 était présentée au dernier poste. Compte tenu de l'âge des vins présentés, des phénomènes de fatigue sensorielle ont été mentionnés par les dégustateurs. La séance d'analyse sensorielle est donc répétée, mais en se déroulant cette fois-ci sur deux jours (*Jour 2* et *3*). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 37**. A nouveau, aucune différence significative n'est observée pour l'amertume et l'astringence. Cependant, le panel perçoit bien à nouveau, une différence significative de douceur pour toutes les séries étudiées, y compris pour la série CS5. Le test *post hoc* de Tukey montre l'existence de deux groupes significativement différents par leur douceur, avec les modalités **FA/FA+5** d'une part et les modalités **FA+10/FA+15** d'autre part. Les *p*-values sont plus basses pour les séries de qualité « Grand vin », pour lesquelles les écarts entre modalités sont

Deuxième partie : Influence sensorielle de la cuvaison des vins rouges sur leur équilibre gustatif

encore plus importants. Ainsi, ces données confirment ceux du *Jour 1*, ce qui donne davantage de robustesse aux résultats.

Tableau 36. Résultats des profils sensoriels de l'expérimentation 2, Jour 1.

Jour		Jour 1																
Descripteur		Douceur																
Série		M4					M5											
Modalité		FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15					
Moyenne des intensités ^a		2,4	2,5	4,7	4,6	2,2	2,5	3,2	4,2	3,3	3,8	3,7	4,6	4,1	3,6	4,6	4,2	
ANOVA <i>p-value</i>		<0,01 **					0,017 *					<0,01 **					0,094	
Test <i>post hoc</i> Tukey		a	a	b	b	a	a	ab	ab	b	a	ab	ab	b	a	a	a	a
Descripteur		Amertume																
Série		M4					M5											
Modalité		FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15					
ANOVA <i>p-value</i>		0,257 NS					0,853 NS					0,492 NS					0,391 NS	
Descripteur		Astringence																
Série		M4					M5											
Modalité		FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15					
ANOVA <i>p-value</i>		0,511 NS					0,333 NS					0,966 NS					0,087 NS	

NS : Non Significatif.

Significatif au risque de 5 % (*), de 1 % (**), de 0,1 % (***)

^a Moyenne des notations des dégustateurs sur une échelle de 0 à 7.

Tableau 37. Résultats des profils sensoriels de l'expérimentation 2, Jour 2 et 3.

Descripteur	Jour 2					Jour 3										
	M4		M5			CS4		CS5								
Modalité	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15				
Moyenne des intensités ^a	2,1	2,2	4,6	5,2	2	2,4	3,7	4,3	3,1	3,3	3,9	4,5	3,2	3,6	4,1	4,8
ANOVA <i>p-value</i>	<0,001 ***		<0,01 **			<0,01 **		<0,01 **			<0,01 **					
Test <i>post hoc</i> Tukey	a	a	b	b	a	a	a	b	a	a	b	b	a	a	b	b
Descripteur	Amertume															
Série	M4		M5			CS4		CS5								
Modalité	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15
ANOVA <i>p-value</i>	0,952 NS		0,428 NS			0,929 NS		0,763 NS								
Descripteur	Astringence															
Série	M4		M5			CS4		CS5								
Modalité	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15	FA	FA+5	FA+10	FA+15
ANOVA <i>p-value</i>	0,809 NS		0,229 NS			0,601 NS		0,553 NS								

B. Discussion

Cette expérimentation portant sur deux cépages, avec deux qualités différentes, a permis d'étudier l'effet de la durée de MPFC sur la sucrosité, l'astringence et l'amertume de vins après FML. Tandis que les paramètres œnologiques élémentaires sont similaires entre modalités d'une même série, les analyses sensorielles ont révélé des différences. Le panel perçoit en effet significativement plus de douceur dans les vins ayant effectué une MPFC d'une durée minimum de 10 jours. Par ailleurs, ces vins ne sont pas perçus différemment en fonction de leur amertume ou de leur astringence. L'obtention de résultats similaires au cours des deux dégustations, permet de valider la reproductibilité du panel et de renforcer l'analyse statistique des résultats. Il est également intéressant de noter que les tendances observées par un groupe de sept dégustateurs avant FML se retrouvent dans une large mesure après l'achèvement de cette dernière.

Cette étude met donc en évidence une évolution de l'équilibre gustatif des vins tout au long des 15 jours de la MPFC. Il apparaît que tous les vins de cette étude ont gagné à cuver, et que ce gain est d'autant plus marqué pour les raisins à haut potentiel œnologique. Il convient de nuancer les conclusions obtenues au regard des conditions particulières de l'étude. En effet, la durée optimale de la macération post-fermentaire doit être adaptée aux conditions du millésime, au cépage, au type de vinification et, plus largement, à la qualité du raisin. Sa dégustation joue donc toujours un rôle clé mais subjectif dans la décision de la date d'écoulage. La compréhension des phénomènes moléculaires liés à la MPFC a pour but d'affiner la prise de décision et d'assister les vinificateurs dans leur tâche.

Conclusion

Ce chapitre sur l'étude sensorielle de la macération post-fermentaire à 30°C a permis de démontrer certaines observations empiriques des vinificateurs. Le recours à l'analyse sensorielle a en effet établi une augmentation significative de la saveur sucrée des vins rouges au cours de cette étape de la vinification, pour tous les vins étudiés. Il apparaît également que cet effet bénéfique varie en fonction de la qualité des raisins et de la durée de la macération. Nous avons montré que ce phénomène ne résultait pas uniquement de la libération de peptides sucrés de la levure au cours de l'autolyse et que des composés du raisin y concouraient. L'effet sur l'astringence semble moins net, mais aucune augmentation de la perception tannique n'a été observée dans les conditions utilisées pour la MPFC, c'est-à-dire sans lessivage du chapeau. Ainsi, ce travail confirme les bienfaits associés à la macération post-fermentaire à chaud et en précise son influence sur le goût du vin. Toutefois, si certains composés sucrés provenant des levures ou du bois de chêne sont connus, aucune molécule édulcorante autre que les sucres n'a été identifiée dans les raisins jusqu'à présent.

CHAPITRE 6 - ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES PÉPINS A LA SUCROSITÉ DES VINS ROUGES

Introduction

Le chapitre précédent a établi l'effet bénéfique de la macération post-fermentaire des vins rouges et suggéré la contribution de molécules sucrées provenant du raisin. Or, dans les années 80, l'œnologue Emile Peynaud fait référence, dans son œuvre « Le vin et les jours » (Peynaud, 1981), à l'importance de l'apport des pépins lors de la cuvaison. En effet, dans un chapitre intitulé « Le vin rouge est un macéré de raisins », il relate une expérience de vinifications effectuées avant lui par Pacottet, au début du XX^{ème} siècle, avec les différentes parties du raisin (Pacottet, 1908) : d'abord la pulpe seule, puis la pulpe et les pellicules et enfin la pulpe, les pellicules et les pépins. Il conclut que « Le moût seul aboutit à un faux vin blanc, gris ou rosé, lourd, nécessitant une acidification. [... Le vin] qui a infusé avec les seules peaux est coloré, il se goûte souple, mais plat, comme incomplet ; les pellicules cédant rapidement leur contenu, une cuvaison prolongée n'améliore pas ce vin. Enfin, celui qui est obtenu avec les pellicules et les pépins est le plus équilibré ; moelleux et velouté, il gagne à cuver ». Ce témoignage suggère un apport des pépins à la qualité des vins, et en particulier à leur douceur, lors de la cuvaison et justifie une étude plus approfondie de la contribution gustative des pépins.

I. Étude bibliographique de l'apport du pépin à la qualité organoleptique du vin

Le pépin est l'un des constituants principaux de la baie de raisin, avec la pulpe, la pellicule et la rafle. Bien que le pépin ne représente qu'une faible part de la baie, c'est une source importante de composés phénoliques. De nombreux travaux se sont attachés à décrire la composition et l'évolution biochimique du pépin, ainsi que la localisation de ses constituants dans les tissus. Cependant, les études sur les aspects sensoriels, voire gustatifs de ces constituants restent plus limitées.

A. Le pépin de raisin

1. Morphologie

D'un point de vue œnologique, la structure de la baie est décrite en trois compartiments : la pulpe, la pellicule et les pépins. Le nombre de pépins est en moyenne de 2 par baie (Galet, 1993) mais varie sensiblement en fonction des cépages et des conditions de la fécondation. Les pépins sont situés dans les loges carpellaires de la baie délimitées par

l'endocarpe (fine couche de cellules). Chez *Vitis vinifera*, les pépins sont généralement piriformes et possèdent une symétrie dorso-ventrale. La face ventrale présente deux dépressions séparées par une arête, le raphé, qui contourne la graine et se prolonge sur la face dorsale, dans la chalaze où il se ramifie. Le pépin de raisin fait partie des graines albuminées, c'est-à-dire que chaque pépin est composé d'un embryon entouré d'un albumen et d'une enveloppe externe formée de deux téguments. Le tégument externe est recouvert d'une cuticule et il est formé de 3 types de tissus (un épiderme, un parenchyme à paroi pecto-cellulosique et un tissu interne fortement lignifié). Le tégument interne est constitué de plusieurs assises cellulaires pecto-cellulosiques (**Figure 34**) (Ristic *et al.*, 2005).

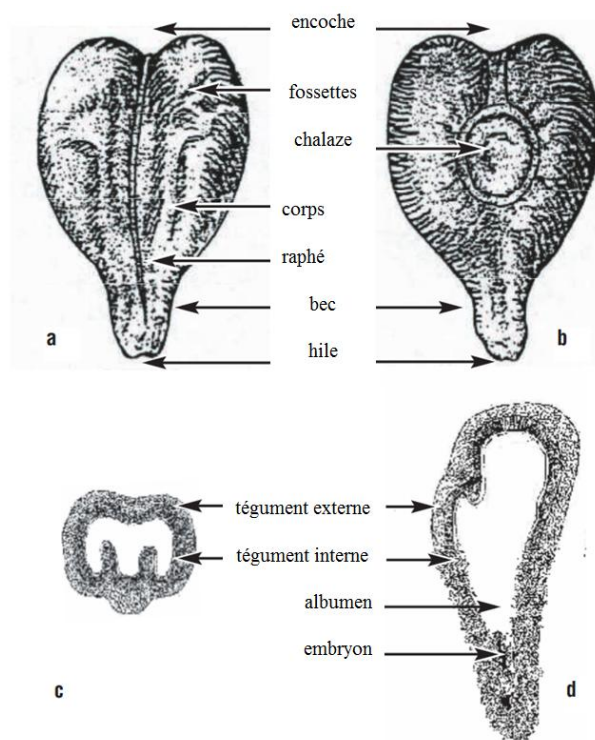


Figure 34. Schéma de la face ventrale **a** et dorsale **b** d'un pépin de raisin à maturité. Coupe centrale transversale **c** et longitudinale **d** (Ristic *et al.*, 2005).

2. Physiologie

Trois phases de modifications histologiques, entraînant des variations physico-chimiques, sont constatées au cours de la croissance et du développement du pépin de raisin. Avant tout, le nombre de pépins dépend du bon déroulement de la fécondation. Si celle-ci ne s'effectue pas dans de bonnes conditions, elle peut conduire à des baies sans pépins (apyrénie). La première phase de croissance se caractérise par l'apparence verte du pépin, en raison de la prédominance de la chlorophylle. Cette phase s'accompagne d'une augmentation

du poids des pépins, d'un enrichissement en acides organiques, d'une accumulation de flavanols et de tanins dans l'enveloppe externe et interne du tégument du pépin (Darné, 1991). Puis, la phase de croissance ralentie, les teneurs en hormones de croissance chutent et laissent place à une hormone de stress, l'acide abscissique (ABA). L'augmentation des teneurs en ABA correspond à la levée d'inhibition des activités enzymatiques impliquées dans l'accumulation des sucres dans les vacuoles des cellules de la pulpe. Le pic de la concentration en ABA correspond à la véraison. Les baies changent de couleurs, les flavanols et les tanins du pépin atteignent alors leur teneur maximale et le début de l'oxydation des tanins est observé avec l'apparition d'une coloration jaunâtre du pépin. Ce dernier se déshydrate, ce qui engendre une perte de poids. Le tégument se lignifie et la couche externe se plasmolyse. L'oxydation des composés phénoliques présents dans le tégument conduit à la coloration brune des pépins (Kennedy *et al.*, 2000 ; Cadot *et al.*, 2006a). Débute alors la dernière phase de croissance qui correspond à la maturation des raisins. L'accroissement cellulaire reprend et des modifications physiologiques sont observées. La baie accumule des éléments minéraux, des acides aminés et des composés phénoliques par la voie de biosynthèse de l'acide shikimique.

3. Composition biochimique

Les pépins représentent 0 à 6 % du poids total de la baie. La composition biochimique moyenne du pépin mature est donnée dans le **Tableau 38**.

Tableau 38. Composition biochimique des pépins en pourcentage de poids frais (Cabanis *et al.*, 1998).

Composé	%
Eau	25-45
Glucides	34-36
Lipides	8-13
Polyphénols	4-10
Composés Azotés	4-6,5
Minéraux	2-4

Les principales catégories de composés phénoliques retrouvés dans le pépin sont les suivantes :

- les acides phénoliques (**Figure 35**) : cette catégorie de molécules correspond aux dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (acide gallique) et hydroxycinnamique (acide caféique). Le composé majoritaire de cette famille de polyphénols dans le pépin de raisin est l'acide gallique. L'acide gallique est rarement présent sous sa forme libre et il est le plus souvent estérifié à un flavanol (Flanzy, 1998).

- les flavonoïdes : les principaux flavonoïdes situés dans le pépin sont les flavan-3-ols (Kennedy *et al.*, 2000) (**Figure 35**), tels que la catéchine et l'*epi*-catéchine. Les flavanols sont présents sous forme libre ou estérifiée à l'acide gallique et sont les unités monomériques constitutives des formes polymérisées, les tanins condensés, tels que les procyanidines (Rebello *et al.*, 2013) (**Figure 35**). Ils sont généralement présents sous forme de dimères ou de trimères (Fuleki *et al.*, 1997 ; Yilmaz *et al.*, 2004) ainsi qu'à des degrés de polymérisation supérieurs (Hayasaka *et al.*, 2003 ; J. Shi *et al.*, 2003a ; Kalili *et al.*, 2013). Les proportions des unités constitutives des tanins sont différentes entre la pellicule et le pépin. Les tanins des pépins ne sont constitués que de procyanidines et sont caractérisés par un taux de galloylation plus élevé (Moutounet *et al.*, 1996 ; Brossaud *et al.*, 1999) et un degré de polymérisation moyen (DPM) plus faible (Prieur *et al.*, 1994 ; Souquet *et al.*, 1996) que les tanins de pellicules.

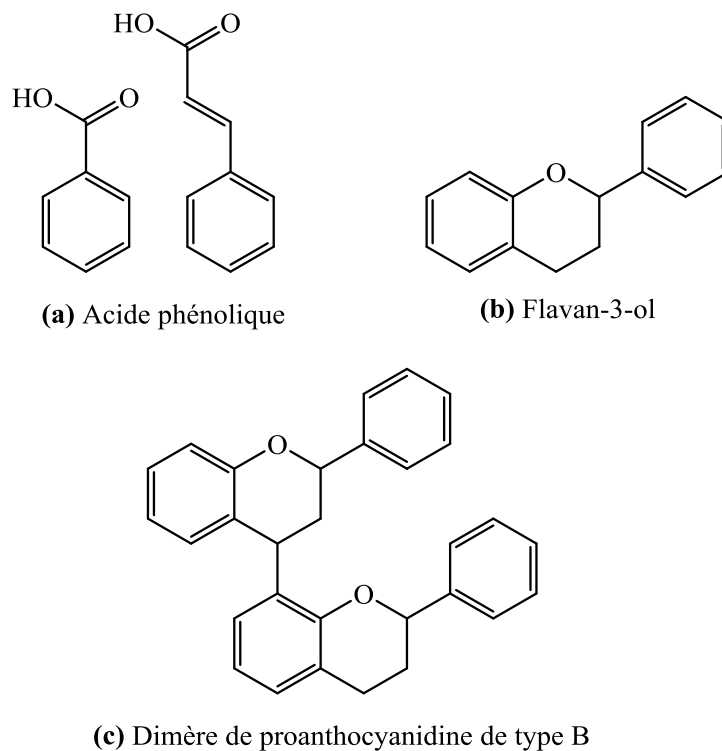


Figure 35. Squelettes des structures chimiques des acides phénoliques (a), des flavan-3-ols (b) et des tanins condensés (exemple d'un dimère de type B) (c).

Les teneurs des pépins de raisin en flavonoïdes ont été largement étudiées (Oszmianski *et al.*, 1989 ; Ricardo da Silva *et al.*, 1991 ; Escribano-Bailon *et al.*, 1992 ; Santos-Buelga *et al.*, 1995 ; Fuleki *et al.*, 1997 ; V. A. P. De Freitas *et al.*, 1999 ; Gabetta *et al.*, 2000 ; Kennedy *et al.*, 2000 ; Gény *et al.*, 2003 ; Guendez *et al.*, 2005). Les gammes de concentration des principaux composés phénoliques, mesurées sur des pépins à maturité, sont reportées dans le **Tableau 39**. Ces concentrations sont données à titre indicatif mais peuvent varier selon l'état de maturité des pépins (Ristic *et al.*, 2005) et en fonction des cépages (Fuleki *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 2010).

Tableau 39. Concentrations en composés phénoliques reportées par Fuleki *et al.* dans des pépins à maturité de plusieurs cépages (Fuleki *et al.*, 1997).

Composé	Concentration (mg/100g de pépins)
(+)-catéchine	21 à 244
(-)-épi-catéchine	23 à 284
Procyanidine B1	3 à 62
Procyanidine B2	9 à 106
Procyanidine B3	0 à 71
Procyanidine B4	2 à 149
Procyanidine B1-3-O-gallate	0 à 74
Procyanidine C1	0 à 10
Procyanidine T2	0 à 76

Dans la baie, les tanins de pépins sont plus abondants que les tanins de pellicules. Bien que les tanins de pépins soient moins extractibles que ceux des pellicules, ils représentent une proportion importante des tanins du vin (Kennedy, 2008).

4. Localisation tissulaire des composés majoritaires

A l'exception des composés glucidiques qui se répartissent dans tous les tissus du pépin, les protéines et les lipides sont exclusivement localisés dans l'albumen. Ce dernier est protégé par le tégument du pépin, qui présente un aspect rigide composé en grande partie de lignine. Ce composé est présent uniquement au niveau du tégument intermédiaire chez le pépin de raisin (Cadot *et al.*, 2006a) et est responsable de la dureté de la graine. Selon Cadot *et al.*, cette couche constitue une barrière à l'oxydation et permettrait une restriction des

échanges gazeux avec le milieu extérieur et une protection vis-à-vis des insectes et champignons (Cadot *et al.*, 2006a).

Les composés phénoliques du pépin, acides phénoliques, flavanols et tanins, sont majoritairement présents au niveau du tégument interne et du tégument externe jusqu'à la cuticule (Amrani Joutei *et al.*, 1995 ; Cadot *et al.*, 2006a ; Rustioni, 2016). Une faible proportion de ces composés (6 %) a également été localisée dans l'albumen (Xu *et al.*, 2010). Thorngate et Singleton ont localisé les tanins de pépins des variétés Pinot noir et Cabernet-Sauvignon dans la couche externe des cellules du tégument, alors que la plupart des flavan-3-ols monomériques sont situés dans l'enveloppe externe et interne du tégument. Les concentrations des flavan-3-ols monomériques semblent varier selon les cépages. Par exemple, des teneurs plus élevées sont mesurées dans les pépins du Pinot noir que dans ceux du Cabernet-Sauvignon (Thorngate *et al.*, 1994). Plus récemment, des coupes histologiques de pépins de Cabernet franc ont montré que la présence de flavanols est liée aux changements des parois cellulaires du tégument externe des pépins (Minana Castello *et al.*, 2006).

Les polyphénols étant des métabolites secondaires, leur quantité et leur répartition dans le pépin dépendent en grande partie du terroir, du millésime (conditions climatiques et de culture), du cépage ainsi que du degré de maturité des pépins (J. Shi *et al.*, 2003a).

B. Facteurs influençant la composition et la qualité organoleptique du vin

1. Niveau de maturité des pépins

Le gain de poids du pépin observé au cours de la maturation de la baie semble appuyer l'hypothèse du développement des pépins au cours de la maturation (Staudt *et al.*, 1986). Les modifications tissulaires des parois suggèrent des conséquences sur les teneurs en tanins (Cadot *et al.*, 2006a). Par ailleurs, des travaux ont mis en évidence une perte de monomères de flavanols et de tanins de faible poids moléculaire ($M < 900$) au cours de la maturation des raisins (Czochanska *et al.*, 1979 ; Romeyer *et al.*, 1986). La maturité des raisins et donc des pépins est un facteur déterminant sur la composition phénolique des vins (Glories, 1981 ; Ryan *et al.*, 2003 ; Canals *et al.*, 2005 ; Fredes *et al.*, 2010 ; Nadal, 2010 ; Elagamey *et al.*, 2013).

2. Terroir et cépage

L'étude de l'effet d'un déficit en eau sur le développement de la baie et du pépin de raisin a mis en évidence que le pépin est moins affecté que la baie en situation de stress hydrique. Aucun effet n'a été observé sur les procyanidines ou leur polymérisation (Gény *et*

al., 2003), cependant les teneurs en monomères de flavan-3-ols diminuent fortement (Kennedy *et al.*, 2000). Cadot *et al.*, montrent, quant à eux une relation positive entre l'importance de la contrainte hydrique avant véraison et le taux de galloylation ainsi qu'une relation négative entre la précocité à la floraison et à la véraison et ce taux de galloylation (Cadot *et al.*, 2006b). Une étude récente a montré que des extraits de pellicules et de pépins provenant d'un terroir entièrement irrigué présentaient plus d'astringence que ceux extraits d'un terroir non irrigué (Kyraleou *et al.*, 2016). Le stress hydrique semble agir de deux manières différentes. Selon un effet direct positif de la concentration des composés phénoliques dans la baie et par un effet indirect pouvant agir positivement ou négativement sur les concentrations, selon les composés, l'intensité et la durée du stress hydrique (Ojeda *et al.*, 2002).

Les teneurs en flavanols et en tanins corrélient positivement avec l'exposition au soleil (D. I. Jackson *et al.*, 1993 ; Downey *et al.*, 2004 ; Cadot *et al.*, 2006b) et sont également fonction du cépage (Santos-Buelga *et al.*, 1995 ; Souquet *et al.*, 1996 ; González-Neves *et al.*, 2004 ; Mané *et al.*, 2007 ; Chira *et al.*, 2008 ; Ortega-Regules *et al.*, 2008 ; Nadal, 2010).

3. Extractibilité des composés phénoliques du pépin

L'extractibilité des composés phénoliques varie au cours de la maturation du pépin. Les procyanidines du pépin présentent une meilleure extractibilité dans les raisins non mûrs, contrairement aux composés phénoliques de la pellicule (González-Manzano *et al.*, 2004 ; Canals *et al.*, 2005 ; Fournand *et al.*, 2006 ; Llaudy *et al.*, 2008). D'un point de vue organoleptique, les vins issus de raisins non mûrs sont perçus avec plus d'astringence et d'amertume, en particulier parce que les pépins contribueraient plus au goût du vin en cédant des quantités importantes de procyanidines fortement galloylées (Romeyer *et al.*, 1986 ; V. De Freitas *et al.*, 2000).

De plus, de nombreuses expérimentations ont été menées afin d'étudier l'extractibilité des composés phénoliques au cours de la trituration du marc, du temps de cuvaison et du pressurage en fin de fermentation alcoolique. Les procyanidines du pépin sont extraites plus lentement que celles de la pellicule. Toutefois, la durée de cuvaison, le pourcentage d'alcool et le pressurage augmentent leurs teneurs (Cerpa-Calderón *et al.*, 2008). D'autres travaux ont également établi une corrélation positive entre l'extraction des composés phénoliques du pépin et la température ainsi que les teneurs en alcool des vins lors de la cuvaison (Oszmianski *et al.*, 1986 ; González-Manzano *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2010). Ces deux

facteurs entraîneraient l'éclatement des cellules et favoriseraient en outre la libération des composés phénoliques (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Xu *et al.* ont mis en évidence que l'extraction de 90 % des composés phénoliques du pépin proviennent de la paroi externe (Xu *et al.*, 2010). De plus, un examen histologique sur des pépins ayant macéré cinq jours dans un moût en fermentation a également montré la diffusion des tanins du tégument externe alors que ceux du tégument interne ne sont pas extraits. Ces mêmes études mettent en évidence la déstructuration des cellules de l'enveloppe externe du pépin (Cadot *et al.*, 2006a ; Minana Castello *et al.*, 2006).

C. Apport organoleptique du pépin au vin

La qualité des vins n'est pas directement liée aux teneurs extraites en composés phénoliques. Dans le moût et dans le vin, les anthocyanes, les flavan-3-ols et les tanins sont globalement associés à des caractéristiques sensorielles majeures du vin rouge telles que la couleur et l'astringence. Ces composés phénoliques peuvent se condenser, selon plusieurs mécanismes (Salas *et al.*, 2004 ; Fulcrand *et al.*, 2006). De nouveaux pigments plus stables que les anthocyanes libres du raisin se forment et stabilisent la couleur des vins rouges. En outre, en milieu acide, les procyanidines peuvent se polymériser (Haslam, 1980) mais également se dépolymériser par rupture des liaisons interflavaniques (Haslam, 1980 ; Vidal *et al.*, 2002).

D'autres travaux montrent que les flavanols et les tanins sont également impliqués dans la sensation d'amertume (Robichaud *et al.*, 1990 ; Peleg *et al.*, 1999 ; Brossaud *et al.*, 2001 ; Vidal *et al.*, 2004 ; Cliff *et al.*, 2012). L'augmentation de la sensation d'astringence est corrélée avec la hausse du degré de polymérisation (Vidal *et al.*, 2003 ; Vidal *et al.*, 2004 ; Curko *et al.*, 2014 ; Chira *et al.*, 2015), mais également avec le degré de galloylation des procyanidines (Curko *et al.*, 2014). Noble met également en évidence que l'augmentation de la sensation d'astringence domine sur la perception de l'amertume avec le degré de polymérisation des tanins (Noble, 1994). Enfin, une étude plus récente établie, par l'ajout de pépins dans un vin en diverses proportions, l'augmentation de la perception d'amertume et d'astringence (Pascual *et al.*, 2016).

Certains tanins ont la particularité d'interagir avec les protéines, cette propriété étant à l'origine du mécanisme de la sensation d'astringence en bouche (Hagerman, 1989 ; Sarni-Manchado *et al.*, 1999 ; V. De Freitas *et al.*, 2001 ; Rinaldi *et al.*, 2015). L'association des procyanidines avec des anthocyanes au cours de la cuvaison, diminue leur réactivité avec les protéines et donc leur astringence (Maury *et al.*, 2001). Les pigments polymères issus de

réactions d'anthocyanes avec les flavanols ne sont pas astringents (Vidal *et al.*, 2004). Ainsi, le rapport tanins/anthocyanes a une importance dans les qualités sensorielles du vin produit. Par exemple, Asselin *et al.* ont montré qu'un rapport anthocyanes/tanins élevé favorisait l'élaboration d'un vin souple (Asselin *et al.*, 1992).

Ainsi, selon les quantités de composés phénoliques extraits et les différentes réactions de complexation ayant lieu au cours de la cuvaison, le vin acquiert des propriétés organoleptiques particulières (Vidal *et al.*, 2004).

Cette revue bibliographique montre que l'essentiel des travaux réalisés sur le péricarpe ont porté sur les composés phénoliques. Il a été établi que ces derniers peuvent évoluer au cours de la maturation de la baie, puis être libérés dans le vin pour procurer des sensations d'astringence et d'amertume. La teneur en tanins de pépins est également modulée par leurs réactions chimiques et notamment leur complexation avec d'autres substances du vin, ce qui peut conduire à une diminution de la perception de l'astringence. Cependant aucune étude ne semble traiter d'un éventuel apport du péricarpe à la saveur sucrée des vins secs.

II. Étude de l'apport gustatif des pépins lors de la cuvaison

A. Matériel et méthodes

1. Mise en place des essais de microvinification

a) Origine des raisins utilisés

Une série de microvinifications a été mise en place au cours du millésime 2014. Pour cela, deux parcelles de deux cépages différents (Merlot et Cabernet-Sauvignon) ont été sélectionnées dans un vignoble de l'AOC Graves. La parcelle de Merlot (**M**) est plantée sur un sol calcaire et celle de Cabernet-Sauvignon (**CS**) sur des Graves.

b) Caractéristiques du millésime 2014

Les caractéristiques du millésime 2014 ont été décrites préalablement au Chapitre 5-**II.1.a)(2)**. Une des spécificités de ce millésime est son mois de mai orageux qui n'a pas été propice à la fécondation des parcelles précoces de Merlot, entraînant une floraison hétérogène et des phénomènes de coulure. En revanche, le mois de juin sec et chaud a permis une bonne floraison des cépages tardifs, comme le Cabernet-Sauvignon et le Cabernet franc.

c) Protocole de vinification

Pour chaque cépage, **M** et **CS**, deux modalités ont été mises en place, l'une dite témoin (**T**) et l'autre dite « épépinée » (**E**). Pour chaque modalité, 10 kg de raisins ont été vendangés à maturité et stockés au frais à 4 °C, avant leur transport. De retour au laboratoire, les raisins de **T** ont été éraflés, foulés et mis en cuve. Ceux de **E** ont été épépinés à l'issue de l'éraflage, puis mis en cuve. Les raisins et le moût ont été protégés à l'aide de CO₂ tout au long de leur traitement, afin d'éviter l'oxydation des jus. Du dioxyde de soufre a été ajouté à 5 g/hL lors du remplissage de chaque cuve. Après homogénéisation des cuves, un levurage a été effectué à 10 g/hL avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* F33 (Laffort œnologie) préalablement réhydratée.

Un pigeage a été réalisé quotidiennement, du début de la FA jusqu'à ce que le moût atteigne une densité de 1,04. Tout au long de la FA, la température a été maintenue aux alentours de 25 °C et une micro-oxygénation douce a été effectuée régulièrement jusqu'à ce que la densité du moût ait atteint 1,04. Du sulfate d'ammonium a été ajouté lorsque le moût a atteint la densité de 1,07 jusqu'à une valeur totale de 200 mg/L d'azote assimilable. A la fin de la fermentation alcoolique, la température des cuves a été fixée à 30 °C pendant 8 jours afin de procéder à une MPFC. Les cuves ont ensuite été écoulées en bonbonnes et bouteilles en séparant les vins de goutte et les vins de presse, obtenus par pressurage à 0,5 bar. Les modalités ont ensuite été placées en chambre froide à 4 °C afin d'éclaircir les vins par décantation des lies. Après soutirage des bonbonnes et des bouteilles, des bactéries lactiques S11BP2 *Instant* (Laffort œnologie) à 1 g/hL ont étéensemencées afin de déclencher la FML. La température a été maintenue à 20 °C. A la fin de la FML (acide malique < 0,07 g/L), les modalités ont été mises en bouteille et conservées jusqu'à leur dégustation.

Ainsi, à la fin des microvinifications, 8 modalités ont été obtenues (**Figure 36**) :

Cépage	Merlot				Cabernet-Sauvignon			
Modalité	Témoin		Epépinée		Témoin		Epépinée	
Type de vin	Goutte	Presse	Goutte	Presse	Goutte	Presse	Goutte	Presse
Modalités finales	MTG	MTP	MEG	MEP	CSTG	CSTP	CSEG	CSEP

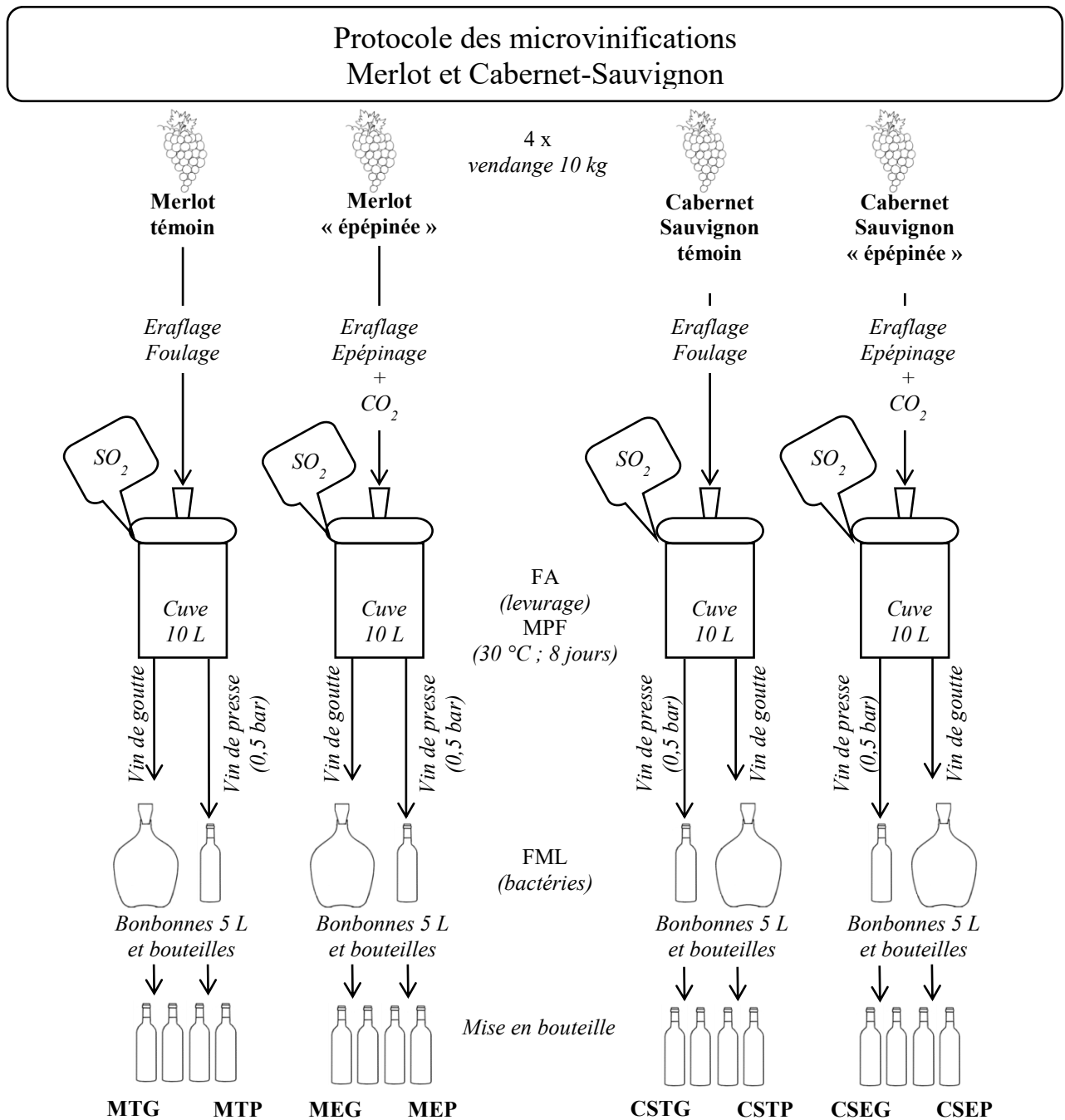


Figure 36. Protocole mis en place pour les microvinifications du millésime 2014.

2. Mise en place des analyses chimiques et sensorielles

De la même manière qu'au Chapitre 5, les paramètres chimiques élémentaires ont été analysés par le laboratoire SARCO et les IPT ont été mesurés au spectrophotomètre à 280 nm.

Une analyse sensorielle a été réalisée à la fin des microvinifications, soit après FML, avec un panel composé de 30 dégustateurs (17 femmes et 13 hommes) âgés de 25 à 65 ans. Les dégustations se sont déroulées à l'ISVV dans les conditions décrites dans la partie expérimentale générale.

Un test triangulaire a été effectué entre les modalités **T** et **E**, pour chaque cépage (**M** et **CS**) et pour chaque type de vin (**G** et **P**). Un profil sensoriel a été ensuite réalisé en évaluant l'intensité de la douceur, de l'amertume et de l'astringence sur une échelle linéaire non structurée de 0 à 7 pour les 8 modalités.

Les résultats ont été interprétés par la loi binomiale pour les tests triangulaires et par une analyse de la variance à 1 facteur (ANOVA) suivie d'un test *post hoc* de Tukey pour les profils sensoriels.

B. Résultats

1. Suivi de la vinification et analyses chimiques des vins après FML

L'analyse des paramètres œnologiques élémentaires a montré des valeurs similaires dans les modalités **T** et **E** pour chaque cépage, ce qui confirme l'homogénéité des raisins. La fermentation alcoolique s'est déroulée en 13 jours pour toutes les modalités avec des concentrations finales en glucose+fructose inférieures à 0,5 g/L. Au cours de la MPFC, les vins sont dégustés régulièrement afin de détecter d'éventuelles déviations. Après écoulage, les mesures de la concentration en acide malique et de l'acidité volatile, permettent de contrôler le déroulement de la FML dans de bonnes conditions et de confirmer son achèvement. Les caractéristiques chimiques des vins après FML sont présentées dans le **Tableau 40**.

Tableau 40. Analyses chimiques des vins après FML des microvinifications 2014.

Modalité	Ethanol (% vol.alc.)	Glucose/ Fructose (g/L)	Acidité totale (g/L)	pH	Acidité volatile (g/L)	Acide Malique (g/L)	IPT
MTG	13	0,2	3,6	3,4	0,1	n.d.	55±3
MEG	13	0,1	3,5	3,4	0,1	n.d.	49±4
CSTG	13	0,1	2,7	3,6	0,1	n.d.	70±6
CSEG	13	0,1	2,6	3,6	0,1	n.d.	73±5
MTP	12,9	0,5	3,5	3,5	0,2	n.d.	50±4
MEP	12,9	0,3	3,5	3,4	0,1	n.d.	46±5
CSTP	13,3	0,4	2,7	3,7	0,2	n.d.	60±5
CSEP	13,6	0,3	2,5	3,7	0,1	n.d.	65±3

n.d. : non détecté (< 0,1 g/L).

Tous les vins présentent des caractéristiques chimiques similaires avec des valeurs moyennes conformes à des vins commerciaux issus de la même appellation et du même millésime. Les IPT sont plus élevés pour les vins de Cabernet-Sauvignon que pour ceux de Merlot, mais il n'existe pas de différence significative entre les modalités **T** et **E** d'un même cépage.

2. Comparaison sensorielle des modalités **T** et **E**

Dans un premier temps, un test triangulaire entre les modalités **T** et **E** est présenté aux dégustateurs afin de déterminer s'ils perçoivent une différence gustative entre ces deux modalités. Ces tests sont réalisés pour les deux cépages et pour les vins de goutte comme pour les vins de presse. Pour ces quatre séries, les résultats, présentés au **Tableau 41**, sont significatifs au seuil de 5 % pour le Merlot et de 0,1 % pour le Cabernet-Sauvignon. Cela signifie que les dégustateurs sont capables de distinguer les vins issus de raisins épépinés de ceux vinifiés en présence de pépins, tant pour les vins de goutte que pour les vins de presse. L'écart entre les modalités semble encore davantage marqué pour les vins de Cabernet-Sauvignon.

Tableau 41. Résultats des tests triangulaires des microvinifications 2014.

Vin	Vin de Goutte		Vin de Presse	
	M	CS	M	CS
Nombre de bonnes réponses /30juges	16	19	15	21
Significativité α	5 %	0,1 %	5 %	0,1 %

Dans un second temps, il est demandé au panel de procéder à un profil sensoriel en notant l'intensité de la douceur, de l'amertume et de l'astringence des vins. Les résultats sont traités par une ANOVA et sont présentés dans le **Tableau 42**. Aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne l'amertume des différentes modalités. En revanche, l'analyse de variance est significative pour la douceur et l'astringence, ce qui signifie que les dégustateurs perçoivent des écarts entre les modalités **T** et **E** pour ces deux descripteurs. Ces résultats sont identiques pour le Merlot et pour le Cabernet-Sauvignon, tant dans les vins de goutte que dans les vins de presse. En outre, les moyennes des notes attribuées par le panel montrent que les vins témoins, vinifiés en présence des pépins, sont perçus plus doux et moins astringents que les vins issus de raisins « épépinés ».

Tableau 42. Résultats des profils sensoriels des microvinifications 2014.

Descripteur	<i>Douceur</i>					
	MG		MP		CSP	
Série						
Modalité	T	E	T	E	T	E
Moyenne des intensités ^a	4,3	2,3	3,9	2,7	3,7	2,9
ANOVA <i>p</i> -value	<0,01 **		0,011 *		<0,044 *	
						0,020 *
Descripteur	<i>Amertume</i>					
	MG		MP		CSP	
Série						
Modalité	T	E	T	E	T	E
Moyenne des intensités ^a	2,6	2,6	2,4	2,5	2,4	2,5
ANOVA <i>p</i> -value	0,659 NS		0,799 NS		0,953 NS	
						0,876 NS
Descripteur	<i>Astringence</i>					
	MG		MP		CSP	
Série						
Modalité	T	E	T	E	T	E
Moyenne des intensités ^a	2,3	3,3	2,4	3,6	3,3	4,7
ANOVA <i>p</i> -value	0,014 *		<0,01 **		<0,01 **	
						<0,001 ***

^a Moyenne des notations des dégustateurs sur une échelle de 0 à 7.

NS : Non Significatif.

Significatif au risque de 5 % (*), de 1 % (**) et de 0,1 % (***).

C. Discussion

Les vins obtenus à partir de raisins épépinés présentent moins de douceur et plus d'astringence que les vins issus de raisins ayant conservé leurs pépins, pour les deux cépages étudiés dans cette expérimentation. Aucune différence d'amertume n'est en revanche perceptible. Aussi paradoxales soient-elles *a priori*, ces conclusions confirment les observations relatées par Pacottet et Peynaud : la présence des pépins au cours de la vinification est profitable à la qualité sensorielle du vin. Plus récemment, Lee *et al.* ont évoqué, sur la base d'une dégustation informelle, le fait qu'un vin issu d'une méthode de vinification traditionnelle serait préféré à un vin dont les pépins ont été éliminés au début de la fermentation alcoolique (Lee *et al.*, 2008). Kovac *et al.* ont également étudié les effets de l'addition de pépins de raisins sur la composition en flavanols et en tanins des vins, ainsi que sur leur astringence. Les résultats suggèrent qu'une addition raisonnée de pépins (60 g/kg de raisin) favoriserait des concentrations plus fortes en composés phénoliques, que ne semblent pas traduire les mesures des IPT et des quantités totales de tanins réalisées dans notre travail. En outre, les mêmes auteurs relatent « les caractéristiques organoleptiques (couleur, goût et arômes) plus prononcées » des vins additionnés de pépins (Kovac *et al.*, 1992 ; Kovac *et al.*, 1995), sans donner davantage de détails. D'autres articles présentent des résultats similaires, suggérant que l'addition de pépins au cours de la vinification augmente non seulement la structure des vins mais également leur astringence alors que les propriétés aromatiques ne sont pas modifiées (Canals *et al.*, 2008). Lors des séances d'analyse sensorielle que nous avons effectuées, les dégustateurs n'ont pas perçu non plus de différence olfactive entre les échantillons. Ainsi, les travaux menés jusqu'à présent ont principalement porté sur la composition phénolique des vins ainsi que sur la perception de leur astringence et de leur amertume. La contribution des pépins à la saveur sucrée n'avait jamais été étudiée jusqu'ici. Sa mise en lumière suggère l'existence, dans les pépins, de molécules à saveur sucrée, qui seraient libérées au cours de la vinification et en particulier de la phase post-fermentaire.

Dans ce contexte, les systèmes développés pour retirer les pépins des cuves pendant la fermentation alcoolique semblent d'un intérêt fortement discutable (Leahy, 2000). De la même façon, l'ajout de pépins exogènes dans une cuve en fermentation pourrait soulever, au-delà de sa pertinence gustative, de nombreuses questions liées à l'authenticité et l'identité. Ces pratiques ne sont donc pas souhaitables pour l'élaboration de vins de qualité.

Enfin, les différences entre les modalités **T** et **E** sont perçues dans les deux cépages, mais semblent accrues dans les vins issus de Cabernet-Sauvignon. Cette observation pourrait être reliée au caractère plus tannique et structuré des vins issus de ce cépage (Chira *et al.*,

2008 ; Chira, 2009). En effet, De Freitas *et al.* ont montré que l'apport de composés phénoliques du pépin est plus important pour les vins de Cabernet-Sauvignon que pour les vins de Merlot (V. De Freitas *et al.*, 2000). Il pourrait en être de même pour des molécules à saveur sucrée, susceptibles d'exercer une influence plus importante sur l'équilibre gustatif des vins de Cabernet-Sauvignon. Il est également possible que les écarts perçus entre cépages soient liés à des teneurs différentes de molécules sucrées dans les pépins. La répétition de telles expériences de microvinification permettrait d'étudier ces deux hypothèses. Les différences gustatives semblent également être plus marquées pour les vins de presse que pour les vins de goutte. Cela pourrait s'expliquer par une libération plus importante de composés sucrés du pépin lors du pressurage, comme cela a été montré pour les procyanidines du pépin (Cerpa-Calderón *et al.*, 2008).

Conclusion

Les expérimentations décrites dans le chapitre précédent ont permis d'établir le rôle bénéfique de la macération post-fermentaire à chaud sur le goût du vin et notamment sur l'augmentation de sa saveur sucrée. Ces conclusions suggèrent l'existence de molécules édulcorantes provenant du raisin. Or, en relatant des expériences de vinification réalisées à partir des différentes parties du raisin, Emile Peynaud souleva l'hypothèse d'une contribution des pépins au moelleux des vins. Dans le présent chapitre, nous avons reproduit des microvinifications, à partir de deux cépages bordelais, dont une seule partie des raisins a été épépinée. La dégustation des vins obtenus après FML a montré une astringence moindre ainsi qu'une douceur significativement plus importante dans les vins issus de raisins contenant leurs pépins. Ainsi, ces résultats étayaient l'hypothèse de l'apport de composés sucrés provenant du pépin et capables de modifier l'équilibre gustatif des vins rouges.

L'approche expérimentale et les outils sensoriels utilisés dans cette partie ont permis de confirmer les observations et les intuitions des vinificateurs les plus fins : les vins rouges gagnent en moelleux lors de la cuvaison et les pépins leur confèrent davantage de saveur sucrée. Toutefois, il est fortement vraisemblable que l'apport gustatif du pépin soit modulé par le niveau de maturité du raisin mais également par les conditions de croissance de la baie. L'influence bénéfique du pépin doit donc être nuancée au regard de ces paramètres.

Afin de préciser l'influence des facteurs viticoles et œnologiques sur la contribution des raisins à la saveur sucrée des vins secs, il convient de donner un éclairage moléculaire aux phénomènes sensoriels mis en évidence dans cette étude.

TROISIÈME PARTIE

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE COMPOSÉS DU RAISIN POSSÉDANT UNE ACTIVITÉ GUSTATIVE

TROISIÈME PARTIE :
ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE COMPOSÉS DU RAISIN POSSÉDANT
UNE ACTIVITÉ GUSTATIVE

CHAPITRE 7 - EXTRACTION ET IDENTIFICATION DE COMPOSÉS SAPIDES DU PÉPIN

Introduction

La contribution gustative des pépins à la douceur des vins a été mise en évidence au cours de la partie II de ce travail. Le présent chapitre consiste en l'étude des composés non volatils du pépin possédant un goût sucré. Pour cela, un protocole de fractionnement et de purification guidé par la gustatométrie est développé. Dans un premier temps, il est nécessaire de mettre en place un protocole d'extraction des composés du pépin puis de les isoler à l'aide de plusieurs techniques séparatives. La nature chimique des molécules recherchées n'est pas connue, par conséquent une approche guidée par l'analyse sensorielle est choisie pour développer le protocole de fractionnement et de purification.

I. Développement d'une technique d'extraction des composés du pépin

A. Sélection de la matière première

Les grappes de raisin ont été sélectionnées dans des parcelles qualitatives de plusieurs crus de la région Bordelaise, en appellations Cadillac-Côtes de Bordeaux, Saint-Julien et Saint-Emilion. Les grappes choisies, issues des millésimes 2014 et 2015, étaient constituées de raisins sains et non millerandés. Elles ont été ramassées en même temps que le reste de la récolte, soit au niveau de maturité œnologique fixé par le vinificateur de chacune des propriétés. L'effet des pépins sur la saveur sucrée a été observé tant pour le Merlot que pour le Cabernet-Sauvignon, par conséquent des grappes des deux cépages ont été collectées. Après récolte, les grappes de raisins ont été conservées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B. Protocole d'extraction des pépins

L'extraction des pépins a été réalisée manuellement, afin de ne pas compromettre l'intégrité du pépin. Les baies étant congelées, il était plus facile de retirer la pulpe. Afin de s'assurer de l'élimination des sucres sur la couche externe des pépins, ces derniers sont rincés rapidement à l'eau. De cette manière, près de 30 kg de raisins ont été épépinés pour donner environ 1,6 kg de pépins.

C. Détermination des conditions d'extraction des composés du pépin

L'objectif de l'extraction solide/liquide était de mimer les conditions d'une macération post-fermentaire à chaud. Il est considéré que 1,35 kg de raisins (soit environ 70 g de pépins) permettent d'obtenir en moyenne 1 L de vin. Ainsi, 70 g de pépins ont été placés en macération dans 1 L d'une solution EtOH/H₂O : 15/85 à pH 3,5, dans une étuve à 30 °C pendant 10 jours, en atmosphère inerte et sans agitation. A l'issue de la macération, le macérat a été filtré à 0,45 µm, concentré à 500 mL afin d'éliminer l'éthanol, et lyophilisé. Au total, 22 macérations ont été réalisées dans des contenants d'un litre.

II. Mise en place d'un protocole de fractionnement de l'extrait de pépins guidé par la gustatométrie

A. Présentation de la stratégie mise en œuvre

1. Principe

Une démarche inductive guidée par la gustatométrie a été mise en place afin de fractionner l'extrait de pépins. Cette démarche consistait à fractionner des extraits par diverses techniques séparatives en étant guidé par la dégustation des fractions, c'est-à-dire sans présager de la nature chimique des molécules cibles. Depuis plusieurs années, des études sur la recherche des déterminants moléculaires du goût proposent l'utilisation d'une telle approche inductive. Initiées notamment dans le laboratoire du Pr. Hofmann à Munich, ces recherches utilisant la dégustation de fractions pour guider le protocole de purification ont été appliquées à de nombreuses matrices alimentaires, et notamment le vin (Glabasnia *et al.*, 2006 ; Hufnagel *et al.*, 2008a). Cette démarche a également été utilisée afin d'isoler de nouveaux composés édulcorants du bois de chêne (Marchal *et al.*, 2011b).

L'élucidation structurale et la caractérisation sensorielle de composés non-volatils nécessite des quantités assez importantes, de l'ordre de quelques milligrammes au minimum. Pour cela, le protocole développé a fait intervenir des techniques séparatives complémentaires, pouvant être utilisées à l'échelle préparative ou semi-préparative, comme l'extraction L/L, la CPC, la SPE et l'HPLC semi-préparative. A l'issue de chaque étape, les différentes fractions obtenues ont été dégustées et celles présentant les caractéristiques gustatives recherchées ont été sélectionnées pour l'étape ultérieure du protocole.

2. Suivi du fractionnement de l'extrait de pépins

L'utilisation de la LC-FTMS permet l'analyse de la constitution des fractions et ainsi le suivi du fractionnement. Les conditions chromatographiques et les paramètres spectrométriques utilisés sont résumés, respectivement, dans les **Tableau 43** et **Tableau 44**.

Tableau 43. Conditions chromatographiques utilisées au cours du fractionnement des extraits de pépins.

Appareil :

U-HPLC Accela (Thermo Fisher Scientific)

Logiciel :

Xcalibur 2.1 pour Exactive

Détecteur UV :

Accela PDA 1 cm LightPipe Flow cell

Colonne :

Hypersil Gold C18 (Thermo Fisher Scientific)

100 x 2,1 mm

Taille des particules 1,9 µm

Phase mobile :

Débit : 600 µL/min

Solvant A : H₂O milli-Q

Solvant B : ACN LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific)

Gradient :

A	Temps (min) :	0	0,3	2	5,3	6	6,5	6,6	7
	% de B :	5	5	7	17	98	98	5	5
B	Temps (min) :	0	1	5	5,3	6	6,15	7	
	% de B :	5	5	30	98	98	5	5	

Injection :

5 µL à l'aide d'un passeur automatique HTC0 Pal équipé de « racks » réfrigérés

Tableau 44. Conditions spectrométriques et d'ionisations utilisées au cours du fractionnement des extraits de pépins.

Paramètre	Mode négatif	Mode positif
Débit du « sheath gas » ^a	80	
Débit du gaz auxiliaire ^a	15	
Débit du « sweep gas »	0	
Tension du spray	-3,5 kV	3,5 kV
Température du capillaire	350 °C	
Tension du capillaire	-25 V	25 V
Tension du tube lens	-120 V	120 V
Tension du skimmer	-20 V	20 V
Température de la source	320 °C	
Résolution ^b	10000	
AGC	5.10 ⁵	
Gamme masses	160-2000 Th	

^a Le débit du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires.

^b Résolution $m/\Delta m$, fwhm à m/z 200 Th.

3. Organisation des dégustations des fractions

A l'issue de chaque étape de fractionnement, les extraits ont été évaporés afin d'éliminer les solvants, puis repris dans de l'eau ultra-pure et lyophilisés. Des travaux antérieurs avaient montré que l'évaporation à sec suivie de la lyophilisation permet d'éliminer les éventuelles traces de solvants, pour le méthanol, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle, le butanol et l'heptane.

Les dégustations ont été réalisées au laboratoire par cinq experts, dans des verres AFNOR. Les fractions ont été dégustées dans 50 mL d'une solution hydro-alcoolique à 12 % vol., préparée à base de distillat de vin dilué dans une eau pure et peu minéralisée (eau de source de Laqueuille, France).

Sauf mention contraire, les fractions d'extrait de pépins ont été dégustées à des concentrations calculées au prorata des quantités obtenues et ramenées à l'équivalent d'un litre de vin. Les échantillons dégustés ont été comparés à une solution témoin correspondant à la solution hydro-alcoolique seule. Le goût de chaque fraction a été décrit et l'intensité de la douceur a été évaluée sur une échelle de 0 à 7. Chaque dégustation a été reproduite deux fois, pour vérifier la cohérence des résultats. Les dégustations ont été réalisées à l'aveugle.

B. Extractions liquide/liquide

1. Choix des solvants et mise en œuvre

La première étape consistait en une extraction L/L, dont la pertinence repose en grande partie sur le choix des solvants. Les composés extraits au cours de la macération de pépins sont plutôt polaires puisqu'ils sont extraits en solution hydro-alcoolique à 15 % d'EtOH. Toutefois, des solvants de polarité croissante ont été utilisés pour partitionner l'extrait brut. Ainsi, une première extraction à l'heptane (Hept) a permis l'élimination des composés les plus apolaires. Puis, des extractions à l'acétate d'éthyle (AcOEt) et au butanol saturé en eau (BuOHsat) ont été réalisées. Les phases organiques de chaque extraction ont été regroupées, évaporées et lyophilisées. La **Figure 37** schématise le protocole mis en œuvre. Les extraits pré-purifiés φ -Hept, φ -AcOEt, φ -BuOHsat et φ -aqueuse, obtenus sous forme de poudre, ont été dégustés en solution hydro-alcoolique.

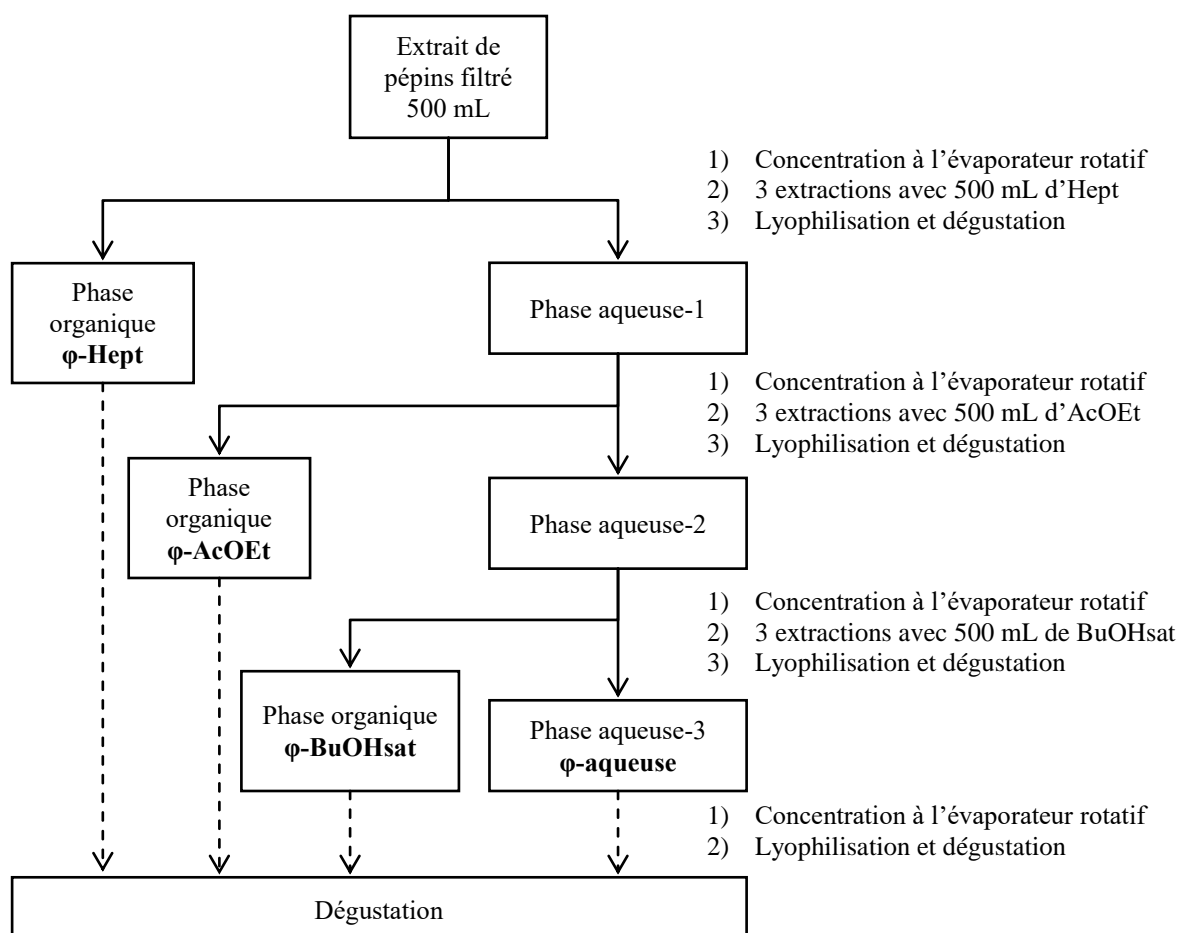


Figure 37. Schéma du protocole d'extractions L/L appliquées à l'extrait brut de pépins.

2. Résultats

a) Extractions liquide/liquide

Les composés du pépin susceptibles de diffuser lors de la MPFC sont extraits par macération des pépins dans une solution hydro-alcoolique. Après filtration du macérat et évaporation de l'EtOH, l'extrait brut de pépins est d'abord fractionné par des extractions liquide/liquide. Les profils chromatographiques des quatre extraits pré-purifiés de pépins sont différents, ce qui confirme la réussite du fractionnement (**Figure 38**).

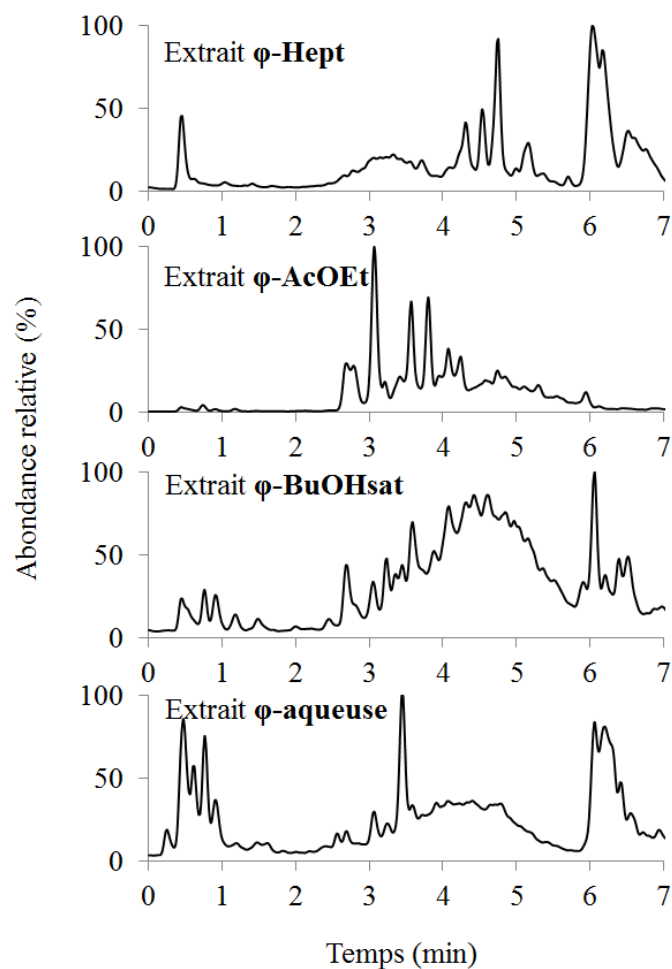


Figure 38. TIC en ionisation négative des extraits pré-purifiés de pépins.

Après lyophilisation, les extraits **φ-Hept**, **φ-AcOEt**, **φ-BuOHsat** sont obtenus sous forme de poudre beige alors que l'extrait **φ-aqueuse** présente un aspect de pâte visqueuse brune. Pour une macération de pépins de 1 L, correspondant à 70 g de pépins, les masses des extraits **φ-Hept**, **φ-AcOEt**, **φ-BuOHsat** et **φ-aqueuse** s'élèvent en moyenne respectivement à 410 mg, 640 mg, 1,44 g et 1,34 g (**Tableau 45**).

Tableau 45. Extraits obtenus après extraction L/L de l'extrait brut de pépins ; quantités extraites pour une macération de 70 g de pépins dans un litre de solution hydro-éthanolique.

	Extrait brut	ϕ -Hept	ϕ -AcOEt	ϕ -BuOHsat	ϕ -aqueuse
Masses $\pm \sigma$ (g)	4,15 \pm 0,20	0,41 \pm 0,08	0,64 \pm 0,10	1,44 \pm 0,25	1,34 \pm 0,19
Aspect	Poudre brune	Poudre beige	Poudre beige	Poudre beige	Pâte visqueuse brune

σ : écart-type, calculé sur la totalité des extractions L/L réalisées.

b) Dégustation

La dégustation des extraits pré-purifiés révèle une forte astringence, entraînant une saturation des dégustateurs. Les concentrations de dégustation ont donc été réévaluées et diluées par 20. De cette manière, les quatre extraits dégustés présentent une amertume plus marquée que le verre témoin. L'extrait ϕ -BuOHsat possède une légère douceur à l'attaque suivie d'une forte astringence et l'extrait ϕ -aqueuse présente quant à lui une saveur sucrée, de l'attaque à la finale.

3. Discussion

En moyenne, les extraits de pépin représentent, après lyophilisation, 6 % du poids total des pépins. Cette observation souligne l'importance de l'apport des pépins au cours de la MPFC, puisque les pépins d'une quantité de raisin permettant d'obtenir 1 litre de vin libèrent en moyenne 4,15 g d'extractibles. Cependant, il faut souligner que la diffusion des composés est vraisemblablement meilleure au cours de cette expérience de modélisation de la MPFC qu'en conditions réelles. En effet, au cours d'une MPFC au chai, certains pépins ont été libérés et se trouvent au fond de la cuve tandis que d'autres sont encore contenus dans les baies constituant le chapeau de marc. Pour ces derniers, la diffusion des composés est plus limitée (Minana Castello *et al.*, 2006).

La mise en place d'une extraction L/L est adaptée pour une première étape de fractionnement. Elle permet de traiter une grande quantité d'échantillon et engendre peu de pertes puisque les deux phases liquides sont récupérées (rendement de 92 %).

La dégustation des quatre extraits met en évidence un fractionnement du goût. L'amertume et l'astringence des extraits ϕ -Hept, ϕ -AcOEt, ϕ -BuOHsat ne sont pas surprenantes en raison des nombreux composés phénoliques (tanins hydrolysables et condensés, flavan-3-ols, dérivés d'acides ellagiques et dérivés de flavonols) contenus dans les

pépins (González-Manzano *et al.*, 2004 ; Gambuti *et al.*, 2009 ; Sandhu *et al.*, 2010 ; Rockenbach *et al.*, 2012 ; Di Lecce *et al.*, 2014 ; Ky *et al.*, 2015). En outre, beaucoup de ces composés phénoliques ont été décrits amers et astringents (Arnold *et al.*, 1978 ; Peleg *et al.*, 1999 ; Brossaud *et al.*, 2001 ; Hufnagel *et al.*, 2008a ; Soares *et al.*, 2013).

Cependant, le goût sucré présenté par l'extrait **ϕ -aqueuse** n'a jamais été mentionné jusqu'à présent. La douceur perçue dans cet extrait suggère la présence de composés sucrés du pépin et tend à confirmer les résultats sensoriels décrits au chapitre 6. Le dosage des sucres réducteurs a par ailleurs montré que cet extrait n'en contenait que des traces (moins de 0,1 g/L), bien inférieures à leur seuil de détection. Cela confirme que la douceur perçue ne provient pas d'oses mais d'autres composés non-volatils édulcorants : il s'agit bien d'une « sucrosité sans sucre ».

L'extrait **ϕ -aqueuse** est donc sélectionné et conservé pour la suite du fractionnement. Cette première étape d'extractions liquide/liquide a ainsi permis l'élimination de composés a priori sans intérêt pour notre étude et représentant plus de 62 % de la masse totale de l'extrait brut.

C. Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge-Gustatométrie (CPC-G)

L'extrait **ϕ -aqueuse** possède un profil chromatographique complexe, avec de nombreux pics et massifs peu résolus. Compte tenu de sa masse importante, la chromatographie de partage centrifuge est choisie afin de le fractionner.

1. Matériel et méthodes

a) Choix du système de CPC

Différents systèmes « pont » AcOEt/iPrOH/H₂O ont été testés en vue du fractionnement de l'extrait **ϕ -aqueuse** (Tableau 46), selon le protocole décrit dans la partie expérimentale générale. Le choix du système a reposé sur l'observation d'une similarité entre les profils chromatographiques de la phase supérieure et inférieure.

Tableau 46. Systèmes testés pour le fractionnement par CPC de l'extrait pré-purifiés ϕ -aqueuse.

	P ₈	P ₉	P ₁₀	P ₁₁	P ₁₂	P ₁₃	P ₁₄
AcOEt	50	25	10	5	4	3	2
iPrOH	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O	50	25	10	5	4	3	2

L'étude des chromatogrammes LC-FTMS des phases supérieures et inférieures a permis de choisir le système P₁₃ pour réaliser le fractionnement par CPC de l'extrait ϕ -aqueuse.

b) Déroulement des expériences de CPC

Au vu des quantités d'extrait ϕ -aqueuse à traiter, l'utilisation du rotor de 1 L, permettant d'injecter jusqu'à 10 g de produit, a été nécessaire. Afin de confirmer la pertinence du système choisi pour ce fractionnement par CPC, une première injection d'1 g de l'extrait ϕ -aqueuse a d'abord été réalisée sur le rotor de 100 mL (CPC-1), selon la méthode 2 décrite au **Tableau 47**. Une autre expérience a été effectuée à partir d'une quantité plus importante d'extrait (6 g), à l'aide du rotor d'1 L, en utilisant la méthode 3.

Tableau 47. Méthodes d'analyse 2 et 3 du fractionnement par CPC.

Méthode d'analyse 2 Rotor 100 mL			Mode ascendant			
	Début (min)	Fin (min)	Débit (mL/min)	Rotor (rpm)	% A	% B
Équilibration	0	15	10	0	100	0
	15	30	10	500	100	0
	30	35	5	2000	100	0
	35	60	5	2000	0	100
Élution	0	60	5	2000	0	100
Extrusion	60	105	5	2000	100	0

Méthode d'analyse 3 Rotor 1 L			Mode ascendant			
	Début (min)	Fin (min)	Débit (mL/min)	Rotor (rpm)	% A	% B
Équilibration	0	20	40	0	100	0
	20	60	25	500	100	0
	60	65	25	1250	100	0
	65	100	25	1250	0	100
Élution	0	120	25	1250	0	100
Extrusion	120	165	40	1250	100	0

Troisième partie : Isolement et identification de composés du raisin possédant une activité gustative

En vue des CPC-1 et -2, l'échantillon de l'extrait ϕ -aqueuse a été solubilisé dans respectivement 10 et 30 mL d'un mélange biphasique P₁₃ puis filtré à 0,45 μ m avant injection. La détection UV a été fixée à 254 et 280 nm et le collecteur de fraction a été réglé respectivement à 5 et 25 mL/min pour les CPC-1 et -2. A la fin des expériences, 105 tubes et 192 tubes ont été collectés respectivement pour les CPC-1 et -2. Des aliquotes de 100 μ L ont été prélevées tous les 10 tubes, évaporées à sec au RapidVap, reprises dans 1 mL d'un mélange 95/5 : H₂O/MeOH et analysées par LC-FTMS. Les tubes ont ensuite été regroupés selon leur profil chromatographique ; leur contenu a été évaporé à sec et lyophilisé. De cette manière, 12 fractions ont été constituées pour chaque CPC (**Figure 39**).

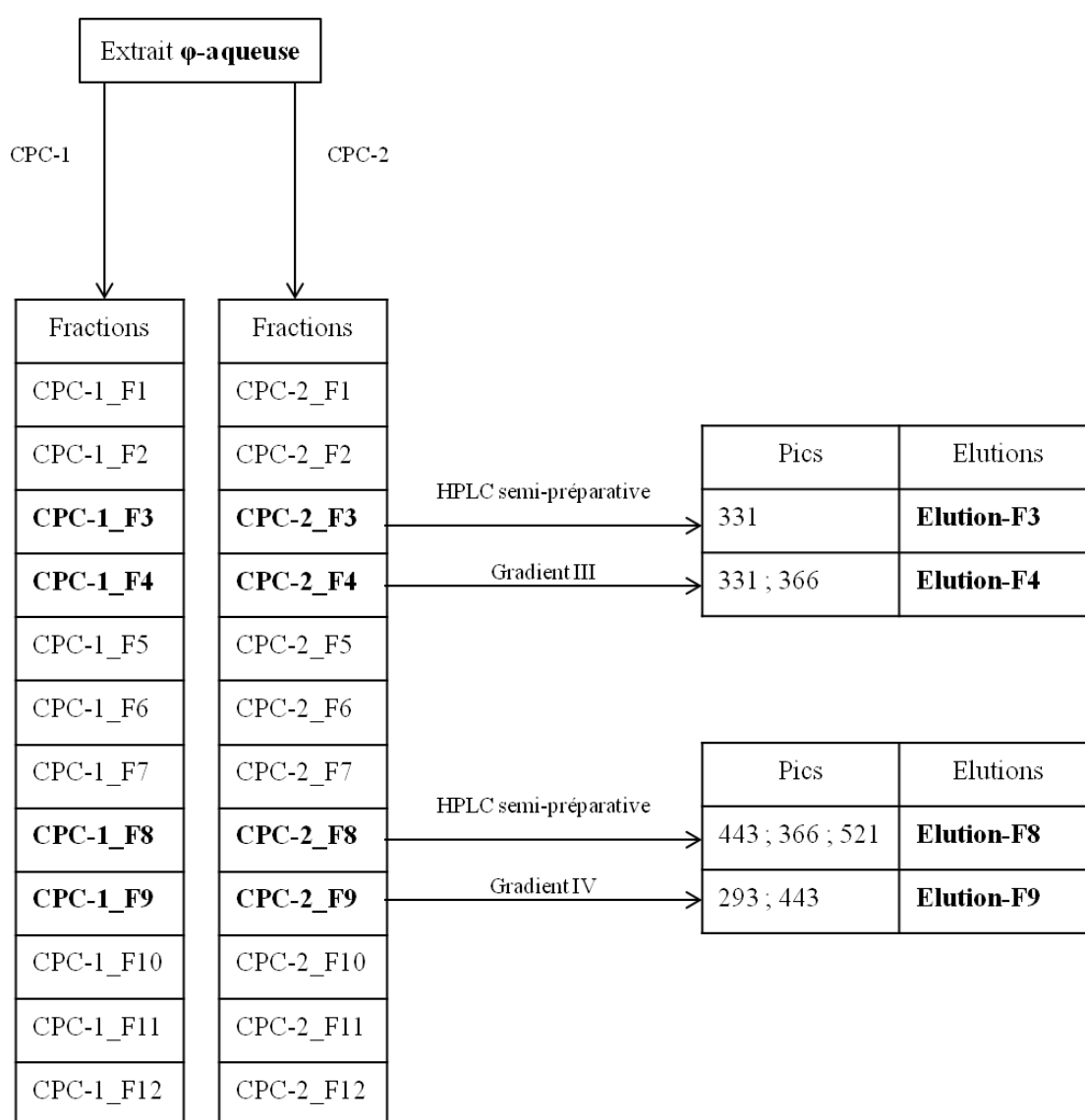


Figure 39. Fractionnement de l'extrait ϕ -aqueuse par CPC-G et HPLC semi-préparative

2. Résultats du fractionnement par CPC-Gustatométrie

Pour les CPC-1 et -2, les volumes des phases inférieures rejetées, sont, respectivement, de 49 et 323 mL, et les pressions à l'équilibre sont de 33 et 48 bar. Ces volumes à l'équilibre indiquent une bonne rétention de phase inférieure dans la colonne, propice à la séparation des constituants de l'extrait.

La solubilisation de l'extrait dans le système de solvant crée une émulsion rendant la filtration des 30 mL du mélange longue et difficile. Après filtration, l'échantillon se présentait cependant sous forme d'un système biphasique, limitant ainsi les risques de déstabilisation de l'équilibre des phases dans le rotor.

Le profil chromatographique UV de la CPC-1 présente des signaux tout au long de l'expérience, suggérant un bon partage des composés (**Figure 40**). Par ailleurs, les chromatogrammes LC-FTMS des tubes analysés sont différents, ce qui confirme la réussite du fractionnement et permettent de constituer des fractions distinctes.

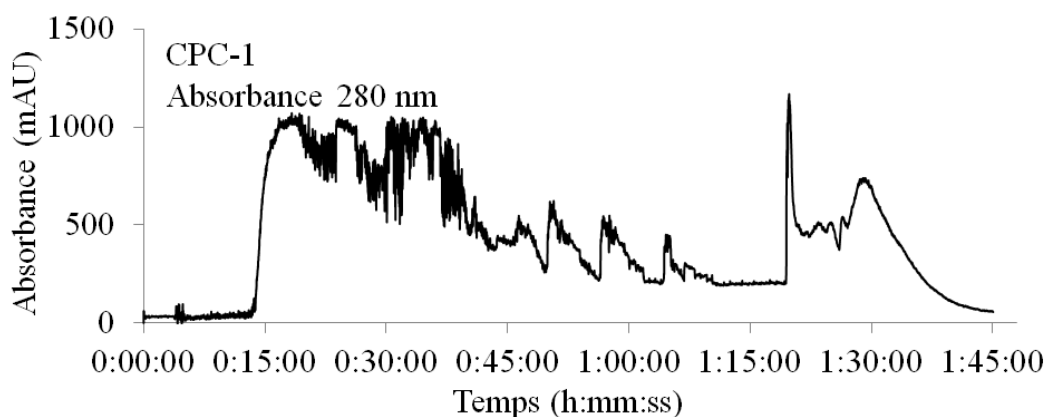


Figure 40. Profil chromatographique UV de la CPC-1.

Dans un premier temps, les 12 fractions sont dégustées en solution hydro-alcoolique et quatre d'entre elles possèdent une saveur sucrée. Ce résultat prouve que le système choisi est adapté à un fractionnement du goût. Le système de CPC P₁₃ est donc validé pour le fractionnement de l'extrait ϕ -aqueuse et la CPC-2 est réalisée sur le rotor de 1 L. Le profil UV (**Figure 41**) de la CPC-2 présente une moins bonne répartition des signaux. Toutefois, les chromatogrammes des injections LC-FTMS sont similaires à ceux obtenus de la CPC-1. Par conséquent, les mêmes fractions sont constituées pour les deux CPC.

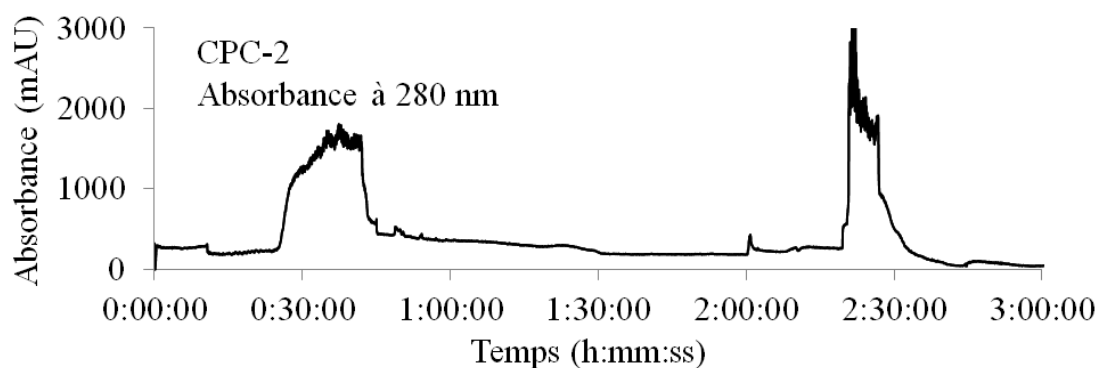


Figure 41. Profil chromatographique UV de la CPC-2.

Les fractions sont obtenues sous forme de poudre en quantité variable (**Tableau 48**). La fraction 11 est la plus abondante, son analyse LC-FTMS montre la présence de nombreux oligomères de flavan-3-ols.

Les fractions de la CPC-2 sont présentées dans un ordre aléatoire à 5 dégustateurs. Leur analyse sensorielle est réalisée en duplicat lors de deux séances distinctes. Les résultats des deux dégustations sont identiques et cohérents avec ceux obtenus pour les fractions de la CPC-1. Le gustatogramme est présenté au **Tableau 48**.

Tableau 48. Gustatogramme de la CPC-2. Les fractions retenues pour la suite du fractionnement sont indiquées en caractères gras.

Fraction	Tubes	Masse (mg)	Goût	Aspect
F1	21 - 32	17,4	Salé 0,5/7	Poudre beige
F2	33 - 47	132,1	Amer 1/7	Poudre brune
F3	48 - 62	101,1	Sucré 5/7	Poudre beige
F4	63 - 67	20	Sucré 4/7	Poudre beige
F5	68 - 79	33,8	-	Poudre beige
F6	80 - 87	17,6	-	Poudre beige
F7	88 - 97	15,3	-	Poudre rose
F8	98 - 108	17,6	Sucré 6/7	Poudre beige
F9	109 - 152	56,9	Sucré 5/7	Poudre beige
F10	153 - 159		-	Solide brun
		281,9		visqueux
F11	160 - 169	4827,6	Astringent 7/7	Poudre brune
F12	170 - 180	75,5	Sucré 1/7	Poudre brune

- : Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec le verre témoin.

La dégustation des fractions met en évidence la saveur sucrée de quatre d'entre elles, **F3**, **F4**, **F8** et **F9**, avec des intensités marquées variant de 4 à 6. En revanche, la fraction majoritaire **F11** possède une astringence marquée, qui peut être reliée à la présence de composés phénoliques révélée par LC-FTMS.

3. Discussion

La CPC, de la même manière que l'extraction L/L, présente un bon rendement (92 %). En effet, les phases stationnaires et mobiles étant liquides, la totalité de l'extrait peut être récupérée. Les seules pertes sont celles causées par la filtration et les transferts de verrerie.

Le système de CPC utilisé permet un fractionnement efficace de l'extrait **φ-aqueuse** puisque douze fractions de profils chromatographiques différents sont obtenues. De la même manière, il permet une bonne séparation des composés sapides, puisque le goût des fractions diffère. Leur dégustation met ainsi en évidence une saveur sucrée pour quatre d'entre-elles : **F3**, **F4**, **F8** et **F9**, dont les chromatogrammes sont représentés dans la **Figure 42**.

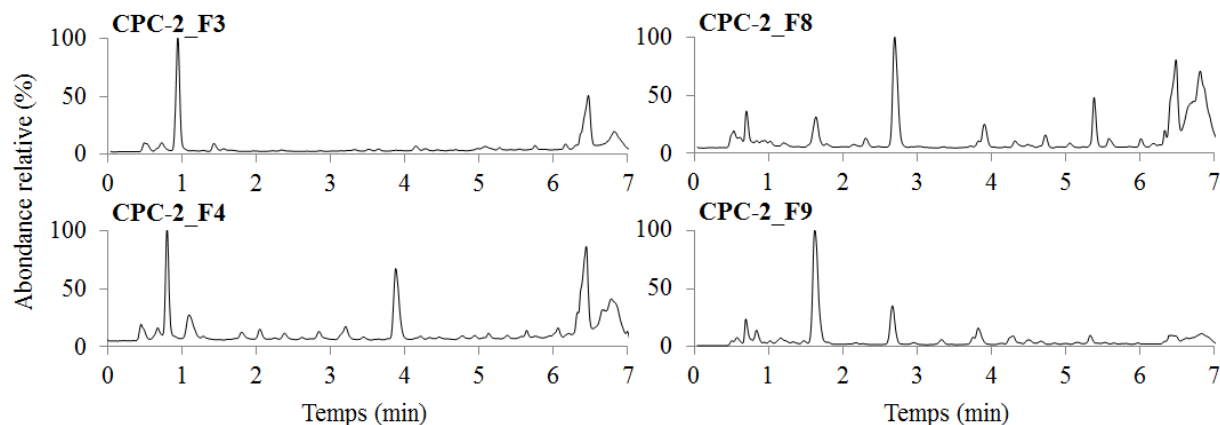


Figure 42. TIC en ionisation négative des fractions **F3**, **F4**, **F8** et **F9** de la CPC-2 (gradient LC : **A**).

La mise en œuvre de la CPC-Gustatométrie a ainsi permis d'obtenir quatre fractions sucrées à partir de l'extrait pré-purifié de pépins. Ces fractions sont conservées pour la suite du protocole.

D. Purification par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) semi-préparative

Au vu des chromatogrammes des fractions **F3**, **F4**, **F8** et **F9** (**Figure 42**), ainsi que des quantités obtenues pour chacune d'elles (**Tableau 48**), la HPLC semi-préparative est choisie pour la purification de leurs composés majoritaires (**Figure 39**).

1. Matériel et méthodes

Chaque fraction a été traitée séparément par HPLC semi-préparative équipée d'une colonne Kinetex XB-C18 (21,2 x 250 mm, 5 μ m, Phenomenex). La phase mobile était constituée d'un mélange H₂O + 0,1 % d'acide formique (phase **A**) et d'ACN + 0,1 % d'acide formique (phase **B**). Le débit était fixé à 20 mL/min et les gradients ont été optimisés afin de séparer au mieux les composés des fractions **F3** et **F4** (Gradient III) et ceux des fractions **F8** et **F9** (Gradient IV). Les conditions chromatographiques utilisées sont détaillées dans le **Tableau 49**.

Tableau 49. Gradients utilisés pour la purification par HPLC semi-préparative des composés présents dans les fractions **F3**, **F4**, **F8** et **F9**.

Gradient III	F3 et F4	Temps (min)	0	3,3	15	29,5	37	53	60	61	70
		% B	5	5	13	21	30	100	100	5	5
Gradient IV	F8 et F9	Temps (min)	0	3,3	29,5	40	47,5	53	60	61	70
		% B	5	5	13	21	30	100	100	5	5

Les échantillons ont été préparés dans 500 μL de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$: 80/20 et filtrés à 0,45 μm avant injection. Une première injection de 5 mg a permis de contrôler l'efficacité de la séparation et de déterminer les temps de rétention des composés. Le solde des échantillons a été traité par des injections successives de 20 mg. Les détecteurs UV et DEDL ont permis de suivre l'élution des composés et de les collecter manuellement à la sortie du système. Pour chaque tube, une aliquote de 50 μL a été prélevée, diluée par 10 avec de l'eau ultra-pure, et injectée en LC-FTMS afin d'étudier sa composition. Pour chaque injection, des tubes dont le contenu présentait un seul pic chromatographique (composé pur) ont été obtenus. Les tubes des différentes injections contenant les mêmes composés purs ont ensuite été regroupés et lyophilisés en vue d'être dégustés.

2. Résultats

a) Résultats des purifications

Plusieurs composés majoritaires et familles de composés sont observables dans les quatre fractions d'intérêt. Dans la suite de ce travail, ces composés seront désignés, pour des raisons de simplification, par la masse nominale m/z de leur ion déprotoné $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Les fractions traitées par HPLC semi-préparative possédaient une saveur sucrée, mais la nature des composés sapides était inconnue. Par conséquent, l'objectif était de collecter les molécules correspondant aux pics majoritaires (notés « pics 1, 2... »), mais également de récupérer la phase mobile éluée entre ces pics (notée « élution »). En effet, des composés non détectables, car présents à faible concentration, pourraient contribuer significativement au goût de la fraction. Le détecteur UV à 280 nm a été utilisé, mais il a été complété pour cette application, par un détecteur DEDL, présentant un caractère universel. Ainsi le **Tableau 50**, récapitule les composés qui ont pu être isolés ainsi que les éluions collectées entre les pics.

Tableau 50. Purifications des fractions **F3**, **F4**, **F8** et **F9** par HPLC semi-préparative.

Fraction traitée	Pic/Elution	m/z observé	Masse (mg)
F3	Pic 1	331	1,3
	Elution	523 ; Flav.*	57,3
F4	Pic 1	331	« grains de poudre »
	Pic 2	366	« grains de poudre »
	Elution	331 ; 366 ; Flav.*	7,9
F8	Pic 1	443	« grains de poudre »
	Pic 2	366	« grains de poudre »
	Pic 3	521	« grains de poudre »
	Elution	293 ; 366 ; 347 ; 443 ; 521 ; Flav.*	5,5
F9	Pic 1	293	« grains de poudre »
	Pic 2	443	« grains de poudre »
	Elution	293 ; 347 ; 443 ; 521 ; Flav.*	4,8

* Flav. : composés de la famille des flavonoïdes (dérivés et oligomères).

Les composés correspondant aux pics collectés dans les fractions d'intérêt sont purifiés en très faible quantité, non mesurable (« grains de poudre »). Les analyses LC-FTMS montrent que ces composés sont encore présents dans les restes des éluions en tant que composés plus ou moins majoritaires. Des flavonoïdes semblent être répartis sur toutes les fractions. Cela s'explique en partie par les états de polymérisation, de glycosylation et galloylation des composés, modifiant leur polarité (Escribano-Bailon *et al.*, 1992 ; Yanagida *et al.*, 2000 ; Yanagida *et al.*, 2003).

b) Résultats de la dégustation

Malgré les faibles quantités obtenues lors des purifications, la dégustation des différentes fractions d'éluion et composés purifiés est tout de même réalisée en solution hydro-alcoolique. Les composés purs, m/z 293, 366, 443 et 521, sont dégustés sans connaître leur concentration (inférieure à 2 mg/L), puisque seuls quelques grains de poudre sont recueillis. Le composé m/z 331 est dégusté à 10 mg/L. Les fractions « éluions » sont dégustées à 20 mg/L. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 51**.

Tableau 51. Résultats de la dégustation après purification par HPLC semi-préparative.

	Composé pur (<i>m/z</i>)					« Elution »			
	293*	331	366*	443*	521*	Elution-F3	Elution-F4	Elution-F8	Elution-F9
Goût	Sucré	Sucré	-	Sucré	-	-	-	Amer Astringent	Sucré
Intensité de la douceur	3/7	3/7	-	4/7	-	-	-	-	5/7

* Concentrations des composés inconnues.

- : Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec le verre témoin.

La dégustation des composés purs donnent dès lors quelques indications sur leur goût. Les composés *m/z* 293, 331 et 443 présentent une saveur sucrée en comparaison au verre témoin. De plus, la douceur la plus intense reportée est celle de la fraction **Elution-F9** avec une intensité de 5 sur 7.

3. Discussion

La purification des composés majoritaires des fractions d'intérêt n'a pas atteint son objectif puisque les composés n'ont pas été obtenus en quantité suffisante pour permettre leurs caractérisations structurale et gustative. Cependant, leur dégustation, ainsi que celle des fractions « élution » mettent en évidence quelques résultats sensoriels intéressants. En particulier, les composés *m/z* 293, 331 et 443 semblent être des composés d'intérêt dans la recherche de composés à saveur douce. La fraction **Elution-F9** présente la plus forte intensité de douceur (5/7) de cette dégustation. L'étude de son profil chromatographique en LC-FTMS permet d'observer les composés suivant : *m/z* 293, 347, 366, 443 et 521, comme l'illustre le chromatogramme des ions totaux de la **Figure 43**.

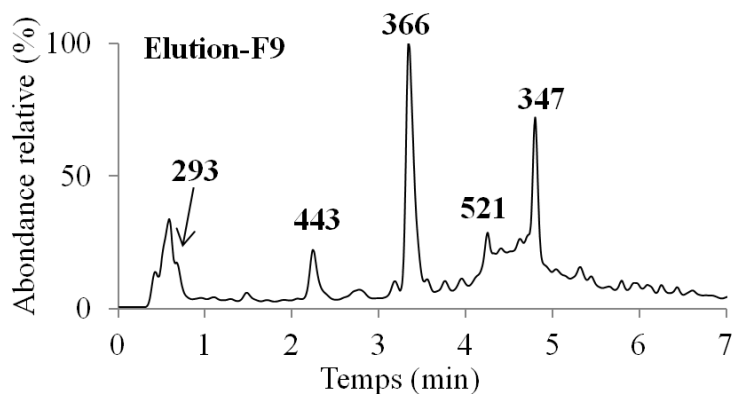


Figure 43. TIC en ionisation négative de la fraction **Elution-F9** après purification par HPLC semi-préparative (gradient LC : **B**).

La suite de ce travail a donc consisté à purifier les composés présents dans la fraction **Elution-F9** en quantité suffisante pour permettre leur caractérisation structurale et gustative. Le composé m/z 331 a également été ciblé en raison de son goût potentiellement intéressant. Une optimisation des méthodes de fractionnement de l'extrait de pépins a été nécessaire pour isoler ces composés d'intérêt.

E. Optimisation des méthodes de fractionnement en vue de la purification des composés de la fraction F3 et F9

1. Stratégie

Afin de purifier les molécules observées dans des fractions sucrées (**Elution-F9** et **F3**), une approche ciblée a été mise en place à l'aide de la LC-FTMS. Pour cela, un criblage a été mis en œuvre et les masses précises des ions quasi-moléculaires des composés d'intérêt ont été ciblées (**Tableau 52**) avec une précision de masse de ± 5 ppm.

Tableau 52. Masses précises m/z des ions quasi-moléculaires $[M-H]^-$ des composés d'intérêt (précision à ± 5 ppm).

Composé d'intérêt	m/z ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$
293	293,1229
331	331,0670
347	347,1165
366	366,1195
443	443,1924
521	521,2020

Ainsi, pour chaque étape de fractionnement, les méthodes ont été adaptées afin d'optimiser la purification des composés d'intérêt en grande quantité. La démarche employée étant une approche ciblée sur des espèces chimiques, aucune dégustation n'a été réalisée au cours des étapes de fractionnement.

2. Optimisation des étapes de fractionnement et de purification

a) Extraction liquide/liquide de l'extrait de pépins

Les composés m/z 293, 331, 347, 366, 443 et 521 sont recherchés dans les extraits pré-purifiés de pépins après extraction L/L afin de vérifier leur présence.

Les composés m/z 293, 331, 347 et 521 sont essentiellement observés dans l'extrait **ϕ -aqueuse** tandis que les composés m/z 366 et 443 sont également détectés dans l'extrait **ϕ -BuOHsat**, co-élués avec des flavonoïdes. Contrairement à l'extrait **ϕ -aqueuse** pouvant être traité directement par CPC à la vue de son profil chromatographique, l'extrait **ϕ -BuOHsat** nécessite au préalable une pré-purification par SPE. Pour cela, les échantillons sont chargés sur des colonnes SPE équipées d'une phase HLB, et des éluations avec des solutions à différents pourcentages d'ACN sont réalisées. L'analyse des éluats par LC-FTMS montre que les composés d'intérêt sont élués à 15 % d'ACN alors que les dérivés de flavonoïdes sont récupérés à des pourcentages en ACN plus élevés.

Ainsi, l'extrait **ϕ -aqueuse** et la fraction élue à 15 % d'ACN de l'extrait **ϕ -BuOHsat** (**ϕ -BuOHsat-15ACN**) sont conservés pour des fractionnements ultérieurs.

b) Optimisation du fractionnement par CPC

Des tests de systèmes de CPC sont réalisés sur l'extrait **ϕ -aqueuse** et sur la fraction **ϕ -BuOHsat-15ACN**. Les tests sont réalisés avec des systèmes fortement polaires de type « pont » BuOHsat/ACN/ H₂O, BuOHsat/MeOH/H₂O, AcOEt/MeOH/H₂O, AcOEt/EtOH/H₂O et AcOEt/BuOH/H₂O en faisant varier les proportions des différents solvants. La stabilité des systèmes est vérifiée. Pour cela, après mélange des solvants et agitation, les deux phases doivent rapidement se séparer. Il est ensuite nécessaire de tester la solubilisation des extraits et des fractions d'intérêt dans ces systèmes. Les meilleurs systèmes sont ensuite sélectionnés en fonction des calculs de K_D des composés cibles. Les systèmes choisis sont présentés dans le **Tableau 53**.

Tableau 53. Systèmes de CPC sélectionnés pour la purification des composés cibles.

Système de CPC	Extrait traité
AcOEt/iPrOH/H ₂ O : 3/1/3	φ-aqueuse
BuOHsat/ACN/H ₂ O : 4/1/4	
AcOEt/MeOH/H ₂ O : 2/1/2	φ-BuOHsat-15ACN
AcOEt/iPrOH/H ₂ O : 5/1/5	
AcOEt/EtOH/H ₂ O : 6/1/6	

Les méthodes de CPC sont également optimisées, essentiellement par le choix de la vitesse de rotation du rotor, où une plus forte vitesse de rotation (2500 rpm au lieu de 2000 rpm pour le rotor 100 mL) permet, dans certains cas, une meilleure stabilisation du système dans le rotor. Cette optimisation est appliquée notamment pour les systèmes « pont » BuOHsat/ACN/H₂O, plus visqueux que les autres systèmes testés. Ainsi, l'augmentation de la vitesse de rotation, entraîne une meilleure dispersion de la phase mobile dans les cellules du rotor et augmente la surface d'échange des deux phases, permettant ainsi une meilleure séparation chromatographique (Berthod *et al.*, 1992).

Après la réalisation des CPC, certaines fractions présentant des masses totales trop importantes pour être traitées par HPLC semi-préparative ont été pré-purifiées par SPE. Dans le cadre de l'utilisation de cette pré-purification par SPE, un compromis doit être trouvé entre l'enrichissement des fractions en composés cibles et les pertes occasionnées par adsorption irréversible sur la colonne.

A la fin de ces expériences de CPC et de SPE, les diverses fractions contenant les composés cibles sont conservées pour la dernière étape de purification par HPLC semi-préparative.

c) Optimisation de la purification par HPLC semi-préparative

L'optimisation de cette étape de purification consiste à choisir le type de colonne chromatographique, les solvants et les gradients d'élution. Pour chaque fraction obtenue précédemment, des tests d'optimisation de méthodes sont réalisés en LC-FTMS à l'aide de colonnes analytiques, de phase similaire aux colonnes de taille semi-préparative. Ainsi, différentes associations de colonnes, de solvants et de gradients sont testées afin d'optimiser la séparation chromatographique et purifier les composés ciblés en un minimum de temps et de solvants.

Troisième partie : Isolement et identification de composés du raisin possédant une activité gustative

Les tests sur colonne analytique ont mis en évidence des variations de temps de rétention pour certains composés cibles en fonction du type d'acide utilisé (acide formique ou TFA) dans les solvants d'élution. Pour les fractions analysées, la meilleure séparation des composés cibles et une bonne reproductibilité sont observées en présence d'acide formique 0,1 % dans les deux phases A et B.

Les spécificités des colonnes utilisées sont résumées dans le **Tableau 54**. Ce sont des colonnes de type C18, présentant quelques différences de greffage. Cela leur offre certaines spécificités, comme une plus grande capacité de charge, une forte résistance au pH ou encore une meilleure rétention des composés polaires.

Tableau 54. Spécificité des colonnes à disposition au laboratoire pour l'optimisation des méthodes en HPLC semi-préparative.

Nom de la colonne	Fournisseur	Taille de particules (µm)	Taille de la colonne (mm x mm)	Spécificité
Atlantis T3 Prep	Waters	5	19 x 250	Bonne rétention de composés polaires
Sunfire	Waters	5	19 x 250	Grande capacité de charge
XBridge PrepC18	Waters	5	19 x 250	Utilisable dans une large gamme de pH (1-12)
Kinetex XB-C18	Phenomenex	5	19 x 250	Résolutive
HypersilGold	ThermoFisher Scientific	5	19 x 250	Résolutive Grande reproductibilité Utilisable dans une large gamme de pH (1-11)

Après optimisation des méthodes, les purifications sont menées par HPLC semi-préparative sur toutes les fractions obtenues lors des fractionnements antérieures. Ainsi, excepté pour le composé m/z 293, les composés d'intérêt sont purifiés en quantités supérieures à 2 mg (**Tableau 55**) permettant ainsi, parallèlement, leur caractérisation gustative et leur détermination structurale. En effet, Le composé m/z 293 s'est avéré être présent sous forme de deux isomères 293-1 et 293-2, ces derniers ont été purifiés en petite quantité permettant uniquement leur caractérisation structurale. En outre, ces isomères sont fortement polaires, puisqu'ils sont élués aux alentours de 7 % d'ACN avec le gradient utilisé en LC-FTMS. Leur purification, difficile avec les colonnes de type C18 dont le laboratoire dispose, pourrait être réalisée différemment à l'aide de colonnes à polarité de phase normale.

Cependant ce type de colonne est fragile, nécessite un conditionnement long et complexe, et doit être utilisé avec des solvants différents, peu compatibles avec la dégustation ultérieure.

Tableau 55. Masses totales des composés purifiés.

Composé d'intérêt <i>m/z</i>	293*	293-1	293-2	331	347	366	443	521
Masse totale (mg)	2	1,7	0,3	18	4	8,5	12,1	2

* mélange des deux isomères *m/z* 293-1 et *m/z* 293-2.

III. Caractérisation structurale et sensorielle des composés purifiés

A. Détermination des caractéristiques gustatives des composés purifiés

Les composés purifiés sont dégustés à 10 mg/L en solution hydro-alcoolique, ainsi que dans un vin blanc et un vin rouge de Bordeaux du millésime 2013. Les cinq experts ont comparé les composés, entre eux et avec le verre témoin. Ils ont ensuite évalué la perception gustative et noté l'intensité de la saveur sucrée perçue. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 56**.

Tableau 56. Caractéristiques gustatives des composés d'intérêt.

	Solution hydro-alcoolique 12 % vol.		Vin Blanc Bordeaux 2013		Vin Rouge Bordeaux 2013	
<i>m/z</i> 293*	Sucré	3/7	Sucré	3/7	n.d.	
<i>m/z</i> 331	Attaque sucrée	3/7	Sucré	3/7	Sucré	3/7
<i>m/z</i> 347	Légère amertume	-	-	-	-	-
<i>m/z</i> 366	Sucré	1/7	Sucré	1,5/7	Sucré	1,5/7
<i>m/z</i> 443	Sucré	3/7	Sucré	4/7	Sucré	6/7
<i>m/z</i> 521	-	-	-	-	-	-

n.d. : non déterminé.

- : Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec le verre témoin.

* mélange des deux isomères *m/z* 293-1 et *m/z* 293-2.

La dégustation établit que les composés *m/z* 347 et 521 sont dépourvus de goût sucré, alors que les autres présentent un goût sucré avec des intensités variables. Les isomères *m/z* 293-1 et *m/z* 293-2 ne sont pas dégustés, seul leur mélange l'a été et celui-ci présente une

douceur moyenne. De plus, la saveur sucrée perçue pour le composé m/z 443 est particulièrement intense et modifie sensiblement l'équilibre gustatif du vin rouge ainsi que celle du vin blanc dans une moindre mesure.

B. Caractérisation structurale des composés purifiés

L'analyse structurale est réalisée par l'étude des données LC-FTMS avec et sans fragmentation en cellule de collision HCD, des spectres RMN et des mesures de polarimétrie, avec les appareils et dans les conditions décrites en partie expérimentale générale. Pour cela, 1 mg de chaque composé est utilisé pour des expérimentations de RMN et 1 mg pour mesurer leur pouvoir rotatoire spécifique. Les techniques de RMN et de polarimétrie étant non destructives, les échantillons sont récupérés et à nouveau lyophilisés.

Le **Tableau 57** récapitule les données de spectrométrie de masse à haute résolution enregistrées pour les composés purifiés, ainsi que leur pouvoir rotatoire. La démarche d'identification grâce aux données LC-FTMS, de fragmentation HCD et de RMN est également détaillée successivement pour chaque composé. L'enregistrement des spectres RMN a été réalisé par le Pr. Pierre Waffo-Téguo et par Eric Pedrot, de l'axe MIB de l'unité de recherche Œnologie. Leur interprétation a été encadrée par le Pr. Waffo-Téguo.

Tableau 57. Données FTMS et pouvoir rotatoire des composés purifiés à partir de l'extrait de pépins.

m/z nominale	Ion moléculaire		Ion fragment ^a		Perte de neutre		$[\alpha]^{25}$
	[M-H] ⁻	Formule ^b	[M-H] ⁻	Formule	[M-H] ⁻	Formule	
293-1 293-2	293,1229	C ₁₂ H ₂₁ O ₈ ⁻	131,0705	C ₆ H ₁₁ O ₃ ⁻	162,0524	C ₆ H ₁₀ O ₅	n.d.
331	331,0670	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀ ⁻	169,0134	C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	162,0536	C ₆ H ₁₀ O ₅	-20*
347	347,1162	C ₁₅ H ₂₃ O ₇ S	267,1596 205,1590	C ₁₅ H ₂₃ O ₄ C ₁₅ H ₂₁ O ₃ C ₁₄ H ₂₁ O	79,9566 18,0107 43,9899	SO ₃ H ₂ O CO ₂	n.d.
366	366,1181	C ₁₇ H ₂₀ O ₈ N ⁻	204,0655 186,0550 142,0650	C ₁₁ H ₁₀ NO ₃ ⁻ C ₁₁ H ₈ NO ₂ ⁻ C ₁₀ H ₈ N ⁻	162,0526 180,0631 224,0531	C ₆ H ₁₀ O ₅ C ₆ H ₁₂ O ₆ C ₇ H ₁₂ O ₈	+2
443	443,1924	C ₂₁ H ₃₁ O ₁₀ ⁻	281,1396	C ₁₅ H ₂₁ O ₅ ⁻	162,0528	C ₆ H ₁₀ O ₅	-60,9
521	521,2020	C ₂₆ H ₃₃ O ₁₁ ⁻	359,1496	C ₂₀ H ₂₃ O ₆ ⁻	162,0524	C ₆ H ₁₀ O ₅	-50

n.d. : non déterminé.

^a : Fragmentation HCD réalisée à 30 eV.

^b : formule brute postulée à partir de la mesure de masse précise, du ratio isotopique et de l'interprétation de la composition des fragments.

* Pouvoir rotatoire mesuré dans l'eau.

1. Identification des composés m/z 293-1 et -2

Les isomères m/z 293 présentent des spectres de masses identiques, avec un ion quasi moléculaire [M-H]⁻ m/z 293,1229, ce qui correspond à une formule brute de C₁₂H₂₂O₈. La présence d'un ion fragment de m/z 131,0705 (C₆H₁₁O₃⁻), correspond à une perte de neutre de 162,0524 (C₆H₁₀O₅), comme illustré à la **Figure 44**. Une seconde fragmentation est observée avec une perte de neutre de 46,0057 (CH₂O₂). Ces données suggèrent, par comparaison avec celles de la littérature, que ces molécules sont constituées d'un groupement glycosyle fixé sur un acide α -hydroxycarboxylique (Von Saint Paul *et al.*, 2011).

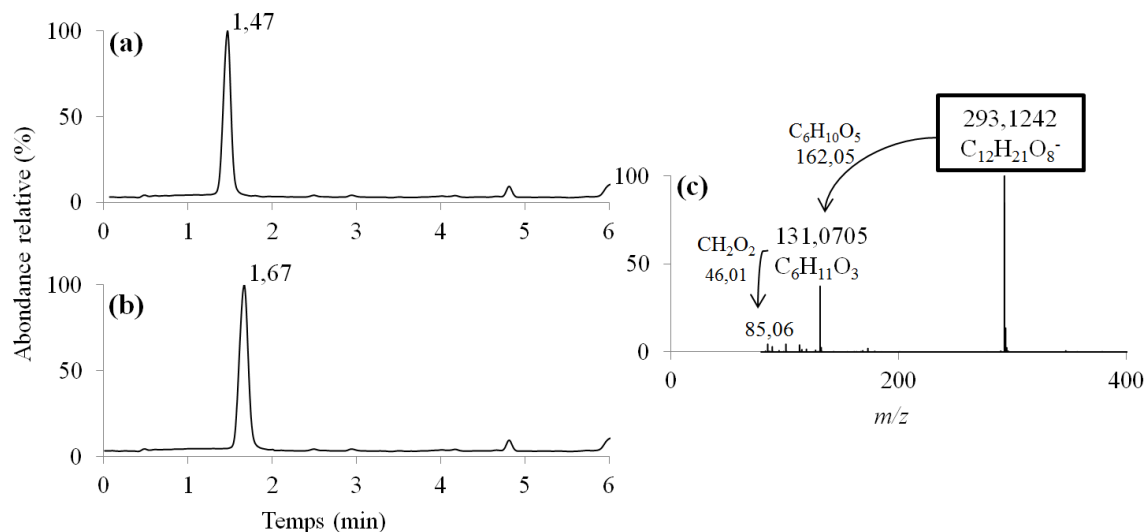


Figure 44. TIC en ionisation négative des isomères m/z 293-1 (a) et m/z 293-2 (b) et de leur spectre FTMS (c).

A notre connaissance, aucun composé de formule brute C₁₂H₂₂O₈ n'a été décrit dans le raisin ou le vin et aucune correspondance n'a été trouvée entre les données RMN expérimentales et celles de la littérature (ANNEXES 6-A et 6-B). Par conséquent, le raisonnement conduisant à la détermination de la structure de ces deux isomères est détaillé ci-dessous.

Détermination des principaux groupes fonctionnels

La composition élémentaire des isomères de m/z 293 permet d'établir qu'ils contiennent deux insaturations, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la présence d'un acide α -hydroxycarboxylique et d'un hexose.

L'analyse des spectres RMN 1D (¹H, ¹³C) et 2D (¹H-¹H COSY, ¹H-¹H ROESY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC) permet d'attribuer tous les signaux du composé 293-1 (ANNEXES 7-A à E).

Identification de la génine

L'analyse du spectre RMN 1D permet de repérer :

- Deux protons résonnant à 1,15 et 1,34 ppm qui apparaissent sous forme de multiplets correspondant au méthylène en position 4.
- Un proton résonnant à 1,68 ppm qui apparaît sous forme de multiplet correspondant au proton du méthine en position 3.

Troisième partie : Isolement et identification de composés du raisin possédant une activité gustative

- Un doublet intégrant pour un proton et résonnant à 3,85 ppm correspond au proton du méthine oxygéné en position 2, couplé au proton du méthine en position 3 avec une constante de couplage 3J vicinal de 5 Hz.
- Un triplet intégrant pour trois protons résonnant dans la zone des méthyles à 0,77 ppm correspond au méthyle en position 5, couplé aux protons du méthylène en position 4 par une constante de couplage 3J vicinal de 7 Hz.
- Un doublet intégrant pour trois protons résonnant dans la zone des méthyles à 0,8 ppm correspond au méthyle en position 6, couplé aux protons du méthine en position 3 par une constante de couplage 3J vicinal de 7 Hz.

L'analyse du spectre HMBC permet en outre de repérer un carbone résonnant à 178,2 ppm correspondant au carbonyle en position 1 caractéristique d'un groupement carboxylique. Cette génine correspond vraisemblablement à l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque.

Identification du sucre

A partir du proton anomérique résonnant à 4,29 ppm (*d*, 7,4 Hz), un système à sept spins, appartenant à un hexose, est identifié par l'analyse du spectre 1H - 1H COSY. Le proton H-2' (*m*) résonne sous forme d'un multiplet à 3,69 ppm, il est couplé au proton H-3' (*t*, 8Hz) à 3,32 ppm, ce dernier est couplé au proton H-4' (*t*, 9,4Hz) à 3,28 ppm, le H-4' corrèle avec le H-5' (*m*) qui résonne à 3,22 ppm. Les protons H-1', H-2', H-3', H-4' et H-5' sont en position *trans* diaxiale. Les protons H-6' du méthylène apparaissent sous forme de doublets dédoublés à 3,55 ppm (*dd* 12,6 ; 5,3 Hz) et 3,67 ppm (*dd*, 12,3 ; 2,1 Hz). Cet hexose est donc un β -glucopyranose. Les valeurs des δC (**Tableau 58**) sont attribuées à l'aide du spectre HSQC.

Tableau 58. Données RMN ^1H et ^{13}C du composé m/z 293-1, l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (H3MP-Glc).

Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1		178,2
2	3,85 <i>d</i> (5 Hz)	82,8
3	1,68 <i>m</i>	37,1
4	1,15 <i>m</i> 1,34 <i>m</i>	24,1
5-CH ₃	0,77 <i>t</i> (7 ; 7 Hz)	10
6-CH ₃	0,8 <i>d</i> (7 Hz)	13,4
1'	4,29 <i>d</i> (7,4 Hz)	103,2
2'	3,24 <i>m</i>	72,8
3'	3,32 <i>t</i> (8,8 ; 8,8 Hz)	75,2
4'	3,28 <i>t</i> (9,1 ; 9,4 Hz)	68,8
5'	3,22 <i>m</i>	75,3
6'	3,55 <i>dd</i> (12,6 ; 5,3 Hz) 3,67 <i>dd</i> (12,3 ; 2,1 Hz)	60

Le spectre HMBC permet de préciser la position du sucre par la corrélation entre le carbone en position 2 du carbonyle et le proton anomérique H-1' du sucre (**ANNEXE 7-E**).

L'interprétation des données RMN permet ainsi d'identifier le composé m/z 293-1 comme étant l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (H3MP-Glc) (**Figure 45**).

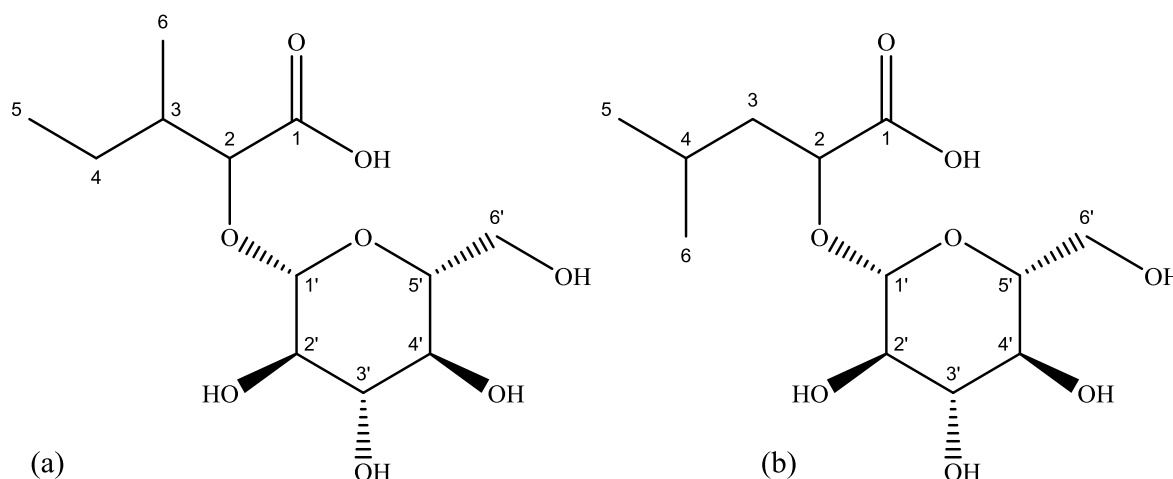


Figure 45. Structure chimique de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (H3MP-Glc) (a) et acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (H4MP-Glc) (b).

Troisième partie : Isolement et identification de composés du raisin possédant une activité gustative

L'analyse des spectres RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC) permet d'attribuer tous les signaux du composé 293-2 (ANNEXES 8-A à E).

Identification de la génine

L'analyse du spectre RMN 1D permet de repérer :

- Deux protons résonnant à 1,36 et 1,56 ppm et apparaissant sous forme de multiplets correspondent au méthylène en position 3.
- Un proton résonnant à 1,62 ppm et apparaissant sous forme de multiplet correspond au proton du méthine en position 4.
- Un proton résonnant à 3,9 ppm sous forme de doublet dédoublé, correspond au proton du méthine oxygéné en position 2, couplé aux protons du méthylène en position 3 par des constantes de couplage ^3J vicinaux de 8,5 et 4,7 Hz.
- Un doublet intégrant pour six protons résonnant dans la zone des méthyles à 0,78 ppm correspondant aux méthyles en position 5 et 6, couplé au proton du méthine en position 4 par une constante de couplage ^3J vicinal de 6,5 Hz.

L'analyse des spectres HSQC permet d'attribuer les carbones sur lesquels sont liés directement les protons (**Tableau 59**).

Tableau 59. Données RMN ^1H et ^{13}C du composé m/z 293-2, l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (H4MP-Glc).

Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1		n.d.
2	3,9 <i>dd</i> (8,5 ; 4,7 Hz)	79,4
3	1,36 <i>m</i> 1,52 <i>m</i>	41
4	1,62 <i>m</i>	23,8
5-CH ₃ , 6-CH ₃	0,78 <i>d</i> (6,5 Hz)	22
1'	4,3 <i>d</i> (7,9 Hz)	102,9
2'	3,22 <i>m</i>	72,8
3'	3,32 <i>t</i> (9 ; 9,3 Hz)	75,2
4'	3,29 <i>t</i> (9,3 ; 9,3 Hz)	68,8
5'	3,22 <i>m</i>	75,3
6'	3,57 <i>dd</i> (12,7 ; 5,3 Hz) 3,67 <i>dd</i> (12,4 ; 2,2 Hz)	60

n.d. : non déterminé.

Troisième partie : Isolement et identification de composés du raisin possédant une activité gustative

Cette génine correspond à l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque. Il s'agit vraisemblablement d'un régioisomère de l'aglycone du composé 293-1.

Identification du sucre

À partir du proton anomérique résonant à 4,3 ppm (*d*, 7,9 Hz), un système à sept spins d'un hexose est identifié par l'analyse du spectre ^1H - ^1H COSY. Les protons H-1', H-2', H-3', H-4' et H-5' sont en position *trans* diaxiale. Il s'agit d'un β -glucopyranose comme précédemment.

Aucune tâche de corrélation n'est observée en HMBC pour justifier la présence d'un groupement carboxyle. Cela peut s'expliquer en raison de la faible quantité de produit pur (0,3 mg) utilisée pour la réalisation des expériences de RMN qui aurait nécessité un traitement plus long. Toutefois, le déplacement chimique du carbone C-2 à 79,4 ppm, similaire à celui du carbone C-2 de l'isomère *m/z* 293-1 suggère que son environnement chimique est le même. En outre, une formule brute de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_8$ a été déterminée pour ce composé, ce qui tend à confirmer la présence d'un acide carboxylique.

Sur cette base, la structure de 293-2 peut donc être proposée comme étant l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (H4MP-Glc) (**Figure 45**).

A notre connaissance, ces deux isomères n'ont jamais été identifiés ni dans le raisin ni dans aucun autre produit naturel. Leur présence parmi les métabolites de certaines plantes a été supposée mais leur structure n'avait jamais été élucidée (Von Saint Paul *et al.*, 2011). La dégustation réalisée à partir de leur mélange a révélé une saveur sucrée évaluée à 3/7. Leur purification en plus grande quantité serait nécessaire afin de préciser les propriétés sensorielles de chaque isomère, d'étudier leur présence dans les vins et d'établir leur seuil de détection.

2. Identification du composé *m/z* 331

Le composé *m/z* 331, d'ion quasi moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ *m/z* 331,0670, a pour formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$. Son spectre FTMS en ionisation négative avec fragmentation HCD présente un ion fragment de *m/z* 169,0134 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5^-$) qui correspond à une perte de neutre de 162,0536 ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$), comme l'illustre la **Figure 46**. L'ion fragment *m/z* 169,0134 est caractéristique de l'acide gallique. Ces données suggèrent que cette molécule est constituée d'un groupement glycosyle lié à un acide gallique, comportant six insaturations.

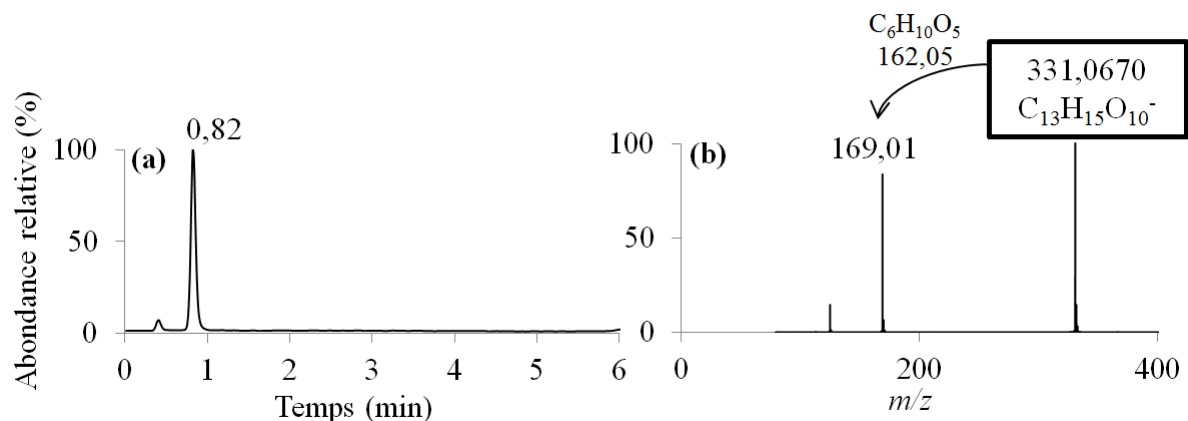


Figure 46. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 331 (a) et de son spectre FTMS (b).

Les données RMN ¹H et ¹³C (ANNEXE 6-C) et la comparaison à celles de la littérature confirment cette hypothèse et établissent ce composé comme étant un mono-galloyl glucose (Pawlowska *et al.*, 2006 ; Sandhu *et al.*, 2010 ; Santos *et al.*, 2013). La position du groupement glycosyle est déterminée grâce au spectre HMBC par la corrélation entre le carbone C-4 du gallate et le proton H-1' de l'anomère β -glucopyranoside (ANNEXE 9-B), suggérant une liaison par une fonction acétal entre l'aldéhyde du glucose et l'hydroxyde 4 de l'acide gallique. Ainsi, ce composé correspond à l'acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside (Figure 47), identifié par Pawlowska *et al.* dans les fraises (Pawlowska *et al.*, 2006).

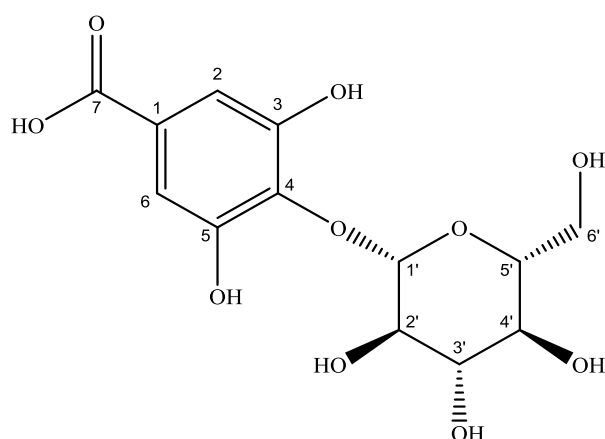


Figure 47. Structure moléculaire de l'acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside.

L'acide gallique et ses dérivés sont très largement répandus dans le règne végétal et représentent une des grandes familles de métabolites secondaires. Parmi les dérivés monoglucosylés d'acide gallique, les esters ont été davantage étudiés et sont très largement

utilisés dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Ils possèdent en effet des activités anti-oxydantes, biologiques et pharmaceutiques diverses (Kanai *et al.*, 1998 ; Dwibedy *et al.*, 1999 ; Abe *et al.*, 2000 ; Saeki *et al.*, 2000 ; Sohi *et al.*, 2003). L'acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside (AG-Glc) a déjà été identifié dans le marc de raisin blanc (Lu *et al.*, 1999), mais jamais dans le vin. En outre, son goût sucré est décrit ici pour la première fois et il est intéressant de noter qu'il est perçu à 10 mg/L, c'est-à-dire à une teneur environ 200 fois inférieure au seuil de détection du glucose.

3. Identification du composé m/z 347

L'étude du spectre de fragmentation et des adduits du composé m/z 347 met en évidence la présence de deux composés co-élus dans les conditions de séparation chromatographiques utilisées ici. Ainsi, il s'agit des deux ions quasi-moléculaires suivant : m/z 429,1768 de formule brute $C_{20}H_{29}O_{10}$ qui présente des adduits formiate et chlorure en mode d'ionisation négative et un adduit ammonium en mode positif, et m/z 267,1596 de formule brute $C_{15}H_{23}O_4$, formé après la perte de neutre de 79,96 qui correspond à un trioxyde de soufre SO_3 . En outre, les données RMN montrent 35 signaux correspondant bien à la présence de 35 carbones. La caractérisation structurale n'a donc pas été poursuivie en raison du peu d'intérêt porté à ces composés, dont le mélange a été jugé insipide voire légèrement amer.

4. Identification du composé m/z 366

Le composé m/z 366 d'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ m/z 366,1181 et de formule brute $C_{17}H_{21}O_8N$ présente trois ions fragments : m/z 204,0657 ($C_{11}H_{10}NO_3^-$), m/z 186,0551 ($C_{11}H_8NO_2^-$), m/z 142,0651 ($C_{10}H_8N^-$). Le premier ion correspond à une perte de neutre de 162,0526 ($C_6H_{10}O_5$), comme indiqué à la **Figure 48**. Cette molécule semble donc contenir un groupement glycosyle fixé sur une génine azotée, comportant 7 insaturations.

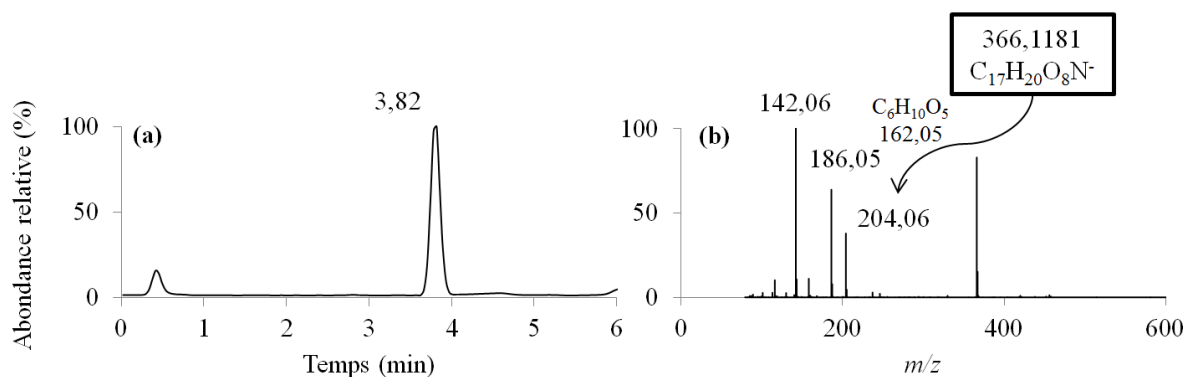


Figure 48. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 366 (a) et de son spectre FTMS (b).

L'analyse de la fragmentation HCD de ce composé, l'interprétation des spectres RMN ¹H et ¹³C (ANNEXES 6-D et 10) et la comparaison avec les données de la littérature confirment cette hypothèse et établissent le composé m/z 366 comme étant l'acide 3-indolyl-(2R)-O-β-D-glucopyranoside lactique (Figure 49).

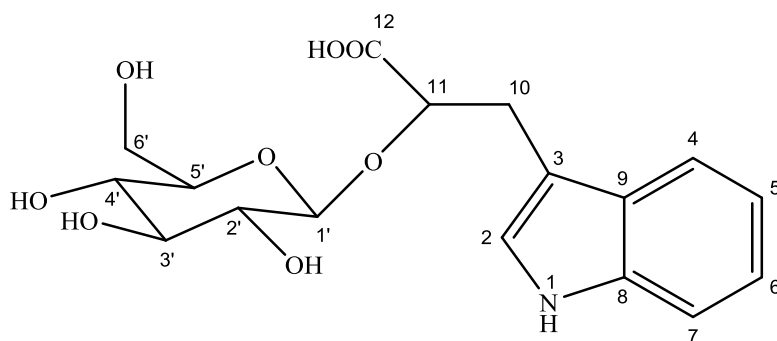


Figure 49. Structure chimique de l'acide 3-indolyl-(2R)-O-β-D-glucopyranoside lactique.

Ce composé a été isolé et caractérisé dans le vin en 2014 par Fabre *et al.* et sa quantification a été réalisée dans différents cépages au cours du processus de vinification. Cependant, son goût n'a jamais été déterminé (Fabre *et al.*, 2014).

Les indoles proviennent très largement du catabolisme du tryptophane et il est supposé que leur biosynthèse est catalysée par des micro-organismes du vin (Arevalo-Villena *et al.*, 2010). Ces composés sont principalement connus pour présenter des odeurs non désirées de « plastique » (Hoenicke *et al.*, 2002) ou animales. La biosynthèse de l'acide 3-indolyl-(2R)-O-β-D-glucopyranoside lactique (ILA-Glc) a été proposée par transformation du tryptophane en acide indole-pyruvique (IPyA) puis en acide indole-3-lactique (ILA), avant sa glycosylation par l'UDP glycosyltransferase (Prinsen *et al.*, 1997 ; R. G. Jackson *et al.*, 2001 ; Woodward *et al.*, 2005). Schwarz *et al.* ont mis en évidence en 2007, l'astringence de composés

structuellement proche de l'ILA-Glc, contenant également un groupement indole et un groupement glycosyle (Schwarz *et al.*, 2007). Toutefois, la dégustation de l'ILA-Glc, réalisée ici pour la première fois, a révélé son goût légèrement sucré, avec une intensité de 1 sur 7.

5. Identification du composé m/z 443

Le composé m/z 443 d'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ m/z 443,1924 possède une formule brute de $C_{21}H_{32}O_{10}$ (**Figure 50**). Aucun ion fragment n'est détecté sans fragmentation, cependant avec une énergie de collision de 30 eV, un ion de m/z 281,1396 ($C_{15}H_{21}O_5^-$) est observé. Celui-ci correspond à une perte de neutre de 162,0528 ($C_6H_{10}O_5$). Ces données suggèrent donc que ce composé est constitué d'un groupement glycosyle lié à une génine, comportant 5 insaturations.

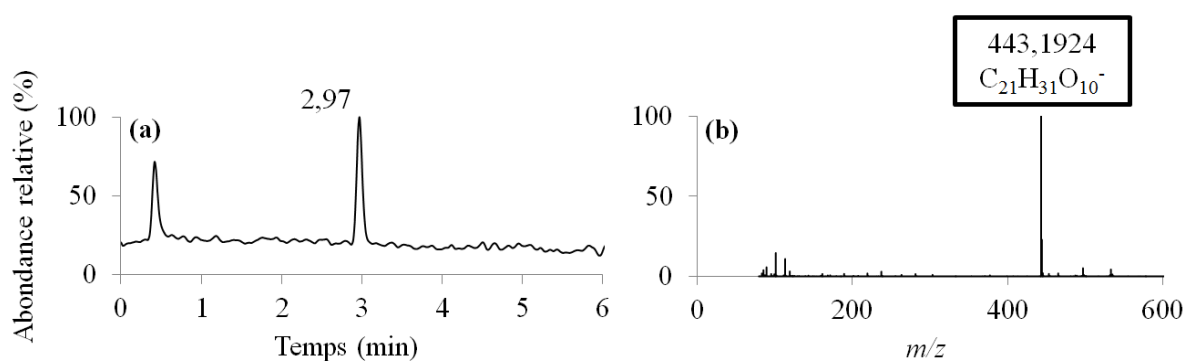


Figure 50. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 443 (a) et de son spectre FTMS (b).

L'interprétation des spectres RMN 1H et ^{13}C (**ANNEXE 6-E**) et la comparaison avec les données de la littérature confirment cette hypothèse par la présence de signaux caractéristiques d'un glucose et établissent ce composé comme étant l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique- β -D-glucopyranoside, décrit par Del Refugio Ramos *et al.* (2004) (**Figure 51**).

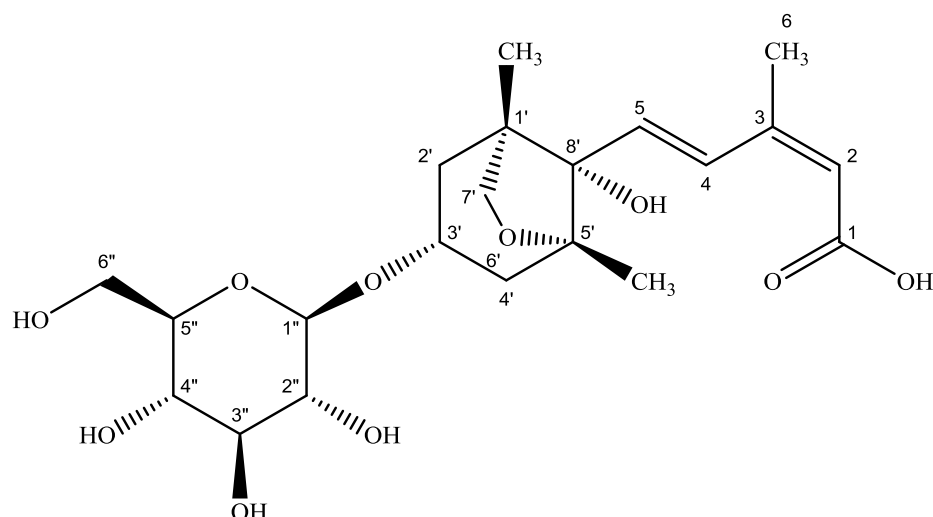


Figure 51. Structure chimique de l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside.

Le spectre HMBC permet notamment de confirmer la position du groupement glycosyle par la corrélation entre le carbone C-3' de la génine et le proton H-1'' de l'hémiacétal du glucose (ANNEXE 11-C). La stéréochimie du carbone C-3' est établie grâce à l'interprétation du spectre ROESY, montrant une corrélation entre les protons équatoriaux H-2', H-4' et le proton H-3', qui est donc également en position équatoriale (ANNEXE 11-B).

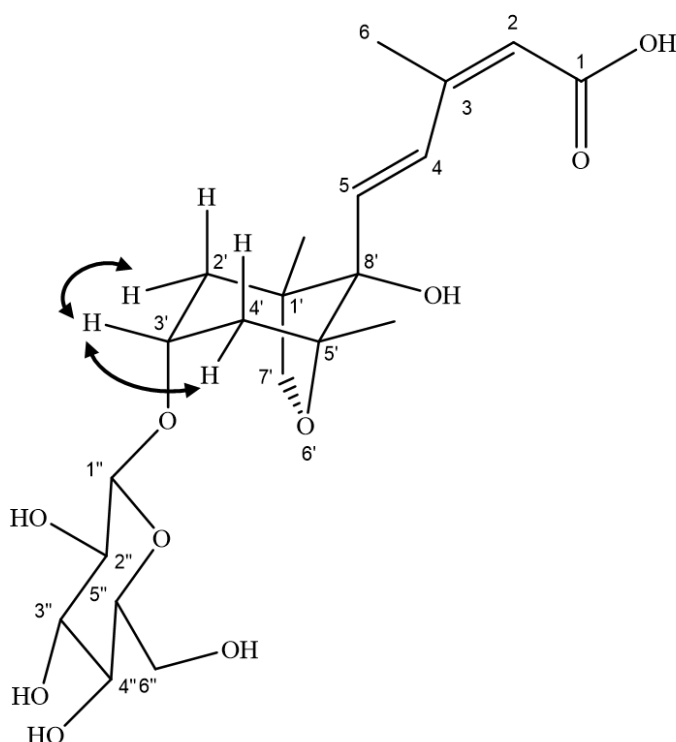


Figure 52. Corrélations observées sur le spectre ROESY ^1H - ^1H de l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside.

L'acide (1'R, 3'R, 5'R, 8'S)-*epi*-dihydrophaséique-3'-O- β -glucopyranoside (*epi*-DPA-Glc) a été identifié dans quelques plantes et fruits tels que dans l'avocat (Del Refugio Ramos *et al.*, 2004) ou la cerise (Setha *et al.*, 2005), cependant il n'a jamais été identifié ni dans le raisin ni dans le vin. Ses propriétés gustatives sont également décrites ici pour la première fois avec une forte saveur sucrée, évaluée en moyenne à 5 sur 7 pour une concentration de 10 mg/L dans le vin.

Le DPA-Glc, isomère de l'*epi*-DPA-Glc, ou acide (1'R, 3'S, 5'R, 8'S)-dihydrophaséique-3'-O- β -glucopyranoside a été plus largement étudié. Ce composé a été observé dans de nombreux fruits et plantes tels que le soja (Setter *et al.*, 1981), les graines d'avocat, le raisin (Hirai *et al.*, 1983), le tournesol (Barthe *et al.*, 1993), les feuilles de *Juniperus phynicea* (Champavier *et al.*, 1999), les germes de cacao (Sannohe *et al.*, 2011) et dans la coque de la noix (Cai *et al.*, 2012). Le DPA-Glc a été mis en évidence comme étant l'un des métabolites majeurs de l'acide abscissique (ABA) via l'acide phaséique (PA) et l'acide dihydrophaséique (DPA) dans l'avocat et la tomate (Milborrow *et al.*, 1982 ; Hirai *et al.*, 1983). Sannohe *et al.* suggèrent que le DPA-glucoside pourrait intervenir dans la croissance des germes (Sannohe *et al.*, 2011). L'ABA est une phytohormone qui régule l'adaptation physiologique aux stress environnementaux de la plante tel que le stress hydrique et osmotique, les basses températures et le développement de l'embryon (Leung *et al.*, 1998). De nombreux auteurs ont établi que l'ABA joue un rôle dans la maturation de la baie de raisin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). De manière générale, moins d'études ont été consacrées à la fonction de l'*epi*-DPA-Glc dans la plante. Récemment, Hirai *et al.* ou encore Del Refugio *et al.* ont mis en évidence dans l'avocat que le métabolite majoritaire du PA est l'*epi*-DPA et non le DPA (Hirai *et al.*, 2003). La réaction du métabolisme de l'ABA serait ainsi une réaction stéréosélective (Del Refugio Ramos *et al.*, 2004). Ces études suggèrent donc que l'*epi*-DPA-Glc serait susceptible d'être impliqué dans le métabolisme de l'ABA dans le raisin, et que ses teneurs pourraient ainsi être liées à la maturité de la baie et donc des pépins.

6. Identification du composé *m/z* 521

Le composé *m/z* 521 d'ion quasi-moléculaire [M-H]⁻ *m/z* 521,2020 et de formule brute C₂₆H₃₄O₁₁ présente un ion fragment de *m/z* 359,1496 (C₂₀H₂₃O₆⁻) ce qui correspond à une perte de neutre de 162,0528 (C₆H₁₀O₅), comme l'illustre la **Figure 53**. Ces données suggèrent donc que ce composé contient un groupement glycosyle fixé à une génine comportant 9 insaturations.

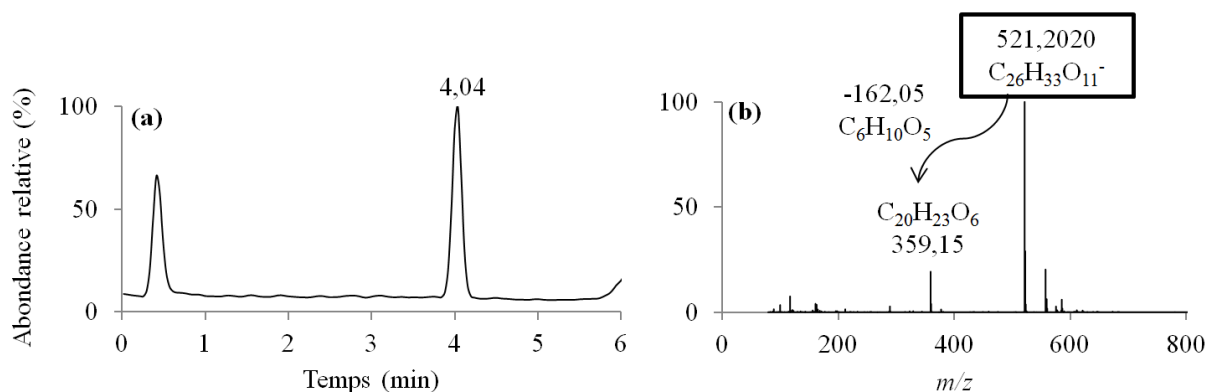


Figure 53. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 521 (a) et de son spectre FTMS (b).

L'interprétation des spectres RMN ^1H et ^{13}C (ANNEXE 6-F) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature confirment cette hypothèse par la présence de signaux caractéristiques d'un glucose. L'analyse complète des données RMN établit le composé m/z 521 comme étant un dérivé glycosylé du lignane isolaricirésinol. La position du groupement glycosyle est déterminée grâce au spectre HMBC par une corrélation entre le proton H-1'' de l'hémi-acétal du glucose et le carbone C-4' de la génine (ANNEXE 12-B). Ainsi, ce lignane correspond à l'isolaricirésinol-4'- O - β -glucopyranoside (Figure 54).

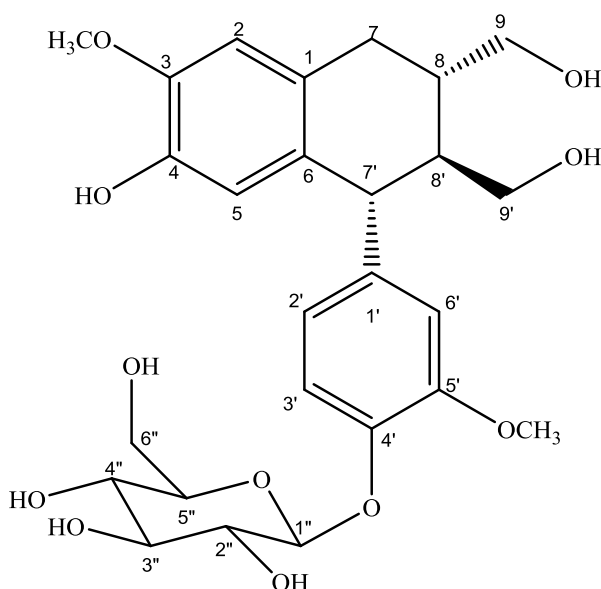


Figure 54. Structure chimique de l'isolaricirésinol-4'- O - β -glucopyranoside.

Ce composé a déjà été identifié dans le vin (Marinos *et al.*, 1992 ; Baderschneider *et al.*, 2001) mais jamais dans le pépin de raisin. Son pouvoir rotatoire suggère qu'il est présent majoritairement sous sa forme lévogyre (Tableau 57). Ce lignane, obtenu en faible quantité

après purification d'un extrait de pépin, est dégusté ici pour la première fois. Celui-ci ne possède aucun goût, il ne présente donc aucun intérêt gustatif dans la recherche de composés sapides. Ainsi, aucune étude complémentaire n'est entreprise pour cette molécule.

IV. Validation de la méthode de fractionnement et des choix de fractions d'intérêt

Le protocole de fractionnement guidé par la gustatométrie décrit précédemment a permis d'isoler et d'identifier quatre molécules du pépin à saveur sucrée. Afin de valider cette démarche et les choix des fractions, plusieurs études parallèles ont été réalisées. En effet, il est nécessaire de s'assurer qu'aucune fraction édulcorante majeure n'a été omise, que ce soit dans l'extrait ϕ -aqueuse ou dans les extraits ϕ -Hept, ϕ -AcOEt, ϕ -BuOHsat. En effet, il est possible que ces fractions contiennent des molécules sucrées, dont le goût serait masqué par des composés amers lors de la dégustation de l'extrait pré-purifié. Ainsi, dans un premier temps le fractionnement par CPC des extraits ϕ -Hept, ϕ -AcOEt, ϕ -BuOHsat a été réalisé. Dans un second temps le fractionnement de l'extrait ϕ -aqueuse a été effectué par une autre technique analytique complémentaire, la chromatographie Flash.

A. Validation du choix de l'extrait ϕ -aqueuse

1. Stratégie

L'extraction L/L réalisée sur l'extrait brut de pépins a mis en évidence un fractionnement du goût. La douceur est retrouvée uniquement dans l'extrait ϕ -aqueuse alors que les extraits ϕ -Hept, ϕ -AcOEt, ϕ -BuOHsat présentent essentiellement de l'amertume et de l'astringence. Ces fractions possèdent des profils chromatographiques très complexes et contiennent de nombreux composés. Certains composés majoritaires, présentant donc des fortes intensités relatives sur le chromatogramme, sont susceptibles de masquer la présence de composés moins abondants. La perception gustative repose sur l'équilibre entre l'intensité gustative des composés et leur abondance dans la solution dégustée. Certains composés majoritaires, ici de la famille des flavonoïdes principalement, sont connus pour présenter de l'amertume et de l'astringence ; ils pourraient masquer le goût d'autres composés moins abondants. Par exemple, dans une fraction donnée, si des composés minoritaires présentent une faible intensité de douceur, alors cette dernière peut être masquée par l'amertume et l'astringence de composés majoritaires. Pour autant, il se peut que cet effet de masquage s'estompe au cours de l'évolution du vin, en raison de la diminution ou de la disparition des

substances amères. Un fractionnement des extraits non étudiés précédemment vise à séparer les molécules les constituant et à étudier l'existence potentielle d'autres fractions sucrées.

a) Matériel et méthodes

Des tests de systèmes ont été réalisés pour chaque extrait pré-purifié. Les systèmes « pont » P₁₃ et P₁₁ ont été sélectionnés, respectivement, pour les extraits **φ-Hept**, **φ-AcOEt**, et pour l'extrait **φ-BuOHsat**.

Un échantillon (1 g) de chaque extrait pré-purifié a ensuite été solubilisé dans 10 mL d'un mélange biphasique, dans les proportions du système choisi, avant d'être filtré à 0,45 µm et injecté en CPC à l'aide du rotor de 100 mL selon la méthode présentée dans le **Tableau 60**.

Tableau 60. Méthode d'analyse 4 utilisée pour le fractionnement par CPC des extraits **φ-Hept**, **φ-AcOEt**, et **φ-BuOHsat**.

Méthode d'analyse 4 Rotor 100 mL			Mode ascendant			
	Début (min)	Fin (min)	Débit (mL/min)	Rotor (rpm)	% A	% B
Équilibration	0	15	10	0	100	0
	15	30	10	500	100	0
	30	35	5	2500	100	0
	35	60	5	2500	0	100
Élution	0	60	5	2500	0	100
Extrusion	60	105	5	2500	100	0

Comme décrit précédemment, les éluions ont été analysées par LC-FTMS afin de regrouper les tubes en fonction de leur profil chromatographique et de constituer des fractions pour chaque extrait traité. Les fractions ont ensuite été évaporées et lyophilisées avant d'être dégustées par le panel expert de 5 dégustateurs en solution hydro-alcoolique à 12 % vol. et dans un vin blanc de Bordeaux 2013.

b) Résultats des fractionnements et des dégustations

Pour les CPC-3 (**φ-Hept**), -4 (**φ-AcOEt**) et -5 (**φ-BuOHsat**), les volumes des phases inférieures rejetés sont, respectivement, de 55, 54 et 63 mL, et les pressions à l'équilibre sont de 33, 30 et 33 bar. Les volumes à l'équilibre des deux premières CPC indiquent une rétention correcte de la phase inférieure dans la colonne. Le volume à l'équilibre de la CPC-5 est plus élevé, indiquant que 37 mL de phase inférieure restent dans le rotor. La surface d'échange n'est donc pas optimale pour une bonne séparation des composés. Ces observations se

confirment par l'allure des profils UV des CPC, étalée au cours du temps pour les CPC-3 et -4, alors que celui de la CPC-5 l'est moins (**Figure 55**).

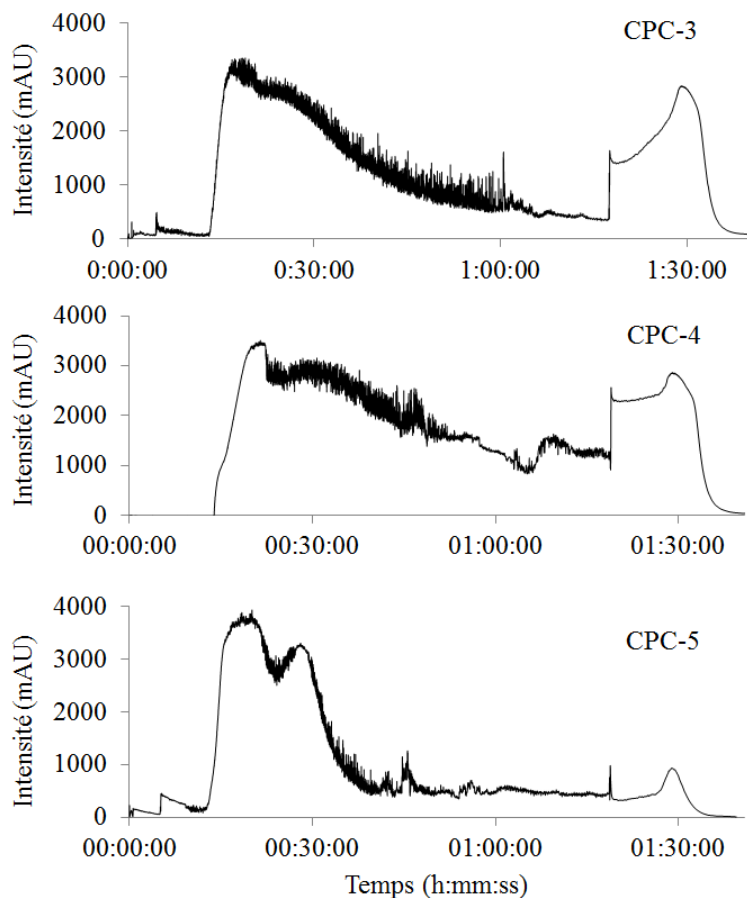


Figure 55. Chromatogrammes des CPC-3, -4 et -5 (absorbance à 280 nm).

Pour les trois CPC, les injections LC-FTMS des tubes de CPC permettent de constituer des fractions de profils chromatographiques différents. Ces fractions présentent des masses assez variables (**Tableau 61**).

Tableau 61. Résultats des fractionnements et gustatogrammes des **CPC-3**, **-4** et **-5**.

	Fraction	Tubes	Masse (mg)	Goût*	Aspect
CPC-3	F1	15-23	138,6	Amer	Poudre beige
	F2	24-37	112,8	-	Poudre beige
	F3	38-53	39,9	-	Poudre beige
	F4	54-63	11,5	-	Poudre beige
	F5	64-83	39,5	Amer/Astringent	Poudre beige
	F6	84-105	490	Astringent	Solide brun
CPC-4	F1	15-23	424,0	Amer/Astringent	Poudre beige
	F2	24-27	165,6	Amer	Poudre beige
	F3	28-37	86,4	Astringent	Poudre beige
	F4	38-53	13,6	Amer	Poudre beige
	F5	54-105	94,4	Brûlant	Solide brun
CPC-5	F1	15-27	122,9	Amer/Astringent	Poudre beige
	F2	28-42	143,2	Amer	Poudre beige
	F3	43-53	55,9	-	Poudre beige
	F4	54-77	63,8	Amer/Astringent	Poudre beige
	F5	78-87	112,6	Astringent	Poudre beige
	F6	88-105	323,2	Astringent	Poudre beige

* Goût perçu en solution hydro-alcoolique 12% vol. et dans un vin blanc de Bordeaux 2013.

- : Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec le verre témoin.

Dans un premier temps, ces fractions sont dégustées en solution hydro-alcoolique au prorata des quantités obtenues et les résultats sont présentés sur le gustatogramme du **Tableau 61**. La dégustation met en évidence que toutes les fractions de CPC ne présentent que de l'amertume et de l'astringence. La dégustation de ces mêmes fractions dans un vin blanc de Bordeaux 2013 aboutit aux mêmes résultats.

2. Discussion

Le fractionnement par CPC des extraits ϕ -Hept, ϕ -AcOEt, ϕ -BuOHsat met en évidence des fractions présentant seulement de l'amertume et de l'astringence alors qu'aucune douceur n'est perçue. Ce résultat diminue le risque d'avoir omis des fractions contenant des composés sucrés d'intensité notable dans les extraits pré-purifiés de pépins ϕ -Hept, ϕ -AcOEt, ϕ -BuOHsat. Cependant, il pourrait être intéressant par la suite de procéder à une

étape supplémentaire de fractionnement par HPLC semi-préparative ou par SPE. L'élimination d'éventuels effets de masquage pourrait mettre en évidence des composés potentiellement sucrés. En effet, le caractère exhaustif de l'étude entreprise ne peut être garanti, et l'existence de molécules sucrées pertinentes est tout à fait possible dans des fractions contenant d'autres composés masquant leur goût. A titre d'exemple, il a été montré dans le chapitre précédent que l'*epi*-DPA-Glc était présent dans l'extrait **φ-BuOHsat**. Pourtant, en dépit de son goût intensément sucré, aucune fraction sucrée n'a été clairement perçue après la CPC-6. Il se peut que ses teneurs, plus faibles dans l'extrait **φ-BuOHsat** que dans l'extrait **φ-aqueuse**, soient insuffisantes pour influencer le goût de la fraction dans laquelle il se trouve si des substances amères y sont également présentes.

B. Fractionnement de l'extrait φ-aqueuse par chromatographie Flash-Gustatométrie

1. Stratégie

L'extrait **φ-aqueuse** a été fractionné par CPC (CPC-2) en raison de sa saveur sucrée. Ce fractionnement a conduit à l'obtention de douze fractions et quatre d'entre elles présentaient une forte sucrosité. Il est cependant nécessaire de s'assurer qu'aucun effet de masquage n'ait empêché la perception de la saveur sucrée d'autres composés d'intérêt dans les huit autres fractions de la CPC-2. Pour cela, un fractionnement de l'extrait **φ-aqueuse** de pépin a été réalisé à l'aide d'une technique avec une sélectivité orthogonale à la CPC : la chromatographie Flash. Cette technique analytique, une fois optimisée, permet de fractionner un échantillon de masse relativement importante en un temps limité. Cependant, contrairement à la CPC, des pertes causées par l'adsorption des composés sur la phase solide stationnaire peuvent survenir.

2. Matériel et méthodes

De la même manière que pour le fractionnement par CPC, et à des fins de comparaison, 6 g d'extrait **φ-aqueuse** de pépins sont solubilisés dans 1 L d'eau, et filtrés à 0,45 μm pour être injectés en chromatographie Flash. Une colonne en verre remplie avec 100 g de phase solide de type HLB Oasis (Waters, Guyancourt, France) a été choisie. Ainsi, le volume de colonne s'élevait à environ 700 mL. La méthode utilisée est décrite dans le **Tableau 62**.

Tableau 62. Méthode de chromatographie Flash utilisée pour le fractionnement de l'extrait aqueuse de pépins.

	Temps début (min)	Temps fin (min)	Débit (ml/min)	Solvant		
				Phase A (échantillon)	Phase B (H ₂ O)	Phase C (MeOH)
Conditionnement	0	35	40	0	0	100
	35	70	40	0	100	0
Chargement échantillon	70	110	25	100	0	0
	110	140	25	0	100	0
Elution	Gradient		25	0	100	0
	140	260	25	0	70	30
	Gradient		25	0	70	30
	260	340	25	0	0	100

Le suivi a été réalisé par LC-FTMS. Tous les dix tubes, des aliquotes de 100 µL ont été prélevées, évaporées au RapidVap, reprises dans un mélange 95/5 : H₂O/MeOH et filtrées à 0,45 µm avant injection LC-FTMS. Les tubes ont été regroupés en fractions selon la similitude de leur profil chromatographique. Après lyophilisation, une dégustation a été réalisée et les fractions retenues ont été traitées séparément par HPLC semi-préparative afin de purifier des composés d'intérêt gustatif. Les méthodes utilisées sont les mêmes que celles décrites au chapitre 7-**II. E. 2.c**) lors de l'optimisation des purifications.

3. Résultats et discussion

L'analyse LC-FTMS met en évidence des profils chromatographiques différents au cours de l'élution. Ainsi, neuf fractions sont constituées, et présentent des masses variables. Les résultats du fractionnement sont présentés dans le **Tableau 63**.

Tableau 63. Gustatogramme de la chromatographie Flash.

Fraction	Tubes	Masse (mg)	Aspect	Goût
Flash-F1	FNR	2975	Liquide visqueux	Sucré (2/7) /Acide/Astringent
Flash-F2	F-H₂O	1430	Liquide visqueux	Sucré (4/7) /Acide/Astringent
Flash-F3	1-99	59,2	Poudre beige	Salé/Amer
Flash-F4	100-145	25	Poudre beige	Sucré (3/7)
Flash-F5	146-199	40	Poudre beige	Sucré (5/7)
Flash-F6	200-224	23,5	Poudre beige	Amer/Astringent
Flash-F7	225-254	25,5	Poudre beige	Amer/Astringent
Flash-F8	255-279	16,8	Poudre beige	Amer/Astringent
Flash-F9	280-338	29,3	Poudre beige	Amer/Astringent

Le rendement de la chromatographie Flash est de 77 %, ce qui est nettement inférieur à celui de la CPC-2 (92 %). Cette perte de masse s'explique principalement par l'adsorption irréversible de certains composés de l'échantillon sur la phase stationnaire solide de la colonne. Il est donc possible que des composés d'intérêt gustatif ne soit pas élués correctement et soient retenus irréversiblement sur la colonne. La fraction non retenue (FNR) lors du chargement de l'échantillon, ainsi que le lavage à l'eau (F-H₂O), élue une grande quantité de composés polaires représentant une masse importante de l'échantillon.

Toutefois, quatre des neuf fractions obtenues présentaient une saveur sucrée, évaluée entre 2 et 5 sur 7. En outre, des fractions amères et astringentes ont également été observées. Ces résultats valident la pertinence de l'utilisation de la Chromatographie Flash couplée à la gustatométrie comme une alternative acceptable à la CPC-G.

Par ailleurs, l'analyse en LC-FTMS de ces fractions montre la présence des mêmes composés majoritaires que dans la fraction **F9** de la CPC-2 : H3MP-Glc, H4MP-Glc, AG-Glc, ILA-Glc et *epi*-DPA-Glc.

Afin d'étudier si d'autres molécules sont responsables de la douceur des quatre fractions obtenues par chromatographie Flash, ces dernières ont été traitées par HPLC semi-préparative. Ainsi, les composés *m/z* 293 et 331 sont purifiés à partir des fractions **Flash-F1** et **Flash-F2**, alors que les composés *m/z* 366 et 443 sont purifiés à partir des fractions **Flash-F4** et **Flash-F5**. La phase mobile élue en dehors de ces pics a également été dégustée après lyophilisation et ne présentait pas de saveur sucrée.

Troisième partie : Isolement et identification de composés du raisin possédant une activité gustative

Ainsi, la mise en œuvre de la chromatographie Flash a permis d'isoler des fractions sapides, mais il est apparu que ces fractions contenaient majoritairement les mêmes molécules sucrées que celles isolées par CPC. Ces résultats confirment les acquisitions précédentes.

Conclusion

L'objectif des travaux reportés dans ce chapitre était de rechercher des composés à saveur sucrée libérés par le pépin au cours de la macération post-fermentaire à chaud. A cette fin, un extrait de pépin est préparé et soumis à un protocole de fractionnements successifs guidés par la gustatométrie. L'utilisation de diverses techniques séparatives (CPC, HPLC, Chromatographie Flash) et spectroscopiques (FTMS, RMN) a permis d'isoler plusieurs fractions douces puis d'en identifier les composés majoritaires. Parmi ces composés, le mélange des acides 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (H3MP-Glc) et 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (H4MP-Glc), l'acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside (AG-Glc), l'acide 3-indolyl-(2*R*)-*O*- β -D-glycoside lactique (ILA-Glc) et l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside (*epi*-DPA-Glc) développent une saveur sucrée lors de leur dégustation en solution hydro-alcoolique ainsi qu'après ajout dans un vin blanc et dans un vin rouge de Bordeaux 2013. En outre, le H3MP-Glc, le H4MP-Glc, l'AG-Glc et l'*epi*-DPA-Glc n'avaient jamais été identifiés dans les vins jusqu'ici.

Par ailleurs, des fractionnements d'autres extraits pré-purifiés ou utilisant d'autres méthodes n'ont pas permis de mettre en évidence davantage de composés édulcorants du raisin. Néanmoins, la présence de telles molécules ne peut être exclue, en raison de phénomènes d'interactions perceptives pouvant masquer leurs propriétés sensorielles.

CHAPITRE 8 - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE COMPOSÉS SAPIDES DU VIN APRÈS MPFC

Introduction

La recherche de composés du vin à saveur sucrée a été orientée dans un premier temps vers des molécules du pépin. Cependant, des composés édulcorants du vin peuvent également provenir des autres tissus de la baie et être libérés par le marc dans le vin. Par ailleurs, ils peuvent être présents sous forme de précurseur dans le raisin et subir des transformations au cours du processus de vinification révélant ainsi leur goût sucré. Ce chapitre décrit une recherche plus élargie de composés du vin possédant un goût sucré.

I. Description de la stratégie employée

A. Principe

Comme pour les pépins, l'étude des composés non-volatils du vin nécessite le développement et l'optimisation d'un protocole de fractionnement adapté. La nature des composés recherchés n'étant pas connue, le fractionnement a également été guidé par gustatométrie. Les mêmes conditions spectroscopiques et chromatographiques qu'au chapitre 7 ont été employées pour suivre les analyses LC-FTMS. Afin de préciser le rôle gustatif de la MPFC, deux vins, l'un écoulé directement après FA et l'autre ayant subi la MPFC, ont été fractionnés en parallèle.

B. Nature et origine des vins utilisés

Les vins utilisés proviennent des expérimentations sur l'effet de la macération post-fermentaire à chaud réalisées au cours de la partie II. Pour réaliser un fractionnement comparatif, les modalités **FA** et **MPF** des vins issus de Merlot (série M2) ont été sélectionnés.

C. Contraintes lors du fractionnement d'un vin

Le vin est un milieu complexe constitué de milliers de molécules. La purification de ses constituants est donc un processus long et difficile. Deux des composants majoritaires du vin sont le glycérol et l'acide tartrique, présents, respectivement à des teneurs moyennes comprises entre 4 et 9 g/L et entre 3 et 6 g/L dans les vins secs. Or, le glycérol est un liquide visqueux susceptible de perturber les séparations ou les lyophilisations envisagées et l'acide tartrique possède une acidité intense pouvant interférer avec le goût des fractions. Il convient donc d'éliminer ces deux composés préalablement à la mise en œuvre du protocole de

fractionnement. Ces composés étant polaires, il était nécessaire de trouver une méthode adaptée afin de les extraire sans éliminer des composés d'intérêt gustatif.

D. Organisation des dégustations des fractions

Les dégustations ont été effectuées selon le protocole décrit au chapitre 7. Les fractions et les composés purs ont été dégustés en comparaison au verre témoin (solution hydro-alcoolique seule ou vin blanc ou vin rouge seul). Le goût de chaque fraction a été décrit et l'intensité de la douceur a été évaluée sur une échelle de 0 à 7. Les dégustations ont été réalisées à l'aveugle.

II. Mise en place d'un protocole de fractionnement et de purification de vin

A. Extractions du vin sur phase solide (SPE)

La chromatographie Flash aurait été la technique la plus appropriée pour réaliser le fractionnement de vin en grande quantité, cependant des problèmes techniques n'ont pas permis son utilisation. L'extraction sur phase solide a donc été utilisée.

1. Matériel et méthodes

Le fractionnement des vins a été réalisé sur quatre colonnes d'un volume de 100 mL, contenant chacune environ 50 g d'une phase de type HLB et conditionnées au laboratoire. Une bouteille de 750 mL de chaque modalité du vin, **FA** et **MPF**, a été diluée par trois avec de l'eau ultra-pure avant d'être filtrée à 0,45 µm et chargée sur les colonnes. Chaque modalité a été chargée de manière identique sur deux colonnes, en parallèle. L'élution réalisée au cours de ce fractionnement est décrite dans le **Tableau 64**. Le débit a été maintenu à 5 mL/min environ par un système de vide.

Tableau 64. Méthode d'élution du fractionnement comparatif des modalités **FA** et **MPF** du vin M2 par SPE.

	Solvant	Volumes élués (mL)
Conditionnement	100 % MeOH	200
	100 % H ₂ O	200
Chargement de l'échantillon	100% Echantillon	1100
	100 % H ₂ O	1000
Elution	10 % MeOH	800
	20 % MeOH	1200
	30 % MeOH	800
	40 % MeOH	600
	50 % MeOH	1000
	60 % MeOH	800
	100 % MeOH	1400

A chaque volume de colonne (100 mL), une aliquote de 100 µL a été prélevée, évaporée au RapidVap, solubilisée dans H₂O/MeOH : 95/5, filtrée à 0,45 µm avant d'être injectée en LC-FTMS. Ainsi, chaque élution a été contrôlée et le regroupement a été effectué sur la base de la similitude des chromatogrammes. Les fractions constituées ont ensuite été évaporées et lyophilisées.

2. Résultats

Ce premier fractionnement par SPE résulte en l'obtention de huit fractions pour chaque modalité (**FA** et **MPF**) (**Figure 56**).

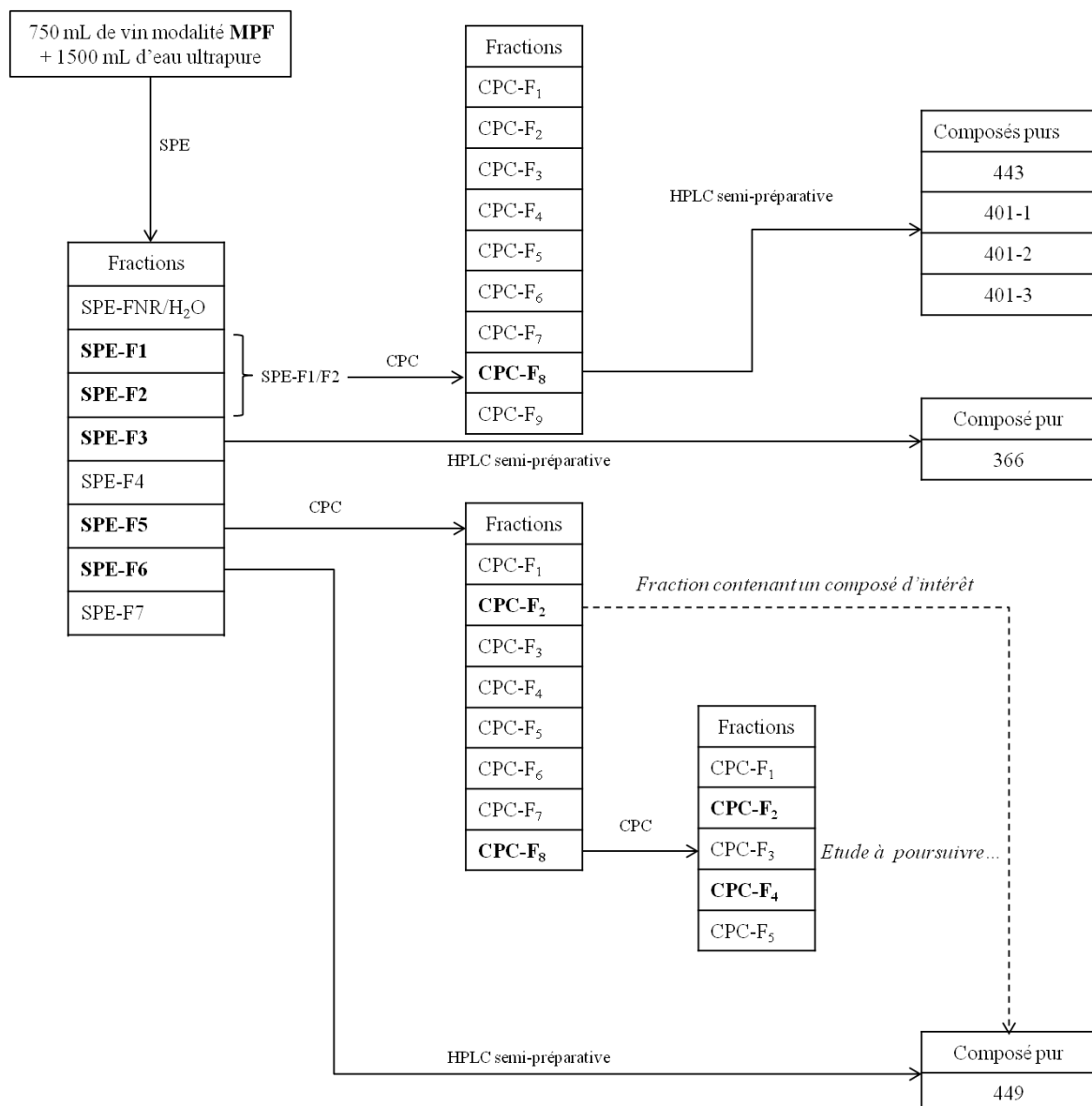


Figure 56. Fractionnement d'un vin de la modalité MPF par SPE, CPC-G et HPLC semi-préparative (Le même fractionnement a également été réalisé sur un vin de la modalité FA).

Les masses obtenues pour chaque fraction sont présentées dans le **Tableau 65**. Pour toutes les fractions, la modalité **MPF** possède des masses plus élevées que la modalité **FA** alors que la quantité de vin injectée était la même.

Tableau 65. Gustatogramme du fractionnement par SPE des modalités **FA** et **MPF** de la série M2.

Fraction	% MeOH	Masse (mg)		Goût	
		FA	MPF	FA	MPF
SPE-FNR/H ₂ O	0	/	/	-	-
SPE-F1	10	visqueux	visqueux	Doux 0,5/7	Doux 1/7
SPE-F2	20	367,5	388,3	Amer 1/7	Doux 4/7
SPE-F3	30	279,7	328,5	-	Doux 1/7
SPE-F4	40	457,2	473,2	-	-
SPE-F5	50	276,8	304,6	Doux 1/7 - Amer	Doux 3/7
SPE-F6	60	286,1	289	Amer 3/7	Amer 1/7
SPE-F7	100	256,5	316,4	Astringent	Astringent

- : Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec le verre témoin.

La dégustation des fractions en solution hydro-alcoolique à 12 % vol. met en évidence des fractions à saveur sucrée. Elles présentent une intensité plus élevée pour les fractions de la modalité **MPF** que pour celles de la modalité **FA** (**Tableau 65**). Par ailleurs, la fraction SPE-FNR/H₂O ne présente pas de saveur sucrée, ce qui suggère l'absence de composés édulcorants dans la fraction non retenue et le lavage (contenant l'essentiel du glycérol et de l'acide tartrique). En outre, à l'exception de **SPE-F1**, toutes les autres fractions sont obtenues sous forme de poudre. L'objectif de cette étape, l'élimination du glycérol et de l'acide tartrique, est donc en grande partie atteint.

3. Discussion

La répartition des masses entre les fractions est similaire pour les deux modalités. Pour une fraction donnée, les chromatogrammes sont également similaires entre les deux modalités, suggérant une bonne reproductibilité des extractions par SPE. Cependant, les fractions de la modalité **MPF** possèdent des masses légèrement supérieures à celles de la modalité **FA**. Cette observation peut s'expliquer par une diffusion plus importante des composés du marc vers le vin au cours de la MPFC et donc une extraction plus importante.

Les résultats de la dégustation mettent en évidence plusieurs fractions d'intérêt, **F1/F2**, **F3**, **F5** et **F6**. Les fractions de la modalité **MPF** présentent plus de douceur (**F1/F2**, **F3**, **F5**) et moins d'amertume (**F6**) que celles de la modalité **FA**. Ces données sont cohérentes avec les résultats obtenus lors de la dégustation des vins décrite au chapitre 5 et suggèrent que les

différences de douceur perçues seraient liées à des différences quantitatives entre les modalités.

Dans le cadre de ce travail, seules les fractions **F1/F2**, **F3** et **F5** pour lesquelles la modalité **MPF** présente plus de douceur que la modalité **FA** ont été étudiées. Au vu du grand nombre de pics présents dans leur chromatogramme LC-FTMS, les fractions **F1/F2** et **F5** nécessitent un second fractionnement par CPC. De par leur profil chromatographique proche, mais également en raison de l'aspect visqueux de la fraction **F1**, ne permettant pas de réaliser des tests de systèmes en CPC, les fractions **F1** et **F2** ont été traitées avec le même système de solvants par CPC. Enfin, la fraction **F3**, dont le chromatogramme présentait peu de pics, a été traitée directement par HPLC semi-préparative (**Figure 57**).

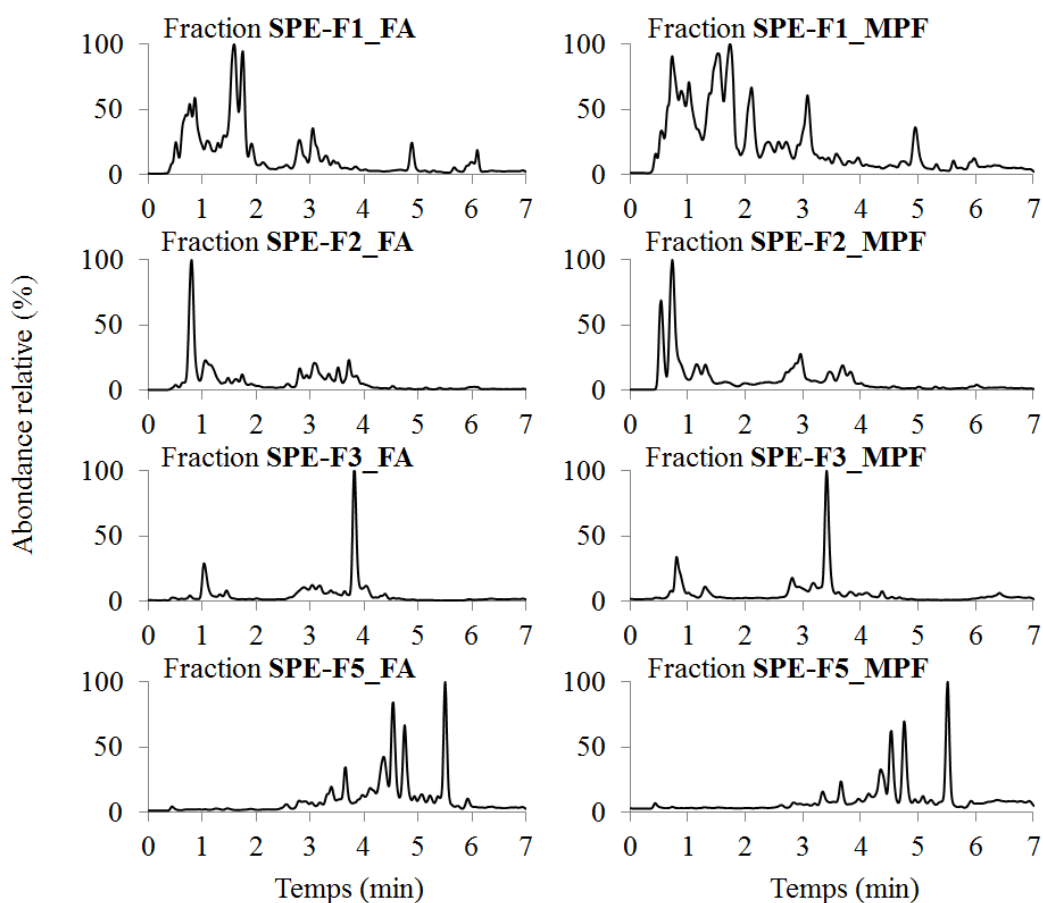


Figure 57. TIC en ionisation négative des fractions sucrées (SPE-F1, -F2, -F3 et -F5) obtenues après SPE pour la modalité **FA** (à gauche) et pour la modalité **MPF** (à droite).

B. Étude de la fraction SPE-F1/F2

Justine Laboyrie a contribué aux travaux décrits dans cette partie, dans le cadre de son stage de M1 Œnologie de l'Université de Bordeaux (avril-mai 2016).

1. Fractionnement par CPC

a) Matériel et méthodes

Des tests de systèmes ont été réalisés et analysés par LC-FTMS. Le système pont P₇ (AcOEt/iPrOH/H₂O : 2/1/2) a été choisi pour la réalisation de l'expérience de CPC avec la fraction **SPE-F1/F2** des deux modalités. Les quantités de fractions à traiter s'élevaient en moyenne à 370 mg, le rotor de 100 mL a donc été choisi, selon la méthode d'analyse 4 (**Tableau 60**). Des prélèvements ont été réalisés tous les dix tubes afin d'être analysés par LC-FTMS et de constituer des fractions.

b) Résultats

Les fractions des deux modalités, **FA** et **MPF**, sont traitées par CPC (**Figure 56**). Cependant, en raison des faibles quantités obtenues après fractionnement, seules les fractions de la CPC réalisée sur la modalité **FA** sont dégustées, soit les fractions de la **SPE-F1/F2-CPC_FA** (les fractions issues de la modalité **MPF** sont conservées pour la suite du protocole). Les résultats du fractionnement et le gustatogramme associé sont présentés dans le **Tableau 66**.

Les expériences de CPC réalisées à partir des fractions **SPE-F1/F2** présentent, pour les deux modalités, des volumes et des pressions à l'équilibre indiquant une bonne rétention de phase inférieure dans la colonne. Les profils UV enregistrés indiquent que les éluions sont similaires entre les deux modalités.

Tableau 66. Gustatogramme du fractionnement de l'extrait **SPE-F1/F2-CPC_FA**.

SPE-F1/F2-CPC_FA			
Veq = 51 mL ; Peq = 29 bar			
Fraction	Tubes	Masse (mg)	Goût
CPC-F ₁	15-21	/	Sucré (1/7)
CPC-F ₂	22-29	/	Amer
CPC-F ₃	30-35	27,4	-
CPC-F ₄	36-47	/	Attaque sucrée (1/7)
CPC-F ₅	48-62	2,8	Amer
CPC-F ₆	63-73	3,3	Brûlant
CPC-F ₇	74-78	4,8	Astringent et amer
CPC-F₈	79-88	39,8	Attaque sucrée (5/7) Finale astringente

CPC-F ₉	89-105	87	Astringent et amer
--------------------	--------	----	--------------------

Le gustatogramme montre un fractionnement des goûts de l'échantillon injecté, avec de nombreuses fractions sapides. En particulier, trois d'entre elles présentent une saveur sucrée, et notamment **F₈**, avec une intensité évaluée à 5 sur 7.

c) Discussion

Seule la fraction **F₈** (SPE-F1/F2-CPC-F₈), présentant la saveur sucrée la plus intense, est conservée en vue de fractionnements ultérieurs. Son chromatogramme LC-FTMS présente quatre pics majoritaires pouvant être associés à un composé de masse nominale m/z 443 et trois composés de m/z 401 (**Figure 58**).

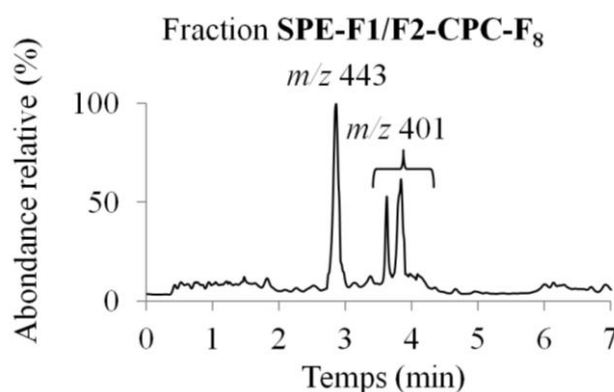


Figure 58. TIC en ionisation négative de la fraction SPE-F1/F2-CPC-F₈ (chromatogrammes identiques pour les modalités **FA** et **MPF**).

La masse totale de cette fraction **F₈** est de 39,8 mg et permet son fractionnement par HPLC semi-préparative. La fraction **F₈**, obtenue de la même façon à partir de la modalité **MPF**, présente un profil chromatographique similaire, et est également traitée par HPLC semi-préparative.

2. Purification des fractions SPE-F1/F2-CPC-F₈ par HPLC semi-préparative

a) Matériel et méthodes

Les fractions SPE-F1/F2-CPC-F₈ des deux modalités, **FA** et **MPF**, ont été traitées séparément par HPLC semi-préparative (**Figure 56**). La colonne utilisée était une Atlantis T3 Prep (21,2 x 250 mm, 5 μ m, Waters) et la phase mobile était constituée d'un mélange H₂O +

0,1 % acide formique (phase **A**) et ACN + 0,1 % acide formique (phase **B**). Le débit était fixé à 20 mL/min et un gradient a été optimisé pour traiter les fractions. Les conditions chromatographiques utilisées sont détaillées dans le **Tableau 67**.

Tableau 67. Gradient d'éluion utilisé pour la purification des fractions **SPE-F1/F2-CPC-F₈** par HPLC semi-préparative.

Temps (min)	0	6,15	25	43	45	49	50	60
% B	10	10	12	13	100	100	10	10

Les échantillons ont été préparés dans 500 µL de H₂O/MeOH : 80/20 puis filtrés à 0,45 µm avant injection. Après une première injection test de 5 mg pour contrôler l'efficacité de la séparation, le solde des échantillons a été injecté par aliquotes successives de 25 mg maximum. Les détecteurs UV et DEDL ont permis de suivre l'éluion des composés et de les collecter manuellement à la sortie du système. Une aliquote de 50 µL de chaque tube a été prélevée, diluée dix fois avec de l'eau ultra-pure, et injectée en LC-FTMS afin d'étudier sa composition. Les tubes des différentes injections contenant les mêmes composés purs ont ensuite été regroupés et lyophilisés.

b) Résultats

Après lyophilisation, les composés de masse nominale m/z 443 et 401, sont obtenus sous forme d'une poudre blanche amorphe. Les masses obtenues sont présentées dans le **Tableau 68**.

Tableau 68. Composés purifiés par HPLC semi-préparative à partir des fractions **SPE-F1/F2-CPC-F₈** (modalités **FA** et **MPF**).

Composé purifié	m/z 443	m/z 401-1	m/z 401-2	m/z 401-3
Temps de rétention T_R (min)	3,07	3,76	3,90	4,01
Masse (mg)	3,6	0,5	1,1	2,8

Les injections LC-FTMS confirment la pureté des produits (**Figure 59**). Le spectre FTMS du composé m/z 443 indique la masse précise de l'ion quasi-moléculaire m/z 443,1934, associée à la formule brute C₂₁H₃₂O₁₀. Les composés m/z 401-1, -2 et -3 sont des isomères puisque leur spectre FTMS présente le même ion déprotoné m/z 401,1467, permettant de leur attribuer la formule brute C₁₈H₂₆O₁₀. Ces isomères possèdent également le même spectre de fragmentation.

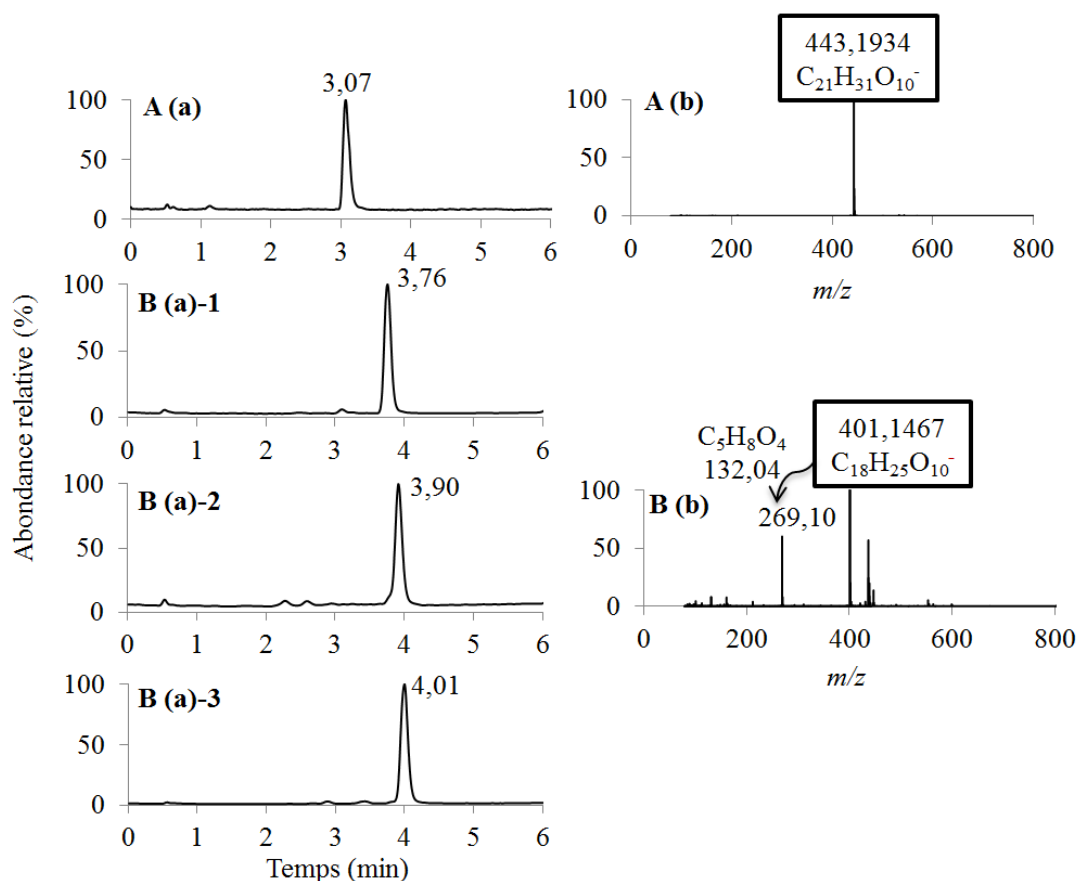


Figure 59. TIC en ionisation négative des composés purifiés m/z 443 **A (a)** et m/z 401-1, -2 et -3 **B (a)-1, -2 et -3** et leur spectre FTMS **A (b)** et **B (b)**.

3. Identification des composés purifiés

L'étude de la masse précise, de la fragmentation et du temps de rétention du composé m/z 443, permet de confirmer qu'il s'agit de l'*epi*-DPA-Glc (acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside) mis en évidence au cours du fractionnement d'extraits de pépins et décrit au chapitre 7. Il s'agit ici de la première identification de l'*epi*-DPA-Glc dans les vins.

L'étude de la masse précise du composé m/z 401 permet d'observer deux adduits, le premier de m/z 437,1231 est un adduit chlorure ($[M+Cl]^-$) et le second de m/z 447,1518 est un adduit formiate ($[M+HCOO]^-$). L'étude de la fragmentation HCD permet d'observer pour les trois isomères, un ion secondaire de m/z 269,1010 correspondant à une perte de neutre de 132,0428, caractéristique d'un groupement pentose ($C_5H_8O_4$). Ainsi, il semble que l'ion quasi-moléculaire de masse m/z 401 soit composé d'une génine ($C_{13}H_{18}O_6$) sur laquelle est fixé un groupement pentose ($C_5H_8O_4$). D'autres fragments de faible intensité relative sont également observés à m/z 101, 131, 161 et 293. L'interprétation des spectres RMN des trois

isomères et leur comparaison aux données de la littérature permettent de déterminer la structure des trois isomères. Ainsi, le composé m/z 401 possède une signature chimique similaire à celle des dérivés hexose-pentose de l'alcool benzylique reportés dans la littérature (Suzuki *et al.*, 1988 ; S. Voirin *et al.*, 1990 ; Chassagne *et al.*, 1996). Tout d'abord, la perte d'un pentose observée en LC-FTMS suggère que ce groupement est situé en position terminale. En outre, l'étude des données RMN ^1H et ^{13}C (ANNEXES 6-G, 6-H et 6-I) montre la présence de signaux caractéristiques de l'alcool benzylique et permet de déterminer la nature des sucres ainsi que de leurs sites de fixation. Ainsi, les composés m/z 401-1, -2 et -3 sont constitués d'un groupe benzylique, d'un glucopyranose et, respectivement, d'un arabinofuranose, d'un arabinopyranose et d'un apiofuranose. Les spectres HMBC montrent pour les trois isomères, une corrélation entre les protons H-7a et H-7b de l'alcool benzylique et le carbone C-1' de l'anomère β -glucopyranose ainsi qu'une corrélation entre le carbone C-1'' de l'hémiacétal du pentose et les protons H-6'a et H-6'b du glucose (ANNEXES 13-B, 14-B et 15-B). Ainsi, les trois isomères 401-1, -2 et -3 sont identifiés comme étant le benzyl 6'- O - α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside (benzyl 6'Araf-Glcp), le benzyl 6'- O - α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside (benzyl 6'Arap-Glcp) et le benzyl 6'- O - α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside (benzyl 6'Apiof-Glcp) (Figure 60).

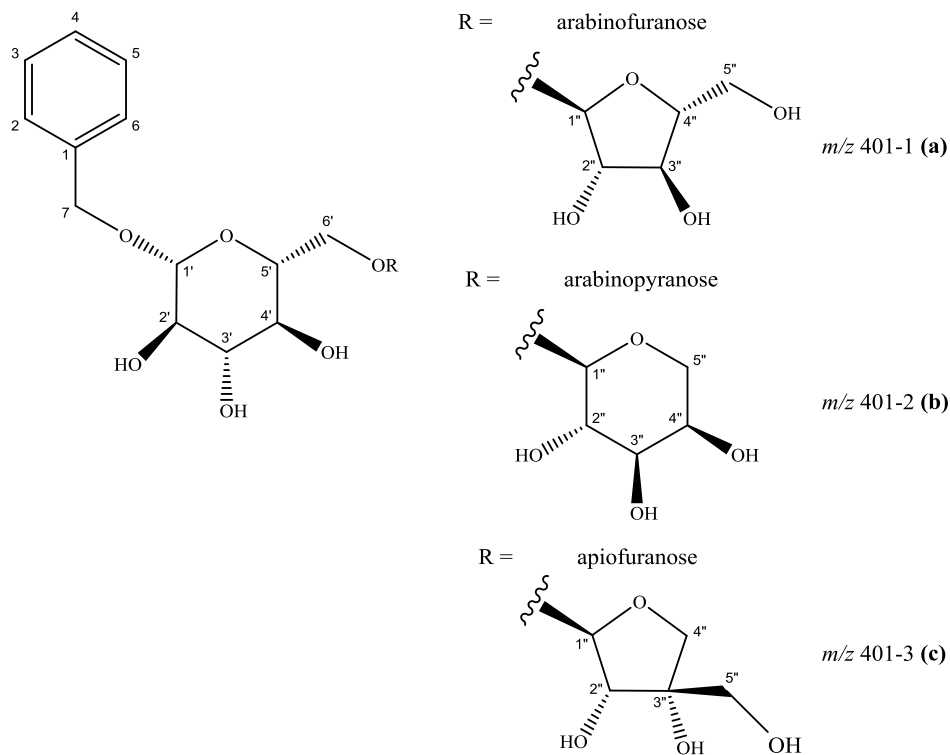


Figure 60. Structures moléculaires du benzyl 6'- O - α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside (a), du benzyl 6'- O - α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside (b) et du benzyl 6'- O - α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside (c).

Les dérivés diglycosylés de l'alcool benzylique, comme ceux du linalool ou du 2-phényl-éthanol, sont connus en tant que précurseurs d'arômes dans certains fruits (Chassagne *et al.*, 1996) ainsi que dans le raisin (Williams *et al.*, 1983 ; Gunata *et al.*, 1988 ; S. G. Voirin *et al.*, 1992 ; López-Tamames *et al.*, 1997 ; Mateo *et al.*, 1997 ; Chassagne *et al.*, 2015). En effet, le benzyl 6'Araf-Glcp et le benzyl 6'Apiof-Glcp ont été précédemment identifiés dans le moût de Pinot noir, contrairement au benzyl 6'Arap-Glcp. Par ailleurs, à notre connaissance, ces trois isomères n'ont jamais été identifiés dans les vins. Enfin, aucun goût ne leur a jamais été attribué. Les quantités purifiées dans ce travail ne permettent pas la caractérisation gustative de ces trois isomères.

Ainsi, la purification de la fraction **SPE-F1/F2-CPC-F₈** a permis l'obtention de quatre composés, dont trois isomères diglycosylés de l'alcool benzylique et l'*epi*-DPA-Glc. Ce composé, déjà isolé à partir d'un extrait de pépin, est à nouveau retrouvé dans une fraction sucrée, ce qui tend à confirmer la pertinence de sa contribution. Les dérivés de l'acide benzylique n'ont pas pu être dégustés, mais au regard de l'intensité modérée de la fraction, de la présence majoritaire de l'*epi*-DPA-Glc et de leur faible abondance, leur effet sur le goût du vin semble limité.

C. Étude de la fraction SPE-F3

Les chromatogrammes des fractions **SPE-F3** des modalités **FA** et **MPF** présentent un seul pic majoritaire. Le composé associé a donc été directement purifié par HPLC semi-préparative (**Figure 56**).

1. Purification par HPLC semi-préparative

a) Matériel et méthodes

La fraction **SPE-F3** de la modalité **FA**, a été traitée par HPLC semi-préparative. Les conditions utilisées étaient les mêmes que pour la purification de la fraction **SPE-F1/F2-CPC-F₈** réalisée au chapitre 8-**II.B.2.**, avec un gradient d'élution différent détaillé dans le **Tableau 69**.

Tableau 69. Gradient d'éluion utilisé pour la purification de la fraction **SPE-F3** de la modalité **FA** par HPLC semi-préparative.

Temps (min)	0	7,3	36	39	44	45	50
% B	10	10	17	100	100	10	10

b) Résultats

Après lyophilisation, 17,5 mg du composé m/z 366, sont obtenus sous forme d'une poudre blanche amorphe. Les injections LC-FTMS confirment la pureté du produit (**Figure 61**), avec un ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ m/z 366,1178, caractéristique d'une molécule de formule brute ($C_{17}H_{21}NO_8$).

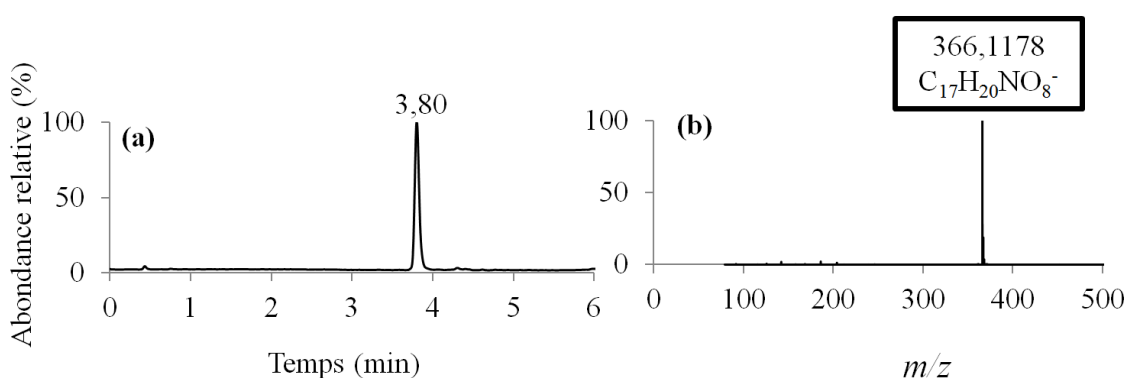


Figure 61. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 366 (a) et de son spectre FTMS (b).

2. Identification du composé purifié

La formule brute, le temps de rétention et les fragments de ce composé m/z 366 sont identiques à ceux de la molécule isolée à partir d'extraits de pépin et décrite au chapitre 7 ; il s'agit donc de l'ILA-Glc (acide 3-indolyl-(2R)-O- β -D-glycoside lactique). La fraction **SPE-F3** ne contenant qu'un seul composé majoritaire, sa faible douceur perçue est cohérente avec la présence de l'ILA-Glc (m/z 366), dont l'intensité sucrée a été évaluée à 1/7 dans le chapitre 7.

D. Étude de la fraction SPE-F5

1. Fractionnement par CPC

a) Matériel et méthodes

Le système Arizona B (Hept/AcOEt/MeOH/H₂O : 1/19/1/19) a été choisi pour traiter les deux modalités, **FA** et **MPF**. Les quantités de fractions à traiter par CPC s'élevaient en

moyenne à 290 mg, le rotor de 100 mL a donc été choisi pour réaliser les fractionnements, selon la méthode d'analyse 4 (**Tableau 60**). Les analyses LC-FTMS ont permis de constituer des fractions sur la base de profils chromatographiques similaires.

b) Résultats

Les fractions des deux modalités, **FA** et **MPF**, sont traitées par CPC (**Figure 56**). Cependant, en raison des faibles quantités obtenues après fractionnement, seules les fractions de la **SPE-F5-CPC_FA** sont dégustées. Le gustatogramme obtenu est présenté dans le **Tableau 70**. Pour les deux modalités, des volumes de phases rejetées et des pressions à l'équilibre correctes ont été observés. Les profils UV attestent du fait que les éluions des deux CPC se sont déroulées de façon similaire.

Tableau 70. Gustatogramme de la fraction **SPE-F5_FA** après CPC.

SPE-F5-CPC_FA		Veq = 48 mL ; Peq = 54 bar	
Fraction	Tubes	Masse (mg)	Goût
F ₁	10-16	/	-
F₂	17-22	2,4	Sucré (5/7)
F ₃	23-29	3,7	Amer
F ₄	30-46	16,6	Aqueux
F ₅	47-62	5,1	Astringent
F ₆	63-78	19,4	Astringent
F ₇	79-83	10,5	Astringent
F₈	84-105	125,2	Attaque sucrée (4/7) Finale astringente

- : Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec le verre témoin.

Si plusieurs échantillons ont été perçus amers ou astringents, deux fractions sucrées sont observées, **F₂** et **F₈**, présentant respectivement une douceur d'intensité 5 et 4 sur une échelle de 7.

c) **Discussion**

La fraction **F₈** de la **SPE-F5-CPC_FA** présente une forte intensité de douceur. Le nombre de pics sur son chromatogramme nécessite un second fractionnement par CPC, détaillé plus bas.

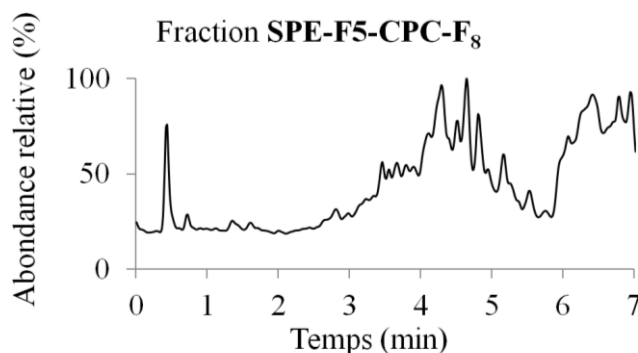


Figure 62. TIC en ionisation négative de la fraction **SPE-F5-CPC-F₈**.

La fraction **F₂** de la **SPE-F5-CPC_FA** présente également une forte intensité de douceur et son chromatogramme ne comporte que quelques pics (**Figure 63**).

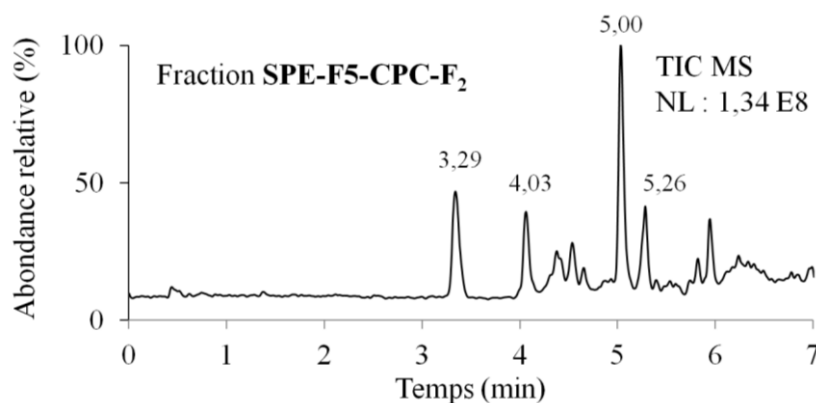


Figure 63. TIC en ionisation négative de la fraction **SPE-F5-CPC-F₂**.

L'analyse LC-FTMS de cette fraction montre que son composé majoritaire, au temps de rétention de 5,00 min possède un ion quasi-moléculaire de m/z 449,1091. Le composé à 5,26 min en est un isomère. D'autres composés, appartenant vraisemblablement à la famille des flavonoïdes, constituent cette fraction (t_R de 3,29 et 4,03 min). La masse totale de cette fraction (2,4 mg) ne permet aucun traitement supplémentaire. Néanmoins, l'intensité de sa saveur sucrée justifie de rechercher son composé majoritaire m/z 449-1 (t_R 5,00) ainsi que son isomère m/z 449-2 (t_R 5,26) dans d'autres fractions de CPC et de SPE. La purification de ces deux isomères sera décrite dans le paragraphe 3 de cette partie **II.D**.

2. Étude de la fraction SPE-F5-CPC-F₈

a) Matériel et méthodes

Après plusieurs tests, le système « pont » P₁₃ (AcOEt/iPrOH/H₂O : 3/1/3) a été choisi pour traiter les fractions **SPE-F5-CPC-F₈** obtenues à partir des deux modalités. Les quantités à traiter par CPC s'élevaient en moyenne à 140 mg, le rotor de 100 mL a donc été choisi pour réaliser les fractionnements, selon la méthode d'analyse 4 (**Tableau 60**). Les analyses LC-FTMS ont permis de constituer des fractions sur la base de profils chromatographiques similaires.

b) Résultats

Les fractions issues des deux modalités **FA** et **MPF** sont traitées en parallèle par CPC (**Figure 56**). Cependant, en raison des faibles quantités obtenues après fractionnement, seules les fractions de la modalité **FA** sont dégustées (**Tableau 71**). Le déroulement des fractionnements étaient corrects et similaires pour les deux expériences.

Tableau 71. Gustatogramme du fractionnement de l'extrait **SPE-F5-CPC-F₈** (modalité **FA**) par CPC.

SPE-F5-CPC_FA		Veq = 49 mL ; Peq = 33 bar	
Fraction	Tubes	Masse (mg)	Goût
F ₁	10-17	8,3	-
F₂	18-24	6,0	Sucré à l'attaque et en milieu de bouche (2/7)
F ₃	25-42	10,5	Acide/Amer
F₄	43-63	22,6	Sucré en milieu de bouche (2/7), finale astringente
F ₅	64-70	53,5	Astringent

- : Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec le verre témoin.

La dégustation en solution hydro-alcoolique montre, pour cet échantillon également, une bonne séparation des molécules sapides avec plusieurs fractions amères, astringentes et douces. Les fractions sucrées **F₂** et **F₄** possèdent une intensité modérée. Compte tenu des quantités obtenues, la purification ne peut être poursuivie. L'analyse LC-FTMS des pics chromatographiques majoritaires de ces fractions permet d'observer de nombreux composés

qui pourraient, sur la base de leur formule brute, appartenir principalement à la famille des flavonoïdes.

3. Purification du composé de masse nominale m/z 449

a) Criblage LC-FTMS

Afin de rechercher les isomères du composé m/z 449, un criblage de son ion quasi-moléculaire, m/z 449,1091 (± 5 ppm), a été réalisé par LC-FTMS dans les fractions issues de la CPC réalisée sur **SPE-F5_FA** ainsi que dans les autres fractions de SPE. Le composé m/z 449 a ainsi été repéré en grande quantité dans la fraction **SPE-F6** des modalités **FA** et **MPF** (**Figure 64**). Cependant, seul l'isomère m/z 449-1 est présent avec une intensité importante.

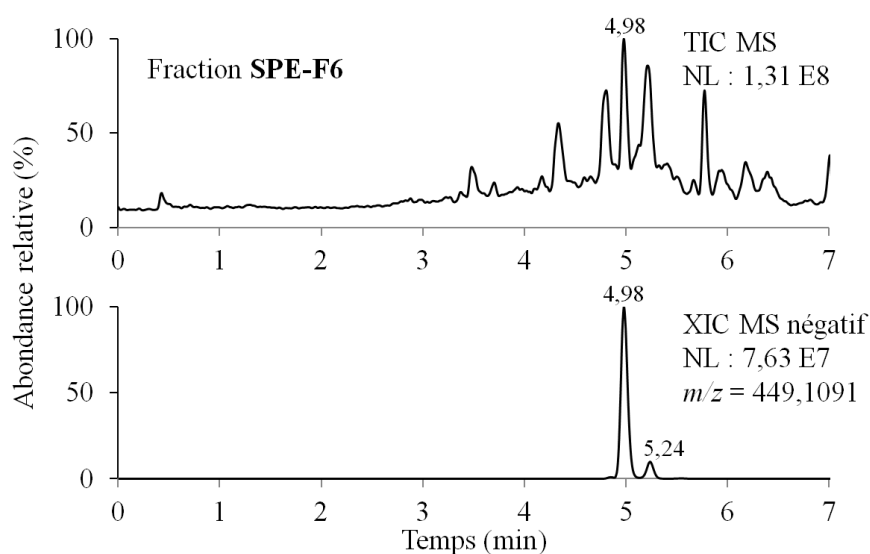


Figure 64. Haut : TIC de la fraction **SPE-F6**. Bas : XIC en ionisation négative de l'ion quasi-moléculaire m/z 449,1091 (± 5 ppm) (les chromatogrammes sont identiques pour les modalités **FA** et **MPF**).

b) Purification de l'extrait **SPE-F6** par HPLC semi-préparative

(1) Matériel et méthodes

La fraction **SPE-F6** de la modalité **FA** a été traitée par HPLC semi-préparative afin de purifier le composé m/z 449. Les mêmes conditions qu'au chapitre 8-**II.B.2.** ont été utilisées, avec un gradient d'éluion différent (**Tableau 72**).

Tableau 72. Gradient d'éluion utilisé pour la purification des fractions **SPE-F6** des modalités **FA** et **MPF** par HPLC semi-préparative.

Temps (min)	0	7,4	44,2	46	51	52	60
% B	17	17	25	100	100	17	17

(2) Résultats

La totalité de la fraction **SPE-F6** est traitée directement par HPLC semi-préparative. Bien que cette fraction possède une masse importante (286,1 mg), la totalité est traitée en sept injections successives de 50 mg maximum. L'optimisation du gradient d'éluion permet de séparer le pic d'intérêt m/z 449-1 du reste de la fraction afin de le purifier. Ainsi, 9,3 mg du composé m/z 449-1 sont purifiés sous forme de poudre blanche amorphe.

Les analyses LC-FTMS confirment la pureté chromatographique du produit (**Figure 65**) et son spectre indique la masse précise de son ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ m/z 449,1091.

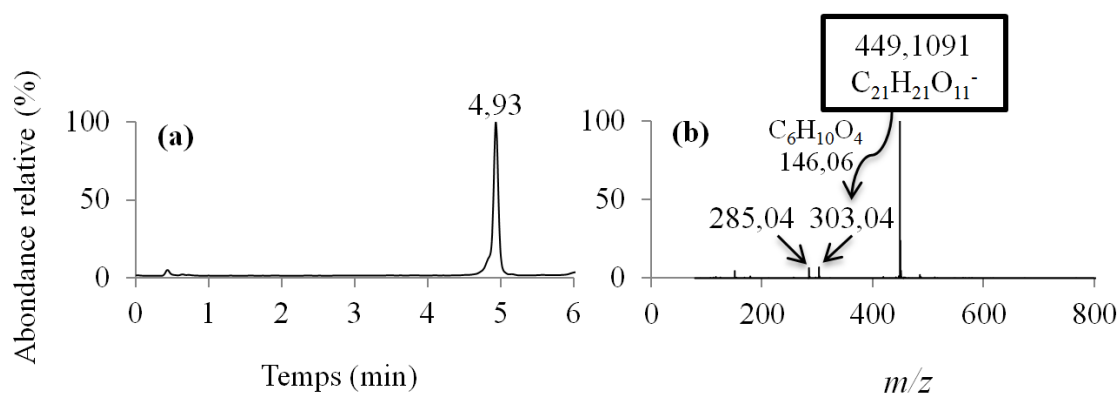


Figure 65. TIC en ionisation négative du composé purifié m/z 449-1 (a) et de son spectre FTMS (b).

c) *Caractérisations structurale et sensorielle du composé m/z 449-1*

La mesure de la masse précise de l'ion quasi moléculaire permet d'établir la formule brute du composé : $C_{21}H_{22}O_{11}$. La fragmentation HCD met en évidence un ion fragment de m/z 303,0496 ($C_{15}H_{12}O_7^-$), correspondant à une perte de neutre de 146,0570, caractéristique d'un groupe désoxy-hexose. Un second ion fragment est observé à m/z 285,0490 ($C_{15}H_{10}O_6^-$). La présence de ces deux ions, en comparaison avec les données de la littérature, suggère que le composé serait dérivé de la taxifoline (Urpi-Sarda *et al.*, 2007) ; il pourrait s'agir d'un dérivé désoxy-hexosyl de la taxifoline.

Pour examiner ces hypothèses et déterminer la structure moléculaire du composé m/z 449-1, des expérimentations en RMN mono- et bi-dimensionnelles sont effectuées. L'étude des spectres RMN (ANNEXE 6-J) et leur comparaison aux données de la littérature (Trousdale *et al.*, 1983 ; Jusoh *et al.*, 2013 ; H. Shi *et al.*, 2015) a montré la présence de signaux caractéristiques de la taxifoline et d'un groupement rhamnose. Dans un premier temps, le spectre HMBC permet de déterminer le lieu de fixation du groupement rhamnose sur la taxifoline, par une corrélation entre le proton H-3 de la taxifoline et le carbone C-1'' de l'hémiacétal du rhamnose (ANNEXE 16-B). Dans un second temps, le spectre ROESY, ne montre aucune corrélation spatiale entre les protons H-2 et H-3, portés par les carbones stéréogènes C-2 et C-3, ce qui suggère que ces protons sont en position *trans*. Les constantes de couplage des protons H-2 et H-3, s'élevant respectivement à 10,7 et 10,0 Hz, corroborent également l'hypothèse d'une configuration relative *trans* pour ces deux protons. De cette manière, la molécule m/z 449-1 est identifiée comme étant l'astilbine, ou (2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside dont la configuration relative est représentée à la **Figure 66**. Le pouvoir rotatoire de l'astilbine est mesuré à -25 et s'accorde avec les valeurs moyenne de -20 décrites précédemment pour ce composé dans la littérature (Jacquemin *et al.*, 1985 ; De Britto *et al.*, 1995 ; Du *et al.*, 2005 ; Regasini *et al.*, 2008 ; Bezerra *et al.*, 2013).

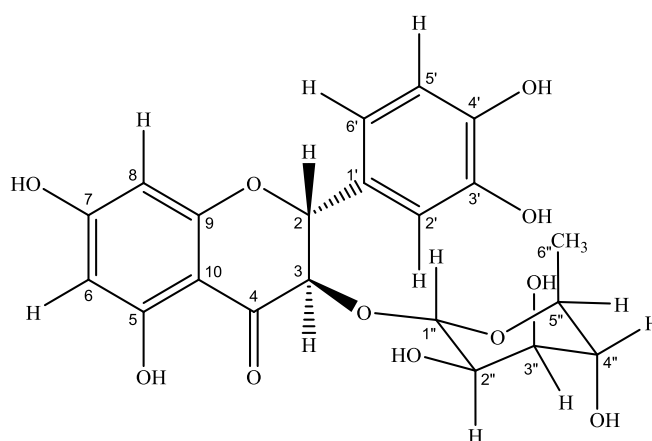


Figure 66. Structure chimique de l'astilbine (configuration relative).

Un ajout d'astilbine est réalisé en solution hydro-alcoolique, dans un vin blanc et dans un vin rouge. En parallèle, des solutions d'*epi*-DPA-Glc sont présentées aux dégustateurs à titre de comparaison. La dégustation montre que l'astilbine possède une saveur sucrée intense, perçue dans toutes les matrices (**Tableau 73**). En outre, l'ajout d'astilbine affecte davantage

l'équilibre gustatif d'un vin blanc que celui d'un vin rouge. Les mêmes résultats ont été obtenus en reproduisant l'expérience une seconde fois, à l'aveugle.

Tableau 73. Résultats de la dégustation des composés astilbine et *epi*-DPA-Glc.

	Solution hydro-alcoolique 12 % vol.		Vin Blanc Bordeaux 2013		Vin Rouge Bordeaux 2013	
<i>Epi</i> -DPA-Glc	Sucré	3/7	Sucré	4/7	Sucré	6/7
Astilbine	Sucré	3/7	Sucré	5/7	Sucré	4/7

L'astilbine, ou (2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside est un flavanonol préalablement identifié dans les végétaux (Kasai *et al.*, 1988 ; Carneiro *et al.*, 1993 ; Cechinel Filho *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 2011 ; Jusoh *et al.*, 2013), dans le vin rouge (Vitrac *et al.*, 2001), dans la pellicule de raisin blanc et le vin blanc (Trousdale *et al.*, 1983), dans le marc de raisin (Lu *et al.*, 1999) et dans les rafles (Souquet *et al.*, 2000). Il possède des activités antimicrobiennes (Moulari *et al.*, 2006), anti-oxydantes (Haraguchi *et al.*, 1996 ; Haraguchi *et al.*, 1997 ; Han *et al.*, 1998) et cicatrisantes (Kimura *et al.*, 2007).

La structure de l'aglycone de l'astilbine contient deux centres stéréogènes, ce qui correspond à quatre diastéréoisomères, dont les dérivés rhamnosylés ont déjà été observés dans la nature (**Figure 67**). Un article de 1988 évoque que l'un d'entre eux, la néoastilbine, possède un goût sucré, mais la méthodologie sensorielle n'est pas précisée. Les propriétés gustatives des trois autres stéréoisomères n'ont jamais été clairement étudiées (Kasai *et al.*, 1988, 1991).

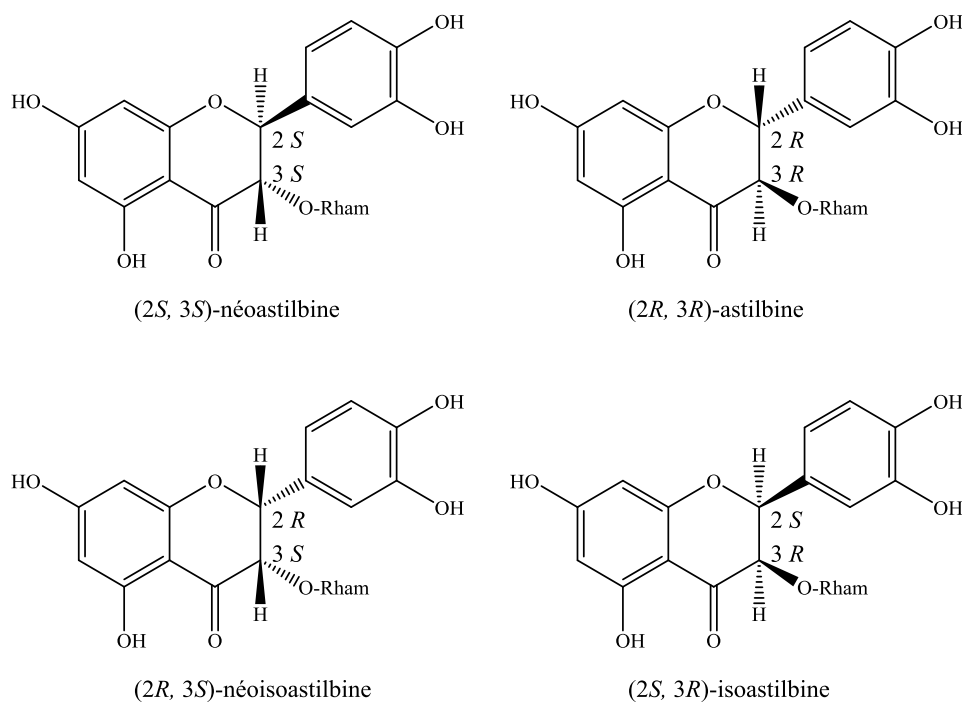


Figure 67. Structures moléculaires des diastéréoisomères de l'astilbine.

L'isomérisation de l'astilbine a également été étudiée. Cette molécule reste en effet stable au pH du vin mais elle s'isomérisé et se dégrade avec l'augmentation de la température, notamment à partir de 45-55 °C (Gaffield *et al.*, 1975b ; Q.-F. Zhang *et al.*, 2013).

Ainsi, l'identification et la dégustation de l'astilbine, isolée par fractionnement de vin guidé par la gustatométrie, ouvre des perspectives intéressantes pour la recherche de composés de la famille des flavanonols pouvant contribuer à la saveur sucrée des vins rouges. En effet, un autre composé de cette même famille a déjà été mis en évidence pour son intense sucrosité (50 fois celle d'une solution de sucrose à 2 %), il s'agit de la taxifoline-3-acétate. Un dérivé synthétique de ce dernier, le 5,7,3'-trihydroxy-4'-méthoxydihydroflavonol-3-acétate, a également été décrit avec une sucrosité 400 fois plus intense que celle du sucrose (Kinghorn, 1987).

Conclusion

L'objectif des deux chapitres précédents était de rechercher des composés à saveur sucrée du pépin ainsi que du vin. Les protocoles de fractionnement mis en place ont permis d'isoler plusieurs composés à saveur sucrée : le mélange des acides H3MP-Glc (2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside) et H4MP-Glc (2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside), l'AG-Glc (acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside), l'ILA-Glc (acide 3-indolyl-(2*R*)-*O*- β -D-glycoside lactique), l'*epi*-DPA-Glc (acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-

Troisième partie : Isolement et identification de composés du raisin possédant une activité gustative

dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside) et l'astilbine ((2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside). Ces composés développent une saveur sucrée lors de leur dégustation en solution hydro-alcoolique ainsi qu'après ajout dans un vin blanc et dans un vin rouge de Bordeaux 2013. En outre, le H3MP-Glc, le H4MP-Glc ont été décrits pour la première fois. L'AG-Glc et l'*epi*-DPA-Glc ont été identifiés pour la première fois dans les vins.

De plus, les isomères, benzyl 6'-*O*- α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside (benzyl 6'*Araf*-Glc p), le benzyl 6'-*O*- α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside (benzyl 6'*Arap*-Glc p) et le benzyl 6'-*O*- α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside (benzyl 6'*Apiof*-Glc p) n'ont jamais été décrits dans les vins, bien que le benzyl 6'*Araf*-Glc et le benzyl 6'*Apiof*-Glc p aient été décrits dans le moût de Pinot noir. Ces composés n'ont jamais été goûtés.

Par ailleurs, l'isolement de l'astilbine et la mise en évidence de sa douceur dans les vins a permis d'ouvrir un nouvel axe pour la recherche de composés sucrés du vin de la famille des flavanonols.

CHAPITRE 9 - QUANTIFICATION DES PRINCIPAUX COMPOSÉS IDENTIFIÉS DANS LA BAIE DE RAISIN ET LES VINS

Introduction

Dans les chapitres précédents, la purification de composés sapides a été décrite dans des extraits de pépin de raisin ainsi que dans du vin. L'utilisation de diverses techniques analytiques et sensorielles a permis d'élucider la structure chimique de ces composés et de préciser les propriétés gustatives de certains d'entre eux.

Or, l'effet d'une molécule sur le goût du vin dépend d'une part de son activité gustative mais également de son abondance. Il est donc nécessaire de disposer de données quantitatives dans les vins. Leur dosage dans les différentes parties de la baie permet en outre de préciser leur localisation.

Ce chapitre traite donc du développement d'une méthode de quantification par U-HPLC-FTMS des composés sapides purifiés précédemment, dans les vins ainsi que dans le raisin.

I. Développement d'une méthode de quantification des composés identifiés

A. Méthodologie

Le dosage des composés a été réalisé à l'aide de l'appareil de LC-FTMS Exactive (ThermoScientific), dont les caractéristiques sont décrites dans la partie expérimentale générale. La quantification a été réalisée à partir de l'intégration des pics chromatographiques correspondant aux ions quasi-moléculaires des composés à doser, selon la méthode des ajouts dosés.

1. Composés quantifiés

Une quantification absolue a été réalisée pour quatre molécules, dont les standards étaient disponibles après purification :

- l'*epi*-DPA-Glc (acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-O- β -glucopyranoside, m/z 443), jamais identifié dans le raisin ou dans les vins.
- l'AG-Glc (acide gallique 4-O- β -glucopyranoside, m/z 331), précédemment identifié dans le marc de vin blanc (Lu *et al.*, 1999) mais jamais observé dans le vin.
- l'ILA-Glc (acide 3-indolyl-(2*R*)-O- β -D-glucopyranoside lactique, m/z 366), déjà identifié et quantifié par HPLC-UV dans le vin rouge par Fabre *et al.* en 2014 (Fabre *et al.*, 2014), mais dont les propriétés sensorielles n'avaient jamais été décrites.

- l'astilbine ((2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, *m/z* 449-1), déjà identifiée et dosée dans les vins rouges et blancs (Trousdale *et al.*, 1983 ; Vitrac *et al.*, 2001) ainsi que dans des raisins issus de différents stades de la pourriture noble (Landrault *et al.*, 2002).

Une quantification relative a en outre été effectuée pour les deux isomères H3MP-Glc et H4MP-Glc, dont les standards n'ont pas pu être obtenus en quantité suffisante pour préparer une gamme de concentrations. Pour ces molécules, identifiées pour la première fois dans une substance naturelle, les aires des pics chromatographiques seront mesurées et les concentrations seront exprimées en équivalents d'AG-Glc. Ils permettront uniquement de discuter des variations entre échantillons.

2. Préparation des échantillons et des solutions de calibration

Avant de quantifier les composés d'intérêt dans les vins et les macérats de parties de la grappe, les échantillons ont été dilués par dix avec de l'eau ultra-pure. Après filtration à 0,45 μ m, 5 μ L de chaque solution ont été injectés directement en LC-FTMS. L'origine des vins étudiés et la préparation des macérats de raisin seront précisées dans les parties correspondantes.

Afin de limiter les effets de la matrice, trois séries de solutions de calibration ont été préparées par dilutions successives d'une solution mère contenant les quatre composés purs à 1 g/L, dans trois matrices : la solution modèle utilisée pour la préparation des macérats, un vin rouge et un vin blanc, tous dilués par dix. La gamme de calibration s'étale de 2 μ g/L à 10 mg/L, avec les concentrations suivantes : 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 500 μ g/L, 200 μ g/L, 100 μ g/L, 50 μ g/L, 20 μ L, 10 μ g/L, 5 μ g/L, 2 μ g/L.

3. Conditions chromatographiques et spectrométriques

L'U-HPLC-FTMS est une technique quantitative alliant résolution chromatographique et spécificité de détection. Les conditions chromatographiques utilisées sont détaillées dans le **Tableau 74**. Les échantillons sont conservés à 12 °C dans les tiroirs du passeur d'échantillons afin de limiter leur éventuelle dégradation au cours d'une longue série d'injections. A l'issue de chaque injection, la seringue et l'injecteur sont rincés trois fois, à l'aide de deux solvants différents : une solution H₂O/MeOH : 50/50 et de l'ACN, afin de ne pas contaminer les vials après des échantillons très concentrés.

Tableau 74. Conditions chromatographiques utilisées pour la quantification des composés d'intérêt.

Appareil :	U-HPLC Accela (Thermo Fisher Scientific)							
Logiciel :	Xcalibur 2.1 pour Exactive							
Colonne :	Hypersil Gold C18 (Thermo Fisher Scientific) 100 x 2,1 mm Taille des particules 1,9 µm							
Phase mobile :	Débit : 600 µL/min Solvant A : H ₂ O ultrapure + 0,1 % acide formique Solvant B : ACN LC-MS Optima + 0,1 % acide formique Gradient :							
	Temps (min) :	0	1	6	6,2	7,7	7,8	9
	% B :	5	5	30	98	98	5	5
Injection :	5 µL à l'aide d'un passeur automatique HTC0 Pal équipé de « racks » réfrigérés							

Les conditions d'ionisation et les paramètres spectrométriques ont été optimisés par une injection directe des composés d'intérêt à un débit constant. Les signaux associés aux composés m/z 331, 366, 443 et 449-1 ont été enregistrés en mode négatif. Les différents débits de gaz, tensions et températures ont été modulés et l'influence de leurs variations sur l'intensité des signaux a été observée. Les valeurs choisies résultent d'un consensus des paramètres permettant une ionisation optimale des différents composés (**Tableau 75**).

Tableau 75. Conditions d'ionisation et paramètres spectrométriques utilisées pour la quantification des composés d'intérêt.

Paramètre	Mode négatif
Débit du « sheath gas » ^a	80
Débit du gaz auxiliaire ^a	15
Débit du « sweep gas »	0
Tension du spray	-4 kV
Température du capillaire	300 °C
Tension du capillaire	-90 V
Tension du tube lens	-170 V
Tension du skimmer	-32 V
Température de la source	300 °C
Résolution ^b	10000
AGC	3.10 ⁶
Gamme masses	160-1000 Th

^a Le débit du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires.

^b Résolution $m/\Delta m$, fwhm à m/z 200 Th.

4. Traitement des résultats

Les pics chromatographiques sont intégrés automatiquement par l'application Quanbrowser du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). La formation d'adduits chlorure, formiate et formiate d'ammonium est observée pour les quatre composés à doser. Ainsi, les composés sont quantifiés à partir de l'aire des pics formés par leur ion quasi-moléculaires et leurs adduits, au temps de rétention attendu (**Tableau 76**).

Tableau 76. Caractéristiques des ions utilisés pour la quantification des composés d'intérêt.

	m/z	Masse exacte théorique	Ion quasi-moléculaire [M-H] ⁻	Adduits Masse exacte et ion correspondant	Temps de rétention (min)
AG-Glc	331	331,0671	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀ ⁻	367,0450 [M+Cl] ⁻	1,1
				394,0639 [M+NH ₄ CO ₂] ⁻	
				402,0971 [M+Cl] ⁻	
ILA-Glc	366	366,1194	C ₁₇ H ₂₀ O ₈ N ⁻	412,1262 [M+HCOO] ⁻	4,8
				429,1165 [M+NH ₄ CO ₂] ⁻	
<i>Epi</i> -DPA-Glc	443	443,1923	C ₂₁ H ₃₁ O ₁₀ ⁻	479,1704 [M+Cl] ⁻	3,2
				506,1895 [M+NH ₄ CO ₂] ⁻	
				485,0872 [M+Cl] ⁻	
Astilbine	449-1	449,1089	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	495,1160 [M+HCOO] ⁻	5,7
				512,1058 [M+NH ₄ CO ₂] ⁻	
H3MP-Glc	293-1	293,1242	C ₁₂ H ₂₁ O ₈ ⁻	329,1020 [M+Cl] ⁻	3,4
H4MP-Glc	293-2			351,0831 [M+HCOO] ⁻	3,6

5. Validation de la méthode de quantification

La méthode de quantification est validée par l'étude de sa sensibilité, de sa linéarité, de sa spécificité, de sa répétabilité et de sa justesse.

a) Sensibilité

De la même manière qu'au chapitre 4, la sensibilité de la méthode LC-FTMS a été déterminée suivant l'approche décrite par De Paepe *et al.* (De Paepe *et al.*, 2013). L'IDL est déterminé à 2 µg/L dans cette étude, dans les macérats de raisin et dans les vins. La LOD et la LOQ ont été évaluées en considérant les concentrations des macérats exprimées en masse d'extrait sec d'une partie de la grappe par litre (soit 13,74 g de pellicules/L ; 45,8 g de pulpes/L ; 7,82 g de pépins/L ; 4,44 g de rafles/L) et le facteur de dilution utilisé pour la préparation des échantillons de chaque matrice (facteur dix pour les vins et les macérats de raisins). Ces données sont présentées dans le **Tableau 77**.

Tableau 77. Paramètres de validation de la sensibilité de la méthode de quantification pour les quatre composés d'intérêt, dans les vins et le raisin.

Matrice	Sensibilité			
	IDL (µg/L)	IQL (µg/L)	LOD	LOQ
VB	2	4	20 µg/L	40 µg/L
VR	2	4	20 µg/L	40 µg/L
Macérat de pellicules	2	4	1,46 µg/g de pellicules	2,92 µg/g de pellicules
Macérat de pulpe	2	4	0,44 µg/g de pulpe	0,88 µg/g de pulpe
Macérat de pépins	2	4	2,56 µg/g de pépins	5,12 µg/g de pépins
Macérat de rafles	2	4	4,5 µg/g de rafles	9 µg/g de rafles

b) Linéarité

Sur la base des études précédentes, nous avons choisi de travailler dans des concentrations s'étalant de l'IQL jusqu'à 10 mg/L. Une courbe de calibration a été établie par le relevé des aires de chaque concentration en fonction de leur concentration nominale. La linéarité a été évaluée par les coefficients de corrélation (R^2) obtenus par régression linéaire (**Tableau 78**). Pour tous les composés, des coefficients de corrélations supérieurs à 0,998 ont été obtenus pour les macérats comme pour les vins.

c) Répétabilité

Pour évaluer la répétabilité, la précision intra-journalière a été déterminée par l'injection successive de 5 réplicats de trois solutions de calibration (50 µg/L, 500 µg/L et 2 mg/L) et le coefficient de variation (CV) est calculé. Celui-ci est inférieur à 5 % pour les trois concentrations (**Tableau 78**) et pour chaque composé. La répétabilité de la méthode est ainsi prouvée.

d) Justesse

La justesse a été évaluée en calculant le ratio de recouvrement entre l'aire mesurée et l'aire attendue en théorie pour un échantillon de macérat (M-1), un vin rouge (VR-C-1) et un vin blanc (VB-C-1) dans lesquels un ajout dosé de 100 µg/L, 500 µg/L et 2 mg/L des composés d'intérêt a été réalisé. Les ratios de recouvrement sont supérieurs à 88 % pour les trois concentrations, ce qui suggère que les effets de la matrice sont négligeables (**Tableau 78**). Ainsi, ces résultats démontrent la justesse de la méthode.

e) Spécificité

La spécificité de l'Orbitrap a été évaluée par la précision de mesure des masses et la répétabilité des temps de rétention. Ces paramètres ont été vérifiés au cours de chaque analyse. La **Figure 68** présente les chromatogrammes d'ions extraits des quatre composés dosés dans un vin rouge et dans les différents macérats, ainsi que leur temps de rétention. Les analyses ont révélé de très faibles variations de temps de rétention ($< 0,03$ min) et une précision de mesure de masse inférieure à 4 ppm pour différentes concentrations en composés d'intérêt (**Tableau 78**). Ainsi, la spécificité de la méthode est garantie.

Tous ces résultats permettent de valider la méthode de quantification des composés d'intérêt par LC-FTMS dans les macérats des constituants de raisins et dans les vins.

Figure 68. TIC et XIC des ions quasi-moléculaires des composés m/z 331, 366, 443 et 449-1 (de haut en bas), en ionisation négative, dans un échantillon de vin rouge et dans les macérats de pépins, de pulpe, de pellicules et de rafles (de gauche à droite).

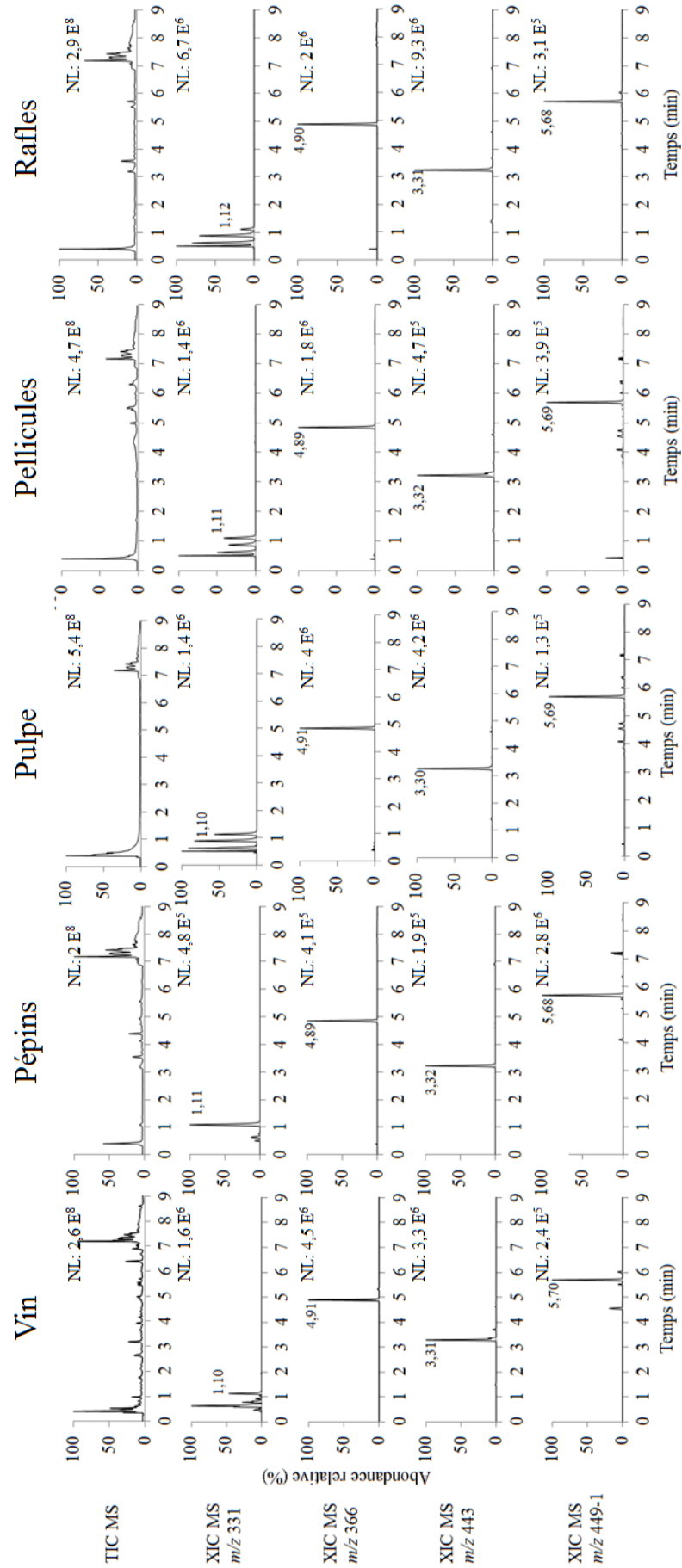


Tableau 78. Paramètres de validation de la méthode de quantification des composés d'intérêt dans les vins et dans les macérats des parties du raisin (linéarité, spécificité, répétabilité et justesse).

m/z	Spécificité			Répétabilité et justesse							
	Matrice	Linéarité	R ²	Variation tr	Précision de mesure de la masse ^a	Répétabilité intra- journalière			Recouvrement		
		Gamme de linéarité				50 µg/L	500 µg/L	2 mg/L	100 µg/L	500 µg/L	2 mg/L
331	VB	2 µg/L-10 mg/L	0,999	0,02 min	3,1 ppm	4,5 %	4,4 %	4,4 %	92 %	88 %	89 %
	VR	2 µg/L-10 mg/L	0,998	0,02 min	3 ppm	1,7 %	2,9 %	1,5 %	91 %	98 %	97 %
	Macérat	2 µg/L-10 mg/L	0,999	0,02 min	3,2 ppm	1,0 %	1,3 %	2,1 %	93 %	97 %	95 %
366	VB	2 µg/L-10 mg/L	0,999	0,03 min	3,7 ppm	1,0 %	1,8 %	1,1 %	91 %	98 %	97 %
	VR	2 µg/L-10 mg/L	0,999	0,03 min	3 ppm	1,9 %	1,0 %	3,3 %	88 %	90 %	99 %
	Macérat	2 µg/L-10 mg/L	0,999	0,03 min	3,7 ppm	0,9 %	0,6 %	1,5 %	90 %	91 %	93 %
443	VB	2 µg/L-10 mg/L	0,998	0,02 min	2 ppm	0,4 %	1,4 %	1,1 %	92 %	88 %	90 %
	VR	2 µg/L-10 mg/L	0,998	0,02 min	1,6 ppm	1,5 %	0,3 %	1,6 %	92 %	99 %	95 %
	Macérat	2 µg/L-10 mg/L	0,998	0,02 min	1,9 ppm	0,6 %	1,3 %	2,1 %	92 %	94 %	97 %
449-1	VB	2 µg/L-10 mg/L	0,999	0,03 min	2 ppm	0,8 %	1,7 %	0,6 %	91 %	93 %	94 %
	VR	2 µg/L-10 mg/L	0,999	0,03 min	2,5 ppm	2,5 %	0,7 %	1,4 %	99 %	93 %	97 %
	Macérat	2 µg/L-10 mg/L	0,999	0,03 min	1,7 ppm	1,0 %	0,3 %	2,2 %	95 %	94 %	93 %

^a La masse expérimentale utilisée pour la détermination de la précision de mesure de masse correspond à la masse moyenne mesurée sur toute la largeur du pic chromatographique des composés d'intérêt. La valeur donnée dans le tableau correspond à la déviation maximum observée sur l'ensemble des concentrations de la gamme de calibration.

II. Application de la méthode à l'analyse des composés identifiés dans la baie de raisin

A. Origine et préparation des macérats de raisins analysés

Plusieurs grappes de raisins de cépage Merlot à maturité, de taille et de poids similaires, ont été sélectionnées dans une propriété de l'appellation de Saint-Emilion lors du millésime 2016. Les quatre parties constitutives de chaque grappe ont été séparées manuellement, et protégées de l'oxydation et de la lumière. Ainsi, la rafle, la pellicule, la pulpe et les pépins de chaque grappe ont été séparés. Les différentes parties de chaque grappe ont été lyophilisées pendant 4 jours afin d'obtenir leur masse d'extrait sec (**Tableau 79**).

Tableau 79. Masses d'extrait sec des différentes parties de la grappe après lyophilisation.

	Rafles	Pellicules	Pulpe	Pépins
Masse (g) $\pm\sigma$	2,22 \pm 0,38	6,87 \pm 1,33	22,90 \pm 3,51	3,91 \pm 1,04

σ : écart type.

Chaque partie a été placée pendant 3 jours à température ambiante dans 500 mL d'une macération hydro-éthanolique : 50/50 à pH 3,5 afin d'extraire les composés d'intérêt. Ces expérimentations ont été réalisées en triplicat. Les concentrations des macérats seront exprimées en $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de grappe ou par partie de la grappe de raisin.

B. Résultats et discussion

Dans un premier temps, l'interprétation des résultats met en évidence les quantités totales de composés extraits lors des macérations (**Figure 69**). En outre, l'AG-Glc et l'*epi*-DPA-Glc sont présents dans des quantités équivalentes, soit respectivement 208 et 234 $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de grappe, alors que les quantités d'ILA-Glc s'élèvent à plus du double (490 $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de grappe). Enfin, l'astilbine est présente en quantités quatre fois supérieures à celles de l'AG-Glc, soit 850 $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de grappe. Les quantités d'H3MP-Glc et d'H4MP-Glc exprimées en équivalent d'AG-Glc, permettent uniquement de conclure quant à leur proportion relative l'une par rapport à l'autre. De cette manière, H3MP-Glc est présent en quantité deux fois plus grande que H4MP-Glc, soit, respectivement, 26 et 12 μg d'équivalent Ag-Glc /g d'extrait sec de grappe.

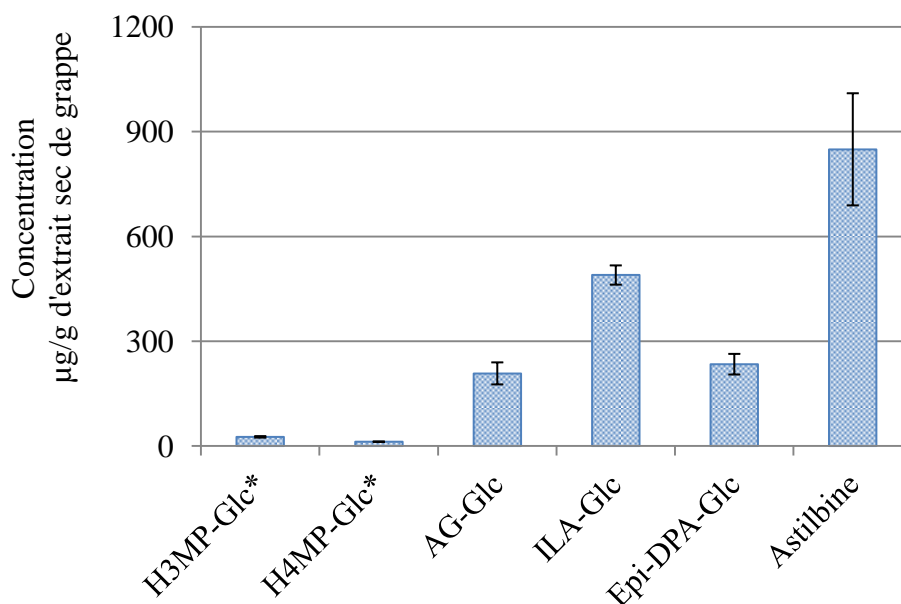


Figure 69. Concentrations totales des composés sucrés dans les macérations, exprimées en $\mu\text{g/g}$ d'extrait sec de grappe (pellicules, pépins, pulpe et rafles).

* Teneurs exprimées en μg d'équivalent AG-Glc/g d'extrait sec.

Dans un second temps, le calcul des concentrations dans chaque partie de la grappe de raisin, permet de localiser les composés sucrés dans ces différentes parties (**ANNEXE 17-A**).

De cette manière on observe que les isomères H3MP-Glc et H4MP-Glc sont présents en grande quantité dans les pépins et les rafles. L'AG-Glc est lui présent majoritairement dans les pépins. Les quantités d'ILA-Glc sont réparties de manière équivalente entre les différentes parties de la grappe de raisin. L'*epi*-DPA-Glc est présent principalement dans les pellicules et les rafles, alors que l'astilbine est majoritairement présent dans les rafles, comme l'illustre la **Figure 70**.

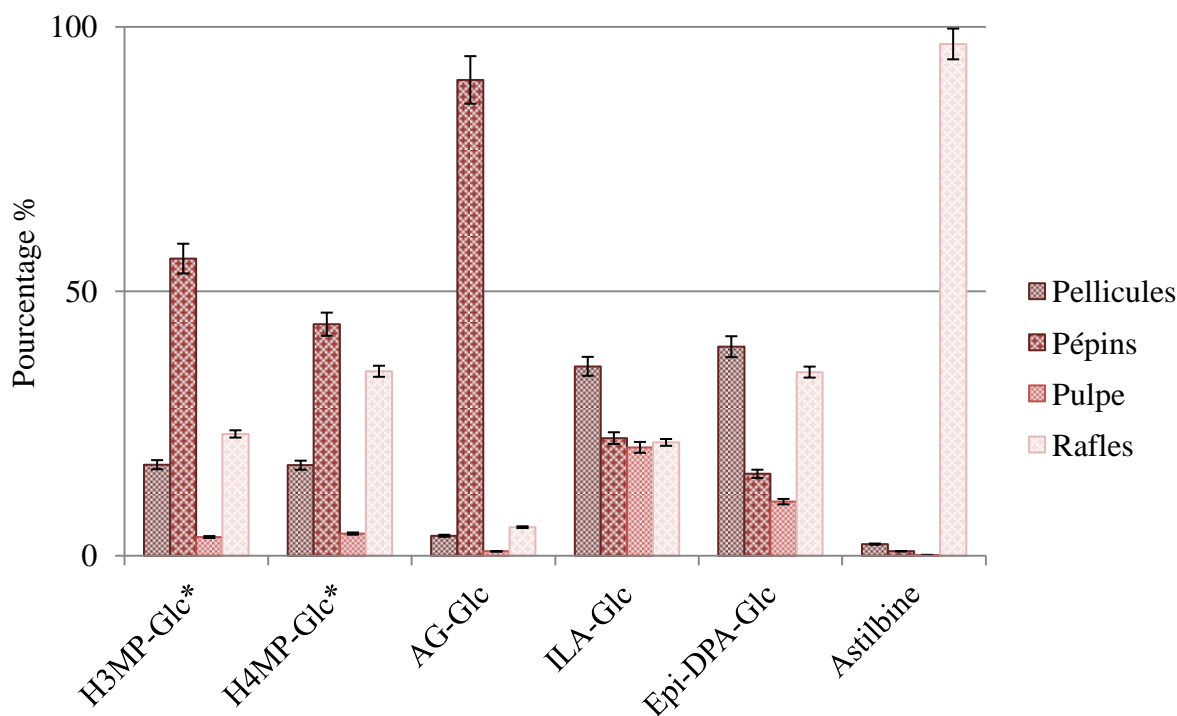


Figure 70. Localisation des composés sucrés dans les parties de la grappe de raisin (pellicules, pépins, pulpe, rafles), exprimée en pourcentage.

Ainsi, l'AG-Glc est extrait à 90 % des pépins de raisins. Les isomères, H3MP-Glc et H4MP-Glc, dont les teneurs sont calculées en équivalent d'AG-Glc, sont également principalement présents dans les pépins (respectivement, 56 et 44 %), puis les rafles (23 et 35 %) et la pellicule (17 et 17 %). L'ILA-Glc est observé majoritairement dans les pellicules (35 %) puis dans les trois autres parties de la grappe à parts égales (~20 % chacune). Les quantités les plus élevées d'*epi*-DPA-Glc sont mesurées dans les pellicules (39,5 %) ainsi que dans la rafle (35 %) et, plus minoritairement, dans les pépins (15,5 %) et la pulpe (10 %). Enfin, l'astilbine est présente en quantité très importante dans la rafle (97 % de la quantité totale extraite d'une grappe) (ANNEXE 17-B). Ce résultat est cohérent avec des travaux antérieurs établissant l'astilbine comme le flavanonol majoritaire de la rafle (Souquet *et al.*, 2000).

Ces résultats mettent en évidence la présence de composés sucrés en quantité non négligeable dans la rafle. Toutefois, la rafle est également connue pour apporter des arômes végétaux (Hashizume *et al.*, 1997 ; Boulton *et al.*, 2013 ; Pascual *et al.*, 2016), de l'amertume et de l'astringence (Arnold *et al.*, 1980 ; Noble, 1994 ; Souquet *et al.*, 2000 ; Vidal *et al.*, 2004).

De cette manière, la seule présence de composés sucrés dans la rafle ne justifie pas son utilisation. A l'exception de certaines vinifications conservant traditionnellement la rafle, comme en Bourgogne, en Beaujolais ou dans la Vallée du Rhône, celle-ci est en effet retirée avant le remplissage des cuves. Par conséquent, les composés sapides retrouvés dans les vins étudiés dans ce travail ne proviennent pas de la rafle ; sa contribution ne sera pas prise en compte dans les résultats présentés plus bas.

L'interprétation des résultats, en excluant les quantités présentes dans la rafle, montre que les teneurs extraites lors des macérations ne varient pas sensiblement, excepté pour les teneurs en astilbine qui diminuent de 90 % (**Figure 71** et **ANNEXE 17-C**).

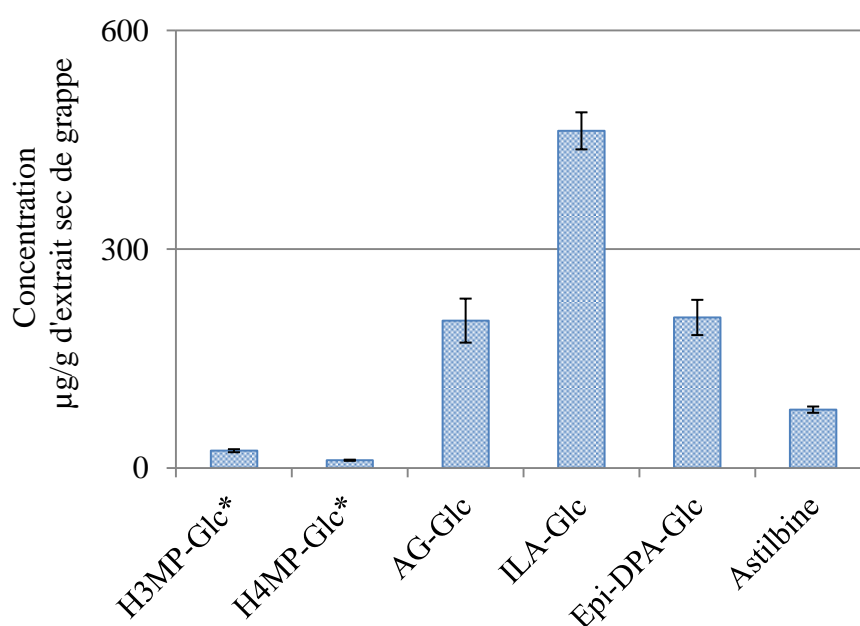


Figure 71. Concentrations totales des composés sucrés dans les macérations, exprimées en µg/g d'extrait sec de grappe (pellicules, pépins, pulpe).

* Teneurs exprimées en µg d'équivalent AG-Glc/g d'extrait sec de grappe.

La **Figure 72** représente la présence relative des composés dans chaque partie de la grappe de raisin : pellicules, pépins et pulpe.

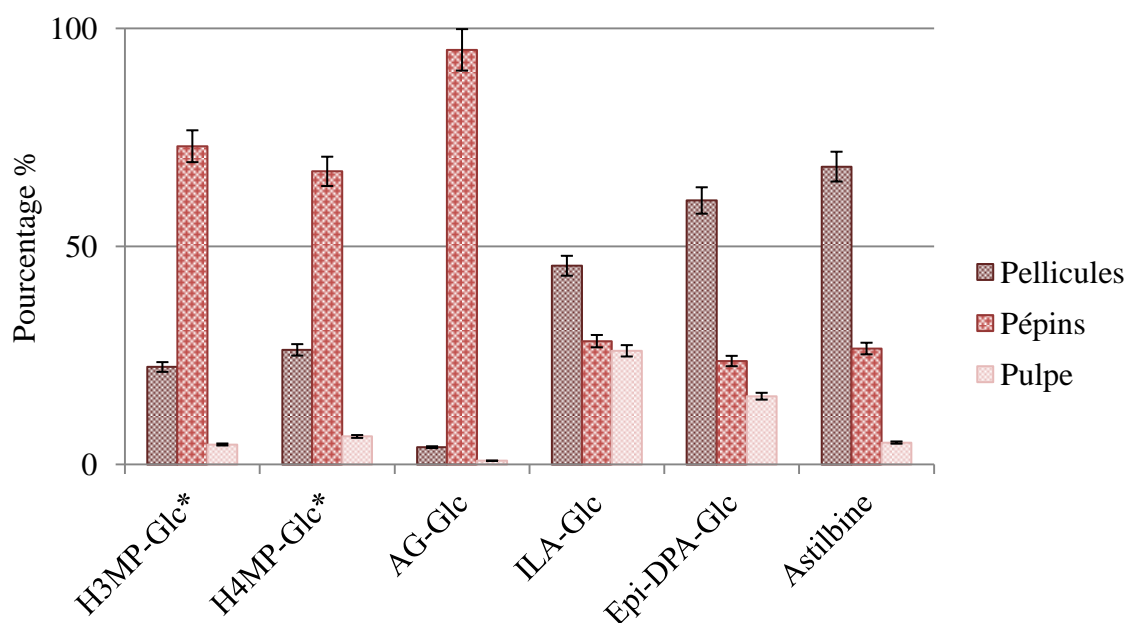


Figure 72. Localisation des composés dans les différentes parties de la grappe de raisin (pellicules, pépins, pulpe), exprimée en pourcentage.

De cette manière, les résultats montrent que la pulpe contient une faible part de la teneur totale en ces composés, sauf pour l'ILA-Glc (26 %) et l'*epi*-DPA-Glc (16 %). En revanche, l'AG-Glc, le H3MP-Glc et le H4MP-Glc sont essentiellement situés dans le pépin, alors que l'ILA-Glc, l'*epi*-DPA-Glc et l'astilbine sont majoritairement localisés dans les pellicules et dans une moindre mesure dans les pépins (ANNEXE 17-D et **Figure 72**).

Les composés sucrés étudiés dans cette partie ont été purifiés à partir d'extraits de pépins, excepté pour l'astilbine, purifié à partir d'un vin. Toutefois, l'étude de leur localisation dans les différentes parties de la grappe de raisin met également en évidence leur présence dans les autres parties de la grappe, principalement la pellicule. Cependant, l'AG-Glc semble lui être assez spécifique du pépin de raisin (95 % de la quantité totale).

III. Application de la méthode à l'analyse des vins

A. Origine des vins analysés

Les composés sucrés identifiés précédemment ont été dosés dans 46 vins rouges commerciaux (20 du Médoc, 12 du Libournais, 6 des Graves et 8 d'autres régions de France),

38 vins blancs commerciaux (15 des Graves, 5 du Sauternais, 5 de la région Bourgogne, 5 de la région Loire et 8 d'autres régions françaises) et 12 vins rouges issus des expérimentations menées au chai et au laboratoire (chapitre 6 et 7). Les millésimes s'étendent de 1981 à 2015.

B. Quantification des composés purifiés dans les vins commerciaux

1. Résultats du dosage de l'AG-Glc (m/z 331)

L'AG-Glc est dosé pour la première fois dans le vin. Ses concentrations sont faibles dans les vins rouges, comprises entre 0 et 1,03 mg/L, avec une valeur moyenne de 80 $\mu\text{g/L}$ et une médiane à 30 $\mu\text{g/L}$ (**Tableau 80**).

Tableau 80. Concentrations en AG-Glc dans des vins rouges commerciaux ($\mu\text{g/L}$).

	Moyenne $\pm \sigma$	Minimum	1 ^{er} quartile	Médiane	3 ^{ème} quartile	Maximum
Vin rouge	80 \pm 190	0	20	30	60	1030

σ : écart-type.

Par ailleurs, les teneurs en AG-Glc dans les vins blancs commerciaux quantifiés dans ce travail sont nulles (**ANNEXE 18**), ce qui est cohérent avec la localisation majoritaire de cette molécule dans les pépins.

2. Résultats du dosage des isomères H3MP-Glc* (m/z 293-1) et H4MP-Glc* (m/z 293-2)

Une quantification relative des isomères H3MP-Glc et H4MP-Glc a été réalisée et les teneurs sont exprimées en équivalent d'AG-Glc. De cette manière il est possible d'observer des concentrations moyennes plus élevées dans les vins rouges que dans les vins blancs (**Tableau 81**).

Tableau 81. Concentrations en H3MP-Glc et H4MP-Glc dans des vins rouges et blancs commerciaux.

	Moyenne $\pm \sigma$	Min.	1 ^{er} quartile	Médiane	3 ^{ème} quartile	Max.	
VR	H3MP-Glc*	2,27 \pm 0,87	0,19	1,77	2,38	2,88	3,57
	H4MP-Glc*	0,73 \pm 0,25	0,18	0,60	0,72	0,86	1,23

VB	H3MP-Glc*	0,92 ± 1,1	0,12	0,24	0,48	1,24	4,35
	H4MP-Glc*	0,42 ± 0,64	0,12	0,25	0,28	0,38	3,27

* Teneurs exprimées en mg/L d'équivalent AG-Glc

σ : écart-type.

VR : Vin rouge ; VB : Vin blanc ; Min. : Minimum ; Max. : Maximum.

Par ailleurs, H3MP-Glc est présent en quantités trois fois supérieures à son isomère H4MP-Glc dans les vins rouges, soit 2,27 mg/L et 0,73 mg/L, respectivement. Les mêmes tendances sont observées pour les vins blancs, où les teneurs de l'isomère H3MP-Glc représentent le double de celles d'H4MP-Glc, soit 0,92 et 0,42 mg/L, respectivement. Ces résultats rejoignent les données obtenues précédemment dans les raisins, avec une plus grande abondance de l'isomère H3MP-Glc.

3. Résultats du dosage de l'ILA-Glc (*m/z* 366)

Les teneurs en ILA-Glc s'élèvent en moyenne à 12,6 mg/L dans les vins rouges et présentent de fortes variations selon les vins (de 0,18 à 36,03 mg/L), traduites par un écart type élevé (**Tableau 82**). Ces résultats sont cohérents avec les teneurs présentées par Fabre *et al.* (2014), bien que les valeurs maximales observées ici soient plus basses.

Les teneurs en ILA-Glc dans les vins blancs sont déterminées pour la première fois et s'élèvent en moyenne à 6,97 mg/L avec des valeurs variant de 0,58 à 15,59 mg/L (**ANNEXE 18**).

Tableau 82. Concentrations en ILA-Glc dans des vins rouges et blancs commerciaux (mg/L).

	Moyenne ± σ	Minimum	1 ^{er} quartile	Médiane	3 ^{ème} quartile	Maximum
Vin rouge	12,60 ± 10,62	0,18	3,32	11,34	21,46	36,03
Vin blanc	6,97 ± 4,68	0,58	2,25	7,19	10,28	15,59

σ : écart-type.

4. Résultats du dosage de l'*epi*-DPA-Glc (*m/z* 443)

L'*epi*-DPA-Glc est également dosé pour la première fois dans les vins. Les concentrations moyennes ont été calculées, respectivement, à 8,37 et 4,62 mg/L dans les vins rouges et les vins blancs commerciaux (**Tableau 83** et **ANNEXE 18**). Les teneurs en *epi*-DPA-Glc varient de 4,67 à 15,65 mg/L dans les vins rouges. Bien que les teneurs mesurées dans les vins blancs soient globalement plus faibles, la valeur la plus élevée a été trouvée dans

un Sauternes (15,80 mg/L). Cela pourrait s'expliquer par les phénomènes de déshydratation des raisins impliqués dans l'élaboration des vins liquoreux de pourriture noble (diminution du volume de 60 % environ selon Thibon *et al.* (2009)) et d'éventuelles modifications du métabolisme de la baie induites par le développement de *Botrytis cinerea*.

Tableau 83. Concentrations en *epi*-DPA-Glc dans des vins rouges et blancs commerciaux (mg/L).

	Moyenne \pm σ	Minimum	1 ^{er} quartile	Médiane	3 ^{ème} quartile	Maximum
Vin rouge	8,37 \pm 2,69	4,67	6,43	7,87	9,47	16,65
Vin blanc	4,62 \pm 3,18	1,79	2,67	3,76	5,16	15,80

σ : écart-type.

5. Résultats du dosage de l'astilbine (*m/z* 449-1)

Dans les vins rouges, les concentrations en astilbine s'élèvent en moyenne à 4,75 mg/L et varient de 0,46 à 41,32 mg/L dans les vins rouges. La même gamme de teneurs est observée dans les vins blancs avec une moyenne de 4,69 mg/L mais avec une plus grande dispersion (de 0,14 à 51,38 mg/L) (**Tableau 84** et **ANNEXE 18**). Ces résultats sont cohérents avec les données reportées par Landrault *et al.* (2002), entre 0,77 et 15,13 mg/L.

Tableau 84. Concentrations en astilbine dans les vins rouges et blancs commerciaux (mg/L).

	Moyenne \pm σ	Minimum	1 ^{er} quartile	Médiane	3 ^{ème} quartile	Maximum
Vin rouge	4,75 \pm 7,73	0,46	1,67	3,00	4,43	41,32
Vin blanc	4,69 \pm 11,28	0,14	0,64	1,52	3,81	51,38

σ : écart-type.

C. Quantification des composés purifiés dans les vins issus des expérimentations

Le dosage des composés purifiés a été réalisé dans les vins issus des microvinifications décrites dans la partie II (**Tableau 85**).

Tableau 85. Concentrations des composés sucrés dans les vins issus des expérimentations de microvinification de la partie II.

H3MP-Glc*	H4MP-Glc*	AG-Glc	ILA-Glc	<i>Epi</i> -DPA-Glc	Astilbine
-----------	-----------	--------	---------	---------------------	-----------

Merlot Témoin (MT)	2,54	0,87	1,24	31,28	6,68	25,63
Merlot Epépiné (ME)	1,70	0,65	0,16	61,83	5,65	29,97
Cabernet-Sauvignon Témoin (CST)	6,95	2,42	1,30	87,15	9,41	4,98
Cabernet-Sauvignon Epépiné (CSE)	5,04	1,86	0,56	108,71	7,64	6,12

* Teneurs exprimées en mg/L d'équivalent AG-Glc.

De manière générale, les teneurs moyennes en H3MP-Glc, H4MP-Glc, AG-Glc et *epi*-DPA-Glc sont plus élevées dans les vins issus des modalités « témoin » (MT et CST) que des vins issus des modalités « épépinés » (ME et CSE). A l'inverse, les teneurs en ILA-Glc sont plus élevées dans les vins issus de raisins épépinés que dans les vins « témoin » pour les deux cépages étudiés.

D. Discussion

Il est intéressant de noter que les abondances moyennes relatives des différentes molécules sont similaires dans les vins rouges et dans les raisins, à l'exception de l'AG-Glc dont les concentrations sont nettement plus faibles qu'attendu dans les vins tandis qu'elles sont proches de celles de l'*epi*-DPA-Glc dans les raisins (**Figure 73**).

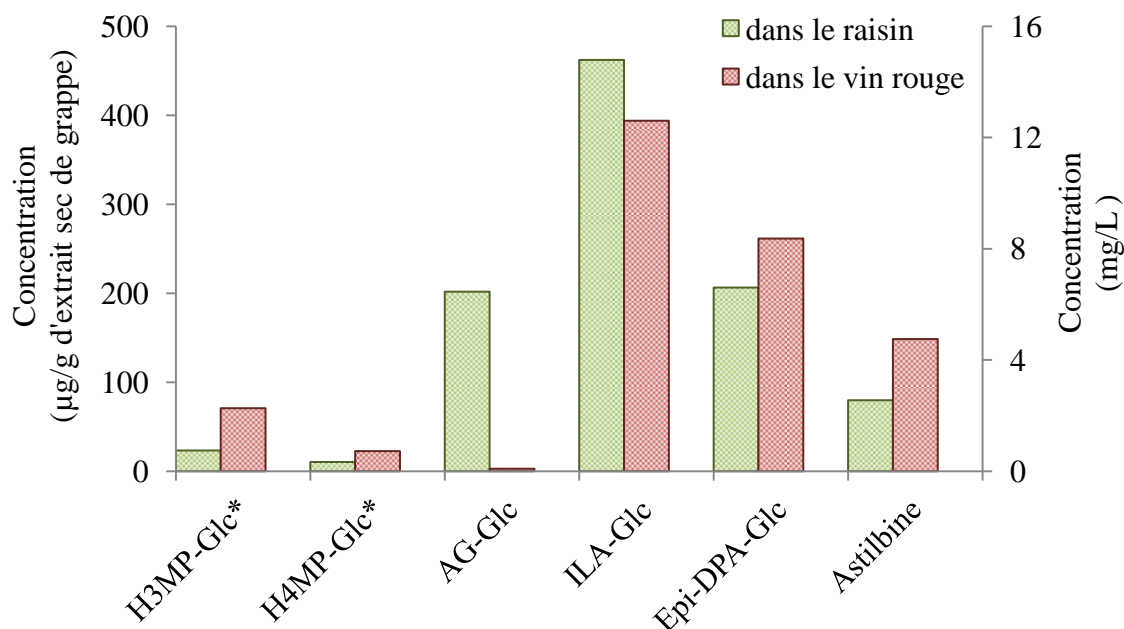


Figure 73. Comparaison des proportions relatives des composés d'intérêt dans le raisin et dans les vins rouges.

Cette observation pourrait s'expliquer par une extractibilité différentielle des deux molécules, en lien avec la localisation principale de l'AG-Glc dans les pépins. Par ailleurs, il est également possible que ce composé soit modifié lors de réactions chimiques se déroulant dans les vins. Ces hypothèses devront être étudiées en dosant les molécules sapides dans des raisins, puis dans les moûts et les vins qui en sont issus, tout au long du processus de vinification.

La quantification des composés sucrés, AG-Glc, H3MP-Glc, H4MP-Glc, ILA-Glc et *epi*-DPA-Glc, dans les vins blancs commerciaux, montre en moyenne des teneurs plus basses que dans les vins rouges. Or, dans la vinification en blanc, l'extraction est pré-fermentaire ; elle se déroule pendant une durée courte et en phase aqueuse, lors du pressurage. Il est donc vraisemblable que les composés localisés majoritairement dans le pépin soient moins extraits et que leurs teneurs soient plus faibles dans ce type de vin.

La quantification dans les vins obtenus à partir des micro-vinifications réalisées au laboratoire est en partie cohérente avec le dosage de ces composés dans les différentes parties de la baie. En effet, H3MP-Glc, H4MP-Glc, AG-Glc et dans une moindre mesure l'*epi*-DPA-Glc sont en grande partie extraits des pépins, il est donc cohérent d'en observer des teneurs plus élevées dans les vins ayant été vinifiés en présence des pépins. Il est en revanche plus surprenant d'observer des teneurs en ILA-Glc et en astilbine plus élevées dans les vins vinifiés sans pépin. Il est possible que des composés libérés par les pépins réagissent avec ces composés, entraînant la diminution de leur concentration. Ces observations devront être répétées et l'étude de la réactivité de ces molécules pourrait alors permettre d'en donner une explication.

Lors de l'application de la méthode de quantification, les vins obtenus lors des expérimentations de MPFC décrites au chapitre 5 n'étaient plus disponibles et n'ont pas pu être analysés. Toutefois, à la lumière d'injections réalisées préalablement et de la mesure des aires des pics correspondants aux composés étudiés, il ne semble pas que les teneurs de ces derniers varient beaucoup pendant la MPFC. Ces données semblent surprenantes, mais restent à préciser en reproduisant des expérimentations de MPFC et en appliquant l'analyse quantitative aux vins obtenus.

L'AG-Glc est observé pour la première fois dans les vins, à des concentrations qui demeurent toutefois faibles. Compte tenu de l'intensité modérée de la saveur sucrée perçue lors d'un ajout de 10 mg/L de cette molécule, il semble qu'elle ne joue pas de rôle significatif dans le goût des vins secs. La détermination de son seuil de détection permettrait de confirmer cette hypothèse. Toutefois, de nombreux isomères de cette molécule sont visibles sur le XIC

en ionisation négative de l'échantillon de vin, à des temps de rétention compris entre 0,5 et 1 minute (**Figure 68**). Leur purification permettrait d'étudier leurs propriétés sensorielles et leur éventuelle contribution gustative. Les XIC des macérats obtenus à partir des grappes montrent en outre que ces isomères de l'AG-Glc sont essentiellement libérés par la pulpe, les pellicules et les rafles, alors que les pépins ne libèrent que de l'AG-Glc.

L'ILA-Glc, l'*epi*-DPA-Glc et l'astilbine sont mesurés, dans certains vins, à des teneurs supérieures à 10 mg/L, concentration à laquelle ils apportent un supplément de saveur sucrée à une solution hydro-alcoolique ou à un vin. Ces résultats suggèrent fortement leur contribution au goût sucré des vins secs. Là aussi, l'obtention par purification ou par synthèse de plus grandes quantités de ces molécules, suivie de la détermination de leur seuil de détection, permettra de préciser l'ampleur de cette contribution.

Des analyses quantitatives doivent également être réalisées sur un plus vaste échantillonnage de vins issus de différents cépages, de différentes régions et résultant de modes de vinifications variés, afin de mieux comprendre leurs effets sur les teneurs en composés sucrés identifiés dans ce travail.

Conclusion

Des composés sucrés du vin et provenant du raisin ont été recherchés par le développement d'une méthode de fractionnement et de purification de macérations de pépins, guidé par la gustatométrie. Ce protocole a permis l'identification de cinq composés à saveur douce dans les pépins : AG-Glc, ILA-Glc, *epi*-DPA-Glc ainsi que deux nouveaux composés dont le mélange a été perçu sucré, H3MP-Glc et H4MP-Glc.

Dans un second temps, la recherche de composés sucrés a également été entreprise par un protocole du même type, appliqué directement à du vin rouge. De cette manière, deux composés identifiés dans le pépin ont également été mis en évidence dans le vin. Il s'agit de l'ILA-Glc et de l'*epi*-DPA-Glc. Par ailleurs, la douceur de l'astilbine, un flavanonol, a été mise en évidence dans les vins et ouvre de nouvelles voies dans la recherche de composés du vin à saveur sucrée.

Afin d'évaluer l'incidence gustative de ces composés dans les vins, une méthode de quantification par LC-FTMS a été développée. Les composés d'intérêt ont ainsi été dosés dans plusieurs types de vins. Leur quantification dans les différentes parties de la grappe de raisin a également permis l'obtention d'informations supplémentaires quant à leur localisation. De cette manière, l'AG-Glc, l'H3MP-Glc et l'H4MP-Glc ont principalement été mis en évidence dans le pépin, alors que l'ILA-Glc, l'*epi*-DPA-Glc et l'astilbine sont majoritairement présents dans les pellicules et dans une moindre mesure dans les pépins voire la pulpe. La comparaison des teneurs en *epi*-DPA-Glc, en astilbine et en ILA-Glc dans les vins avec les concentrations de dégustation utilisées pour leur caractérisation gustative ont permis d'en suggérer l'influence sur le goût du vin. Cependant, il sera nécessaire de le démontrer sans ambiguïté en déterminant leurs seuils de détection.

L'étude complémentaire des teneurs en H3MP-Glc, H4MP-Glc, AG-Glc, ILA-Glc, *epi*-DPA-Glc et en astilbine au cours de la maturation des baies permettrait une meilleure compréhension des phénomènes de régulation de leur biosynthèse. Le rôle de différents paramètres viticoles, tels que le cépage, le millésime ou d'autres pratiques culturales, sur les teneurs de ces composés sucrés doit être précisé afin de déterminer les conditions favorables à leur accumulation dans la baie de raisin. Par ailleurs, il est nécessaire d'étudier les modalités de leur extraction au cours de la cuvaison et leur réactivité chimique pour établir les conditions de vinification influençant leurs teneurs et comprendre leur évolution au cours du temps.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La révélation d'un goût complexe, agréable et relié à un lieu donné constitue l'objectif majeur des vinificateurs de grands vins. Or, comme l'écrivait Emile Peynaud, « le vin n'est pas tout le raisin ; il n'en représente que la meilleure part ». La vinification ne consiste donc pas en une extraction exhaustive des constituants du raisin mais fait appel à la sensibilité du vinificateur, dont les choix doivent permettre un équilibre judicieux des odeurs et des saveurs du vin. Depuis des décennies, la recherche en œnologie a pour objectif de comprendre les mécanismes complexes de la transformation du raisin en vin, et notamment d'identifier les déterminants moléculaires des arômes et des goûts. En effet, leur connaissance et leur mesure permettent de traduire, de manière quantifiable, les conséquences des pratiques de vinification et ainsi d'aider les vinificateurs à atteindre les objectifs qu'ils se sont fixés. L'équilibre gustatif, s'articulant autour des saveurs acide, amère et sucrée, est l'une des caractéristiques fondamentales de la qualité du vin. En dépit de son importance sensorielle, ses bases moléculaires n'ont été que partiellement étudiées pour l'amertume et la saveur sucrée.

Le premier axe de cette thèse a consisté en l'étude de la contribution des lignanes du bois de chêne au goût du vin. En effet, un lignane, le (\pm)-lyonirésinol, a récemment été décrit comme présentant une amertume intense. L'utilisation d'une approche de criblage ciblée par LC-FTMS a permis d'isoler plusieurs dérivés et analogues du lyonirésinol, et leur structure moléculaire a été déterminée par RMN. Neuf molécules ont été ainsi identifiées. Un composé, le quercorésinol ou lyonirésinol 9-*O*-gallate, a été décrit pour la première fois. Quatre lignanes n'avaient jamais été observés dans le genre *Quercus* et, au total, neuf molécules ont été détectées pour la première fois dans le vin. Leur caractérisation sensorielle a révélé plusieurs composés amers, sans toutefois établir de lien évident entre leur structure chimique et leurs propriétés organoleptiques. Une analyse quantitative a toutefois montré que le lyonirésinol est à la fois le lignane le plus amer et le plus abondant du bois de chêne. Bien qu'aucun analogue structural à fort potentiel gustatif n'ait pu être identifié, les résultats de cette étude ont permis de mieux connaître la diversité chimique des lignanes du bois de chêne. Dans un second temps, l'étude des stéréoisomères du lyonirésinol a mis en évidence un diastéréoisomère, l'*epi*-lyonirésinol, gustativement peu actif. Les énantiomères du lyonirésinol ont également été séparés et leur configuration absolue a été précisée par dichroïsme circulaire vibrationnel. L'analyse sensorielle a révélé que seule la forme dextrogyre, (8*R*, 8'*R*, 7'*S*)-(+)-lyonirésinol, est amère. La comparaison de son seuil de détection et de ses concentrations dans les vins a permis de démontrer son effet sur le goût du vin, par une augmentation d'amertume. Enfin,

une méthode de quantification des énantiomères a été développée et aucun effet significatif de l'origine botanique ou de l'intensité de la chauffe du bois sur les teneurs en (+)-lyonirésinol n'a été observé. Cependant, ces teneurs varient sensiblement entre différents échantillons de la même espèce et les origines de cette hétérogénéité devront faire l'objet d'études ultérieures afin de mieux maîtriser la contribution amère de l'élevage sous bois.

Ce travail sur l'amertume des lignanes s'inscrit dans le prolongement des recherches effectuées au laboratoire depuis quelques années sur l'effet gustatif du bois de chêne. Or, le goût du vin est certes modulé lors de son élevage, mais il repose également sur les constituants des raisins, libérés et transformés pendant la vinification. Le second axe de cette thèse a donc été consacré à l'étude de l'influence de la macération post-fermentaire à chaud sur la saveur sucrée des vins secs. Des expérimentations ont été mises en place, tant au chai qu'au laboratoire, afin de confirmer l'intuition de certains praticiens notant une augmentation de la sucrosité des vins pendant la macération post-fermentaire. L'hypothèse de la contribution des pépins à ce phénomène a alors été émise. Des expériences de microvinifications ont été réalisées à partir de raisins entiers ou épépinés. La dégustation des vins obtenus après FML a montré une perception moins astringente et plus sucrée dans les vins issus de raisins contenant leurs pépins. Cette approche expérimentale a permis, à l'aide d'outils sensoriels, de démontrer que les vins rouges gagnent en moelleux lors de la cuvaison et que les pépins leur confèrent davantage de saveur sucrée. Toutefois, l'apport gustatif du pépin est vraisemblablement modulé par le niveau de maturité du raisin mais également par les conditions de croissance de la baie. Les conclusions relatives à l'influence bénéfique du pépin doivent donc être nuancées au regard de ces paramètres. Au-delà de l'approche phénoménologique mise en œuvre, une connaissance plus fine des marqueurs responsables des modifications perçues permettrait d'apporter ces nuances.

La dernière partie de cette thèse a ainsi consisté à donner un éclairage moléculaire aux phénomènes sensoriels mis en évidence précédemment. A cette fin, des composés sucrés du vin provenant du raisin ont été recherchés par une approche inductive. Une méthode de fractionnement et de purification de macérations de pépins et de vin guidée par la gustatométrie a été développée. Ce protocole a permis l'identification de cinq composés à saveur douce dans les pépins : le mélange des acides 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (H3MP-Glc) et 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (H4MP-Glc), l'acide gallique-4-*O*- β -glucopyranoside (AG-Glc), l'acide 3-indolyl-(2*R*)-*O*- β -D-glycoside lactique (ILA-Glc), l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside (*epi*-DPA-Glc) et l'astilbine ((2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-

rhamnopyranoside). A notre connaissance, il s'agit de la première identification de l'H3MP-Glc et l'H4MP-Glc. L'*epi*-DPA-Glc est détecté pour la première fois dans le raisin et dans le vin tandis que l'AG-Glc, déjà reporté dans le marc de raisin blanc, n'avait jamais été observé dans le vin. Une méthode de quantification dans des vins et des macérats de raisin a par ailleurs été développée pour les composés identifiés. Leur dosage dans les différentes parties de la grappe de raisin a permis de préciser leur localisation. Ainsi, l'AG-Glc, l'H3MP-Glc et l'H4MP-Glc ont principalement été mis en évidence dans les pépins, alors que l'ILA-Glc, l'*epi*-DPA-Glc et l'astilbine sont majoritairement présents dans les pellicules et dans une moindre mesure dans les pépins voire la pulpe. La comparaison des teneurs en *epi*-DPA-Glc, en astilbine et en ILA-Glc dans les vins avec les concentrations de dégustation utilisées pour leur caractérisation gustative ont permis d'en suggérer l'influence sur le goût du vin. Cependant, il sera nécessaire de le confirmer en déterminant leurs seuils de détection.

Ce travail de thèse a ainsi démontré l'effet de la cuvaison sur la saveur sucrée, mais également l'apport des pépins au moelleux des vins secs. En utilisant diverses techniques de chimie analytique et une méthodologie inductive, il a également permis l'identification des premiers marqueurs de la sucrosité des vins secs provenant des raisins, ce qui ouvre de nombreuses perspectives de recherche.

Un travail sur la connaissance des facteurs viticoles et œnologiques influençant les teneurs en composés sucrés identifiés doit tout d'abord être entrepris. Pour cela, l'étude complémentaire des teneurs en H3MP-Glc, H4MP-Glc, AG-Glc, ILA-Glc, *epi*-DPA-Glc et en astilbine au cours de la maturation des baies permettrait une meilleure compréhension des phénomènes de régulation de leur biosynthèse. Le rôle de différents paramètres viticoles, tels que le cépage, la climatologie ou les pratiques culturales, dans la formation de ces composés sucrés doit être précisé afin de déterminer les conditions favorables à leur accumulation dans la baie de raisin. Par ailleurs, il est nécessaire d'étudier les modalités de leur extraction au cours de la cuvaison et leur réactivité chimique pour établir les conditions de vinification influençant leurs teneurs et comprendre leur évolution au cours du temps. Au-delà d'une meilleure compréhension du fonctionnement de la plante en réaction à son environnement, ces études posséderont une visée pratique et chercheront à transmettre des préconisations aux viticulteurs.

Par ailleurs, les premières analyses effectuées semblent indiquer un effet modéré de la MPFC sur les concentrations des marqueurs. Si cette observation était vérifiée, elle ne contredirait pas pour autant leur rôle dans la saveur sucrée des vins secs mais elle ne pourrait expliquer les différences sensorielles perçues lors de la MPFC. La recherche des déterminants

moléculaires de la sucrosité des vins secs devra donc être poursuivie. Pour cela, plusieurs voies sont possibles. En particulier, un isomère de l'astilbine a été observé dans les chromatogrammes, mais il n'a pas pu être purifié en quantités permettant son identification et sa caractérisation sensorielle. Or, des travaux antérieurs avaient décrit les propriétés édulcorantes d'un stéréoisomère de l'astilbine, et d'autres flavanonols, observés dans différentes espèces végétales, sont également sucrés. Jusqu'à présent, peu de données sont disponibles sur la diversité des composés de cette famille chimique ainsi que sur leurs propriétés sensorielles. L'étude de la contribution gustative des flavanonols devra donc être poursuivie. Par ailleurs, plusieurs isomères de l'AG-Glc ont été observés sur les chromatogrammes des injections LC-FTMS des échantillons de vins et de raisins. L'isolement et l'étude des caractéristiques gustatives de ces isomères doivent également être entrepris. Cette recherche de nouveaux marqueurs moléculaires pourrait être réalisée par criblage ciblé de vins, en recherchant les ions quasi-moléculaires associés à de potentiels dérivés des marqueurs précédemment identifiés, comme cela a été décrit dans la première partie pour les lignanes. Toutefois, une toute autre approche, déductive cette fois, pourrait être employée en faisant appel à la modélisation moléculaire. Celle-ci consiste à calculer l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde afin de former un complexe stable. Il s'agit de la méthode d'amarrage moléculaire (ou « docking »). Compte tenu de la diversité des mécanismes d'interaction avec les récepteurs sucrés, sa mise en œuvre peut être délicate *ab initio*. A présent que le champ des composés sucrés potentiels a été réduit à certaines familles de molécules du vin, cette technique d'amarrage permettrait d'étudier l'association de ces composés et de leurs dérivés au récepteur du sucré T1R2/T1R3. Elle pourrait ainsi être employée en complémentarité avec une approche analytique pour émettre des hypothèses sur de nouveaux composés sapides, dont la synthèse permettrait d'évaluer les caractéristiques sensorielles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

-
- Abe, I., Seki, T., & Noguchi, H. (2000). Potent and selective inhibition of squalene epoxidase by synthetic galloyl esters. *Biochemical and biophysical research communications*, 270(1), 137-140.
- Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, 100(6), 693-702.
- Allen, A. L., McGeary, J. E., & Hayes, J. E. (2014). Polymorphisms in TRPV1 and TAS2Rs Associate with Sensations from Sampled Ethanol. *Alcoholism : Clinical and Experimental Research*, 38(10), 2550-2560.
- Amrani Joutei, K., & Glories, Y. (1995). Tanins et anthocyanes : localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Revue Française d'oenologie*, 153.
- Arevalo-Villena, M., Bartowsky, E. J., Capone, D., & Sefton, M. A. (2010). Production of indole by wine-associated microorganisms under oenological conditions. *Food Microbiology*, 27(5), 685-690.
- Arnold, R. A., & Noble, A. C. (1978). Bitterness and Astringency of Grape Seed Phenolics in a Model Wine Solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29(3), 150-152.
- Arnold, R. A., Noble, A. C., & Singleton, V. L. (1980). Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *J Agric Food Chem*, 28(3), 675-678.
- Arramon, G. (2001). *Les triterpènes et lignanes des bois de chêne européen Quercus robur L. et Quercus petraea Liebl. Quantification et apports qualitatifs aux eaux de vie d'Armagnac.* (Thèse de Doctorat), Université de Bordeaux 2.
- Assadi-Porter, F. M., Aceti, D. J., & Markley, J. L. (2000). Sweetness determinant sites of brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein. *Arch Biochem Biophys*, 376(2), 259-265.
- Assadi-Porter, F. M., Maillet, E. L., Radek, J. T., Quijada, J., Markley, J. L., & Max, M. (2010). Key amino acid residues involved in multi-point binding interactions between brazzein, a sweet protein, and the T1R2-T1R3 human sweet receptor. *J Mol Biol*, 398(4), 584-599.
- Asselin, C., Pages, J., & Morlat, R. (1992). Typologie sensorielle du Cabernet franc et influence du terroir. Utilisation de méthodes statistiques multidimensionnelles. *OENO One*, 26(3), 129-154.
- Auger, C., Teissedre, P.-L., Gérain, P., Lequeux, N., Bornet, A., Serisier, S., Besançon, P., Caporiccio, B., Cristol, J.-P., & Rouanet, J.-M. (2005). Dietary Wine Phenolics Catechin, Quercetin, and Resveratrol Efficiently Protect Hypercholesterolemic Hamsters against Aortic Fatty Streak Accumulation. *J Agric Food Chem*, 53(6), 2015-2021.
- Aust, S. D. (1997). *Assessing the antioxidant activities of polyphenols : New methods for analysing old plant polyphenols* (Vol. 25). Les Ulis, France: EDP Sciences.
- Ayres, D. C., & Loike, J. D. (1990). *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties.* Cambridge: Cambridge University Press.

B

-
- Bachmanov, A. A., Bosak, N. P., Floriano, W. B., Inoue, M., Li, X., Lin, C., Murovets, V. O., Reed, D. R., Zolotarev, V. A., & Beauchamp, G. K. (2011). Genetics of sweet taste preferences. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(4), 286-294.

- Baderschneider, B., & Winterhalter, P. (2001). Isolation and Characterization of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*, 49(6), 2788-2798.
- Baek, N.-I., Chung, M.-S., Shamon, L., Kardono, L. B. S., Tsaouri, S., Padmawinata, K., Pezzuto, J. M., Soejarto, D. D., & Kinghorn, A. D. (1993). Selliguaeain A, a novel highly sweet proanthocyanidin from the rhizomes of *Selliguea feei*. *Journal of Natural Products*, 56(9), 1532-1538.
- Barthe, P., Hogge, L. R., Abrams, S. R., & Le Page-Degivry, M.-T. (1993). Metabolism of (+) abscisic acid to dihydrophaseic acid-4'- β -d-glucoopyranoside by sunflower embryos. *Phytochemistry*, 34(3), 645-648.
- Bartoshuk, L. M., Conner, E., Karrer, T., Kochenbach, K., Palcso, M., Snow, D., Pelchat, M., & Danowski, S. (1993). PROP supertasters and the perception of ethyl alcohol *Chem Senses*, 5, 526-527.
- Bauer, W. J., Badoud, R., & Löliger, J. (2010). Chapitre 5 : Arôme, goût et couleur *Science et technologie des aliments : principes de chimie des constituants et de technologie des procédés* (pp. 338-351): PPUR Presses polytechniques.
- Baum-Baicker, C. (1985). The psychological benefits of moderate alcohol consumption : a review of the literature. *Drug and Alcohol Dependence*, 15(4), 305-322.
- Behrens, M., Brockhoff, A., Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., & Meyerhof, W. (2004). The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(2), 479-485.
- Belitz, H. D., Gosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Berthod, A., & Lacombe, P. (1992). Une technique en développement : la chromatographie à contre courant (CCC). *Spectra 2000*, 169, 22-24.
- Bertuccioli, M., Zini, S., Siliani, A., & Picchi, M. (2002). *Valutazione sensoriale dei risultati di tecniche di vinificazione*. Pinerolo, Italie: Chiriotti.
- Bezerra, G. P., Da Silva Góis, R. W., De Brito, T. S., De Lima, F. J. B., Bandeira, M. A. M., Romero, N. R., Magalhães, P. J. C., & Santiago, G. M. P. (2013). Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 62-69.
- Bisson, J. (2012). *Développements méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge : Application aux stilbénoides*. (Doctorat en Sciences, Technologies, Santé), Université Bordeaux Segalen.
- Blackman, J., Rutledge, D. N., Tesic, D., Saliba, A., & Scollary, G. R. (2010). Examination of the potential for using chemical analysis as a surrogate for sensory analysis. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 2-7.
- Blednov, Y. A., Walker, D., Martinez, M., Levine, M., Damak, S., & Margolskee, R. F. (2008). Perception of sweet taste is important for voluntary alcohol consumption in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 7(1), 1-13.
- Blizard, D. A. (2007). Sweet and Bitter Taste of Ethanol in C57BL/6J and DBA2/J Mouse Strains. *Behavior Genetics*, 37(1), 146-159.
- Bonvehí, S. J., & Coll, V. F. (2000). Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 210(3), 189-195.
- Bosso, A., Panero, L., Petrozziello, M., Follis, R., Motta, S., & Guaita, M. (2011). Influence of the Submerged-Cap Vinification on the Polyphenolic Composition and the Volatile Compounds of Barbera Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*.
- Boulton, R. B. (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67-87.

- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2013). *Principles and practices of winemaking* : Springer Science & Business Media.
- Brockhoff, A., Behrens, M., Massarotti, A., Appendino, G., & Meyerhof, W. (2007). Broad Tuning of the Human Bitter Taste Receptor hTAS2R46 to Various Sesquiterpene Lactones, Clerodane and Labdane Diterpenoids, Strychnine, and Denatonium. *J Agric Food Chem*(55), 6236-6243.
- Brossaud, F., Cheynier, V., Asselin, C., & Moutounet, M. (1999). Flavonoid Compositional Differences of Grapes Among Site Test Plantings of Cabernet franc. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 277-284.
- Brossaud, F., Cheynier, V., & Noble, A. C. (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(1), 33-39.
- Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J.-D., & Meyerhof, W. (2002). The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to β -glucopyranosides. *Nature genetics*, 32(3), 397-401.
- Buffeteau, T., Cavagnat, D., Bouchet, A., & Brotin, T. (2007). Vibrational Absorption and Circular Dichroism Studies of (-)-Camphanic Acid. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(6), 1045-1051.
- Buffeteau, T., Lagugn -Labarthe, F., & Sourisseau, C. (2005). Vibrational Circular Dichroism in General Anisotropic Thin Solid Films: Measurement and Theoretical Approach. *Applied Spectroscopy*, 59(6), 732-745.

C

-
- Cabanis, J. C., Cabanis, M. T., Cheynier, V., & Teissedre, P. L. (1998). Caract risation de la mati re premi re et des produits  labor s. In C. Eds Flanzky (Ed.), *Oenologie : fondements scientifiques et technologiques*. (Tec & Doc ed., pp. 291-336). Paris: Lavoisier.
- Cadot, Y., Mi ana-Castell , M. T., & Chevalier, M. (2006a). Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. *J Agric Food Chem*, 54(24), 9206-9215.
- Cadot, Y., Mi ana Castell , M. T., & Chevalier, M. (2006b). Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Franc) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 65-75.
- Cai, L., Liu, C.-S., Fu, X.-W., Shen, X.-J., Yin, T.-P., Yang, Y.-B., & Ding, Z.-T. (2012). Two new glucosides from the pellicle of the walnut (*Juglans regia*). *Natural Products and Bioprospecting*, 2(4), 150-153.
- Canals, R., Llaudy, M. C., Canals, J. M., & Zamora, F. (2008). Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1183-1190.
- Canals, R., Llaudy, M. C., Valls, J., Canals, J. M., & Zamora, F. (2005). Influence of Ethanol Concentration on the Extraction of Color and Phenolic Compounds from the Skin and Seeds of Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *J Agric Food Chem*, 53(10), 4019-4025.
- Cao, Y., Willett, W. C., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., & Giovannucci, E. L. (2015). Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies. *British Medical Journal*, 351.
- Carneiro, E., Calixto, J. B., Monache, F. D., & Yunes, R. A. (1993). Isolation, Chemical Identification and Pharmacological Evaluation of Eucryphin, Astilbin and Engelit

- Obtained from the Bark of *Hymenaea martiana*. *International Journal of Pharmacognosy*, 31(1), 38-46.
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J Agric Food Chem*, 54(23), 8936-8944.
- Castillo, J., Benavente, O., & Del Rio, J. A. (1993). Hesperetin 7-O-glucoside and prunin in Citrus species (*C. aurantium* and *C. paradisi*). A study of their quantitative distribution in immature fruits and as immediate precursors of neohesperidin and naringin in *Citrus aurantium*. *J Agric Food Chem*, 41(11), 1920-1924.
- Cechinel Filho, V., Schlemper, V., Santos, A. R. S., Pinheiro, T. R., Yunes, R. A., Mendes, G. L., Calixto, J. B., & Delle Monache, F. (1998). Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(3), 223-227.
- Cerpa-Calderón, F. K., & Kennedy, J. A. (2008). Berry Integrity and Extraction of Skin and Seed Proanthocyanidins during Red Wine Fermentation. *J Agric Food Chem*, 56(19), 9006-9014.
- Champavier, Y., Comte, G., Vercauteren, J., Allais, D. P., & Chulia, A. J. (1999). Nortriterpenoid and sesquiterpenoid glucosides from *Juniperus phynicea* and *Galega officinalis*. *Phytochemistry*, 50(7), 1219-1223.
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444(7117), 288-294.
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2000). T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell*, 100(6), 703-711.
- Chassagne, D., Alexandre, H., Massoutier, C., Salles, C., & Feuillat, M. (2015). The aroma glycosides composition of Burgundy Pinot noir must. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 39(4), 177-178.
- Chassagne, D., Crouzet, J., Bayonove, C. L., Brillouet, J.-M., & Baumes, R. L. (1996). 6-O- α -L-Arabinopyranosyl- β -D-glucopyranosides as aroma precursors from passion fruit. *Phytochemistry*, 41(6), 1497-1500.
- Chassaing, S., Lefeuvre, D., Jacquet, R., Jourdes, M., Ducasse, L., Galland, S., Grelard, A., Saucier, C., Teissedre, P.-L., Dangles, O., & Quideau, S. (2010). Physicochemical Studies of New Anthocyano-Ellagitannin Hybrid Pigments: About the Origin of the Influence of Oak C-Glycosidic Ellagitannins on Wine Color. *European Journal of Organic Chemistry*, 2010(1), 55-63.
- Chatonnet, P. (1995a). *Incidences du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins. Applications technologiques*. (Thèse de Doctorat), Université Bordeaux 2.
- Chatonnet, P. (1995b). *Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne*. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux II.
- Chatonnet, P., Boidron, J., Dubourdiou, D., & Pons, M. (1994). Evolution des composés polyphénoliques du bois de chêne au cours de son séchage. Premiers résultats. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 28, 337-357.
- Chatonnet, P., Boidron, J. N., & Pons, M. (1989). Effect on heat on oak wood and its chemical composition. Part 2. Variations of certain compounds in relation to toasting intensity. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 23(4), 223-250.
- Chatonnet, P., Dubourdiou, D., & Boidron, J. N. (1992). Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sciences des Aliments*, 665-685.

- Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298-305.
- Chira, K. (2009). *Structures moléculaire et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais*.
- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., & Teissedre, P.-L. (2008). 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 Agric Food Chem*, 57(2), 545-553.
- Chira, K., & Teissedre, P. L. (2013). Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: behaviour during storage. *Food Chem*, 140(1-2), 168-177.
- Chira, K., Zeng, L., Le Floch, A., Péchamat, L., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2015). Compositional and sensory characterization of grape proanthocyanidins and oak wood ellagitannin. *Tetrahedron*, 71(20), 2999-3006.
- Clarín, T., Sandhu, S., & Apfelbach, R. (2010). Odor detection and odor discrimination in subadult and adult rats for two enantiomeric odorants supported by c-fos data. *Behavioural Brain Research*, 206(2), 229-235.
- Cliff, M. A., Stanich, K., Edwards, J. E., & Saucier, C. T. (2012). Adding Grape Seed Extract to Wine Affects Astringency and Other Sensory Attributes. *Journal of Food Quality*, 35(4), 263-271.
- Cretin, B. N., Sallembien, Q., Sindt, L., Daugey, N., Buffeteau, T., Waffo-Teguo, P., Dubourdieu, D., & Marchal, A. (2015). How stereochemistry influences the taste of wine: Isolation, characterization and sensory evaluation of lyoniresinol stereoisomers. *Analytica Chimica Acta*, 888, 191-198.
- Curko, N., Kovacevic Ganic, K., Gracin, L., Ethapic, M., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2014). Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chem*, 145, 15-22.
- Czepa, A., & Hofmann, T. (2003). Structural and Sensory Characterization of Compounds Contributing to the Bitter Off-Taste of Carrots (*Daucus carota* L.) and Carrot Puree. *J Agric Food Chem*, 51(13), 3865-3873.
- Czochanska, Z., Foo, L. Y., & Porter, L. J. (1979). Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*, 18(11), 1819-1822.

D

-
- Dadá, G., Corbani, A., Manitto, P., Speranza, G., & Lunazzi, L. (1989). Lignan Glycosides from the Heartwood of European Oak *Quercus petraea*. *Journal of Natural Products*, 52(6), 1327-1330.
- Darné, G. (1991). *Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vignes*. (Thèse Doctorat ès Sciences), Bordeaux, Bordeaux.
- Dawid, C., & Hofmann, T. (2012). Identification of Sensory-Active Phytochemicals in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *J Agric Food Chem*, 60(48), 11877-11888.
- De Britto, J., Manickam, V. S., & Gopalakrishnan, S. (1995). Determination of Aglycone Chirality in Dihydroflavonol 3-O- α -L-Rhamnosides by $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43(2), 338-339.
- De Freitas, V., Glories, Y., & Monique, A. (2000). Developmental Changes of Procyanidins in Grapes of Red *Vitis vinifera* Varieties and Their Composition in Respective Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(4), 397-403.

- De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *J Agric Food Chem*, 49(2), 940-945.
- De Freitas, V. A. P., & Glories, Y. (1999). Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1601-1606.
- De Paepe, D., Servaes, K., Noten, B., Diels, L., De Loose, M., Van Droogenbroeck, B., & Voorspoels, S. (2013). An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. *Food Chem*, 136(2), 368-375.
- Dea, S., Plotto, A., Manthey, J. A., Raithore, S., Irey, M., & Baldwin, E. (2013). Interactions and Thresholds of Limonin and Nomilin in Bitterness Perception in Orange Juice and Other Matrices. *Journal of Sensory Studies*, 28(4), 311-323.
- Del Refugio Ramos, M., Jerz, G., Villanueva, S., López-Dellamary, F., Waibel, R., & Winterhalter, P. (2004). Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). *Phytochemistry*, 65(7), 955-962.
- DeMiglio, P., Pickering, G. J., & Reynolds, A. G. (2002). *Astringent sub-qualities elicited by red wine: the role of ethanol and pH*. Paper presented at the IN Cullen, C.W., Pickering, G.J., and Phillips, R. (eds). Proceedings of the International Bacchus to The Future Conference, St Catharines Ontario, May 23rd – 25th, 2002.
- Desportes, C., Charpentier, M., Duteurtre, B., Maujean, A., & Duchiron, F. (2001). Isolation, Identification, and Organoleptic Characterization of Low-Molecular-Weight Peptides from White Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4), 376-380.
- Di Lecce, G., Arranz, S., Jauregui, O., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P., & Lamuela-Raventos, R. M. (2014). Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albarino grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chem*, 145, 874-882.
- Diako, C., McMahon, K., Mattinson, S., Evans, M., & Ross, C. (2016). Alcohol, Tannins, and Mannoprotein and their Interactions Influence the Sensory Properties of Selected Commercial Merlot Wines: A Preliminary Study. *Journal of Food Science*, 81(8), S2039-S2048.
- Doussot, F., De Jéso, B., Quideau, S., & Pardon, P. (2002). Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting; influence of tree species, geographic location, and single-tree effects. *J Agric Food Chem*, 50(21), 5955-5961.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 55-73.
- Drewnowski, A. (2001). The Science and Complexity of Bitter Taste. *Nutrition Reviews*, 59(6), 163-169.
- Drewnowski, A., & Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer : a review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1424-1435.
- Du, Q., Li, L., & Jerz, G. (2005). Purification of astilbin and isoastilbin in the extract of smilax glabra rhizome by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1077(1), 98-101.
- DuBois, G. E., & Prakash, I. (2012). Non-caloric sweeteners, sweetness modulators, and sweetener enhancers. *Annual review of food science and technology*, 3, 353-380.
- Dubourdieu, D., & Gény, L. (2014). Le millésime 2014 à Bordeaux. *Bordeaux raisins, Les lettres du millésime*. Retrieved from
- Dubourdieu, D., & Gény, L. (2015). Le millésime 2015 à Bordeaux *Bordeaux raisins, Les lettres du millésime*. Retrieved from

- Dwibedy, P., Dey, G. R., Naik, D. B., Kishore, K., & Moorthy, P. N. (1999). Pulse radiolysis studies on redox reactions of gallic acid: one electron oxidation of gallic acid by gallic acid–OH adduct. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1(8), 1915-1918.

E

-
- Elagamey, A. A., Abdel-Wahab, M. A., Shimaa, M. M. E., & Abdel-Mogib, M. (2013). Comparative study of morphological characteristics and chemical constituents for seeds of some grape table varieties. *Journal of American Science*, 9(1), 447-454.
- Esaki, S., Konishi, F., & Kamiya, S. (1979). Relationship between the Structure and Taste of Some Naringin Analogs. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(2), 231-235.
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., & Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153-159.
- Escribano-Bailon, T., Gutierrez-Fernandez, Y., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (1992). Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *J Agric Food Chem*, 40(10), 1794-1799.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *J Agric Food Chem*, 55(11), 4501-4510.

F

-
- Fabre, S., Absalon, C., Pinaud, N., Venencie, C., Teissedre, P.-L., Fouquet, E., & Pianet, I. (2014). Isolation, characterization, and determination of a new compound in red wine. *Anal Bioanal Chem*, 406(4), 1201-1208.
- Faurion, A. (2000). Physiologie de la gustation. In P. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS (Ed.), *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (Vol. Oto-rhino-laryngologie, 20-490-C-10, pp. 15).
- Fischer, U., & Noble, A. C. (1994). The Effect of Ethanol, Catechin Concentration, and pH on Sourness and Bitterness of Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 6-10.
- Flanzy, C. (1998). *Oenologie : fondements scientifiques et technologiques* (pp. 1131). Paris: Tec & doc-Lavoisier.
- Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19(3), 286-291.
- Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., & Salmon, J. M. (2002). New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees : a bibliographic review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*.
- Foucault, A. P., & Chevotot, L. (1998). Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*, 808(1-2), 3-22.
- Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J.-M., Moutounet, M., & Cheynier, V. (2006). Accumulation and Extractability of Grape Skin Tannins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stages. *J Agric Food Chem*, 54(19), 7331-7338.
- Francesca, N., Romano, R., Sannino, C., Le Grottaglie, L., Settanni, L., & Moschetti, G. (2014). Evolution of microbiological and chemical parameters during red wine making with extended post-fermentation maceration. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 84-93.

- Frank, O., Ottinger, H., & Hofmann, T. (2001). Characterization of an Intense Bitter-Tasting 1H,4H-Quinolizinium-7-olate by Application of the Taste Dilution Analysis, a Novel Bioassay for the Screening and Identification of Taste-Active Compounds in Foods. *J Agric Food Chem*, 49(1), 231-238.
- Frank, S., Wollmann, N., Schieberle, P., & Hofmann, T. (2011). Reconstitution of the Flavor Signature of Dornfelder Red Wine on the Basis of the Natural Concentrations of Its Key Aroma and Taste Compounds. *J Agric Food Chem*, 59(16), 8866-8874.
- Fredes, C., Von Bennewitz, E., Holzapfel, E. A., & Saavedra, F. (2010). Relation between seed appearance and phenolic maturity : A case study using grapes cv. Carménère. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(3), 381-389.
- Freedman, T. B., Cao, X., Dukor, R. K., & Nafie, L. A. (2003). Absolute configuration determination of chiral molecules in the solution state using vibrational circular dichroism. *Chirality*, 15(9), 743-758.
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289-297.
- Fuleki, T., & Ricardo da Silva, J. M. (1997). Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario. *J Agric Food Chem*, 45(4), 1156-1160.

G

-
- Gabetta, B., Fuzzati, N., Griffini, A., Lolla, E., Pace, R., Ruffilli, T., & Peterlongo, F. (2000). Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia*, 71(2), 162-175.
- Gaffield, W., Lundin, R. E., Gentili, B., & Horowitz, R. M. (1975a). C-2 stereochemistry of naringin and its relation to taste and biosynthesis in maturing grapefruit. *Bioorganic Chemistry*, 4(3), 259-269.
- Gaffield, W., Waiss, A. C., & Tominaga, T. (1975b). Structural relations and interconversions of isomeric astilbins. *The Journal of Organic Chemistry*, 40(8), 1057-1061.
- Gagné, S., Saucier, C., & Gény, L. (2006). Composition and Cellular Localization of Tannins in Cabernet Sauvignon Skins during Growth. *J Agric Food Chem*, 54(25), 9465-9471.
- Galet, P. (1993). Précis de viticulture (pp. 582). Montpellier: Dehan.
- Gambutì, A., Capuano, R., Lecce, L., Fragasso, M. G., & Moio, L. (2009). Extraction of phenolic compounds from 'Aglianico' and 'Uva di Troia' grape skins and seeds in model solutions: Influence of ethanol and maceration time. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 48(4), 193-200.
- Gambutì, A., Strollo, D., Ugliano, M., Lecce, L., & Moio, L. (2004). trans-Resveratrol, Quercetin, (+)-Catechin, and (-)-Epicatechin Content in South Italian Monovarietal Wines: Relationship with Maceration Time and Marc Pressing during Winemaking. *J Agric Food Chem*, 52(18), 5747-5751.
- Gao, L., Girard, B., Mazza, G., & Reynolds, A. G. (1997). Changes in Anthocyanins and Color Characteristics of Pinot Noir Wines during Different Vinification Processes. *J Agric Food Chem*, 45(6), 2003-2008.
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency : a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(2), 74-95.
- Gawel, R., Van Sluyter, S. C., & Waters, E. J. (2007). The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(1), 38.
- Gény, L., Saucier, C., Bracco, S., Daviaud, F., & Glories, Y. (2003). Composition and Cellular Localization of Tannins in Grape Seeds during Maturation. *J Agric Food Chem*, 51(27), 8051-8054.

- Gerbaux, V. (1993). Etude de quelques conditions de cuvaison susceptibles d'augmenter la composition polyphénolique des vins de Pinot noir. *Revue des Oenologues*, 69, 15-18.
- Gerbaux, V., Briffox, C., & Vincent, B. (2003). *Optimisation de la macération finale à chaud, intérêt d'un enzymage et d'une macération sous chapeau immergé pour la vinification du pinot noir*. Lattes, France: Union des oenologues de France.
- Geuns, J. (2003). Stevioside. *Phytochemistry*, 64(5), 913-921.
- Ghisalberti, E. L. (1997). Cardiovascular activity of naturally occurring lignans. *Phytomedicine*, 4(2), 151-166.
- Gibbs, B. F., Alli, I., & Mulligan, C. (1996). Sweet and taste-modifying proteins : a review. *Nutrition Research*, 16(9), 1619-1630.
- Gilbertson, T. A., Damak, S., & Margolskee, R. F. (2000). The molecular physiology of taste transduction. *Current opinion in neurobiology*, 10(4), 519-527.
- Glabasnia, A., & Hofmann, T. (2006). 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 Agric Food Chem*, 54(9), 3380-3390.
- Glories, Y. (1981). *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 195-217.
- Goldner, M. C., Zamora, M. C., Di Leo Lira, P., Gianninoto, H., & Bandoni, A. (2009). Effect of ethanol level in the perception of aroma attributes and the detection of volatile compounds in red wine. *Journal of Sensory Studies*, 24(2), 243-257.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., & Fernández-Fernández, J. I. (2001). Phenolic Compounds and Color Stability of Red Wines: Effect of Skin Maceration Time. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3), 266-270.
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 283-289.
- González-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., Carbonneau, A., & Moutounet, M. (2004). Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 191-196.
- Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., & Fernandez-Zurbano, P. (2013). Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *J Agric Food Chem*, 61(37), 8861-8870.
- Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chem*, 89(1), 1-9.
- Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.-M., Bayonove, C., & Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research*, 184, 139-149.
- Guth, H., & Seis, A. (2002, 7-10 October 2001.). *Flavour of wines: towards an understanding by reconstitution experiments and an analysis of ethanol's effect on odour activity of key compounds*. . Paper presented at the Eleventh Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, SA Australian.
- Gutierrez-Rosales, F., Rios, J. J., & Gomez-Rey, M. L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 51(20), 6021-6025.

H

- Hagerman, A. E. (1989). Chemistry of Tannin-Protein Complexation. In R. W. Hemingway, J. J. Karchesy, & S. J. Branham (Eds.), *Chemistry and Significance of Condensed Tannins* (pp. 323-333). Boston, MA: Springer US.
- Han, L.-K., Ninomiya, H., Taniguchi, M., Baba, K., Kimura, Y., & Okuda, H. (1998). Norepinephrine-Augmenting Lipolytic Effectors from *Astilbe thunbergii* Rhizomes. *Journal of Natural Products*, *61*(8), 1006-1011.
- Haraguchi, H., Mochida, Y., Sakai, S., Masuda, H., Tamura, Y., Mizutani, K., Tanaka, O., & Chou, W.-H. (1996). Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *60*(6), 945-948.
- Haraguchi, H., Ohmi, I., Fukuda, A., Tamura, Y., Mizutani, K., Tanaka, O., & Chou, W.-H. (1997). Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *61*(4), 651-654.
- Hardman, M., & Makarov, A. A. (2003). Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Anal Chem*, *75*(7), 1699-1705.
- Harmatha, J., & Dinan, L. (2003). Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochemistry Reviews*, *2*(3), 321-330.
- Hashizume, K., & Samuta, T. (1997). Green Odorants of Grape Cluster Stem and Their Ability To Cause a Wine Stemmy Flavor. *J Agric Food Chem*, *45*(4), 1333-1337.
- Haslam, E. (1980). In vino veritas : Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, *19*(12), 2577-2582.
- Hayasaka, Y., Waters, E. J., Cheynier, V., Herderich, M. J., & Vidal, S. (2003). Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *17*(1), 9-16.
- Herve Du Penhoat, C. L. M., Michon, V. M. F., Peng, S., Viriot, C., Scalbert, A., & Gage, D. (1991). Structural elucidation of new dimeric ellagitannins from *Quercus robur* L. roburins A-E. *Journal of the Chemical Society*(7), 1653-1660.
- Hirai, N., Kondo, S., & Ohigashi, H. (2003). Deuterium-labeled Phaseic Acid and Dihydrophaseic Acids for Internal Standards. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *67*(11), 2408-2415.
- Hirai, N., & Koshimizu, K. (1983). A New Conjugate of Dihydrophaseic Acid from Avocado Fruit. *Agricultural and Biological Chemistry*, *47*(2), 365-371.
- Hoenicke, K., Simat, T. J., Steinhart, H., Christoph, N., Geßner, M., & Köhler, H.-J. (2002). Untypical aging off-flavor in wine : formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors. *Analytica Chimica Acta*, *458*(1), 29-37.
- Holzwarth, G., Hsu, E. C., Mosher, H. S., Faulkner, T. R., & Moscovitz, A. (1974). Infrared circular dichroism of carbon-hydrogen and carbon-deuterium stretching modes. Observations. *Journal of the American Chemical Society*, *96*(1), 251-252.
- Huang, H., Cheng, Z., Shi, H., Xin, W., Wang, T. T. Y., & Yu, L. (2011). Isolation and Characterization of Two Flavonoids, Engeletin and Astilbin, from the Leaves of *Engelhardtia roxburghiana* and Their Potential Anti-inflammatory Properties. *J Agric Food Chem*, *59*(9), 4562-4569.
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008a). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *J Agric Food Chem*, *56*(4), 1376-1386.

Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008b). Quantitative Reconstruction of the Nonvolatile Sensometabolome of a Red Wine. *J Agric Food Chem*, 56(19), 9190-9199.

I

-
- Imai, K., Yamauchi, K., & Mitsunaga, T. (2013). Extractives of *Quercus crispula* sapwood infected by the pathogenic fungus *Raffaelea quercivora* II: isolation and identification of phenolic compounds from infected sapwood. *Journal of Wood Science*, 59(6), 517-521.
- Inoshiri, S., Sasaki, M., Kohda, H., Otsuka, H., & Yamasaki, K. (1987). Aromatic glycosides from *Berchemia racemosa*. *Phytochemistry*, 26(10), 2811-2814.
- ISO 8587 : 2007. Sensory analysis. Methodology. Ranking, (2007a).
- ISO. (2007b). *NF ISO 4120 : 2007. Sensory analysis. Methodology. Triangle test.* (E. b. I. O. o. S. Genève. Ed.). Geneva, Switzerland: International Organization for standardization.
- ISO 13299 :2016. Sensory analysis. Methodology. General guidance for establishing a sensory profile, (2016).
- Ivanova, V., Dörnyei, Á., Márk, L., Vojnoski, B., Stafilov, T., Stefova, M., & Kilár, F. (2011). Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chem*, 124(1), 316-325.

J

-
- Jackson, D. I., & Lombard, P. B. (1993). Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 409-430.
- Jackson, R. G., Lim, E.-K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D. A., & Bowles, D. J. (2001). Identification and Biochemical Characterization of an *Arabidopsis* Indole-3-acetic Acid Glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4350-4356.
- Jacquemin, H., Boissonnat, A., Faugeras, G., Tillequin, F., & Delaveau, P. (1985). Flavonoïdes de glycoxyton *huberi* Ducke. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 43(5), 521-525.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., & Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36(2), 117-122.
- Jeong, E. J., Cho, J. H., Sung, S. H., Kim, S. Y., & Kim, Y. C. (2011). Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells by lignans isolated from *Euonymus alatus* leaves and twigs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(8), 2283-2286.
- Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19(6), 596-607.
- Joslyn, M. A., Goldstein, J. L., Mrack, M. E., & Stewart, G. F. (1964). Astringency of fruit and fruit products in relation to phenolic content. In A. Press (Ed.), *Advances in Food Research* (pp. 179). New York.
- Jourdes, M., Michel, J., Saucier, C., Quideau, S., & Teissedre, P. L. (2011). Identification, amounts, and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Anal Bioanal Chem*, 401(5), 1535-1543.

- Jusoh, S., Zakaria, Z., & Din, L. B. (2013). Isolation of astilbin from leaves of *Cratoxylum arborescens*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 17(3), 430-435.
- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Tan, G. T., Ma, C., Hung, N. V., Cuong, N. M., Bunyapraphatsara, N., Soejarto, D. D., & Fong, H. H. S. (2005). Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry*, 66(23), 2745-2751.

K

-
- Kalili, K. M., Vestner, J., Stander, M. A., & de Villiers, A. (2013). Toward unraveling grape tannin composition: application of online hydrophilic interaction chromatography x reversed-phase liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for grape seed analysis. *Anal Chem*, 85(19), 9107-9115.
- Kanai, S., & Okano, H. (1998). Mechanism of the protective effects of sumac gall extract and gallic acid on the progression of CCl₄-induced acute liver injury in rats. *American Journal of Chinese Medicine*, 26(03n04), 333-341.
- Kasai, R., Hirono, S., Chou, W.-H., Tanaka, O., & Chen, F.-H. (1988). Sweet Dihydroflavonol Rhamnoside from Leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese Folk Medicine, Hung-qi. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(10), 4167-4170.
- Kasai, R., Hirono, S., Chou, W.-H., Tanaka, O., & Chen, F.-H. (1991). An Additional Sweet Dihydroflavonol Glycoside from Leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese Folk Medicine, Huang-qi. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39(7), 1871-1872.
- Kato, Y. (1963). Structure of lyoniresinol (dimethoxysolariciresinol). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 11, 823-827.
- Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S., Saucier, C., Jourdes, M., & Glories, Y. (2006). Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Boğazkere and Öküzgözü. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 1012-1017.
- Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e investigación agraria*, 35, 107-120.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55(1), 77-85.
- Kim, M. J., Yoo, S. H., Kim, Y., & Hong, J. H. (2016). Relative sweetness and sweetness quality of phylodulcin [(3R)-8-Hydroxy-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one]. *Food Science and Biotechnology*, 25(4), 1065-1072.
- Kimura, Y., Sumiyoshi, M., & Sakanaka, M. (2007). Effects of Astilbe thunbergii rhizomes on wound healing : Part 1. Isolation of promotional effectors from Astilbe thunbergii rhizomes on burn wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 72-77.
- Kingdon, K. H. (1923). A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Physical Review*, 21(4), 408-418.
- Kinghorn, A. D. (1987). Biologically Active Compounds from Plants with Reputed Medicinal and Sweetening Properties. *Journal of Natural Products*, 50(6), 1009-1024.
- Kinghorn, A. D., & Soejarto, D. D. (2002). Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure and Applied Chemistry*, 74(7), 1169-1179.
- Kiritsakis, A. K. (1998). Flavor components of olive oil-A review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75(6), 673-681.
- Koga, K., Taguchi, A., Koshimizu, S., Suwa, Y., Yamada, Y., Shirasaka, N., & Yoshizumi, H. (2007). Reactive Oxygen Scavenging Activity of Matured Whiskey and Its Active Polyphenols. *Journal of Food Science*, 72(3), S212-S217.
- Kostadinović, S., Wilkens, A., Stefova, M., Ivanova, V., Vojnoski, B., Mirhosseini, H., & Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels and antioxidant activity of Vranec and Merlot

- wines from Macedonia: Effect of variety and enological practices. *Food Chem*, 135(4), 3003-3009.
- Kovac, V., Alonso, E., Bourzeix, M., & Revilla, E. (1992). Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. *J Agric Food Chem*, 40(10), 1953-1957.
- Kovac, V., Alonso, E., & Revilla, E. (1995). The Effect of Adding Supplementary Quantities of Seeds During Fermentation on the Phenolic Composition of Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(3), 363-367.
- Koyama, K., Goto-Yamamoto, N., & Hashizume, K. (2007). Influence of Maceration Temperature in Red Wine Vinification on Extraction of Phenolics from Berry Skins and Seeds of Grape (*Vitis vinifera*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(4), 958-965.
- Ky, I., & Teissedre, P.-L. (2015). Characterisation of Mediterranean Grape Pomace Seed and Skin Extracts: Polyphenolic Content and Antioxidant Activity. *Molecules*, 20(2), 2190.
- Kyraleou, M., Kotseridis, Y., Koundouras, S., Chira, K., Teissedre, P. L., & Kallithraka, S. (2016). Effect of irrigation regime on perceived astringency and proanthocyanidin composition of skins and seeds of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah grapes under semiarid conditions. *Food Chem*, 203, 292-300.

L

-
- Laaksonen, O., Sandell, M., & Kallio, H. (2010). Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. *European Food Research and Technology*, 231(2), 271-285.
- Lacampagne, S. (2010). *Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin : impact de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux*.
- Lafon, J., Couillud, P., & Gaybellile, F. (1973). *Le cognac*. Paris, France: J.B. Baillière.
- Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J.-M., Gasc, F., Cros, G., & Teissedre, P.-L. (2002). Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal Wines and in Grapes during Noble Rot Development. *J Agric Food Chem*, 50(7), 2046-2052.
- Lanier, S. A., Hayes, J. E., & Duffy, V. B. (2005). Sweet and bitter tastes of alcoholic beverages mediate alcohol intake in of-age undergraduates. *Physiology and Behavior*, 83(5), 821-831.
- Latha, R. S., & Lakshmi, P. K. (2012). Electronic tongue: An analytical gustatory tool. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 3(1), 3-8.
- Le Berre, E., Atanasova, B., Langlois, D., Etiévant, P., & Thomas-Danguin, T. (2007). Impact of ethanol on the perception of wine odorant mixtures. *Food Quality and Preference*, 18(6), 901-908.
- Leahy, R. (2000). Délestage fermentation. *Vineyard and winery*, 26, 63-69.
- Lee, J., Kennedy, J. A., Devlin, C., Redhead, M., & Rennaker, C. (2008). Effect of early seed removal during fermentation on proanthocyanidin extraction in red wine: A commercial production example. *Food Chem*, 107(3), 1270-1273.
- Legin, A., Rudnitskaya, A., Clapham, D., Seleznev, B., Lord, K., & Vlasov, Y. (2004). Electronic tongue for pharmaceutical analytics: quantification of tastes and masking effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(1), 36-45.
- Lemon, C. H., Brassler, S. M., & Smith, D. V. (2004). Alcohol activates a sucrose-responsive gustatory neural pathway. *Journal of Neurophysiology*, 92(1), 536-544.

- Leung, J., & Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual review of plant biology*, 49(1), 199-222.
- Li, S., Wang, Z., Ding, F., Sun, D., Ma, Z., Cheng, Y., & Xu, J. (2014). Content changes of bitter compounds in 'Guoqing No.1' Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) during fruit development of consecutive 3 seasons. *Food Chem*, 145, 963-969.
- Liggins, J., Grimwood, R., & Bingham, S. A. (2000). Extraction and Quantification of Lignan Phytoestrogens in Food and Human Samples. *Analytical Biochemistry*, 287(1), 102-109.
- Lindemann, B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413(6852), 219-225.
- Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., & Zamora, F. (2008). Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *European Food Research and Technology*, 226(3), 337-344.
- López-Tamames, E., Carro-Mariño, N., Gunata, Y. Z., Sapis, C., Baumes, R., & Bayonove, C. (1997). Potential Aroma in Several Varieties of Spanish Grapes. *J Agric Food Chem*, 45(5), 1729-1735.
- Lu, Y., & Foo, L. Y. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem*, 65(1), 1-8.

M

-
- Maciuk, A. (2005). *Nouvelles Méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : Application à l'isolement de substances naturelles*. (Thèse de Doctorat), Université de Reims.
- MacRae, W. D., Hudson, J. B., & Towers, G. H. N. (1989). The Antiviral Action of Lignans. *Planta Medica Journal Impact and Description*, 55(6), 531-535.
- Makarov, A. (1999).
- Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem*, 72(6), 1156-1162.
- Mané, C., Souquet, J. M., Ollé, D., Verriés, C., Véran, F., Mazerolles, G., Cheynier, V., & Fulcrand, H. (2007). Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design : Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties. *J Agric Food Chem*, 55(18), 7224-7233.
- Marchal, A. (2010). *Recherches sur les bases moléculaires de la saveur sucrée des vins secs. Approches analytique et sensorielle.*, Université Victor Segalen Bordeaux 2.
- Marchal, A., Cretin, B. N., Sindt, L., Waffo-Téguo, P., & Dubourdieu, D. (2014). Contribution of oak lignans to wine taste: chemical identification, sensory characterization and quantification. *Tetrahedron*.
- Marchal, A., Cretin, B. N., Sindt, L., Waffo-Téguo, P., & Dubourdieu, D. (2015a). Contribution of oak lignans to wine taste: chemical identification, sensory characterization and quantification. *Tetrahedron*, 71(20), 3148-3156.
- Marchal, A., Génin, E., Waffo-Téguo, P., Bibès, A., Da Costa, G., Mérillon, J.-M., & Dubourdieu, D. (2015b). Development of an analytical methodology using Fourier transform mass spectrometry to discover new structural analogs of wine natural sweeteners. *Analytica Chimica Acta*, 853(0), 425-434.
- Marchal, A., Marullo, P., Durand, C., Moine, V., & Dubourdieu, D. (2015c). Fermentative conditions modulating sweetness in dry wines: Genetics and environmental factors influencing the expression level of the *saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene. *J Agric Food Chem*, 63(1), 304-311.

- Marchal, A., Marullo, P., Moine, V., & Dubourdiou, D. (2011a). Influence of yeast macromolecules on sweetness in dry wines: role of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Hsp12. *J Agric Food Chem*, 59(5), 2004-2010.
- Marchal, A., Pons, A., Lavigne, V., & Dubourdiou, D. (2013). Contribution of oak wood ageing to the sweet perception of dry wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1), 11-19.
- Marchal, A., Prida, A., & Dubourdiou, D. (2015d). New Approach for Differentiating Sessile and Pedunculate Oak: Development of a LC-HRMS Method To Quantitate Triterpenoids in Wood. *J Agric Food Chem*.
- Marchal, A., Waffo-Téguo, P., Génin, E., Mérillon, J. M., & Dubourdiou, D. (2011b). Identification of new natural sweet compounds in wine using centrifugal partition chromatography-gustatometry and Fourier transform mass spectrometry. *Anal Chem*, 83(24), 9629-9637.
- Marinos, V. A., Tate, M. E., & Williams, P. J. (1992). Lignan and phenylpropanoid glycerol glucosides in wine. *Phytochemistry*, 31(12), 4307-4312.
- Martin, S., & Pangborn, R. M. (1970). Taste interaction of ethyl alcohol with sweet, salty, sour and bitter compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21(12), 653-655.
- Masson, G., Moutounet, M., & Puech, J. L. (1995). Ellagitannin Content of Oak Wood as a Function of Species and of Sampling Position in the Tree. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 262-268.
- Mateo, J. J., Gentilini, N., Huerta, T., Jime'nez, M., & Di Stefano, R. (1997). Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *Journal of Chromatography A*, 778(1), 219-224.
- Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M. C., & García, J. M. (2004). Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81(1), 71-75.
- Matissek, R. (1997). Evaluation of xanthine derivatives in chocolate – nutritional and chemical aspects. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 205(3), 175-184.
- Matsunami, H., Montmayeur, J.-P., & Buck, L. B. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 404(6778), 601-604.
- Mattes, R. D., & DiMeglio, D. (2001). Ethanol perception and ingestion. *Physiology and Behavior*, 72, 217-229.
- Mazur, W. (1998). 11. Phytoestrogen content in foods *Baillieres Clinical Endocrinology Metabolism* (Vol. 12, pp. 729-742).
- Mazur, W. M., Duke, J. A., Wähälä, K., Rasku, S., & Adlercreutz, H. (1998). Isoflavonoids and Lignans in Legumes : Nutritional and Health Aspects in Humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(4), 193-200.
- McRae, J. M., Ziora, Z. M., Kassara, S., Cooper, M. A., & Smith, P. A. (2015). Ethanol concentration influences the mechanisms of wine tannin interactions with poly(l - proline) in model wine. *J Agric Food Chem*, 63(17), 4345-4352.
- Merida, J., Moyano, L., Millan, C., & Medina, M. (2015). Extraction of phenolic compounds in controlled macerations of Pedro Ximenez grapes. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 30(2), 117-127.
- Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G., & Behrens, M. (2010). The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses*, 35(2), 157-170.
- Michel, J., Albertin, W., Jourdes, M., Le Floch, A., Giordanengo, T., Mourey, N., & Teissedre, P. L. (2016). Variations in oxygen and ellagitannins, and organoleptic

- properties of red wine aged in French oak barrels classified by a near infrared system. *Food Chem*, 204, 381-390.
- Milborrow, B. V., & Vaughan, G. T. (1982). Characterization of Dihydrophaseic Acid 4'-O-P-D-Glucopyranoside as a Major Metabolite of Abscisic Acid. *Functional Plant Biology*, 9(3), 361-372.
- Milder, I. E. J., Arts, I. C. W., Van De Putte, B., Venema, D. P., & Hollman, P. C. H. (2005). Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*, 93(3), 393-402.
- Minana Castello, M. T., Cadot, Y., Paravidino, E., Chevalier, M., & Moutounet, M. (2006). *Extraction des flavan-3-ols des pépins des baies de raisin à différents stades de maturité : localisation et quantification des proanthocyanidines extractibles et non extractibles*. Paper presented at the XXIXème Congrès Mondial de la Vigne et du Vin, 25-30 juin 2006, Logroño (Espagne).
- Mogra, R., & Dashora, V. (2009). Exploring the Use of Stevia rebaudiana as a sweetener in comparison with other sweeteners. *Journal of Human Ecology*, 25(2), 117-120.
- Moine-Ledoux, V., & Dubourdieu, D. (1999). An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 537-543.
- Montmayeur, J.-P., & Matsunami, H. (2002). Receptors for bitter and sweet taste. *Current opinion in neurobiology*, 12(4), 366-371.
- Mosedale, J. R., Puech, J.-L., & Feuillat, F. (1999). The Influence on Wine Flavor of the Oak Species and Natural Variation of Heartwood Components. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 503-512.
- Moulari, B., Pellequer, Y., Lboutounne, H., Girard, C., Chaumont, J. P., Millet, J., & Muyard, F. (2006). Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 106(2), 272-278.
- Moutounet, M., Rabier, P. H., Puech, J. L., Verette, E., & Barillere, J. M. (1989). Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Science Aliments*, 9, 35-51.
- Moutounet, M., Rigaud, J., Souquet, J. M., & Cheynier, V. (1996). *Caractérisation structurale des tanins de la baie de raisin : Quelques exemples de l'incidence du cépage, du terroir et du mode de conduite de la vigne* (Vol. 69). Paris, France: Office international de la vigne et du vin.
- Mueller, K. L., Hoon, M. A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2007). The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature*, 446(7133), 342-342.
- Murayama, W., Kobayashi, T., Kosuge, Y., Yano, H., Nunogaki, Y., & Nunogaki, K. (1982). A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *Journal of Chromatography A*, 239*, 643-649.

N

-
- Nabeta, K., Yonekubo, J., & Miyake, M. (1987). Phenolic compounds from the heartwood of European oak (*Quercus robur* L.) and brandy. *Japan Wood Research Society*, 33, 408-415.
- Nadal, M. (2010). Phenolic Maturity in Red Grapes. In S. Delrot, H. Medrano, E. Or, L. Bavaresco, & S. Grando (Eds.), *Methodologies and Results in Grapevine Research* (pp. 389-409). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Nafie, L. A., Keiderling, T. A., & Stephens, P. J. (1976). Vibrational circular dichroism. *Journal of the American Chemical Society*, 98(10), 2715-2723.

- Nesbitt, P. D., & Thompson, L. U. (1997). Lignans in homemade and commercial products containing flaxseed. *Nutrition Cancer*, 29(3), 222-227.
- Noble, A. C. (1994). Bitterness in wine. *Physiology and Behavior*, 56(6), 1251-1255.
- Nolden, A. A., & Hayes, J. E. (2015). Perceptual qualities of ethanol depend on concentration, and variation in these percepts associates with drinking frequency. *Chemosensory Perception*, 8(3), 149-157.
- Nonier, M.-F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., & Fouquet, E. (2009). Origin of brown discoloration in the staves of oak used in cooperage – Characterization of two new lignans in oak wood barrels. *C. R. Chimie*, 12(1–2), 291-296.
- Nurgel, C., & Pickering, G. J. (2005). Contribution of glycerol, ethanol and sugar to the perception of viscosity and density elicited by model white wines. *Journal of Texture Studies*, 36(3), 303-323.
- Nurmi, T., Heinonen, S. M., Mazur, W., Deyama, T., Nishibe, S., & Adlercreutz, H. (2003). Lignans in selected wines. *Food Chem*, 83(2), 303-309.

O

-
- Ohashi, K., Watanabe, H., Okumura, Y., Uji, T., & Kitagawa, I. (1994). Indonesian Medicinal Plants. XII. Four Isomeric Lignan-Glucosides from the Bark of *Aegle marmelos* (Rutaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(9), 1924-1926.
- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., & Deloire, A. (2002). Influence of Pre- and Postveraison Water Deficit on Synthesis and Concentration of Skin Phenolic Compounds during Berry Growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(4), 261-267.
- Omar, M., Matsuo, Y., Maeda, H., Saito, Y., & Tanaka, T. (2013). New ellagitannin and galloyl esters of phenolic glycosides from sapwood of *Quercus mongolica* var. *crispula* (Japanese oak). *Phytochemistry Letters*, 6(3), 486-490.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Bautista-Ortin, A. B., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2008). Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Evolution of their content and extractability.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 26-32.
- Oszmianski, J., Romeyer, F. M., Sapis, J. C., & Macheix, J. J. (1986). Grape Seed Phenolics : Extraction as Affected by Some Conditions Occurring During Wine Processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(1), 7-12.
- Oszmianski, J., & Sapis, J. C. (1989). Fractionation and identification of some low molecular weight grape seed phenolics. *J Agric Food Chem*, 37(5), 1293-1297.
- Ottinger, H., Soldo, T., & Hofmann, T. (2003). Discovery and Structure Determination of a Novel Maillard-Derived Sweetness Enhancer by Application of the Comparative Taste Dilution Analysis (cTDA). *J Agric Food Chem*, 51(4), 1035-1041.
- Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1961a). Studies on Controlled Fermentation. V. effects on color, Composition, and Quality of Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 12(1), 9-19.
- Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1961b). Studies with Controlled Fermentation. VI. Effects of Temperature and Handling on Rates, Composition, and Quality of Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 12(3), 117-128.

P

-
- Pacottet, P. (1908). *Vinification* (J. B. B. Fils Ed.).
- Pan, J.-Y., Zhang, S., Wu, Li, Q.-X., & Xiao, Z.-H. (2010). Litseaglutinin A and Lignans from *Litsea glutinosa*. *Helvetica Chimica Acta*, 93(5), 951-957.
- Pascual, O., González-Royo, E., Gil, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J. M., Hermosín-Gutiérrez, I., & Zamora, F. (2016). Influence of Grape Seeds and Stems on Wine Composition and Astringency. *J Agric Food Chem*, 64(34), 6555-6566.
- Pawlowska, A. M., De Leo, M., & Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) Fruits: Identification of Anthocyanins and Gallic Acid Derivatives. *J Agric Food Chem*, 54(26), 10234-10238.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1123-1128.
- Pérez, C., Almonacid, L. N., Trujillo, J. M., González, A. G., Alonso, S. J., & Navarro, E. (1995). Lignans from *Apollonias barbujuana*. *Phytochemistry*, 40(5), 1511-1513.
- Peynaud, E. (1971). *Connaissance et travail du vin* (Dunod Ed.). Paris, France: Dunod.
- Peynaud, E. (1981). *Le vin et les jours* (Payot Ed.).
- Pezet, R., & Cuenat, P. (1996). Resveratrol in Wine: Extraction From Skin During Fermentation and Post-fermentation Standing of Must From Gamay Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(3), 287-290.
- Piggott, J. R. (1990). Relating sensory and chemical data to understand flavor. *Journal of Sensory Studies*, 4(4), 261-272.
- Piutti, A. (1886). Una nuova specie di asparagine. *L'Orosi-Giornale di Chimica. Farmacia e Scienze Affini*, 198-202.
- Poncet-Legrand, C., Doco, T., Williams, P., & Vernhet, A. (2007). Inhibition of Grape Seed Tannin Aggregation by Wine Mannoproteins: Effect of Polysaccharide Molecular Weight. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 87-91.
- Pretsch, E., Bühlmann, P., & Badertscher, M. (2009). *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data* : Springer Berlin Heidelberg.
- Prida, A., Boulet, J.-C., Ducouso, A., Nepveu, G., & Puech, J.-L. (2006). Effect of species and ecological conditions on ellagitannin content in oak wood from an even-aged and mixed stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. *Annals of Forest Science*, 63(4), 415-424.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36(3), 781-784.
- Prinsen, E., Van Dongen, W., Esmans, E. L., & Van Onckelen, H. A. (1997). HPLC Linked Electrospray Tandem Mass Spectrometry: A Rapid and Reliable Method to Analyse Indole-3-Acetic Acid Metabolism in Bacteria. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(1), 12-22.
- Puech, J.-L., Feuillat, F., & Mosedale, J. R. (1999). The Tannins of Oak Heartwood: Structure, Properties, and Their Influence on Wine Flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 469-478.

Q

-
- Quideau, S., Jourdes, M., Lefeuvre, D., Pardon, P., Saucier, C., Teissedre, P., & Glories, Y. (2010). Ellagitannins - An Underestimated Class of Plant Polyphenols: Chemical Reactivity of C-Glucosidic Ellagitannins in Relation to Wine Chemistry and Biological Activity *Recent Advances in Polyphenol Research* (Vol. 2, pp. 81-137).

Quinn, M. K., & Singleton, V. L. (1985). Isolation and Identification of Ellagitannins from White Oak Wood and an Estimation of Their Roles in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(2), 148-155.

R

-
- Rahman, M. D. A., Katayama, T., Suzuki, T., & Nakagawa, T. (2007). Stereochemistry and biosynthesis of (+)-lyoniresinol, a syringyl tetrahydronaphthalene lignan in *Lyonia ovalifolia* var. *elliptica* I : isolation and stereochemistry of syringyl lignans and predicted precursors to (+)-lyoniresinol from wood. *Journal of Wood Science*, 53(2), 161-167.
- Rebello, L. P. G., Lago-Vanzela, E. S., Barcia, M. T., Ramos, A. M., Stringheta, P. C., Da-Silva, R., Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., & Herмосín-Gutiérrez, I. (2013). Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea×IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. *Food Research International*, 54(1), 354-366.
- Reed, D. R., Tanaka, T., & McDaniel, A. H. (2006). Diverse tastes : Genetics of sweet and bitter perception. *Physiology and Behavior*, 88(3), 215-226.
- Regasini, L. O., Fernandes, D. C., Castro-Gamboa, I., Silva, D. H. S., Furlan, M., Bolzani, V. D. S., Barreiro, E. J., Cardoso-Lopes, E. M., Young, M. C. M., Torres, L. B., Velloso, J. C. R., & De Oliveira, O. M. M. (2008). Chemical constituents of the flowers of *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). *Química Nova*, 31(4), 802-806.
- Renault, J.-H., Nuzillard, J.-M., Intes, O., & Maciuk, A. (2002). Solvents systems. In A. Berthod. (Ed.), *Countercurrent Chromatography – The support-Free Liquid Stationary Phase*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Ribéreau-Gayon, P. (1973). Interpretation chimique de la couleur des vins rouges. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 12, 119-142.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006a). *Traité d'oenologie -Microbiologie du vin. Vinifications* (2ème ed. Vol. 1): Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdiou, D. (2006b). *Traité d'oenologie - Chimie du vin. Stabilisation et traitements* (2ème ed. Vol. 2): Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P., & Glories, Y. (1983). Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(5), 505-516.
- Ricardo da Silva, J. M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A., & Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, 30(4), 1259-1264.
- Rinaldi, A., Gambuti, A., & Moio, L. (2012). Application of the SPI (Saliva Precipitation Index) to the evaluation of red wine astringency. *Food Chem*, 135(4), 2498-2504.
- Rinaldi, A., Iturmendi, N., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., & Moio, L. (2015). Transfer of tannin characteristics from grape skins or seeds to wine-like solutions and their impact on potential astringency. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 667-676.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 17-23.
- Ristic, R., & Iland, P. G. (2005). Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(1), 43-58.
- Robichaud, J. L., & Noble, A. C. (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(3), 343-353.

- Rocha, G. B., Freire, R. O., Simas, A. M., & Stewart, J. J. P. (2006). RM1 : A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *Journal of Computational Chemistry*, 27(10), 1101-1111.
- Rockenbach, I. I., Ritter, C., Santiago-Schübel, B., Thiele, B., Fett, R., & Galensa, R. (2012). Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. *Food Research International*, 48(2), 848-855.
- Roland, W. S. U., Van Buren, L., Gruppen, H., Driesse, M., Gouka, R. J., Smit, G., & Vincken, J.-P. (2013). Bitter taste receptor activation by flavonoids and isoflavonoids: modeled structural requirements for activation of hTAS2R14 and hTAS2R39. *J Agric Food Chem*, 61(44), 10454-10466.
- Romeyer, F. M., Macheix, J.-J., & Sapis, J.-C. (1986). Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry*, 25(1), 219-221.
- Rouseff, R. L., Martin, S. F., & Youtsey, C. O. (1987). Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *J Agric Food Chem*, 35(6), 1027-1030.
- Rudnitskaya, A., Nieuwoudt, H. H., Muller, N., Legin, A., du Toit, M., & Bauer, F. F. (2010). Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue. *Anal Bioanal Chem*, 397(7), 3051-3060.
- Rustioni, L. (2016). Grape seed ripening evaluation by ortho-diphenol quantification. *Italian journal of food science*, 28(3), 510-516.
- Ryan, J.-M., & Revilla, E. (2003). Anthocyanin Composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *J Agric Food Chem*, 51(11), 3372-3378.

S

-
- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197-206.
- Sadhu, S. K., Phattanawasin, P., Choudhuri, M. S. K., Ohtsuki, T., & Ishibashi, M. (2006). A new lignan from *Aphanamixis polystachya*. *Journal of Natural Medicines*, 60(3), 258-260.
- Saeki, K., Yuo, A., Isemura, M., Abe, I., Seki, T., & Noguchi, H. (2000). Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23(11), 1391-1394.
- Sáenz-Navajas, M.-P., Fernández-Zurbano, P., & Ferreira, V. (2012). Contribution of Nonvolatile Composition to Wine Flavor. *Food Reviews International*, 28(4), 389-411.
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J. P., & Cheynier, V. (2004). Demonstration of the occurrence of flavanol–anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 325-332.
- Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., & Lee, Y. S. (2005). An update on bioactive plant lignans. *Nat Prod Rep*, 22(6), 696-716.
- Sandhu, A. K., & Gu, L. (2010). Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J Agric Food Chem*, 58(8), 4681-4692.
- Sannohe, Y., Gomi, S., Murata, T., Ohyama, M., Yonekura, K., Kanegae, M., & Koga, J. (2011). A new glycosylated dihydrochalcone acid from cacao germs (*Theobroma cacao* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(8), 1606-1607.

- Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E. M., & Escribano-Bailón, M. T. (1995). Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chem*, 53(2), 197-201.
- Santos, S. A. O., Vilela, C., Freire, C. S. R., Neto, C. P., & Silvestre, A. J. D. (2013). Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from Eucalyptus wood. *Journal of Chromatography B*, 938, 65-74.
- Sarni-Manchado, P., Canals-Bosch, J. M., Mazerolles, G., & Cheynier, V. (2008). Influence of the glycosylation of human salivary proline-rich proteins on their interactions with condensed tannins. *J Agric Food Chem*, 56(20), 9563-9569.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Interactions of Grape Seed Tannins with Salivary Proteins. *J Agric Food Chem*, 47(1), 42-47.
- Sarni, F., Moutounet, M., Puech, J. L., & Rabier, P. (1990). Effect of heat treatment of oak wood extractable compounds. *Holzforschung*, 44(6), 461-466.
- Saroli, A. (1985). Interaction of denatonium chloride with the bitter taste receptor. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*.
- Saroli, A. (1986). Structure-activity relationship of bitter compounds related to denatonium chloride and dipeptide methyl esters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 182, 118-120.
- Saroli, A. (1987). Structure-activity relationship of bitter dipeptide esters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 184, 122-124.
- Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y., & Quideau, S. (2006). Extraction, detection, and quantification of flavano-ellagitannins and ethylvescalagin in a Bordeaux red wine aged in oak barrels. *J Agric Food Chem*, 54(19), 7349-7354.
- Scharbert, S., & Hofmann, T. (2005). Molecular Definition of Black Tea Taste by Means of Quantitative Studies, Taste Reconstitution, and Omission Experiments. *J Agric Food Chem*, 53(13), 5377-5384.
- Scharbert, S., Holzmann, N., & Hofmann, T. (2004a). Identification of the Astringent Taste Compounds in Black Tea Infusions by Combining Instrumental Analysis and Human Bioresponse. *J Agric Food Chem*, 52(11), 3498-3508.
- Scharbert, S., Jezussek, M., & Hofmann, T. (2004b). Evaluation of the taste contribution of theaflavins in black tea infusions using the taste activity concept. *European Food Research and Technology*, 218(5), 442-447.
- Schlienger, J. L., & Monnier, L. (2014). Histoire du goût sucré : entre morale et plaisir. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 8(3), 346-351.
- Schmiech, L., Uemura, D., & Hofmann, T. (2008). Reinvestigation of the Bitter Compounds in Carrots (*Daucus carota* L.) by Using a Molecular Sensory Science Approach. *J Agric Food Chem*, 56(21), 10252-10260.
- Schwarz, B., & Hofmann, T. (2007). Isolation, Structure Determination, and Sensory Activity of Mouth-Drying and Astringent Nitrogen-Containing Phytochemicals Isolated from Red Currants (*Ribes rubrum*). *J Agric Food Chem*, 55(4), 1405-1410.
- Scinska, A., Koros, E., Habrat, B., Kukwa, A., Kostowski, W., & Bienkowski, P. (2000). Bitter and sweet components of ethanol taste in humans. *Drug and Alcohol Dependence*, 60(2), 199-206.
- Scott, K. (2005). Taste recognition: food for thought. *Neuron*, 48(3), 455-464.
- Scragg, A. H., & Allan, E. J. (1994). Quassia amara (Surinam Quassia) : In Vitro Culture and the Production of Quassin. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Medicinal and Aromatic Plants VI* (pp. 316-326). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Seikel, M. K., Hostettler, F. D., & Niemann, G. J. (1971). Phenolics of *Quercus rubra* wood. *Phytochemistry*, 10(9), 2249-2251.

- Setha, S., Kondo, S., Hirai, N., & Ohigashi, H. (2005). Quantification of ABA and its metabolites in sweet cherries using deuterium-labeled internal standards. *Plant Growth Regulation*, 45(3), 183-188.
- Setter, T. L., Brenner, M. L., Brun, W. A., & Krick, T. P. (1981). Identification of a Dihydrochalcone Acid Aldopyranoside from Soybean Tissue. *Plant Physiology*, 68(1), 93-95.
- Shi, H., Liu, M., Wang, R., Gao, B., Zhang, Z., Niu, Y., & Yu, L. (2015). Separating four diastereomeric pairs of dihydroflavonol glycosides from *Engelhardia roxburghiana* using high performance counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1383, 79-87.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., & Kakuda, Y. (2003a). Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *Journal of medicinal food*, 6(4), 291-299.
- Shi, P., Zhang, J., Yang, H., & Zhang, Y.-P. (2003b). Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in mammalian evolution. *Molecular biology and evolution*, 20(5), 805-814.
- Shin, W., Kim, S. J., Shin, J. M., & Kim, S.-H. (1995). Structure-taste correlations in sweet dihydrochalcone, sweet dihydroisocoumarin, and bitter flavone compounds. *Journal of medicinal chemistry*, 38(21), 4325-4331.
- Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J.-M., Fouquet, E., Pianet, I., & Dufourc, E. J. (2003). Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin-Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach. *Biochemistry*, 42(35), 10385-10395.
- Singh, N., Pydi, S. P., Upadhyaya, J., & Chelikani, P. (2011). Structural basis of activation of bitter taste receptor T2R1 and comparison with Class A G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 36032-36041.
- Soares, S., Kohl, S., Thalmann, S., Mateus, N., Meyerhof, W., & De Freitas, V. (2013). Different Phenolic Compounds Activate Distinct Human Bitter Taste Receptors. *J Agric Food Chem*, 61(7), 1525-1533.
- Sohi, K. K., Mittal, N., Hundal, M. K., & Khanduja, K. L. (2003). Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: a Bcl-2 independent mechanism. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 49(4), 221-227.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., & Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1013-1023.
- Somers, T. C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, 10(9), 2175-2186.
- Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43(2), 509-512.
- Souquet, J.-M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *J Agric Food Chem*, 48(4), 1076-1080.
- Stark, T., Bareuther, S., & Hofmann, T. (2006). Molecular Definition of the Taste of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) by Means of Quantitative Studies and Sensory Experiments. *J Agric Food Chem*, 54(15), 5530-5539.
- Stark, T., Wollmann, N., Wenker, K., Lösch, S., Glabasnia, A., & Hofmann, T. (2010). Matrix-Calibrated LC-MS/MS Quantitation and Sensory Evaluation of Oak Ellagitannins and Their Transformation Products in Red Wines. *J Agric Food Chem*, 58(10), 6360-6369.
- Staudt, G., Schneider, W., & Leidel, J. (1986). Phases of berry growth in *Vitis vinifera*. *Annals of Botany*, 58(6), 789-800.
- Stephens, P. J., & Devlin, F. J. (2000). Determination of the structure of chiral molecules using ab initio vibrational circular dichroism spectroscopy. *Chirality*, 12(4), 172-179.

- Stephens, P. J., Pan, J.-J., Devlin, F. J., Urbanová, M., Julínek, O., & Hájíček, J. (2008). Determination of the absolute configurations of natural products via density functional theory calculations of vibrational circular dichroism, electronic circular dichroism, and optical rotation : The iso-schizozygane alkaloids isoschizogaline and isoschizogamine. *Chirality*, 20(3-4), 454-470.
- Sudraud, P. (1963). *Etude expérimentale de la vinification en rouge*. (Thèse Docteur Ingénieur), Faculté des Sciences de Bordeaux.
- Sun-Waterhouse, D., & Wadhwa, S. S. (2013). Industry-Relevant Approaches for Minimising the Bitterness of Bioactive Compounds in Functional Foods : A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 607-627.
- Sun, B. S., Pinto, T., Leandro, M. C., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Spranger, M. I. (1999). Transfer of Catechins and Proanthocyanidins From Solid Parts of the Grape Cluster Into Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(2), 179-184.
- Suzuki, Y., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Sugawara, F., Yoshida, S., Nukada, T., & Ogawa, T. (1988). Synthesis of Benzyl 6-O-beta-D-apiofuranosyl-beta-D-glucopyranoside, a Metabolite of Benzoic Acid in *Lemna paucicostata*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(5), 1261-1266.

T

-
- Temussi, P. A. (2006). Natural sweet macromolecules: how sweet proteins work. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(16), 1876-1888.
- Temussi, P. A. (2009). Sweet, bitter and umami receptors: a complex relationship. *Trends Biochem Sci*, 34(6), 296-302.
- Thibon, C., Dubourdieu, D., Darriet, P., & Tominaga, T. (2009). Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexanol content in *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc and Semillon grape juice. *Food Chem*, 114(4), 1359-1364.
- Thorngate, J. H. (1992). *Flavan-3-ols and their polymers in grapes and wines: Chemical and sensory properties*. . Dissertation, University of California, Davis.
- Thorngate, J. H. (1997). The physiology of human sensory response to wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 271-279.
- Thorngate, J. H., & Singleton, V. L. (1994). Localization of Procyanidins in Grape Seeds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(2), 259-262.
- Tibiriçá, E. (2001). Cardiovascular Properties of Yangambin, a Lignan Isolated from Brazilian Plants. *Cardiovasclar Drug Reviews*, 19(4), 313-328.
- Tominaga, T., Blanchard, L., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2000). A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *J Agric Food Chem*, 48(5), 1799-1802.
- Trousdale, E. K., & Singleton, V. L. (1983). Astilbin engeletin in grapes and wine. *Phytochemistry*, 22(2), 619-620.

U

-
- Upadhyaya, J., Pydi, S. P., Singh, N., Aluko, R. E., & Chelikani, P. (2010). Bitter taste receptor T2R1 is activated by dipeptides and tripeptides. *Biochemical and biophysical research communications*, 398(2), 331-335.
- Urpi-Sarda, M., Zamora-Ros, R., Lamuela-Raventos, R. M., Cherubini, A., Jauregui, O., de la Torre, R., Covas, M. I., Estruch, R., Jaeger, W., & Andres-Lacueva, C. (2007). HPLC–Tandem Mass Spectrometric Method to Characterize Resveratrol Metabolism in Humans. *Clinical Chemistry*, 53(2), 292-299.

V

- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J.-M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2002). Changes in Proanthocyanidin Chain Length in Winelike Model Solutions. *J Agric Food Chem*, 50(8), 2261-2266.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564-573.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 57-65.
- Vitrac, X., Castagnino, C., Waffo-Téguo, P., Delaunay, J.-C., Vercauteren, J., Monti, J.-P., Deffieux, G., & Mérillon, J.-M. (2001). Polyphenols Newly Extracted in Red Wine from Southwestern France by Centrifugal Partition Chromatography. *J Agric Food Chem*, 49(12), 5934-5938.
- Vivas, N. (1997). *Recherches sur la qualité du chêne français de tonnellerie (Q. petraea Liebl., Q. robur L.) et sur les mécanismes d'oxydoréduction des vins rouges au cours de leur élevage en barriques* (Thèse de Doctorat), Université de Bordeaux 2.
- Vivas, N., & Glories, Y. (1996). Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red Wines During Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 103-107.
- Vivas, N., Pianet, I., Bourgeois, G., Vitry, C., Servens, C., & Glories, Y. (1998). Characterization of Heartwood Lignin Fractions from *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl., the Main Oak Species Used for Barrel Making. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(1), 49-55.
- Voirin, S., Baumes, R., Bayonove, C., M'Bairaroua, O., & Tapiero, C. (1990). Synthesis and N.M.R. spectral properties of grape monoterpenyl glycosides. *Carbohydrate Research*, 207(1), 39-56.
- Voirin, S. G., Baumes, R. L., Sapis, J.-C., & Bayonove, C. L. (1992). Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. *Journal of Chromatography A*, 595(1), 269-281.
- Von Saint Paul, V., Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Keßler, T., Schmitt-Kopplin, P., & Schäffner, A. R. (2011). The Arabidopsis Glucosyltransferase UGT76B1 Conjugates Isoleucic Acid and Modulates Plant Defense and Senescence. *The Plant Cell*, 23(11), 4124-4145.

W

- Waterhouse, A. L., Ignelzi, S., & Shirley, J. R. (2000). A Comparison of Methods For Quantifying Oligomeric Proanthocyanidins From Grape Seed Extracts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(4), 383-389.
- Wiener, A., Shudler, M., Levit, A., & Niv, M. Y. (2012). Bitter DB : a database of bitter compounds. *Nucleic acids research*, 40(D1), D413-D419.
- Wiet, S. G., & Beyts, P. K. (1992). Sensory Characteristics of Sucralose and other High Intensity Sweeteners. *Journal of Food Science*, 57(4), 1014-1019.
- Wildenradt, H. L., & Singleton, V. L. (1974). The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25(2), 119-126.

- Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., & Massy-Westropp, R. A. (1983). Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *Vitis Vinifera* grapes. *Phytochemistry*, 22(9), 2039-2041.
- Wilson, C. W. M., O'Brien, C., & MacAirt, J. G. (1973). The effect of metronidazole on the human taste threshold to alcohol. *British Journal of Addiction to Alcohol and Other Drugs*, 68(2), 99-110.
- Winnig, M., Bufe, B., Kratochwil, N. A., Slack, J. P., & Meyerhof, W. (2007). The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct Biol*, 7(1), 1.
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707-735.
- Wu, S., Wu, D., Liang, J., & Berthod, A. (2012). Modeling gradient elution in countercurrent chromatography: Efficient separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *J Sep Sci*, 35, 964-976.

X

-
- Xu, C., Zhang, Y., Wang, J., & Lu, J. (2010). Extraction, distribution and characterisation of phenolic compounds and oil in grapeseeds. *Food Chem*, 122(3), 688-694.

Y

-
- Yanagida, A., Kanda, T., Takahashi, T., Kamimura, A., Hamazono, T., & Honda, S. (2000). Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 890(2), 251-259.
- Yanagida, A., Shoji, T., & Shibusawa, Y. (2003). Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 56(1-3), 311-322.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *J Agric Food Chem*, 52(2), 255-260.
- Yoshinari, K., Sashida, Y., & Shimomura, H. (1989). Two New Lignan Xylosides from the Barks of *Prunus siori* and *Prunus padus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(12), 3301-3303.

Z

-
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto : Aspectos científicos y prácticos*. .
- Zehnter, R., & Gerlach, H. (1995). Enantiodifferentiation in Taste Perception of the Phylloolulcins. *Tetrahedron*, 6(11), 2779-2786.
- Zhang, B., Cai, J., Duan, C. Q., Reeves, M. J., & He, F. (2015). A review of polyphenolics in oak woods. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 6978-7014.
- Zhang, Q.-F., Fu, Y.-J., Huang, Z.-W., Shangguang, X.-C., & Guo, Y. X. (2013). Aqueous Stability of Astilbin: Effects of pH, Temperature, and Solvent. *J Agric Food Chem*, 61(49), 12085-12091.
- Zhang, X.-Y., Li, B.-G., Zhou, M., Yuan, X.-H., & Zhang, G.-L. (2006). Chemical Constituents of *Phacellaria compressa* Benth. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(2), 236-240.

- Zhang, Y.-P., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, *112*(3), 293-301.
- Zhao, G. Q., Zhang, Y.-P., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, *115*(3), 255-266.
- Zheng, M. S., Yang, J. H., Li, Y., Li, X., Chang, H. W., & Son, J. K. (2010). Anti-Inflammatory activity of constituents isolated from *Ulmus davidiana* var. *Japonica*. *Biomolecules and Therapeutics*, *18*(3), 321-328.
- Zhu, J., Ren, J., Qin, J., Cheng, X., Zeng, Q., Zhang, F., Yan, S., Jin, H., & Zhang, W. (2012). Phenylpropanoids and lignanoids from *Euonymus acanthocarpus*. *Archives of Pharmacal Research*, *35*(10), 1739-1747.
- Zimman, A., Joslin, W. S., Lyon, M. L., Meier, J., & Waterhouse, A. L. (2002). Maceration Variables Affecting Phenolic Composition in Commercial-scale Cabernet Sauvignon Winemaking Trials. *American Journal of Enology and Viticulture*, *53*(2), 93-98.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Article

Marchal, A., Cretin, B.N., Sindt, L., Waffo-Teguo, P. and Dubourdieu, D., Contribution of oak lignans to wine taste: chemical identification, sensory characterization and quantification, 2015, *Tetrahedron*, 71(20), 3148-3156.

Cretin, B.N., Sallembien, Q., Sindt, L., Daugey, N., Buffeteau, T., Waffo-Teguo, P., Dubourdieu, D. and Marchal, A., How stereochemistry influences the taste of wine: isolation, characterization and sensory evaluation of lyoniresinol stereoisomers, 2015, *Analytica Chimica Acta*, 888, 191-198.

Cretin, B.N., Dubourdieu, D. and Marchal, A., Development of a quantitation method to assay both lyoniresinol enantiomers in wines, spirits, and oak wood by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, 2016, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(14), 3789-3799.

Cretin, B.N., Dubourdieu, D., Marchal, A., Influence of ethanol content on sweetness and bitterness perception in dry wines, *LWT*, soumis.

Oral

Does stereochemistry influence the taste of wine? Purification, characterization and sensory evaluation of lyoniresinol isomers, *Symposium d'oenologie (Oeno 2015)* – juin 2015, Bordeaux.

Towards molecular explanation of wine bitterness: Identification of new lignans from oak wood and sensory assessment, *In Vino Analytica Scientia Symposium (IVAS)* – juillet 2015, Italie.

How stereochemistry can influence the taste of wine? Molecular explanation of wine bitterness through the identification and sensory assessment of new lignans from oak wood, *Journée scientifique de l'école doctorale SVS* – avril 2016, Bordeaux.

How stereochemistry can influence the taste of wine? Molecular explanation of wine bitterness through the identification and sensory assessment of new lignans from oak wood, *Young Scientist Symposium (YSS 2016)* – mai 2016, Talence (*Prix du meilleur oral / 26*).

Poster

Contribution of oak lignans to wine taste: chemical identification, sensory characterization and quantification, *Symposium d'oenologie (Oeno 2015)* – juin 2015, Bordeaux.

Does stereochemistry influence the taste of wine? Purification, characterization and sensory evaluation of lyoniresinol isomers, *In Vino Analytica Scientia Symposium (IVAS)* – juillet 2015, Italie (*Prix 2^{ème} poster / 93*).

Encadrement de stagiaires

Lauriane Sindt, Master 2

Quentin Sallembien, Licence 3

Xiaotong YAO, Master 1

Chloé Papin, Licence 3

Justine Laboyrie, Master 1

Valentin Pothier, Licence 2

ANNEXES

ANNEXE 1

DONNEES RMN ^1H et ^{13}C DES LIGNANES 1 à 10

ANNEXE 1-A : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des lignanes non glycosylés, lyonirésinol, **1**, **2**, **9** et **10**.

	lyonirésinol		1		2		8		10	
	δ_{C}	δ_{H} (J=Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J=Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J=Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J=Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J=Hz)
1	128,8		127,5		124		131,4		126,20	
2	106,4	6,6 s	111	6,67 s	106,2	6,62 s	105,8	6,33 s	106,01	6,59 s
3	147,3		145,8		147,3		147,2		147,42	
4	137,5		143,9		137,3		132,8		137,14	
5	146,3		115,9	6,22 s	146,1		147,2		144,96	
6	124,9		132,3		127,7		105,8	6,33 s	126	
7	32,1	2,58 dd (15,1 ; 11,8) 2,71 dd (15,1 ; 4,6)	32,2	2,8 m	31,5	2,68 dd (15,1 ; 10,8) 2,83 dd (15,2 ; 5)	35,1	2,54 dd (8 ; 13,3) 2,71 dd (5,3 ; 13,3)	32,37	2,68 dd (17 ; 11,4) 2,99 dd (17 ; 5,8)
8	39,5	1,63 m	38,5	2,02 m	35,6	2,01 m	42,8	1,92 m	33,60	2,02 m
9	65,4	3,50 dd (10,3 ; 6,8) 3,60 dd (10,7 ; 5)	64,5	3,72 m	66,9	4,17 dd (10,8 ; 7,2) 4,36 dd (10,9 ; 5,1)	60,6	3,58 dd (5,5 ; 10,8) 3,67 m	63,91	3,54 dd (11,3 ; 5,2) 3,60 dd (11 ; 4,7)
3-OMe	55,3	3,87 s	54,9	3,82 s	54,8	3,87 s	55,1	3,76 s	54,74	3,86 s
5-OMe	58,7	3,39 s			58,3	3,39 s	55,1	3,76 s	58,27	3,26 s
1'	137,9		136,2		137,1		131,4		133,20	
2'	105,5	6,4 s	106,2	6,45 s	105,1	6,4 s	105,8	6,33 s	107,3	6,41 s
3'	147,6		147,8		147,3		147,2		147	
4'	133,2		133,5		132,8		132,8		136,3	
5'	147,6		147,8		147,3		147,2		147	
6'	105,5	6,4 s	106,2	6,45 s	105,1	6,4 s	105,8	6,33 s	107,3	6,41 s
7'	40,9	4,32 d (5,6)	47,1	3,83 m	40,2	4,39 d (5,4)	35,1	2,54 dd (8 ; 13,3) 2,71 dd (5,3 ; 13,3)	39,87	4,59 d (4,4)
8'	47,5	1,99 m	46,5	1,8 m	46,9	2,13 m	42,8	1,92 m	43	1,93 m
9'	62,8	3,5 d (4,9)	60,6	3,42 dd (3,9 ; 11,3) 3,69 m	61,8	3,53 dd (11,1 ; 6,2) 3,58 dd (11 ; 4,3)	60,6	3,58 dd (5,5 ; 10,8) 3,67 m	61,81	3,46 dd (10,5 ; 8,4) 3,68 dd (10,8 ; 5,8)
3'-OMe	55,2	3,75 s	55,3	3,8 s	55	3,74 s	55,1	3,76 s	55	3,74 s
5'-OMe	55,2	3,75 s	55,3	3,8 s	55	3,74 s	55,1	3,76 s	55	3,74 s
gallate	1'''				119,9					
	2'''				108,4	7,04 s				
	3'''				145					
	4'''				138					
	7'''				166,9					

ANNEXE 1-B : Déplacements chimiques ¹H et ¹³C des lignanes glycosylés 3, 4, 5, 6, 7 et 9.

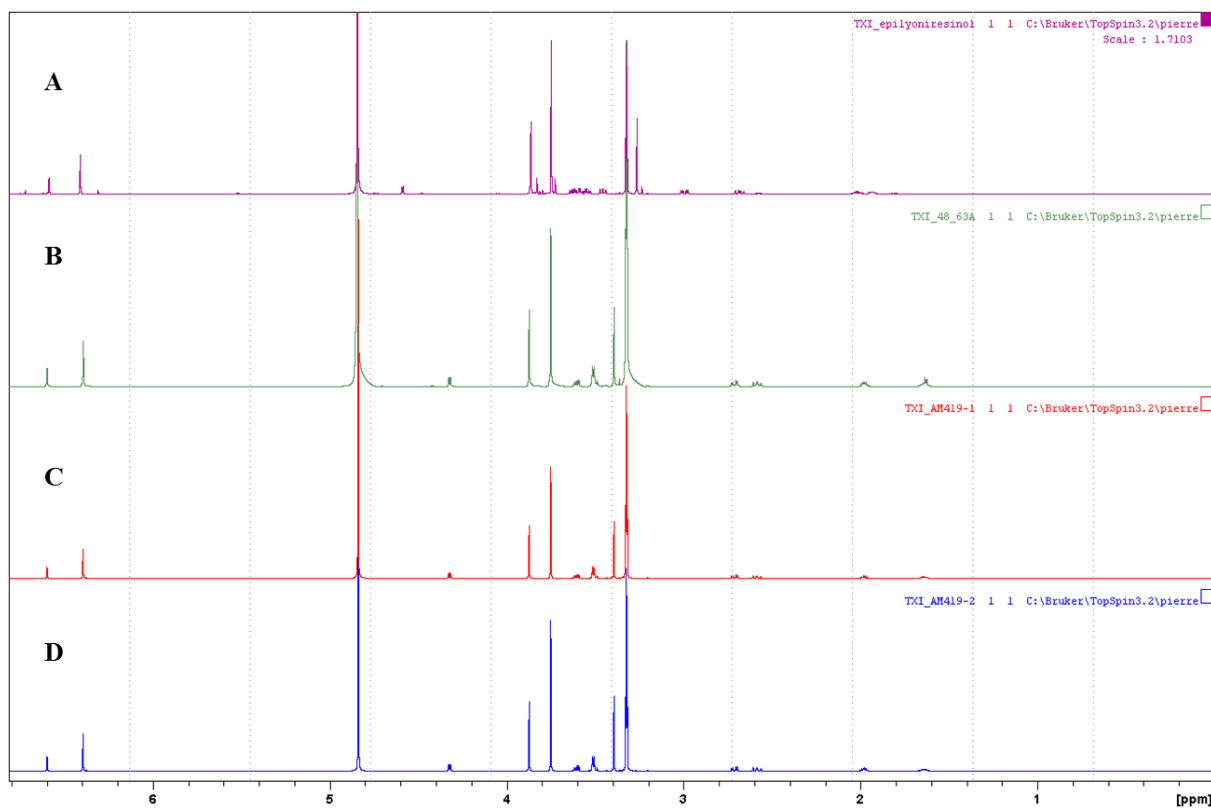
	3		4		5		6		7		9		
	¹³ C	¹ H (J=Hz)	¹³ C	¹ H (J=Hz)	¹³ C	¹ H (J=Hz)	¹³ C	¹ H (J=Hz)	¹³ C	¹ H (J=Hz)	¹³ C	¹ H (J=Hz)	
1	134,3		129		124,4		124,25		124,4		131,6		
2	106,2	6,58 s	106,3	6,58 s	106,3	6,6 s	106,2	6,59 s	106,3	6,6 s	105,8	6,34 s	
3	147		147		146,9		146,4		147,1		147,4		
4	137		137,6		136,8		137,3		137,5		132,8		
5	146		145,9		145,6		146		146,1		147,4		
6	122,7		124,2		122,7		123		123,6		105,8	6,34 s	
7	32,1	2,64 dd (15 ; 11,5) 2,73 dd (15,2 ; 4,7)	32,1	2,69 m 2,7 m	31,9	2,63 dd (14,8 ; 11,7) 2,73 dd (15,1 ; 4,6)	32	2,67-2,7 m	32	2,73 dd (15,2 ; 11,1) 2,81 dd (14,7 ; 4,2)	34,6	2,72 dd (13,7 ; 7) 2,57 dd (12 ; 8,2)	
8	45	2,07 m	45,1	2,04 m	38,9	1,72 m	39,5	1,70 m	35,9	2,06 m	39,7	2,08 m	
9	64,2	3,55 dd (10,8 ; 6,5) 3,66 dd (10,9 ; 4,2)	64,4	3,69 m (11,1 ; 6,1) 3,65 dd (11,1 ; 4,6)	64,5	3,56 dd (10,9 ; 6,6) 3,66 dd (10,8 ; 4,3)	64,6	3,63 d (5) 3,63 d (5)	66,6	4,25 dd (8,2 ; 6,4) 4,36 dd (11 ; 4,5)	69,5	3,99 dd (9,6 ; 5,8) 3,49 m	
3-OMe	57,4	3,86 s	54,7	3,86 s	54,8	3,87 s	54,8	3,87 s	54,8	3,87 s	54,7	3,76 s	
5-OMe	58,3	3,34 s	58,3	3,31 s	58,3	3,36 s	58,3	3,34 s	58,3	3,35 s	54,7	3,76 s	
1'	132,2		132,5		137,6		137,6		133		131,6		
2'	105,4	6,43 s	105,5	6,42 s	105,4	6,44 s	105,6	6,43 s	105,4	6,45 s	105,8	6,37 s	
3'	147,2		147,2		147,1		147,2		147,4		147,4		
4'	139,5		139,5		132		132		139		132,8		
5'	147,2		147,2		147,1		147,2		147,4		147,4		
6'	105,4	6,43 s	105,5	6,42 s	105,4		105,6		105,4	6,45 s	105,8	6,37 s	
7'	41,2	4,37 d (6,7)	41,5	4,23 d (7)	40,9	4,44 d (6,2)	41,4	4,24 d (6,4)	41,2	4,44 d (6,3)	34,2	2,65 dd (13,6 ; 6,9) 2,58 dd (12 ; 8,5)	
8'	38,6	1,72 m	38,9	1,72 m	44,7	2,09 m	44,7	2,14 m	45,3	2,2 m	42,2	1,95 m	
9'	69,4	3,43 dd (9,7 ; 3,9) 3,85 dd (11,3 ; 5,3)	69,5	3,59 dd (10 ; 4,8) 3,82 dd (10,1 ; 4,6)	69,8	3,47 dd (9,8 ; 4) 3,9 dd (9,7 ; 5,6)	70,4	3,61 dd (10,2 ; 5,2) 3,87 dd (12 ; 5,9)	68,8	3,49 m 3,89 m	61	3,56 dd (10,9 ; 6,3) 3,7 dd (10,9 ; 5,6)	
3'-OMe	55,1	3,75 s	55	3,75 s	55,1	3,76 s	55,1	3,77 s	55,2	3,75 s	54,7	3,77 s	
5'-OMe	55,1	3,75 s	55	3,75 s	55,1	3,76 s	55,1	3,77 s	55,2	3,75 s	54,7	3,77 s	
sucrte	1''	104	4,23 d (7,6)	103,6	4,11 d (7,5)	103,3	4,3 d (7,8)	102,7	4,15 d (7,8)	104,2	4,24 d (6,9)	103,9	4,19 d (7,5)
	2''	73,3	3,23 dd (8,9 ; 7,7)	73,3	3,2 dd (9,7 ; 7)	73,6	3,25 dd (9,1 ; 8,1)	73,6	3,21 m	73,3	3,24 dd (8,6 ; 7,9)	73,5	3,21 dd (8,8 ; 7,8)
	3''	76,5	3,32 m	76,3	3,28 dd (9,8 ; 8)	76,5	3,38 dd (8,8 ; 8,8)	76,5	3,31 m	76,5	3,32 m	76,5	3,31 m
	4''	69,5	3,49 ddd (10,1 ; 8,9 ; 5,4)	69,5	3,5 ddd (10,1 ; 8,9 ; 5,4)	70	3,3 dd (8,6 ; 8,6)	70	3,32 m	69,5	3,49 m	69,4	3,46 m
	5''	65,3	3,84 dd (11,3 ; 5,3) 3,17 dd (11,4 ; 10,4)	65,3	3,87 dd (11,3 ; 5,6) 3,17 dd (11,3 ; 10,5)	76,2	3,25 m	76,5	3,17 m	65,3	3,15 dd (11,3 ; 10,5) 3,83 dd (11,6 ; 5,3)	65,4	3,86 dd (11,5 ; 5,3) 3,18 dd (11,1 ; 10,8)
	6''					61,2	3,67 dd (12 ; 5,6) 3,89 dd (9,7 ; 5,6)	61	3,7 dd (11,8 ; 5,5) 3,86 dd (12,7 ; 2,3)				
gallate	1'''									119,0			
	2''' , 6'''									108,6	7,05 s		
	3''' , 5'''									145,2			
	4'''									138,1			
	7'''									167,1			

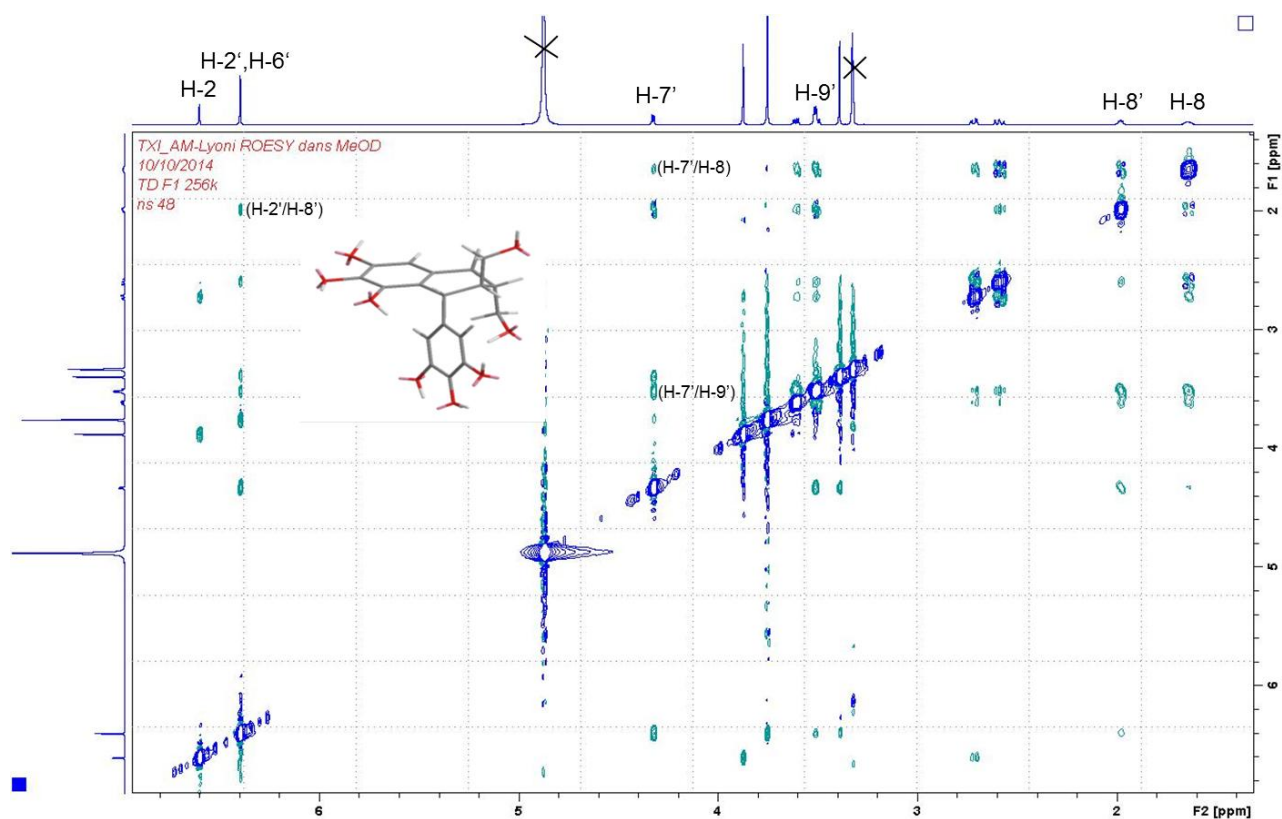
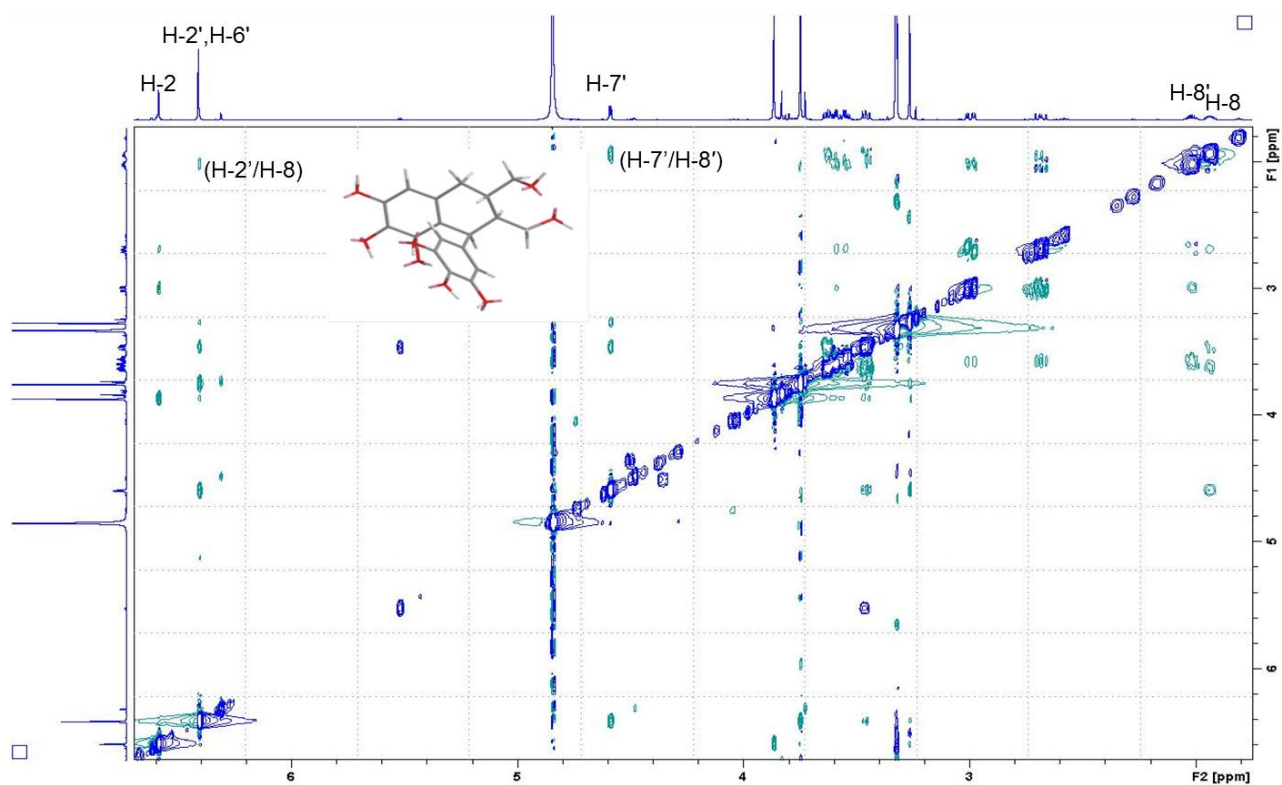
ANNEXE 2

DONNEES RMN ^1H et ^1H - ^1H ROESY DES ISOMERES DU LYONIRESINOL

ANNEXE 2-A

Spectres ^1H de l'*épi*-lyonirésinol **10** (A), lyonirésinol (B), et des énantiomères **a** (C) et **b** (D) du lyonirésinol dans CD_3OD à 300 °K.



ANNEXE 2-B : Spectres ^1H - ^1H ROESY du lyonirésinol dans CD_3OD .ANNEXE 2-3 : Spectres ^1H - ^1H ROESY de l'épi-lyonirésinol **10** dans CD_3OD .

ANNEXE 3
RECAPITULATIF DES RESULTATS DES CALCULS D'OPTIMISATION DES 28
CONFORMATIONS LES PLUS STABLES.

Conformères	RM1	dRM1	DFT SCF / 6-311G (d,p) (5D, 7F)	dHF	Free / Gibbs (J)	dHa x1.10 ⁶	Etats	% Etats	Somme (%)
an9_13	-297,26064	2,29567	-1456,74656	98,10	-1456,3281	-	1,0000	11,663	11,66
an3_3	-297,82022	1,73609	-1456,74385	2815,05	-1456,3280	55	0,9425	10,992	22,65
an2_1	-299,05990	0,49641	-1456,74382	2842,35	-1456,3280	75	0,8683	10,127	32,78
an9_2	-299,50392	0,05239	-1456,74529	1373,68	-1456,3279	68	0,8061	9,401	42,18
an9_12	-297,33423	2,22208	-1456,74666	0,00	-1456,3278	120	0,7083	8,261	50,44
an5b_4	-297,81087	1,74544	-1456,74561	1055,20	-1456,3275	220	0,5588	6,517	56,96
an1_1	-298,54518	1,01113	-1456,74553	1135,46	-1456,3273	228	0,4371	5,098	62,06
an1_30	-297,76973	1,78658	-1456,74550	1159,73	-1456,3272	117	0,3853	4,494	66,55
an1_17	-298,02796	1,52835	-1456,74540	1261,20	-1456,3272	32	0,3723	4,341	70,89
an1_18	-297,99780	1,55851	-1456,74526	1400,85	-1456,3269	294	0,2712	3,163	74,06
an1_12	-298,14204	1,41427	-1456,74371	2946,85	-1456,3268	118	0,2385	2,782	76,84
an1_13	-298,13694	1,41937	-1456,74375	2911,87	-1456,3266	171	0,1984	2,314	79,15
an1_16	-298,03415	1,52216	-1456,74413	2533,31	-1456,3266	5	0,1973	2,301	81,45
an7_4	-299,10234	0,45396	-1456,74334	3321,52	-1456,3265	49	0,1870	2,181	83,63
an1_26	-297,80106	1,75525	-1456,74428	2382,51	-1456,3264	161	0,1572	1,833	85,47
an1_29	-297,77098	1,78533	-1456,74434	2318,54	-1456,3263	40	0,1506	1,756	87,22
an1_33	-297,64634	1,90997	-1456,74410	2561,60	-1456,3261	250	0,1149	1,340	88,56
an1_36	-297,41559	2,14072	-1456,74317	3488,10	-1456,3260	101	0,1030	1,202	89,77
an1_34	-297,56539	1,99091	-1456,74365	3016,21	-1456,3257	264	0,0774	0,903	90,67
an8_5	-297,40504	2,15127	-1456,74188	4783,19	-1456,3256	71	0,0717	0,837	91,51
an4_6	-298,25849	1,29782	-1456,74109	5569,64	-1456,3254	198	0,0580	0,676	92,18
an9_6	-298,34671	1,20960	-1456,74287	3793,27	-1456,3254	60	0,0543	0,634	92,81
an6_9	-297,67108	1,88523	-1456,74009	6573,70	-1456,3254	1	0,0543	0,633	93,45
an1_47	-297,10331	2,45300	-1456,74209	4572,07	-1456,3254	3	0,0541	0,631	94,08
an1_39	-297,32973	2,22658	-1456,74190	4758,13	-1456,3253	60	0,0507	0,591	94,67
an4_12	-297,57109	1,98522	-1456,74240	4259,50	-1456,3253	9	0,0502	0,586	95,26

an4_2	-298,85851	0,69779	-1456,74201	4647,39	-1456,3253	27	0,0488	0,569	95,82
an1_38	-297,37811	2,17820	-1456,74185	4811,12	-1456,3251	151	0,0414	0,483	96,31
an1_43	-297,19727	2,35904	#####	4745,16	-1456,3250	162	0,0348	0,406	96,71

RM1(Rocha *et al.*, 2006) et **dRM1** : énergies totales issues de calculs semi-empiriques

SCF / 6-311G(d,p) (5D, 7F) et **dHF** : énergie HF = Hartree Fock SCF , calculées en DFT (B3PW91 / 6-311G(d,p) (5D, 7F))

Free / Gibbs : enthalpie libre dite de Gibbs (Joule) s'exprime selon $G = H - T\Delta S$

Avec : $T = 298,15^\circ\text{K}$

S : entropie (J/K)

H : enthalpie (J)

dHa x 1.10⁶ : différence d'enthalpie libre de Gibbs entre deux conformations successive

Etats : "nombre d'états" pour la conformation considérée

% Etats = "**nombre d'état**" / **somme d'états** ; probabilité pour chaque conformation permettant de pondérer chaque spectre (de chaque conformation) pour en produire le spectre théorique calculé final

Somme (%) : correspond à la somme des % pris en compte pour calculer le spectre théorique final

ANNEXE 4

**DONNEES BRUTES DE QUANTIFICATION DU (±)-lyonirésinol ET DE SES
ENANTIOMERES (+)-lyonirésinol ET (-)-lyonirésinol DANS LES VINS ET EAUX-DE-VIE.**

Echantillons	(±)- lyonirésinol (mg/L)	(+)- lyonirésinol (%)	(-)- lyonirésinol (%)	(+)- lyonirésinol (mg/L)	(-)- lyonirésinol (mg/L)	Ratio énantiomérique <i>r</i>
VR-1	3,02	67	33	2,02	1,00	2,03
VR-2	2,20	48	52	1,06	1,14	0,93
VR-3	2,98	56	44	1,67	1,31	1,27
VR-4	1,60	56	44	0,89	0,70	1,27
VR-5	1,57	53	47	0,84	0,73	1,14
VR-6	0,78	52	48	0,40	0,37	1,09
VR-7	1,32	55	45	0,72	0,60	1,21
VR-8	1,29	54	46	0,69	0,59	1,17
VR-9	2,30	56	44	1,28	1,02	1,25
VR-10	2,16	68	32	1,47	0,69	2,14
VR-11	2,30	52	48	1,19	1,11	1,08
VR-12	2,20	68	32	1,50	0,71	2,12
VR-13	0,79	54	46	0,43	0,36	1,19
VR-14	1,15	63	37	0,72	0,42	1,71
VR-15	1,31	58	42	0,76	0,55	1,39
VR-16	2,10	63	37	1,33	0,77	1,73
VR-17	4,78	61	39	2,92	1,86	1,57
VR-18	2,00	61	39	1,21	0,78	1,55
VR-19	1,53	53	47	0,81	0,72	1,12
VR-20	5,88	58	42	3,43	2,45	1,40
VR-21	5,24	57	43	3,01	2,23	1,35
VR-22	3,37	56	44	1,90	1,47	1,30
VR-23	0,59	47	53	0,28	0,32	0,87
VR-24	7,16	49	51	3,54	3,63	0,98
VR-25	6,89	58	42	3,98	2,90	1,37
VR-26	4,71	57	43	2,67	2,04	1,31
VR-27	2,75	57	43	1,56	1,18	1,32
VR-28	6,48	55	45	3,57	2,92	1,22
VR-29	4,47	61	39	2,71	1,76	1,54
VR-30	4,75	57	43	2,70	2,05	1,32
VR-31	2,63	61	39	1,60	1,03	1,56
VR-32	2,68	59	41	1,58	1,10	1,44
VR-33	9,99	55	45	5,54	4,44	1,25
VR-34	3,86	54	46	2,07	1,78	1,16
VR-35	5,06	51	49	2,56	2,50	1,03
VR-36	2,59	46	54	1,18	1,41	0,84
VR-37	2,95	54	46	1,61	1,35	1,19
VR-38	3,26	55	45	1,80	1,46	1,23
VR-39	4,81	35	65	1,66	3,15	0,53

Vins Rouges

VR-40	6,43	53	47	3,39	3,05	1,11	
VR-41	4,81	53	47	2,56	2,26	1,13	
VR-42	5,62	63	37	3,53	2,09	1,69	
VR-43	4,64	46	54	2,13	2,50	0,85	
VR-44	2,13	59	41	1,26	0,88	1,43	
VR-45	0,88	62	38	0,55	0,34	1,61	
VR-46	4,71	54	46	2,56	2,15	1,19	
VR-47	4,16	50	50	2,07	2,08	1,00	
VR-48	2,28	67	33	1,53	0,75	2,06	
VR-49	4,89	38	62	1,88	3,01	0,62	
VR-50	1,93	42	58	0,81	1,12	0,73	
VR-51	0,87	60	40	0,52	0,34	1,52	
VR-52	2,55	65	35	1,67	0,88	1,88	
VR-53	1,56	64	36	0,99	0,57	1,74	
VR-54	1,98	62	38	1,23	0,75	1,65	
VR-55	3,98	63	37	2,51	1,47	1,71	
VR-56	3,45	75	25	2,58	0,87	2,95	
VR-57	1,79	59	41	1,06	0,73	1,44	
VR-58	7,78	61	39	4,77	3,02	1,58	
VR-59	0,90	61	39	0,55	0,35	1,56	
<hr/>							
Vins Blancs	VB-1	2,33	55	45	1,29	1,04	1,24
	VB-2	1,67	55	45	0,91	0,76	1,20
	VB-3	1,43	58	42	0,83	0,60	1,39
	VB-4	1,52	54	46	0,82	0,69	1,18
	VB-5	1,60	52	48	0,84	0,76	1,10
	VB-6	1,21	53	47	0,64	0,57	1,11
	VB-7	1,21	51	49	0,61	0,59	1,03
	VB-8	1,38	52	48	0,72	0,66	1,10
	VB-9	1,21	56	44	0,68	0,53	1,27
	VB-10	1,39	56	44	0,78	0,61	1,28
<hr/>							
Eaux-de-vie	EDV-1	6,60	55	45	3,64	2,96	1,23
	EDV-2	8,24	59	41	4,89	3,34	1,46
	EDV-3	4,90	54	46	2,65	2,25	1,18
	EDV-4	3,43	58	42	1,99	1,44	1,38
	EDV-5	17,51	57	43	9,97	7,53	1,32
	EDV-6	6,80	53	43	3,76	3,03	1,24
	EDV-7	5,87	55	45	3,20	2,66	1,20
	EDV-8	7,46	49	51	3,67	3,79	0,97
	EDV-9	11,19	49	51	5,46	5,74	0,95
	EDV-10	15,76	52	48	8,23	7,52	1,09

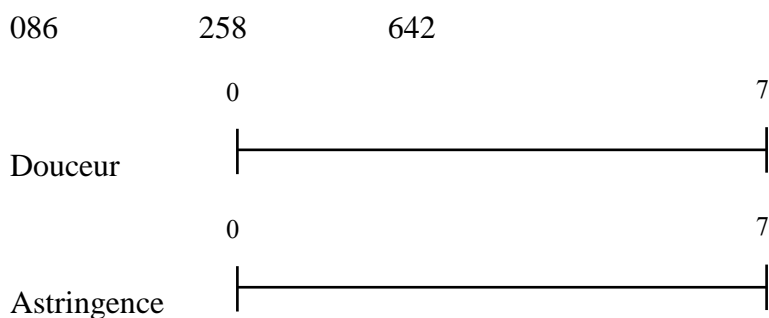
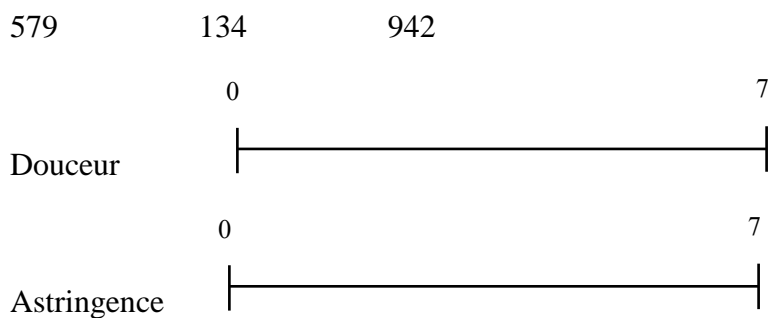
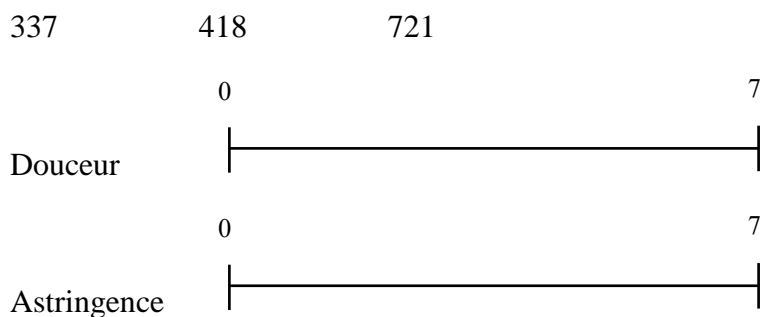
ANNEXE 5
EXEMPLE D'UNE FICHE D'ANALYSE SENSORIELLE
TEST TRIANGULAIRE ET PROFIL SENSORIEL.

Date :

Nom et Prénom :

Veillez **déguster** les verres dans l'**ordre de la feuille** et entourer le verre différent.

Puis, noter l'intensité de la douceur et de l'astringence de chaque échantillon sur l'échelle linéaire.

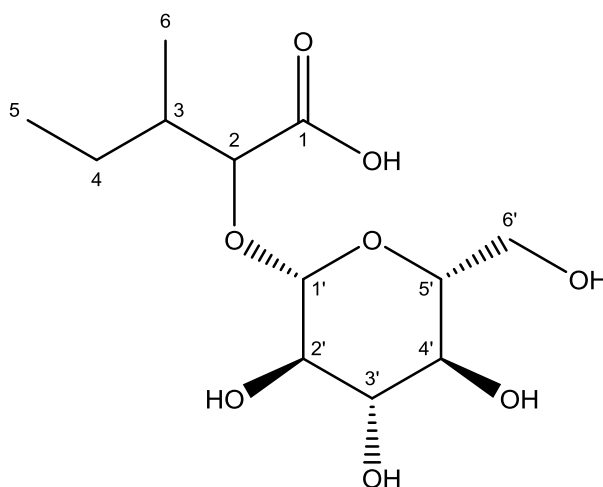
Poste 1**Poste 2****Poste 3**

ANNEXE 6

DONNEES RMN ^1H et ^{13}C DES COMPOSES EXTRAITS DU PEPIN ET DU VIN.

ANNEXE 6-A

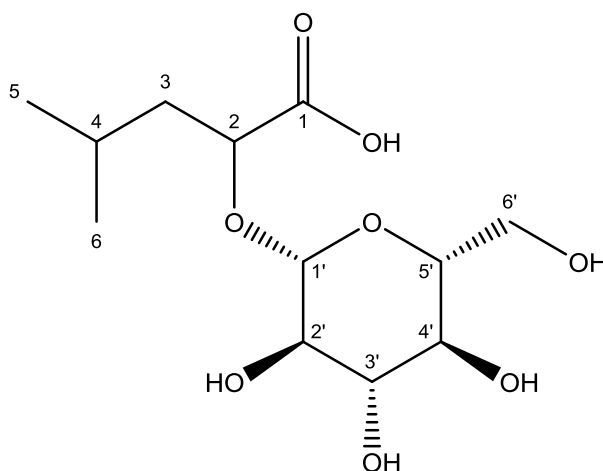
Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 293-1,
acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside dans D_2O .



Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1		178,2
2	3,85 <i>d</i> (5 Hz)	82,8
3	1,68 <i>m</i>	37,1
4	1,15 <i>m</i> 1,34 <i>m</i>	24,1
5- CH_3	0,77 <i>t</i> (7 ; 7 Hz)	10
6- CH_3	0,8 <i>d</i> (7 Hz)	13,4
1'	4,29 <i>d</i> (7,4 Hz)	103,2
2'	3,24 <i>m</i>	72,8
3'	3,32 <i>t</i> (8,8 ; 8,8 Hz)	75,2
4'	3,28 <i>t</i> (9,1 ; 9,4 Hz)	68,8
5'	3,22 <i>m</i>	75,3
6'	3,55 <i>dd</i> (12,6 ; 5,3 Hz) 3,67 <i>dd</i> (12,3 ; 2,1 Hz)	60

ANNEXE 6-B

Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 293-2,
acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside dans D_2O .

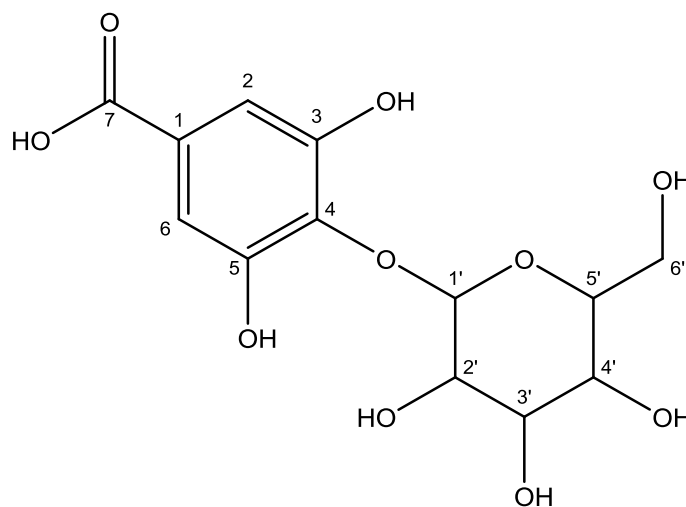


Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1		n.d.
2	3,9 <i>dd</i> (8,5 ; 4,7 Hz)	79,4
3	1,36 <i>m</i> 1,52 <i>m</i>	41
4	1,62 <i>m</i>	23,8
5- CH_3 , 6- CH_3	0,78 <i>d</i> (6,5 Hz)	22
1'	4,3 <i>d</i> (7,9 Hz)	102,9
2'	3,22 <i>m</i>	72,8
3'	3,32 <i>t</i> (9 ; 9,3 Hz)	75,2
4'	3,29 <i>t</i> (9,3 ; 9,3 Hz)	68,8
5'	3,22 <i>m</i>	75,3
6'	3,57 <i>dd</i> (12,7 ; 5,3 Hz) 3,67 <i>dd</i> (12,4 ; 2,2 Hz)	60

n.d. : non déterminé

ANNEXE 6-C

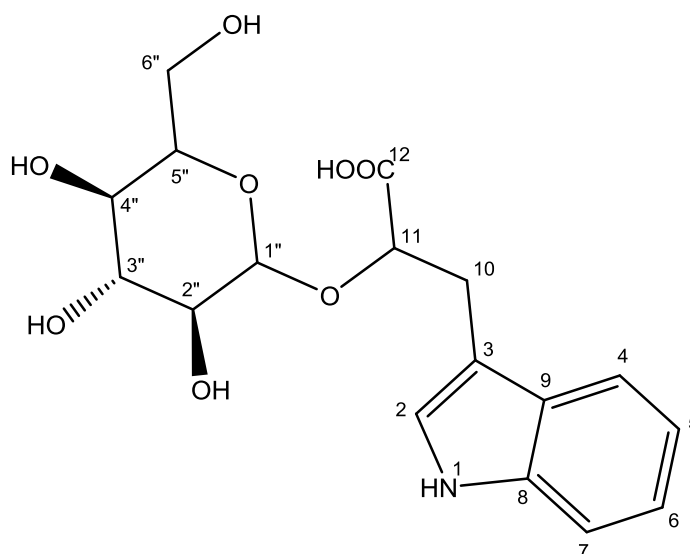
Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 331,
acide gallique-4- O - β -glucopyranoside dans D_2O .



Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1		128,9
2, 6	7,86 <i>s</i>	109,3
3, 5		149,2
4		135,5
7		170,9
1'	4,9 <i>d</i> (7,7 Hz)	103
2'	3,46 <i>m</i>	72,8
3'	3,41 <i>m</i>	75,2
4'	3,36 <i>m</i>	68,5
5'	3,25 <i>m</i>	75,7
6'	3,6 <i>dd</i> (12,5 ; 2,3 Hz) 3,68 <i>dd</i> (12,5 ; 5 Hz)	59,7

ANNEXE 6-D

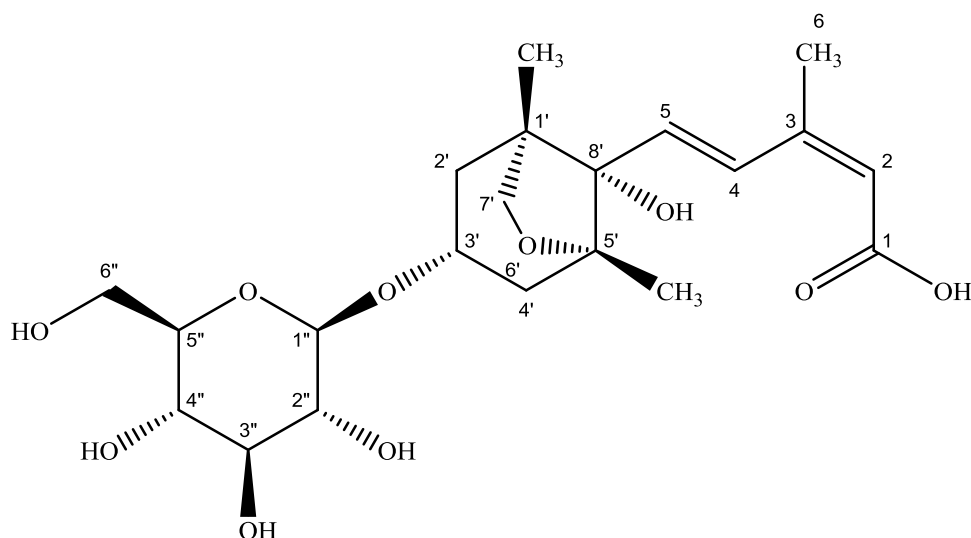
Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 366,
acide 3-indolyl-(2R)-O- β -D-glycoside lactique dans CD_3OD .



Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1	-	-
2	7,23 <i>s</i>	123,3
3	-	108,9
4	7,6 <i>d</i> (7,9 Hz)	117,7
5	7 <i>dd</i> (7,5 ; 7,5 Hz)	118
6	7,1 <i>dd</i> (7,6 ; 7,6 Hz)	120,5
7	7,3 <i>d</i> (8,1 Hz)	110,5
8	-	136,4
9	-	127,3
10	3,25 <i>m</i>	27,2
11	4,5 <i>t</i> (6,3 ; 6,1 Hz)	77,7
12	-	176
1''	4,34 <i>d</i> (7,3 Hz)	102,1
2''	3,3 <i>m</i>	73,1
3''	3,3 <i>m</i>	75,7
4''	3,28 <i>m</i>	69,6
5''	3,14 <i>m</i>	76,2
6''	3,77 <i>dd</i> (11,9 ; 2,4 Hz) 3,66 <i>dd</i> (11,9 ; 5,4 Hz)	60,6

ANNEXE 6-E

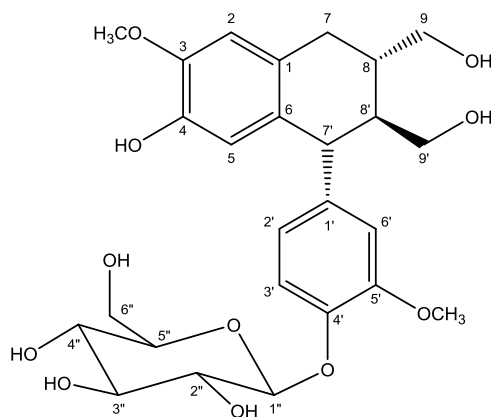
Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 443,
acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside dans CD_3OD .



Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J en Hz)	δ ^{13}C (en ppm)
1		n.d.
2	5,76 <i>s</i>	117,8
3		149,9
4	7,94 <i>d</i> (16 Hz)	130,2
5	6,52 <i>d</i> (16 Hz)	133,6
6	2,08 <i>s</i>	19,7
1'		47,8
2' ax	1,79 <i>m</i>	41,5
2' eq	1,99 <i>dd</i> (13,7 ; 6,5 Hz)	41,5
3'	4,26 <i>m</i>	72,4
4'ax	1,81 <i>m</i>	41,5
4'eq	2,18 <i>dd</i> (13,7 ; 6,5 Hz)	41,5
5'		86,1
7'a	3,75 <i>d</i> (7,3 Hz)	75,7
7'b	3,81 <i>dd</i> (7,4 ; 2,1 Hz)	75,7
8'		81,6
9'	1,17 <i>s</i>	18,2
10'	0,94 <i>s</i>	14,8
1''	4,36 <i>d</i> (7,8 Hz)	101,7
2''	3,14 <i>dd</i> (8 ; 9 Hz)	73,7
3''	3,35 <i>d</i> (9,2 Hz)	76,7
4''	3,28 <i>m</i>	70,4
5''	3,28 <i>m</i>	76,6
6'' a	3,67 <i>dd</i> (12 ; 4,5 Hz)	61,4
6'' b	3,87 <i>d</i> (12 Hz)	61,4

ANNEXE 6-F

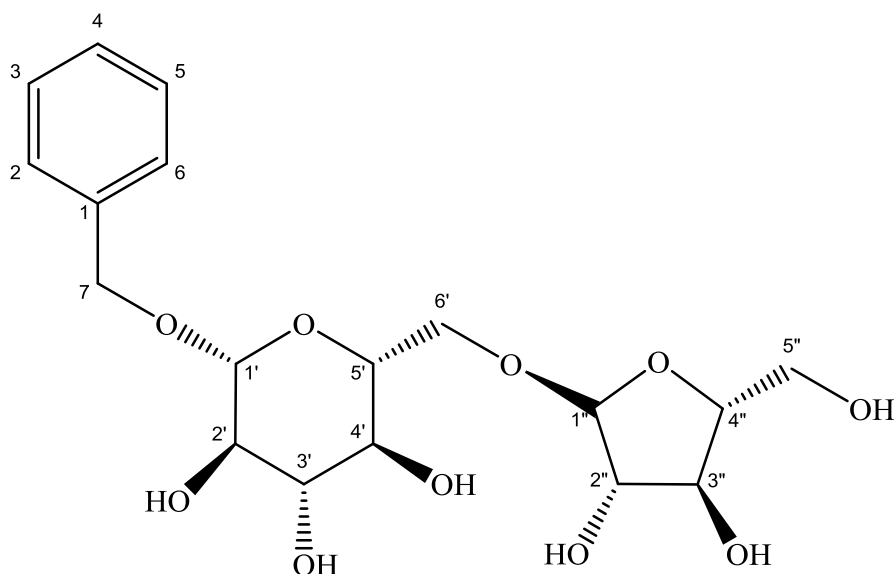
Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 521,
 (\pm)-isolaricirésinol 4'- O - β -glucopyranoside dans CD_3OD .



Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1		130,7
2	6,74 <i>s</i>	111,7
3		147,2
4		144,4
5	6,5 <i>s</i>	117,5
6		134,7
7	2,8 <i>m</i>	31,4
8	1,78 <i>m</i>	45,6
9	3,65 <i>m</i>	64,14
3-OMe	3,82 <i>s</i>	55
1'		137,3
2'	6,7 <i>s</i>	112,4
3'		147,6
4'		144,1
5'	6,76 <i>d</i> (8 Hz)	114,4
6'	6,6 <i>dd</i> (8,2 ; 1,8 Hz)	121,5
7'	3,83 <i>m</i>	46,2
8'	2,04 <i>m</i>	38
9'	3,65 <i>m</i>	60,8
3'-OMe	3,79 <i>s</i>	54,6
1''	4,4 <i>d</i> (8 Hz)	101,8
2''	3,37 <i>m</i>	73,4
3''	3,33 <i>m</i>	76,5
4''	3,40 <i>m</i>	69,6
5''	3,38 <i>m</i>	76,5
6''	3,66 <i>m</i> 3,4 <i>m</i>	61,2

ANNEXE 6-G

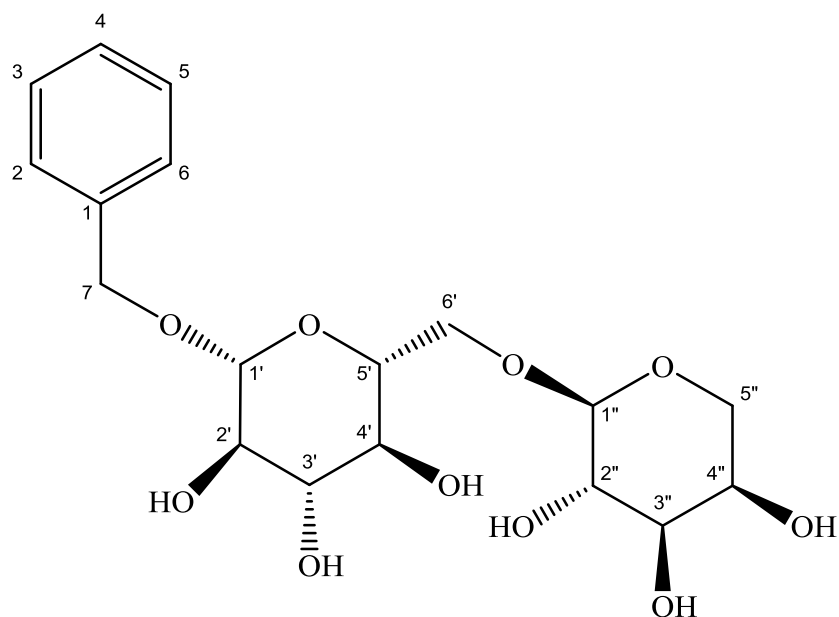
Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 401-1,
benzyl 6'- O - α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside dans CD_3OD .



Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1	-	137,3
2	7,42 <i>d</i> (7,4 Hz)	127,8
3	7,32 <i>dd</i> (7,4 ; 7,4 Hz)	127,6
4	7,26 <i>dd</i> (7,4 ; 7,1 Hz)	127,6
5	7,32 <i>dd</i> (7,4 ; 7,4 Hz)	127,6
6	7,42 <i>d</i> (7,4 Hz)	127,8
7	4,66 <i>d</i> (12 Hz) 4,89 <i>d</i> (11,8 Hz)	70,5
1'	4,36 <i>d</i> (7,7 Hz)	101,8
2'	3,25 <i>dd</i> (8,5 ; 8,3 Hz)	73,5
3'	3,26-3,36 <i>m</i>	76,5
4'	3,26-3,36 <i>m</i>	70,6
5'	3,44 <i>m</i>	75,3
6'	3,66 <i>dd</i> (11,5 ; 5,7 Hz) 3,75 <i>dd</i> (11,8 ; 3,4 Hz)	61,6
1''	5 <i>s</i>	108,5
2''	4,03 <i>m</i>	81,7
3''	3,85 <i>dd</i> (5,7 ; 3,4)	77,6
4''	4,01 <i>m</i>	84,5
5''	4,04 <i>dd</i> (11,2 ; 2,5 Hz) 3,66 <i>dd</i> (11,5 ; 5,7 Hz)	66,6

ANNEXE 6-H

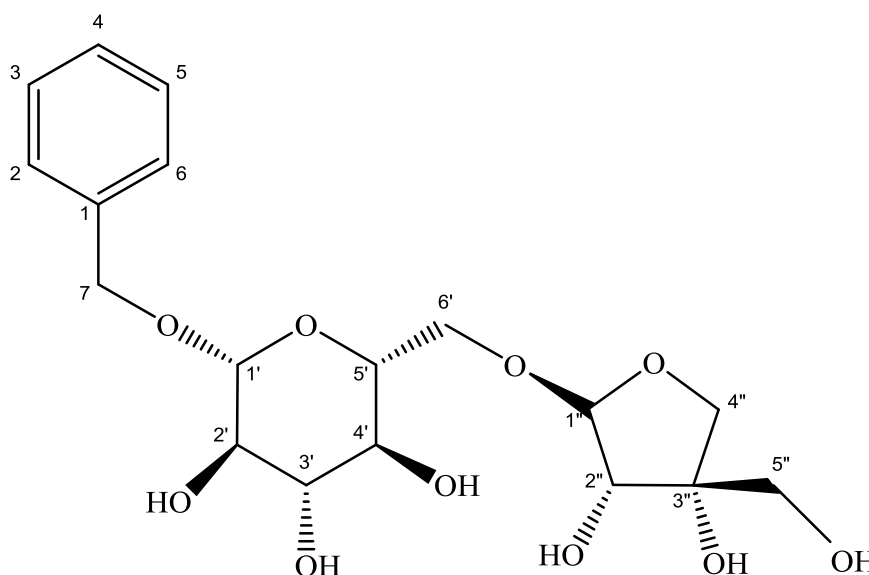
Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 401-2,
benzyl 6'- O - α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside dans CD_3OD .



Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1	-	137
2	7,42 <i>d</i> (7,5 Hz)	127,8
3	7,32 <i>dd</i> (7,1 ; 7,1 Hz)	127,7
4	7,26 <i>dd</i> (7,8 ; 7,5 Hz)	127,3
5	7,32 <i>dd</i> (7,1 ; 7,1 Hz)	127,7
6	7,42 <i>d</i> (7,5 Hz)	127,8
7	4,9 <i>d</i> (12,3 Hz) 4,67 <i>d</i> (12,3 Hz)	69,7
1'	4,37 <i>d</i> (7,7 Hz)	101,8
2'	3,26 <i>m</i>	73,5
3'	3,35 <i>m</i>	76,6
4'	3,35 <i>m</i>	70,3
5'	3,45 <i>m</i>	75,3
6'	3,53 <i>m</i> 3,87 <i>dd</i> (12,3 ; 3,8 Hz)	64,9
1''	4,35 <i>d</i> (6,3 Hz)	103,5
2''	3,62 <i>dd</i> (8,5 ; 6,6 Hz)	70,8
3''	3,53 <i>m</i>	72,8
4''	3,8 <i>m</i>	67,6
5''	3,76 <i>dd</i> (10,9 ; 5,2 Hz) 4,11 <i>dd</i> (11,3 ; 2,4 Hz)	68,1

ANNEXE 6-I

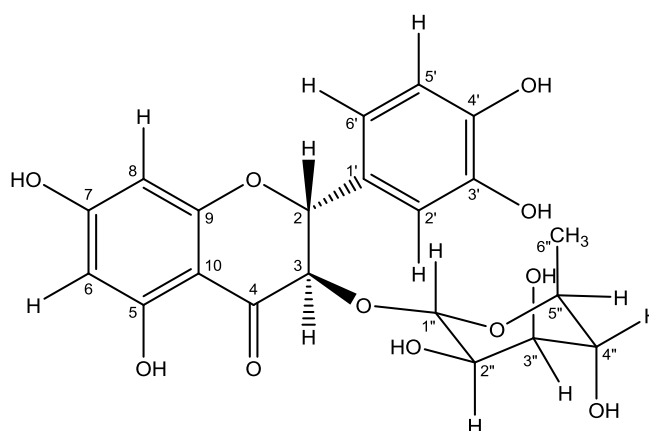
Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 401-3,
benzyl 6'- O - α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside dans CD_3OD .



Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1	-	137
2	7,42 <i>m</i>	127,9
3	7,32 <i>m</i>	127,6
4	7,26 <i>m</i>	127,4
5	7,32 <i>m</i>	127,6
6	7,42 <i>m</i>	127,9
7	4,9 <i>d</i> (11,7 Hz) 4,7 <i>d</i> (12 Hz)	69,7
1'	4,34 <i>d</i> (7,8 Hz)	101,8
2'	3,25 <i>m</i>	73,6
3'	3,39 <i>m</i>	76,6
4'	3,26-3,36 <i>m</i>	70,3
5'	3,44 <i>m</i>	75,5
6'	4,02 <i>m</i> 3,65 <i>m</i>	67,1
1''	5,04 <i>d</i> (2,4 Hz)	109,8
2''	3,9 <i>d</i> (2,6 Hz)	76,5
3''	-	78,3
4''	3,77 <i>d</i> (9,5 Hz) 3,9 <i>d</i> (9,5 Hz)	73,5
5''	3,6 <i>s</i>	64,6

ANNEXE 6-J

Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C du composé m/z 449,
astilbine ou (2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside dans CD_3OD .

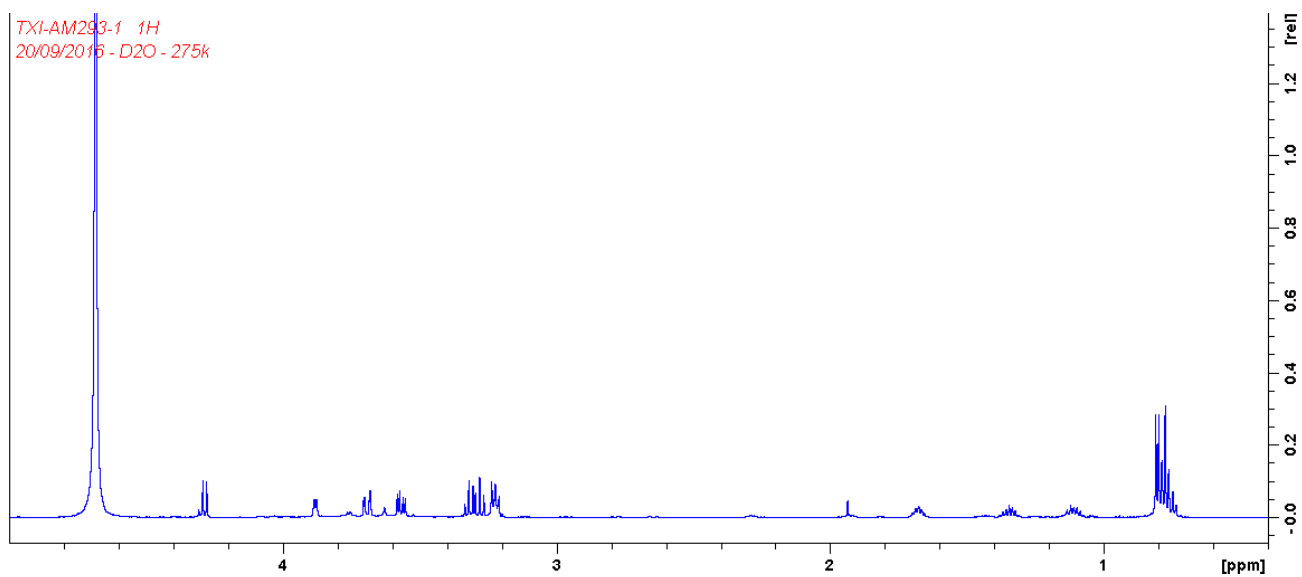


Numéro de l'atome	δ ^1H (en ppm) multiplicité (J)	δ ^{13}C (en ppm)
1	---	---
2	5,09 <i>d</i> (10,7 Hz)	82,4
3	4,56 <i>d</i> (10 Hz)	77
4	---	194,8
5	---	164,2
6	5,93 <i>s</i>	95,9
7	---	167
8	5,91 <i>s</i>	94,5
9	---	162,5
10	---	100
1'	---	126,6
2'	6,96 <i>s</i>	114,1
3'	---	145,6
4'	---	145
5'	6,83 <i>m</i>	115
6'	6,83 <i>m</i>	119
1''	4,11 <i>s</i>	100,6
2''	3,56 <i>s</i>	70,2
3''	3,66 <i>dd</i> (9,7; 2,8 Hz)	71,3
4''	3,3 <i>m</i>	73
5''	4,2 <i>m</i>	67
6''	1,18 <i>d</i> (6,1 Hz)	16

ANNEXES 7 à 16
SPECTRES MONO ET BI-DIMENSIONNELS
DES COMPOSES EXTRAITS DU PEPIN ET DU VIN.

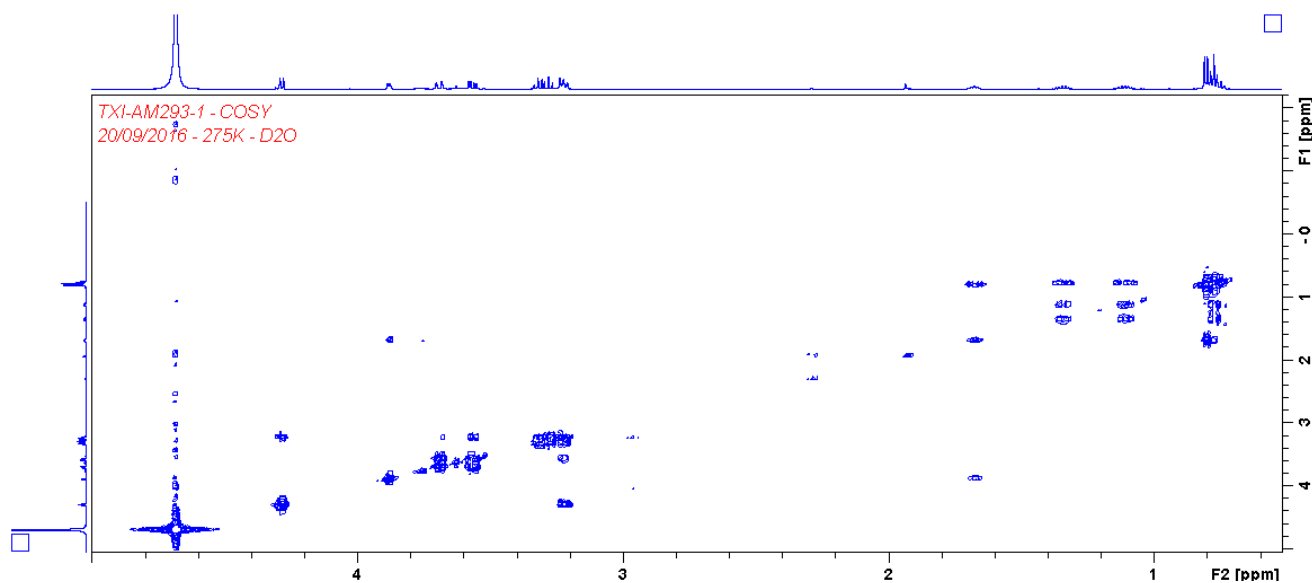
ANNEXE 7-A

Spectre ^1H de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .



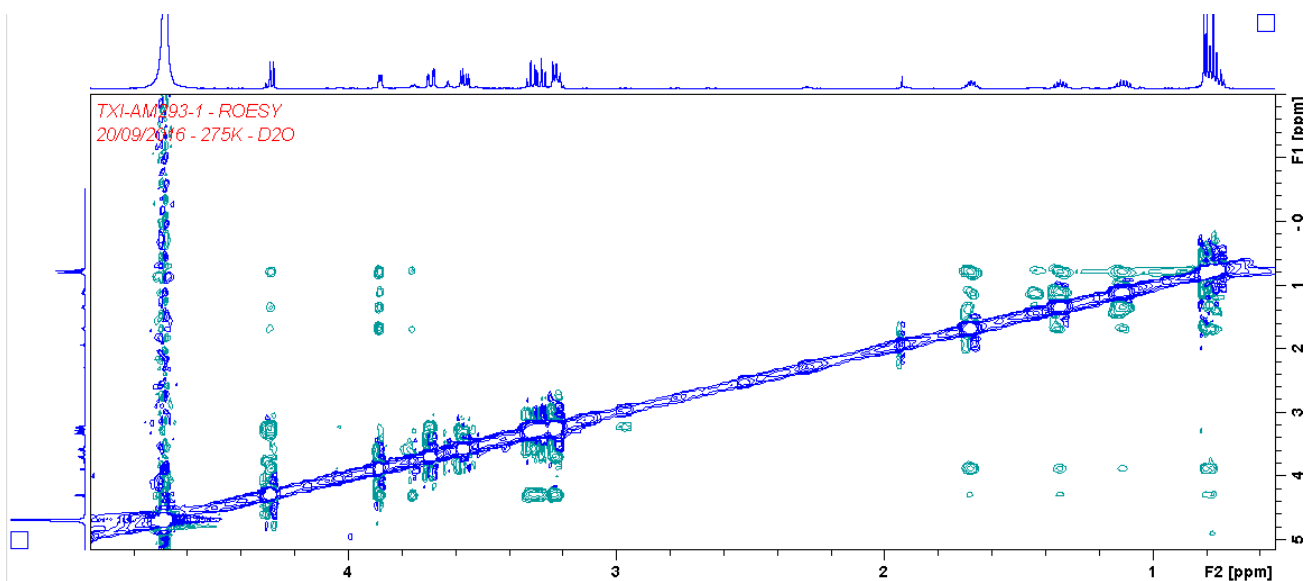
ANNEXE 7-B

Spectre ^1H - ^1H COSY de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2-*O*- β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .



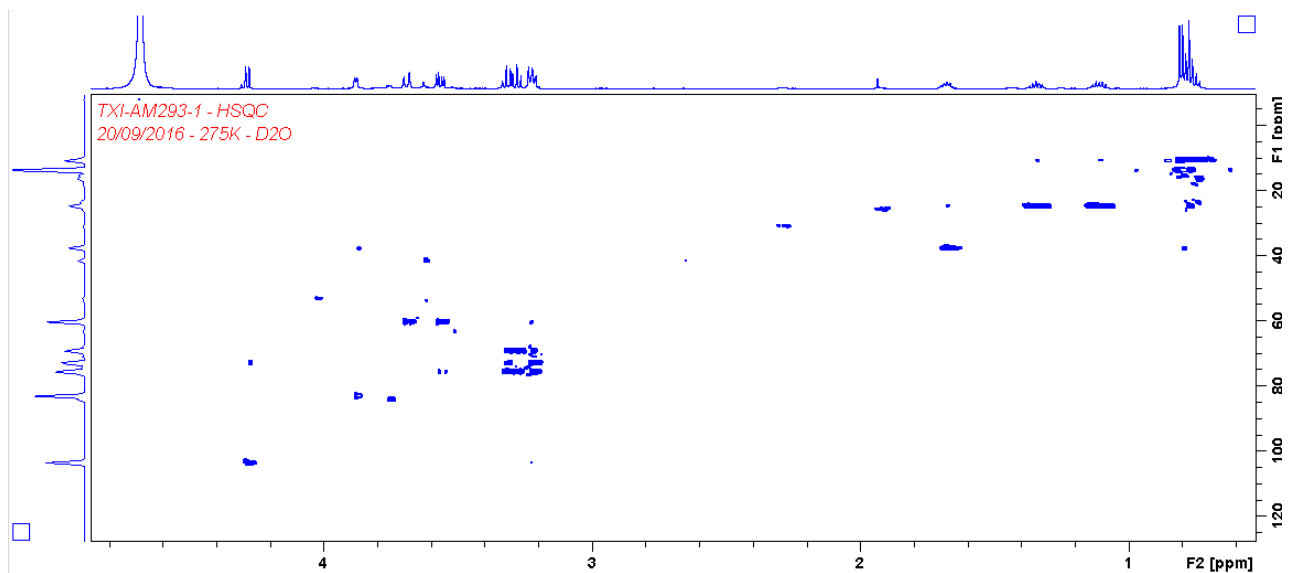
ANNEXE 7-C

Spectre ^1H - ^1H ROESY de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .



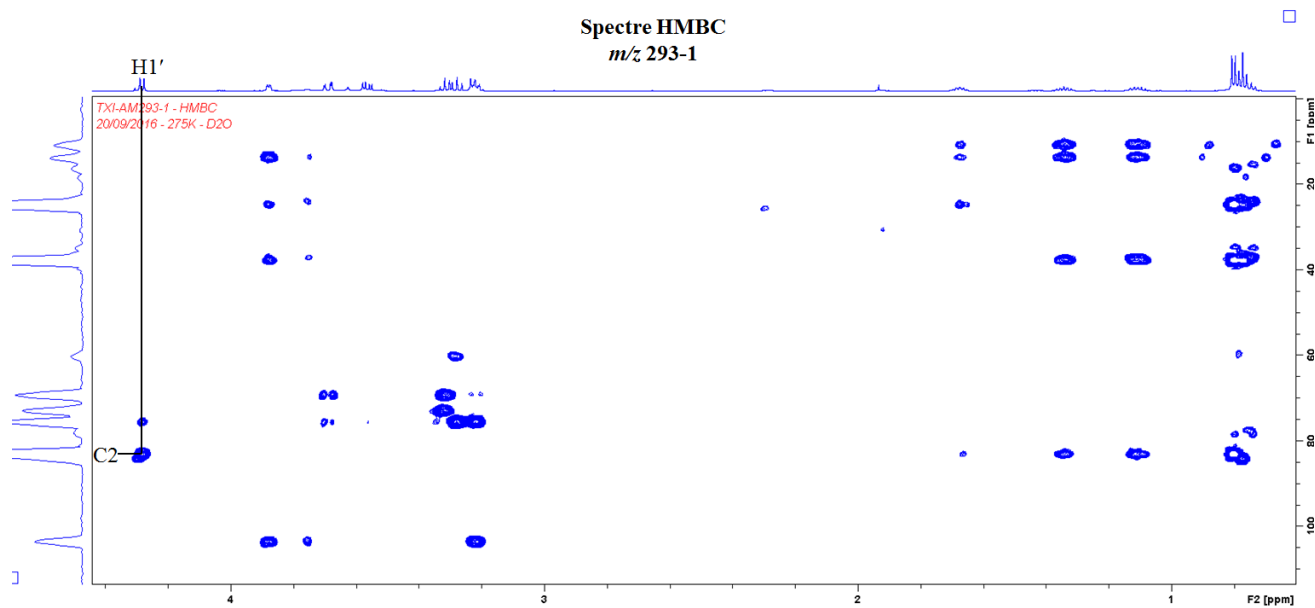
ANNEXE 7-D

Spectre ^1H - ^{13}C HSQC de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .



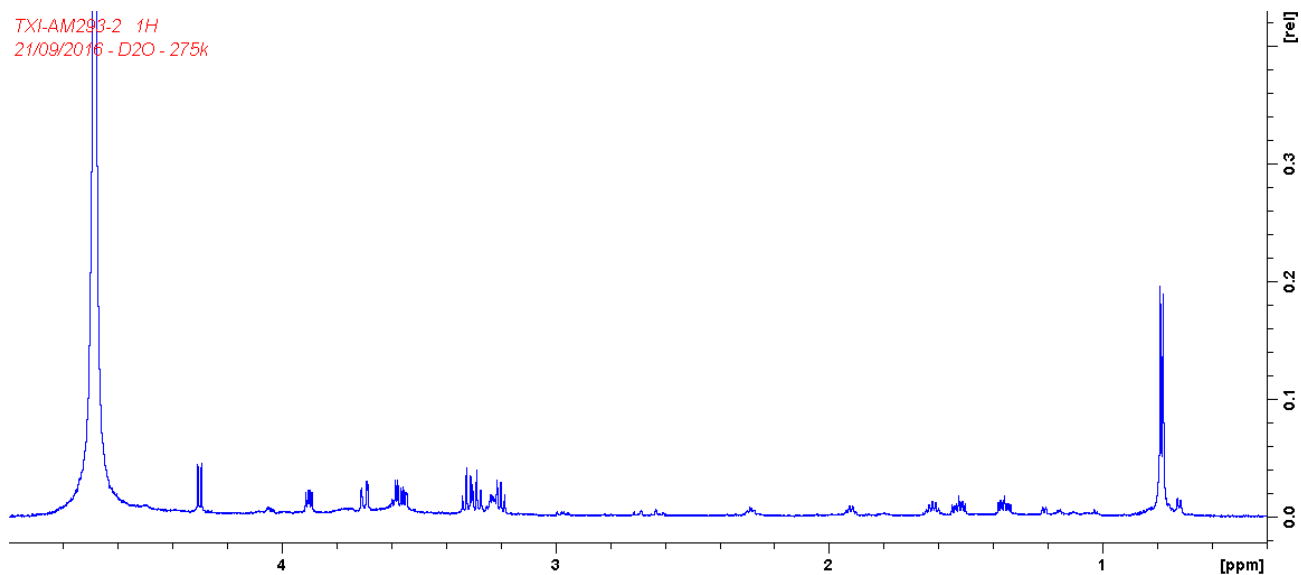
ANNEXE 7-E

Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide 2-hydroxy-3-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (m/z 293-1) dans D_2O .



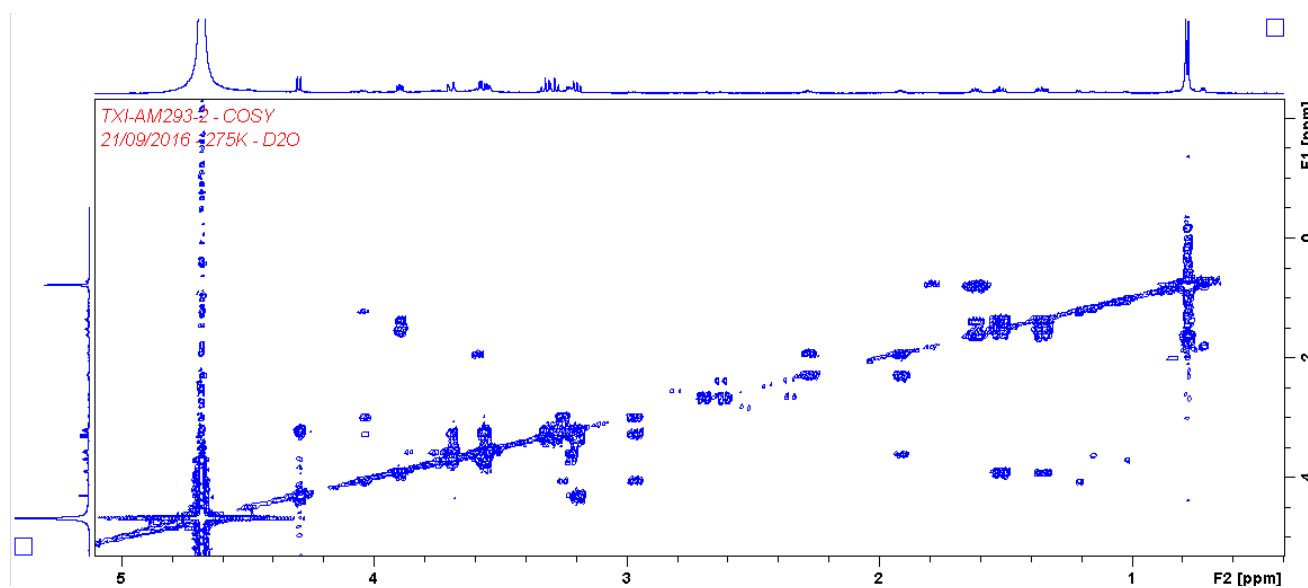
ANNEXE 8-A

Spectre ^1H de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .



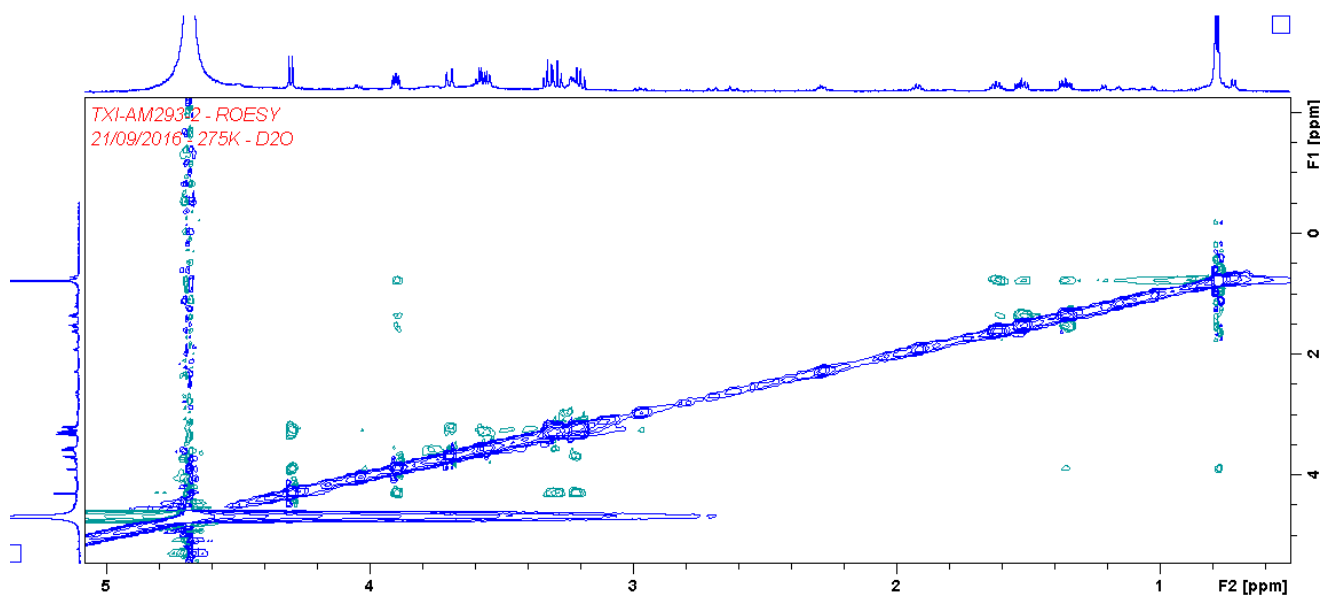
ANNEXE 8-B

Spectre ^1H - ^1H COSY de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .



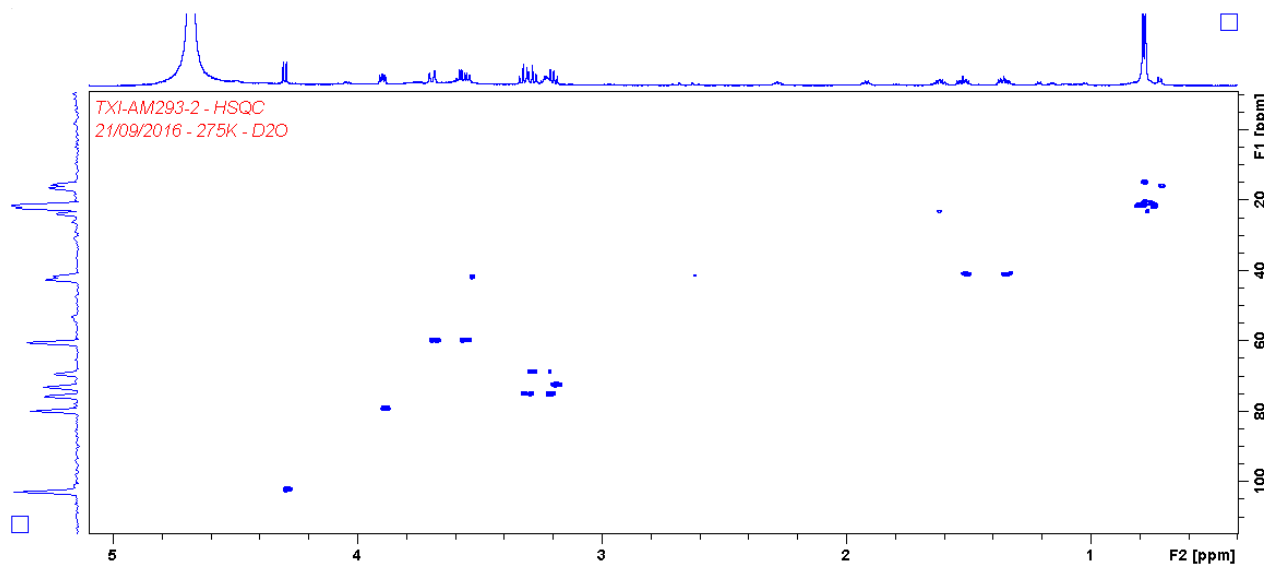
ANNEXE 8-C

Spectre ^1H - ^1H ROESY de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .



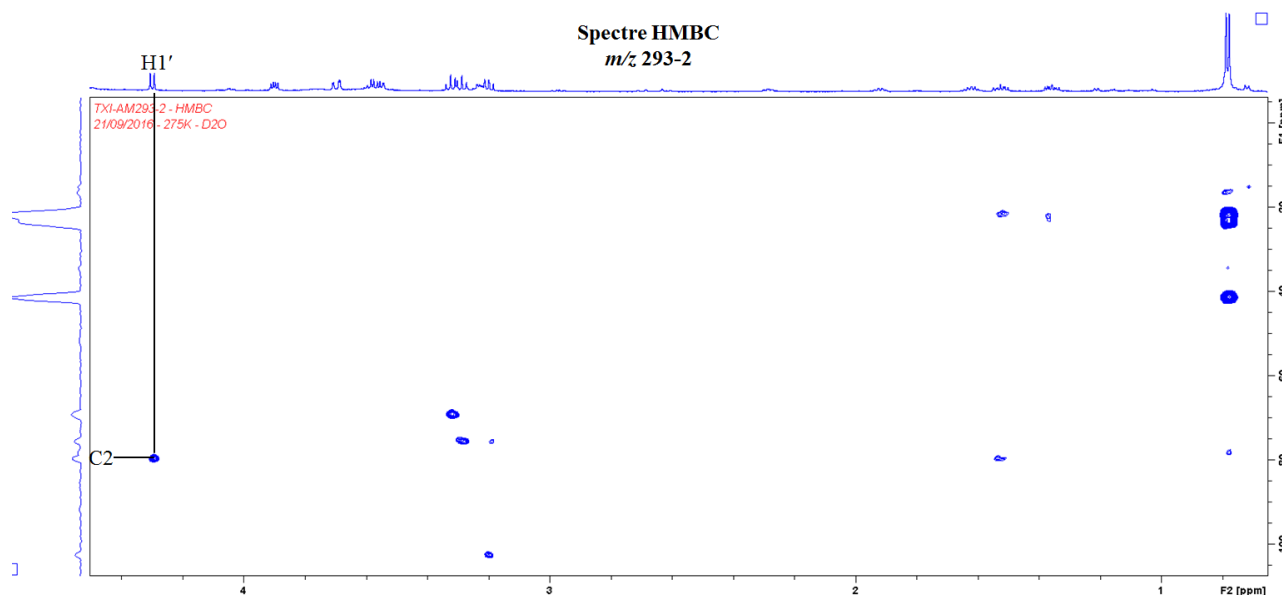
ANNEXE 8-D

Spectre ^1H - ^{13}C HSQC de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .

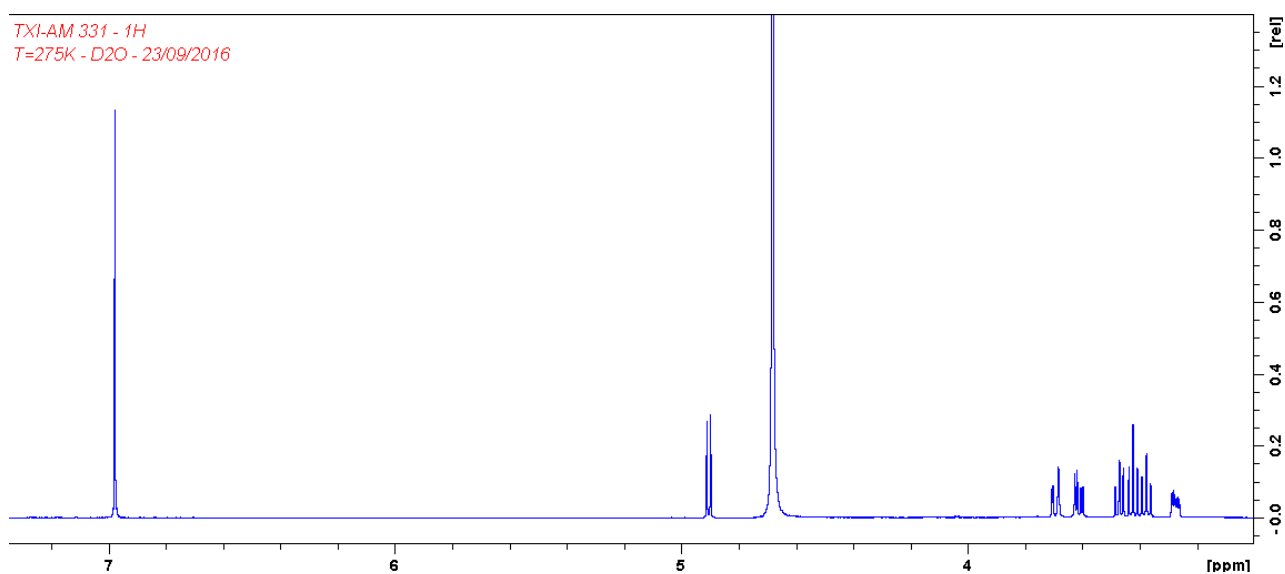


ANNEXE 8-E

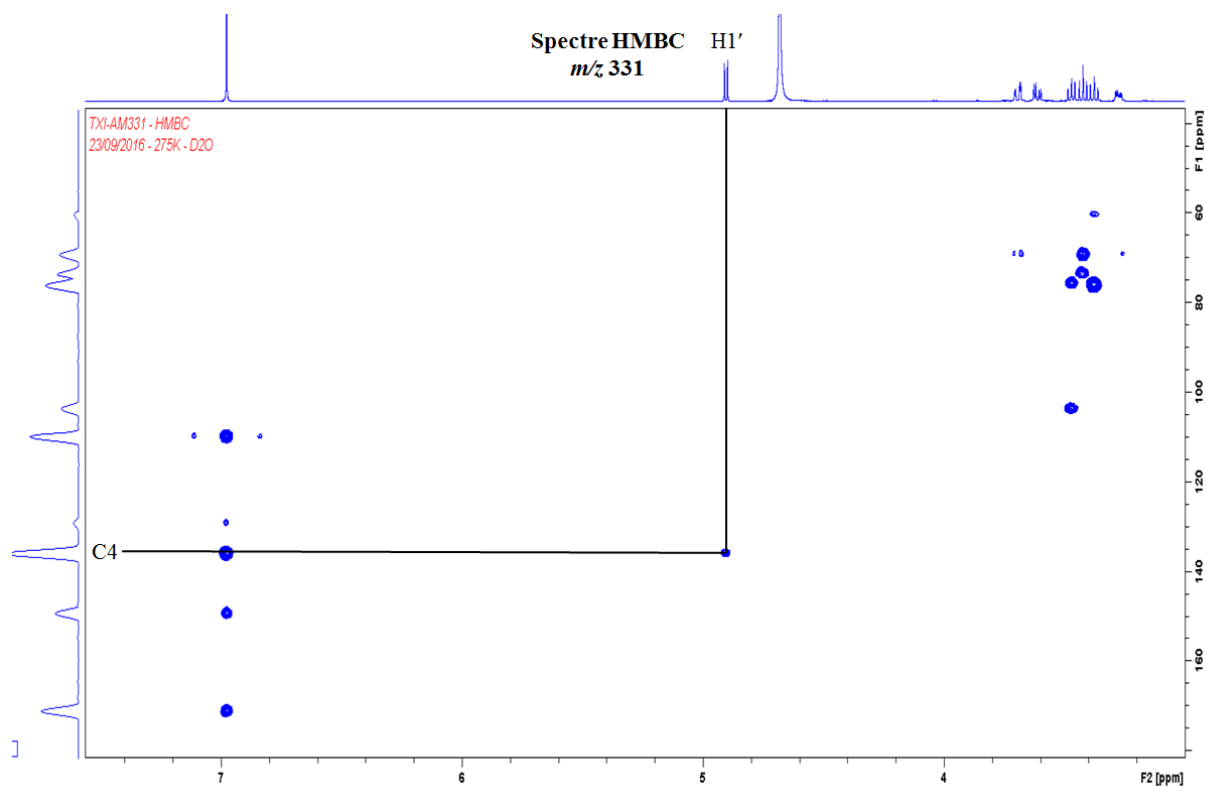
Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide 2-hydroxy-4-méthylpentanoïque-2- O - β -glucopyranoside (m/z 293-2) dans D_2O .



ANNEXE 9-A

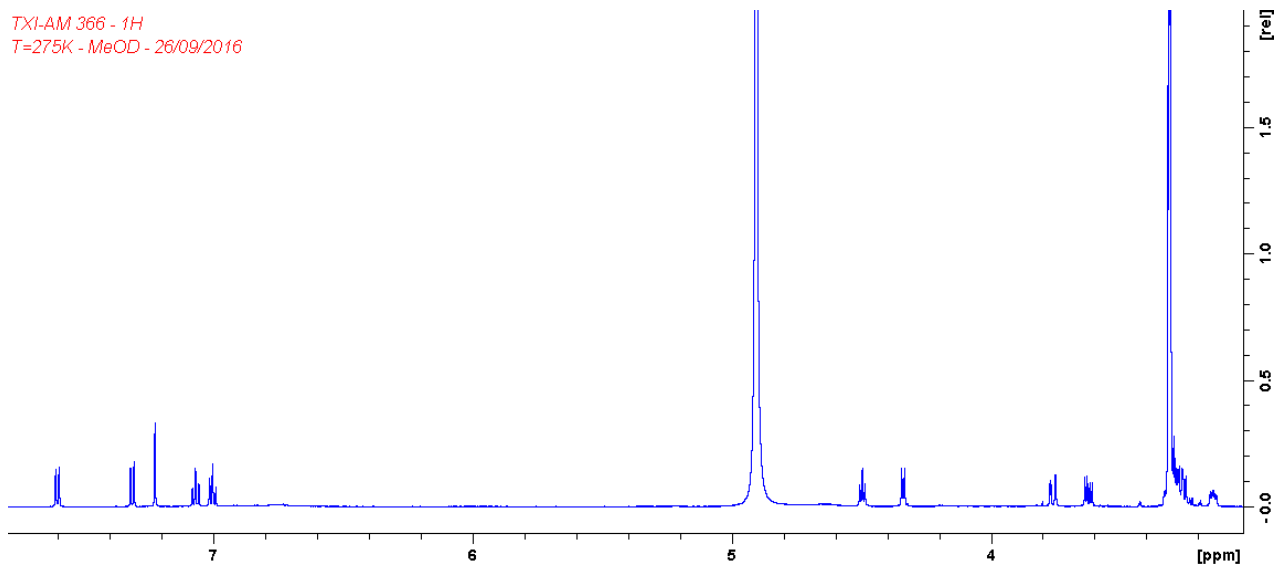
Spectre ^1H de l'acide gallique-4- O - β -glucopyranoside (m/z 331) dans D_2O .

ANNEXE 9-B

Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide gallique-4- O - β -glucopyranoside (m/z 331) dans D_2O .

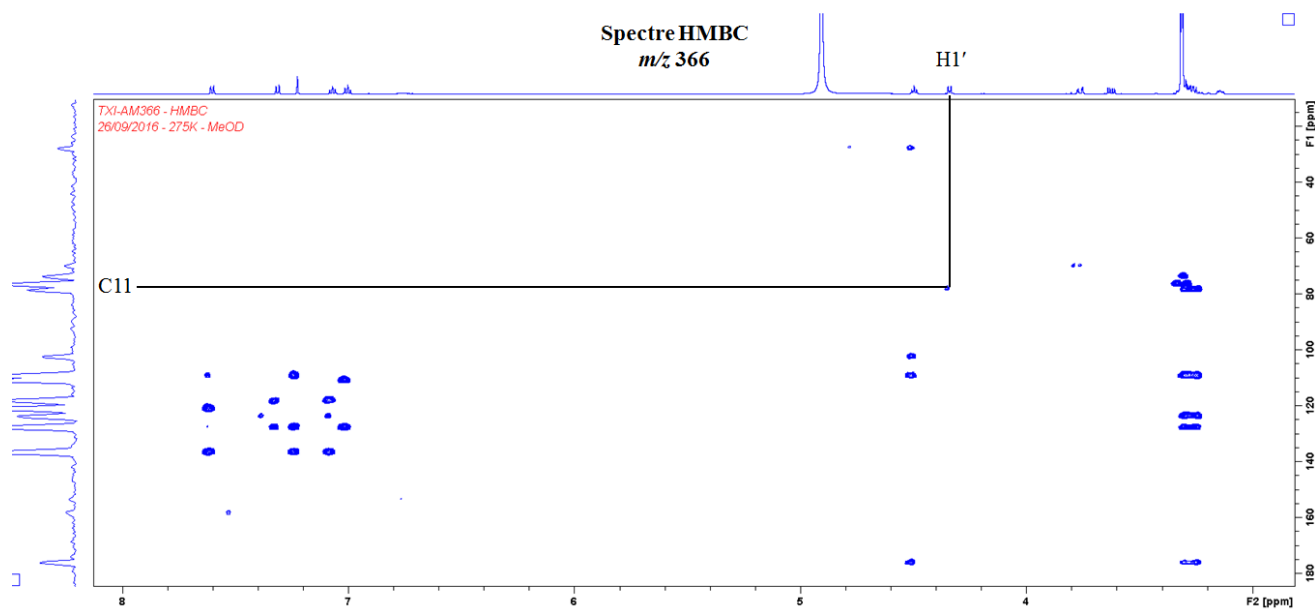
ANNEXE 10-A

Spectre ^1H de l'acide 3-indolyl-(2*R*)-*O*- β -D-glucopyranoside lactique (m/z 366) dans CD_3OD .



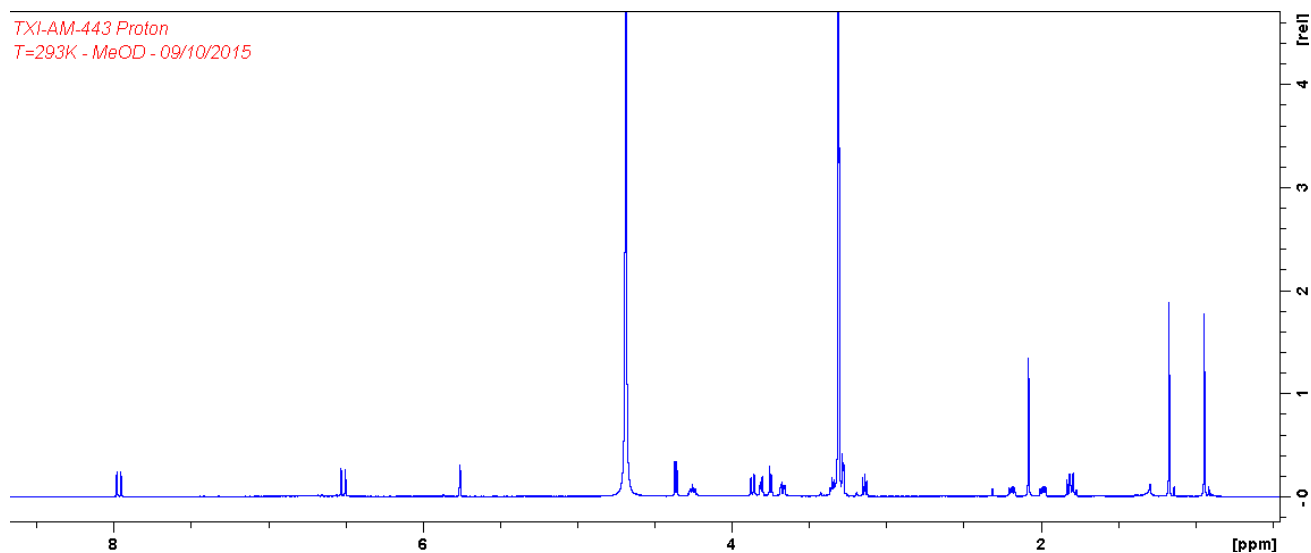
ANNEXE 10-B

Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide 3-indolyl-(2*R*)-*O*- β -D-glucopyranoside lactique (m/z 366) dans CD_3OD .



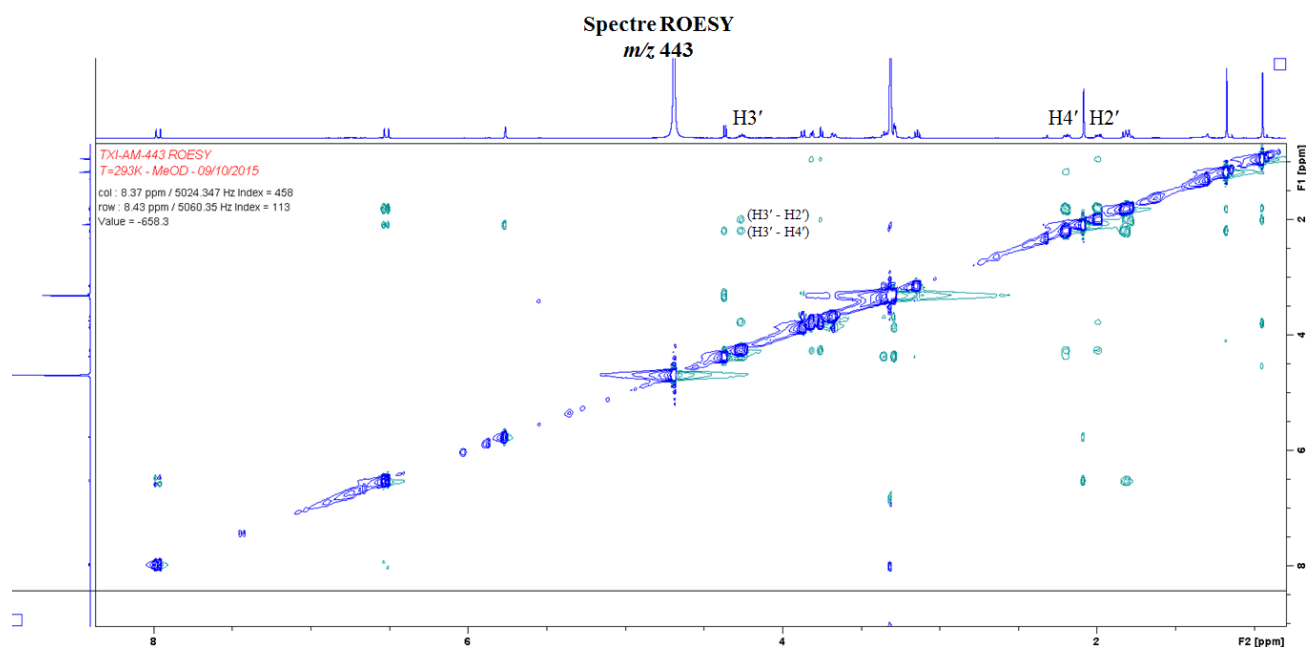
ANNEXE 11-A

Spectre ^1H de l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 443) dans CD_3OD .



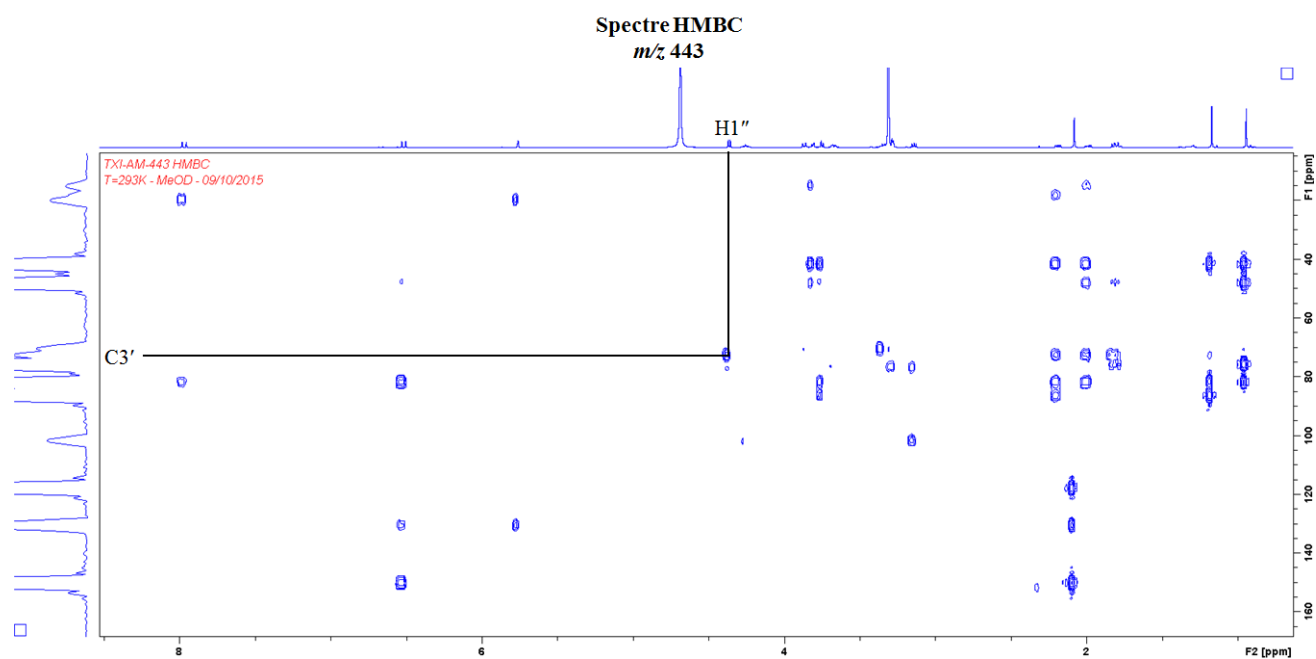
ANNEXE 11-B

Spectre ^1H - ^1H ROESY de l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 443) dans CD_3OD .

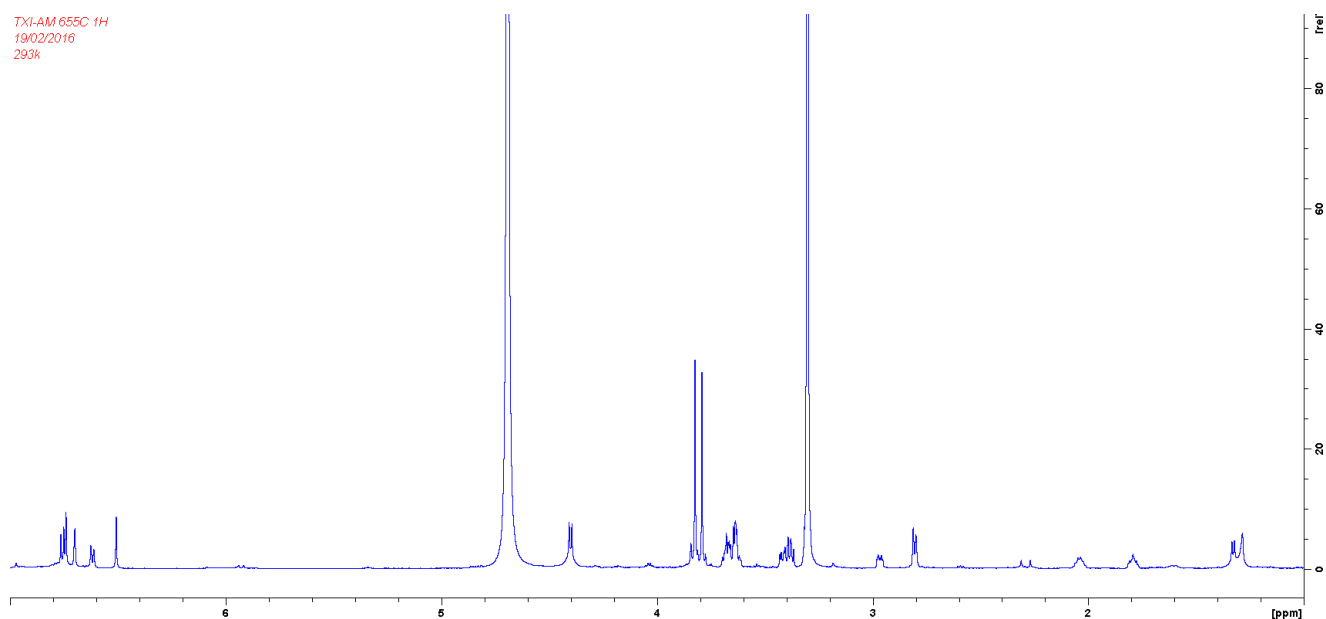


ANNEXE 11-C

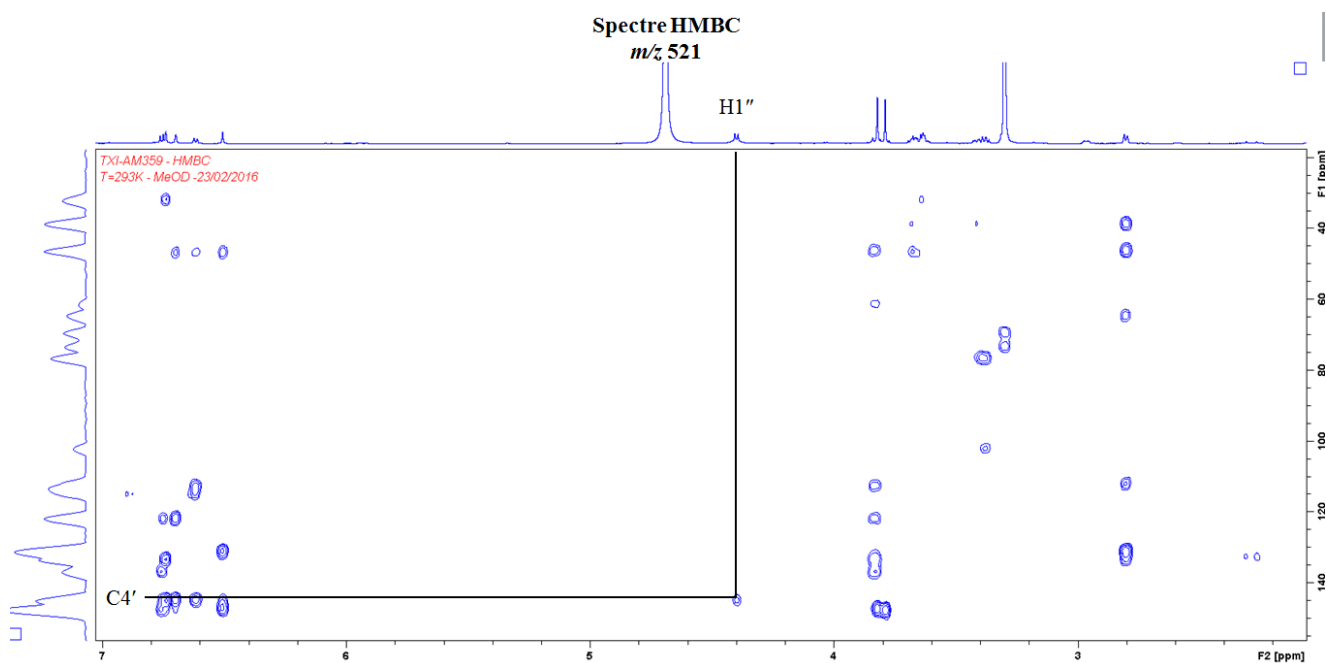
Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide (1'*R*, 3'*R*, 5'*R*, 8'*S*)-*epi*-dihydrophaséique-3'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 443) dans CD_3OD .



ANNEXE 12-A

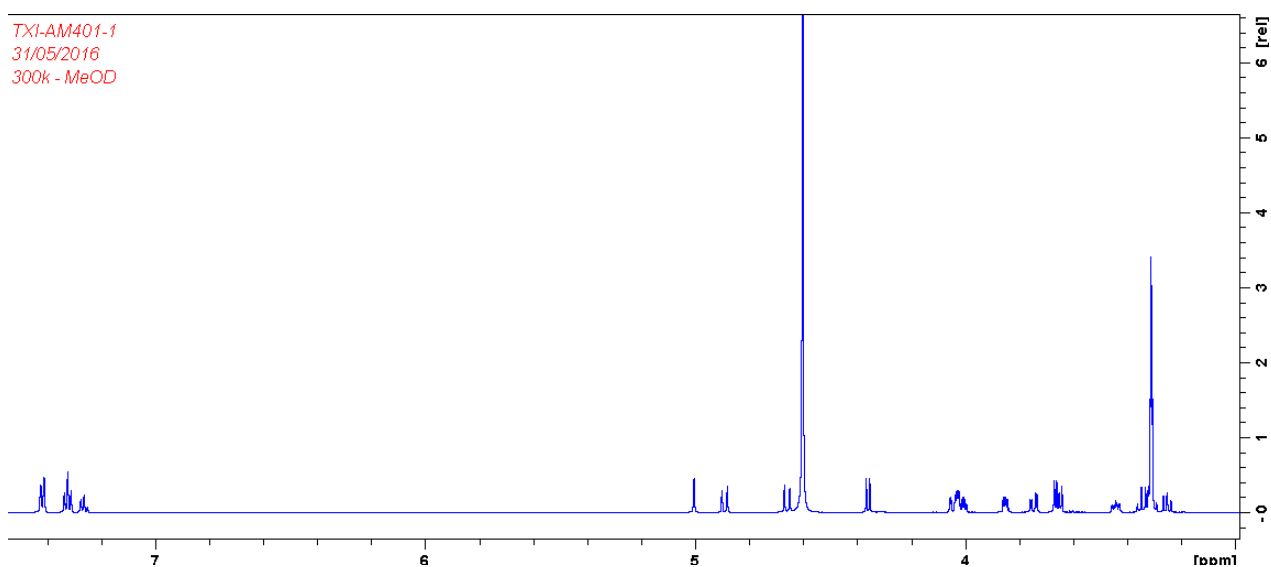
Spectre ^1H de l'isolaricirésinol-4'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 521) dans CD_3OD .

ANNEXE 12-B

Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'isolaricirésinol-4'-*O*- β -glucopyranoside (m/z 521) dans CD_3OD .

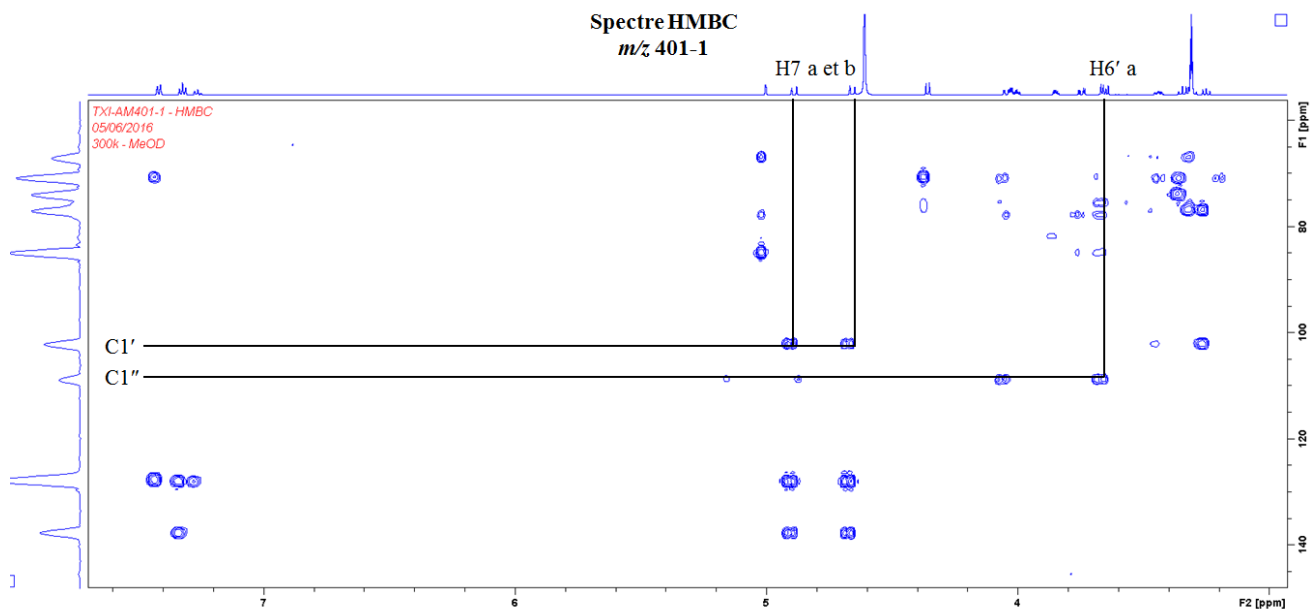
ANNEXE 13-A

Spectre ^1H du benzyl 6'-*O*- α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-1) dans CD_3OD .



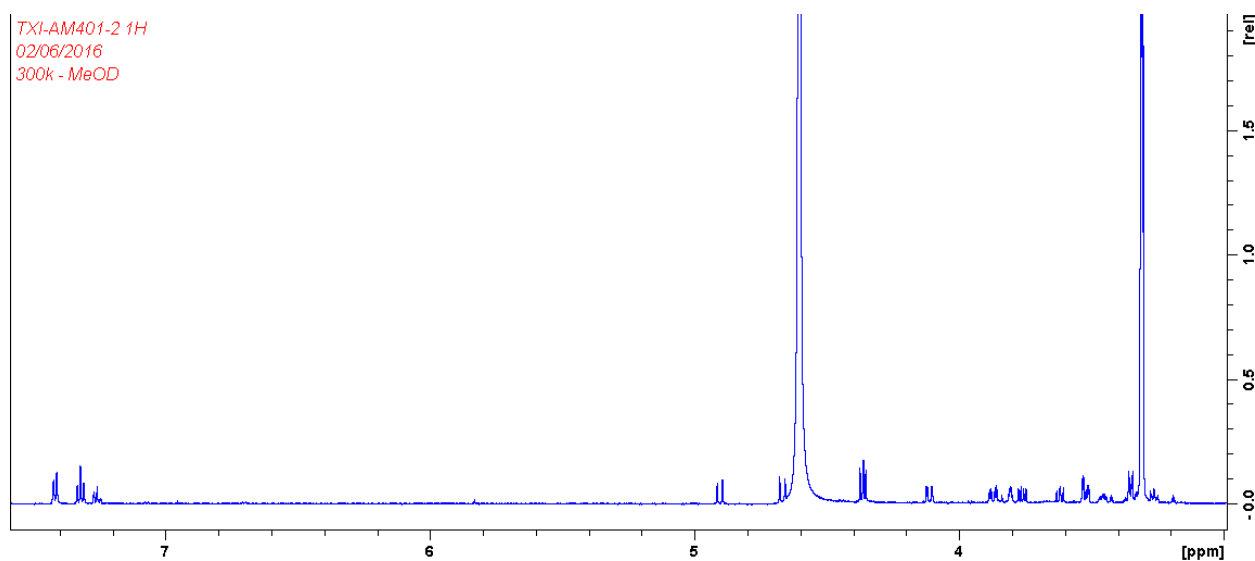
ANNEXE 13-B

Spectre ^1H - ^{13}C HMBC du benzyl 6'-*O*- α -arabinofuranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-1) dans CD_3OD .



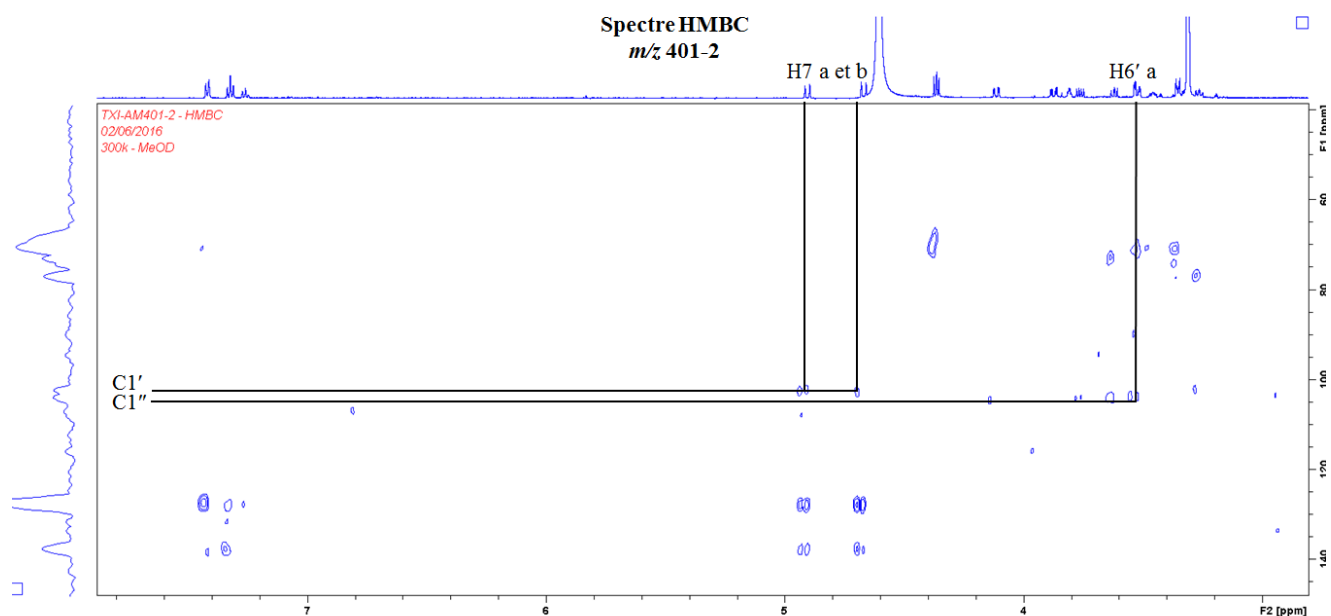
ANNEXE 14-A

Spectre ^1H du benzyl 6'-*O*- α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-2) dans CD_3OD .

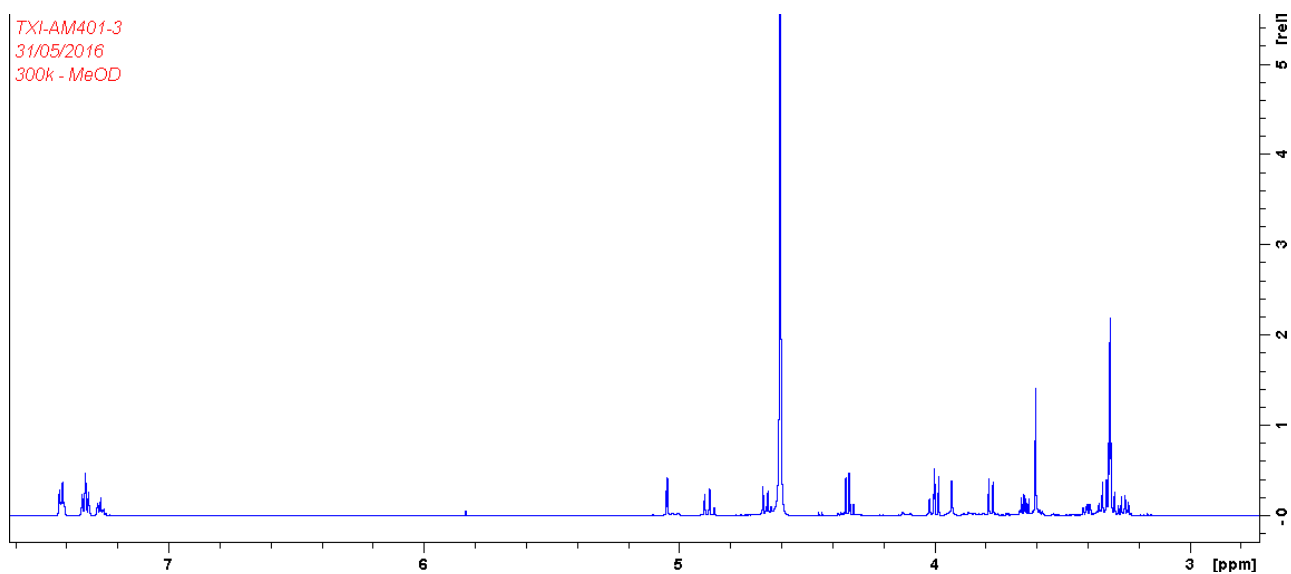


ANNEXE 14-B

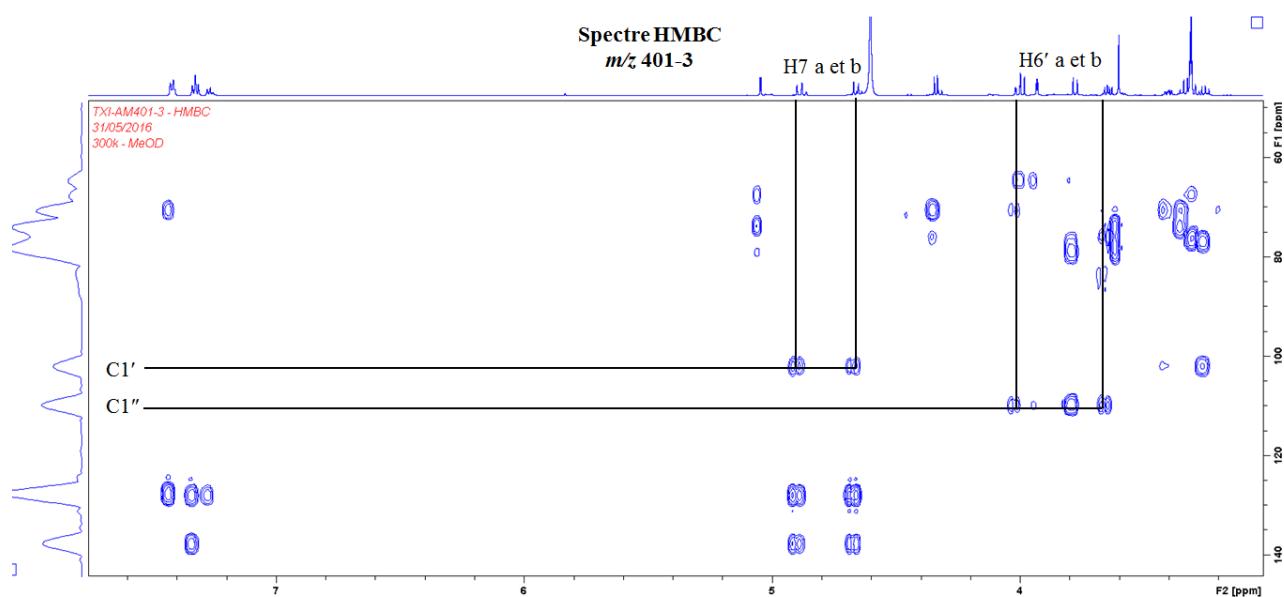
Spectre ^1H - ^{13}C HMBC du benzyl 6'-*O*- α -arabinopyranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-2) dans CD_3OD .



ANNEXE 15-A

Spectre ^1H du benzyl 6'-*O*- α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-3) dans CD_3OD .

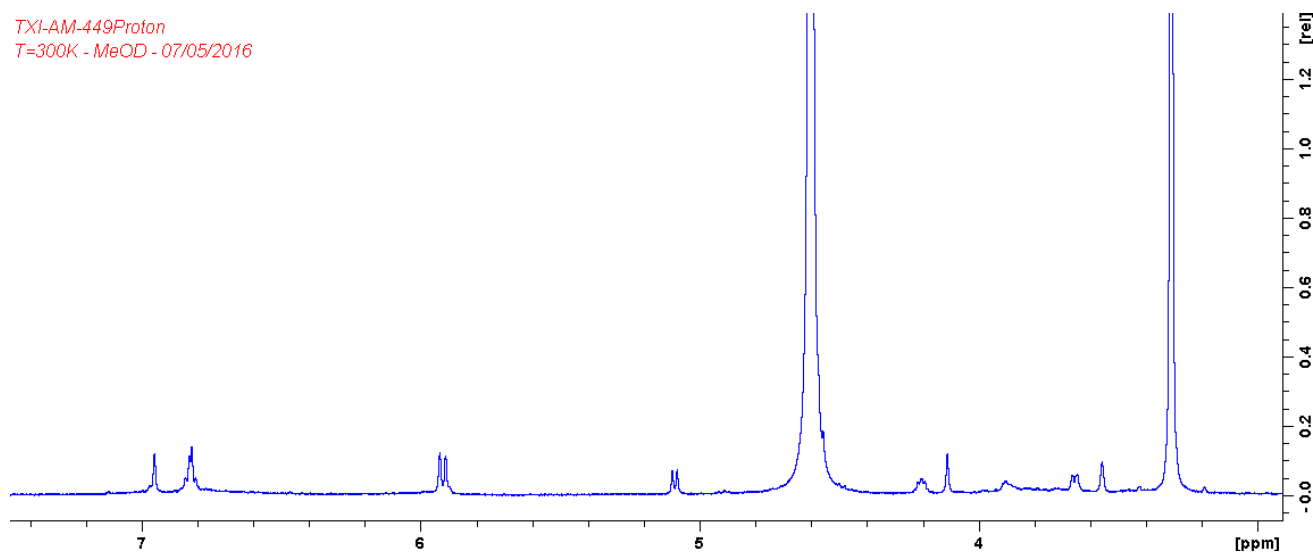
ANNEXE 15-B

Spectre ^1H - ^{13}C HMBC du benzyl 6'-*O*- α -apiofuranosyl- β -glucopyranoside (m/z 401-3) dans CD_3OD .

ANNEXE 16-A

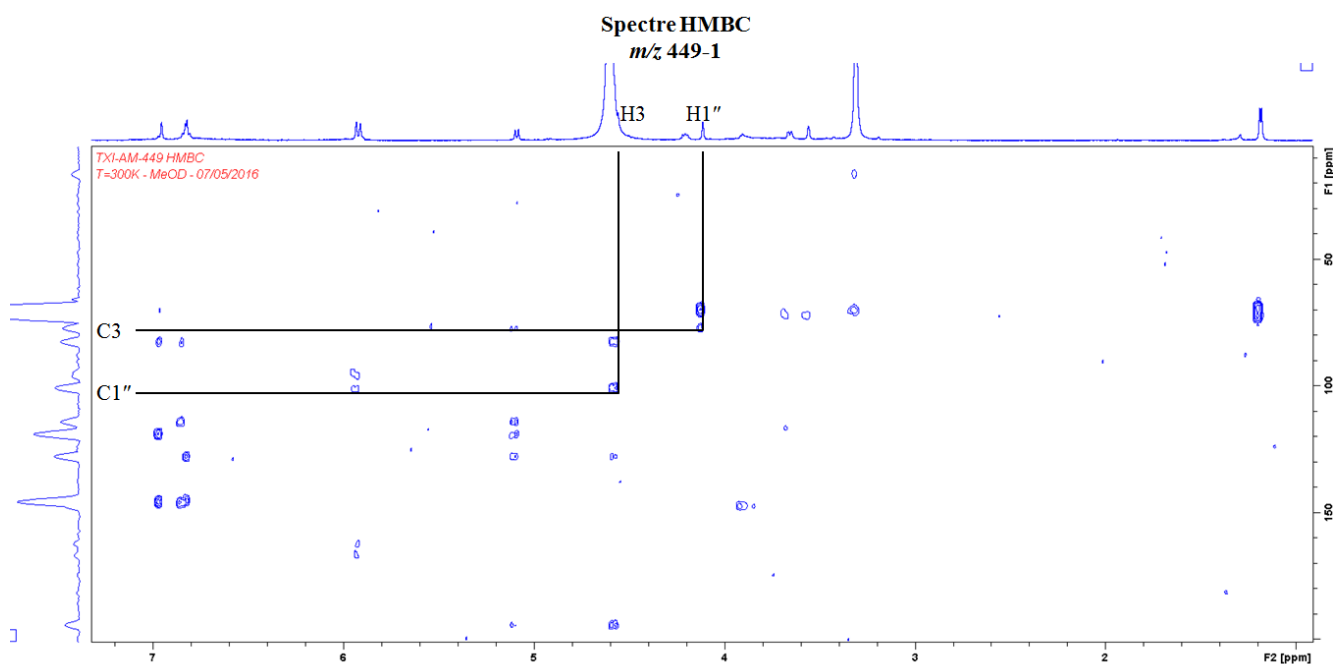
Spectre ^1H de l'astilbine, (2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (m/z 449-1) dans CD_3OD .

TXI-AM-449Proton
T=300K - MeOD - 07/05/2016



ANNEXE 16-B

Spectre ^1H - ^{13}C HMBC de l'astilbine, (2*R*, 3*R*)-taxifoline-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (m/z 449-1) dans CD_3OD .



ANNEXE 17-A

**CONCENTRATION DES COMPOSÉS SUCRÉS DANS LES MACÉRATIONS DE
CHAQUE PARTIE DE LA GRAPPE DE RAISIN, EXPRIMÉES EN $\mu\text{g/g}$ D'EXTRAIT
SEC DE LA GRAPPE ($\pm \sigma$).**

	H3MP-Glc*	H4MP-Glc*	AG-Glc	ILA-Glc	<i>Epi</i> -DPA-Glc	Astilbine
Pellicules	8,6 \pm 0,8	4,1 \pm 0,3	17,3 \pm 0,8	185,1 \pm 5,6	129,1 \pm 15,0	71,0 \pm 5,6
Pépins	28,2 \pm 1,6	10,5 \pm 1,1	410,6 \pm 69,1	114,9 \pm 7,8	50,6 \pm 7,0	27,6 \pm 0,9
Pulpe	1,8 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1	3,8 \pm 0,3	106,0 \pm 9,6	33,4 \pm 5,9	5,2 \pm 0,1
Rafles	11,5 \pm 0,3	8,4 \pm 0,1	24,7 \pm 0,3	110,8 \pm 8,7	113,4 \pm 21,8	3112,0 \pm 631,5

* Teneurs exprimées en μg d'équivalent AG-Glc/g d'extrait sec d'une partie de la grappe.

σ : écart-type.

ANNEXE 17-B

**LOCALISATION DES COMPOSÉS IDENTIFIÉS DANS LES DIFFÉRENTES
PARTIES DE LA GRAPPE DE RAISIN (PELLICULES, PÉPINS, PULPE, RAFLES),
EXPRIMÉE EN POURCENTAGE DE LA MASSE TOTALE EXTRAITE POUR
CHAQUE COMPOSÉ.**

	H3MP-Glc*	H4MP-Glc*	AG-Glc	ILA-Glc	<i>Epi</i> -DPA-Glc	Astilbine
Pellicules	17	17	4	36	39	2
Pépins	56	44	90	22	16	1
Pulpe	4	4	1	21	10	0
Rafles	23	35	5	21	35	97

ANNEXE 17-C

**CONCENTRATIONS DES COMPOSÉS SUCRÉS EN $\mu\text{g/g}$ D'EXTRAIT SEC DE
GRAPPE ($\pm \sigma$).**

H3MP-Glc*	H4MP-Glc*	AG-Glc	ILA-Glc	<i>Epi</i> -DPA-Glc	Astilbine
10,3 \pm 0,8	23,4 \pm 2,1	201,8 \pm 30,2	462,1 \pm 25,4	206,2 \pm 24,2	79,7 \pm 4,3

* Teneurs exprimées en μg d'équivalent AG-Glc/g d'extrait sec de grappe.

σ : écart-type.

ANNEXE 17-D

**LOCALISATION DES COMPOSÉS IDENTIFIÉS DANS LES DIFFÉRENTES
PARTIES DE LA GRAPPE DE RAISIN (PELLICULES, PÉPINS, PULPE),
EXPRIMÉE EN POURCENTAGE**

	H3MP-Glc*	H4MP-Glc*	AG-Glc	ILA-Glc	<i>Epi</i> -DPA-Glc	Astilbine
Pellicules	22	26	4	46	60	68
Pépins	73	67	95	28	24	27
Pulpe	5	7	1	26	16	5

ANNEXE 18

**DONNEES BRUTES DE QUANTIFICATION DE L' H3MP-GLC* (*m/z* 293-1),
L'H4MP-GLC* (*m/z* 293-2), L'AG-Glc (*m/z* 331), L'ILA-Glc (*m/z* 366), L'*epi*-DPA-Glc
(*m/z* 443), ET DE L'ASTILBINE (*m/z* 449-1), DANS LES VINS ET LES MACERATS
DE RAFLES, PELLICULES, PULPES ET PEPINS.**

	Code	Mill.	Appel.	H3MP- Glc*	H4MP- Glc*	AG- Glc	ILA- Glc	<i>Epi</i> - DPA- Glc	Astilbine
Vin Rouge Commercial	VR-C-1	2006	Autre	1,158	0,595	0,005	3,669	16,651	1,498
	VR-C-2	2006	Autre	3,518	1,140	0,061	1,049	11,626	1,221
	VR-C-3	2006	Autre	1,374	0,675	0,000	1,604	7,127	41,324
	VR-C-4	2006	Autre	1,449	0,567	0,000	3,120	7,356	37,668
	VR-C-5	2006	Autre	2,193	0,820	0,007	1,189	16,368	2,133
	VR-C-6	2011	Autre	2,399	0,866	1,033	30,828	5,655	2,986
	VR-C-7	2014	Autre	1,856	0,701	0,795	10,991	7,929	5,491
	VR-C-8	2006	Graves	3,441	1,069	0,031	11,244	9,658	1,675
	VR-C-9	2006	Graves	2,776	0,863	0,059	14,869	12,876	3,538
	VR-C-10	2007	Graves	1,758	0,619	0,020	18,820	4,955	8,709
	VR-C-11	2008	Graves	2,865	0,877	0,053	29,085	9,030	4,430
	VR-C-12	2008	Graves	2,657	0,843	0,043	23,014	7,241	3,424
	VR-C-13	2008	Graves	1,804	0,651	0,073	11,817	5,533	5,653
	VR-C-14	1990	Médoc	0,186	0,190	0,003	0,176	11,751	0,461
	VR-C-15	1997	Médoc	3,192	0,966	0,016	3,242	7,806	2,096
	VR-C-16	1998	Médoc	2,039	0,606	0,023	5,739	8,785	0,797
	VR-C-17	1998	Médoc	2,464	0,661	0,029	4,243	10,672	0,722
	VR-C-18	1998	Médoc	3,153	1,066	0,188	6,076	13,136	0,950
	VR-C-19	1999	Médoc	2,358	0,538	0,019	3,536	5,809	1,417
	VR-C-20	1999	Médoc	3,140	1,032	0,154	0,780	10,462	1,711
	VR-C-21	2000	Médoc	2,778	0,819	0,016	36,028	6,427	4,645
	VR-C-22	2002	Médoc	3,268	1,231	0,081	11,775	7,199	2,266
	VR-C-23	2002	Médoc	0,187	0,176	0,011	0,181	7,531	2,729
	VR-C-24	2002	Médoc	2,881	0,714	0,033	15,702	10,866	4,038
	VR-C-25	2002	Médoc	2,706	0,748	0,022	11,189	7,003	3,137
	VR-C-26	2002	Médoc	3,169	0,856	0,054	11,429	8,905	4,411
	VR-C-27	2004	Médoc	3,456	0,968	0,015	24,179	9,851	1,319
	VR-C-28	2004	Médoc	2,772	0,841	0,029	12,777	6,295	2,961
	VR-C-29	2005	Médoc	3,306	1,005	0,066	21,860	9,538	2,192

VR-C-30	2007	Médoc	2,229	0,598	0,022	20,252	6,446	2,579
VR-C-31	2007	Médoc	2,577	0,760	0,023	7,392	8,672	1,331
VR-C-32	2008	Médoc	3,212	0,972	0,056	32,358	7,987	3,480
VR-C-33	2008	Médoc	3,569	1,076	0,092	32,735	8,246	2,382
VR-C-34	2008	Médoc	2,666	0,806	0,036	28,925	8,266	3,256
VR-C-35	1981	Libournais	1,497	0,204	0,000	0,185	8,083	1,672
VR-C-36	1981	Libournais	1,920	0,496	0,004	0,214	6,233	1,278
VR-C-37	1998	Libournais	0,350	0,230	0,005	0,235	5,403	1,487
VR-C-38	1999	Libournais	1,287	0,514	0,014	4,488	4,673	3,021
VR-C-39	2007	Libournais	1,437	0,468	0,044	16,816	5,930	4,340
VR-C-40	2007	Libournais	1,915	0,619	0,038	17,125	6,618	6,102
VR-C-41	2007	Libournais	1,789	0,600	0,033	22,507	7,811	6,204
VR-C-42	2007	Libournais	1,407	0,565	0,001	11,545	8,633	5,285
VR-C-43	2008	Libournais	1,831	0,604	0,271	22,678	6,055	6,218
VR-C-44	2003	Libournais	1,691	0,730	0,022	0,720	9,275	3,730
VR-C-45	2006	Libournais	2,504	0,862	0,265	7,422	6,681	3,160
VR-C-46	2013	Libournais	2,013	0,667	0,017	23,671	5,926	7,299

* Teneurs exprimées en mg/L d'équivalent AG-Glc

Mill. : Millésime

Appel. : Appellation

CS : Cabernet Sauvignon

M : Merlot

	Code	Mill.	Appel.	H3MP-Glc*	H4MP-Glc*	AG-Glc	ILA-Glc	Epi-DPA-Glc	Astilbine
Vin Blanc Commercial	VB-C-1	1998	Autre	0,569	0,265	0,000	7,325	4,839	0,587
	VB-C-2	2005	Autre	1,325	0,438	0,000	8,938	8,258	3,875
	VB-C-3	2005	Autre	1,255	0,356	0,000	12,537	6,297	2,474
	VB-C-4	2007	Autre	0,312	0,231	0,000	1,167	2,462	0,866
	VB-C-5	2007	Autre	4,354	3,271	0,000	12,853	5,156	15,501
	VB-C-6	2009	Autre	0,167	0,167	0,000	1,134	1,793	1,244
	VB-C-7	2010	Autre	0,182	0,248	0,000	1,276	2,336	2,279
	VB-C-8	2012	Autre	0,262	0,221	0,000	10,277	3,133	0,430
	VB-C-9	2014	Autre	0,381	0,271	0,000	7,235	2,341	6,330
	VB-C-10	2015	Autre	0,427	0,326	0,000	11,508	5,099	1,449
	VB-C-11	2015	Autre	1,190	0,494	0,000	11,873	5,313	25,002
	VB-C-12	2015	Autre	2,361	0,941	0,000	14,745	8,797	51,376
	VB-C-31	2010	Autre	0,115	0,115	-	-	-	-
	VB-C-32	2012	Autre	1,045	0,385	0,000	4,147	4,645	1,052

VB-C-13	2010	Bourgogne	0,774	0,293	0,000	15,591	3,439	0,210
VB-C-14	2011	Bourgogne	0,416	0,253	0,000	1,153	1,944	2,154
VB-C-15	2012	Bourgogne	0,151	0,200	0,000	1,531	2,177	1,515
VB-C-16	2012	Bourgogne	0,979	0,315	0,000	5,081	4,185	3,563
VB-C-17	2014	Bourgogne	0,342	0,270	0,000	13,945	3,755	1,042
VB-C-18	1999	Graves	0,561	0,315	0,000	9,525	2,463	0,176
VB-C-19	2000	Graves	0,574	0,255	0,000	7,190	3,456	0,636
VB-C-20	2001	Graves	0,235	0,235	0,000	5,824	3,036	0,382
VB-C-21	2002	Graves	0,164	0,212	0,000	4,029	2,780	0,614
VB-C-22	2003	Graves	0,163	0,255	0,000	5,839	5,124	0,539
VB-C-23	2004	Graves	0,259	0,256	0,000	7,758	2,827	0,690
VB-C-24	2006	Graves	0,454	0,300	0,000	7,667	2,488	1,056
VB-C-25	2011	Graves	3,343	0,825	0,000	2,250	8,731	9,276
VB-C-26	2012	Graves	0,514	0,257	0,000	13,878	4,055	0,142
VB-C-27	2012	Graves	0,235	0,245	0,000	13,688	3,506	0,160
VB-C-28	2013	Graves	0,350	0,288	0,000	8,856	4,829	13,518
VB-C-29	2013	Graves	1,254	0,456	0,000	6,387	4,896	3,812
VB-C-30	2014	Graves	0,207	0,249	0,000	4,203	2,071	4,072
VB-C-33	2008	Graves	0,699	0,300	0,000	5,593	2,937	3,761
VB-C-34	1982	Sauternes	1,697	0,359	0,000	0,866	6,761	1,291
VB-C-35	1990	Sauternes	2,992	0,680	0,000	0,584	15,802	1,697
VB-C-36	2008	Sauternes	1,508	0,415	0,000	8,471	6,827	3,997
VB-C-37	2010	Sauternes	2,954	0,860	0,000	2,176	9,652	3,728
VB-C-38	2011	Sauternes	0,169	0,226	0,000	0,843	2,671	3,092

* Teneurs exprimées en mg/L d'équivalent AG-Glc.

Mill. : Millésime

Appel. : Appellation

CS : Cabernet Sauvignon

M : Merlot

	Code	Mill.	Appel.	Cépage	H3MP- Glc*	H4MP- Glc*	AG-Glc	ILA-Glc	Epi-DPA- Glc	Astilbine
Eurythmoflora	VR-E-1	2014	C.de B	M	0,933	0,397	0,048	5,983	2,001	5,786
	VR-E-2	2014	C.de B	M	1,008	0,426	0,173	7,373	2,123	6,367
	VR-E-3	2014	C.de B	M	0,929	0,397	0,002	18,230	1,992	8,883
	VR-E-4	2014	C.de B	M	0,956	0,400	0,034	24,881	2,004	9,351
	VR-E-5	2014	Graves	M	1,250	0,469	0,000	4,875	2,784	5,773
	VR-E-6	2014	Graves	M	1,275	0,491	0,000	3,674	2,835	5,305
	VR-E-7	2015	Graves	CS	2,778	0,964	0,321	51,392	6,763	1,561

VR-E-8	2015	Graves	CS	2,727	0,950	0,311	50,841	6,579	1,491
VR-E-9	2014	Graves	M	2,543	0,874	1,236	31,282	6,681	25,630
VR-E-10	2014	Graves	M	1,705	0,654	0,160	61,826	5,654	29,967
VR-E-11	2014	Graves	CS	6,953	2,417	1,303	87,149	9,411	4,981
VR-E-12	2014	Graves	CS	5,036	1,857	0,563	108,713	7,642	6,121

* Teneurs exprimées en mg/L d'équivalent AG-Glc.

Mill. : Millésime

Appel. : Appellation

C.de B. : Côtes de Bordeaux

CS : Cabernet Sauvignon

M : Merlot

	Code	Millésime	H3MP-Glc*	H4MP-Glc*	AG-Glc	ILA-Glc	Epi-DPA-Glc	Astilbine
Macérations	M1-pel	2016	0,112	0,054	0,017	0,182	0,120	0,067
	M1-pep	2016	0,205	0,076	0,352	0,120	0,049	0,027
	M1-pul	2016	0,070	0,045	0,004	0,098	0,028	0,005
	M1-raf	2016	0,051	0,037	0,025	0,105	0,100	2,666
	M2-pel	2016	0,109	0,054	0,016	0,179	0,116	0,066
	M2-pep	2016	0,217	0,076	0,366	0,122	0,061	0,029
	M2-pul	2016	0,072	0,044	0,004	0,099	0,030	0,005
	M2-raf	2016	0,050	0,038	0,025	0,103	0,094	2,611
	M3-pel	2016	0,135	0,062	0,018	0,194	0,152	0,079
	M3-pep	2016	0,238	0,095	0,514	0,103	0,042	0,027
	M3-pul	2016	0,103	0,050	0,004	0,120	0,042	0,005
	M3-raf	2016	0,053	0,037	0,024	0,124	0,146	4,059

* Teneurs exprimées en mg/L d'équivalent AG-Glc.

pel : pellicule ; pep : pépin ; pul : pulpe ; raf : rafle.