

# Recherches sur les composés du bois de chêne modulant la saveur des vins et des eaux-de-vie

Delphine Winstel

## ▶ To cite this version:

Delphine Winstel. Recherches sur les composés du bois de chêne modulant la saveur des vins et des eaux-de-vie. Autre [q-bio.OT]. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT: 2019BORD0409. tel-03498278

# HAL Id: tel-03498278 https://theses.hal.science/tel-03498278

Submitted on 21 Dec 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

# **DOCTEUR DE**

# L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

## ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par

**Delphine WINSTEL** 

Née le 25 août 1992 à Bayonne (64)

# RECHERCHES SUR LES COMPOSÉS DU BOIS DE CHÊNE MODULANT LA SAVEUR DES VINS ET DES EAUX-DE-VIE

Sous la direction de : Axel MARCHAL

Soutenue le 20 décembre 2019

Membres du jury :

M. Philippe DARRIET, Professeur, Université de BordeauxPrésMme Céline RIVIERE, Maître de Conférences, Université de LilleRapM. Jean-Hugues RENAULT, Professeur, URCA, ReimsRapM. Loïc BRIAND, Directeur de Recherche, CSGA, DijonExaM. Eric FREROT, Principal scientist, Société Firmenich, GenèveExaM. Axel MARCHAL, Maître de Conférences, Université de BordeauxDirecteur

Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Directeur de thèse

#### Recherches sur les composés du bois de chêne modulant la saveur des vins et des eaux-

#### de-vie

L'élevage en barriques est une étape clé de l'élaboration des vins et des eaux-de-vie, modifiant leur expression aromatique et influençant leur saveur. Si les principaux composés volatils libérés par le bois de chêne ont été identifiés, les déterminants moléculaires amers et sucrés demeurent, dans une large mesure, inconnus. Le premier axe de ce travail a consisté à apporter de nouvelles connaissances sur des familles de molécules déjà identifiées dans le bois de chêne : les lignanes et les coumarines. Une influence significative du (±)-lyonirésinol sur l'amertume des spiritueux a d'abord été démontrée. Puis, des analyses sensorielles ont mis en évidence la contribution de six coumarines à l'amertume des vins et des spiritueux via des effets de synergie. La fraxétine a été identifiée pour la première fois dans les trois matrices de l'étude. Dans un second axe, la sensation de sucrosité conférée au vin par la chauffe des douelles lors de la fabrication des barriques a été étudiée, ce qui a permis de confirmer et d'interpréter des observations empiriques. Ce travail a en effet visé à isoler de nouvelles molécules sapides, selon deux méthodologies différentes. La première a consisté à mettre en place un protocole de fractionnement d'extraits de bois de chêne, par des techniques séparatives couplées à la gustatométrie, et a permis la purification de onze molécules sapides. Leur identification a été réalisée par HRMS et RMN. Dans un second temps, une approche ciblée a été adoptée à la suite d'un criblage métabolomique par HRMS sur plusieurs eaux-de-vie de Cognac. Deux nouveaux composés ont pu être purifiés. Ces marqueurs ont été quantifiés dans des extraits de bois de chêne, des vins et des spiritueux. L'incidence de plusieurs paramètres de tonnellerie sur leur teneur a ainsi été étudiée.

Mots clés : saveur sucrée, amertume, goût, bois de chêne, œnologie, chimie analytique.

#### Research on taste-active compounds of oak wood responsible for wines and spirits taste

#### balance

During barrel aging, wines and spirits undergo organoleptic changes caused by the release of aroma and taste molecules. While the key aromatic compounds released from oak wood have been identified, the bitter and sweet molecular determinants remain largely unknown. The first objective of this work was to bring new insights on the families of molecules already identified in oak wood: lignans and coumarins. First, a significant impact of (±)lyoniresinol on spirits bitterness has been demonstrated. Then, sensory analysis showed the contribution of six coumarins to bitter taste of wines and spirits by synergistic effect. Fraxetin was identified for the first time in all three matrices of the study. In the second part of this work, the contribution of oak wood toasting to wine sweet taste has been studied, which allowed to confirm and to interpret empirical observations. Indeed, the aim of this study was to isolate new taste-active compounds, according to two different methods. For the first one, a fractionation protocol of oak wood extracts has been established. Separation techniques coupled with gustatometry allowed the purification of eleven taste-active compounds. Their identification has been carried out by HRMS and NMR. For the second method, a targeted approach has been used following a metabolomic screening by HRMS on several eaux-de-vie of Cognac. Two new taste-active molecules have been purified. These new markers have been quantified in several oak wood extracts, wines and spirits. The influence of oenological parameters on its content has been studied.

Keywords: sweetness, bitterness, taste, oak wood, oenology, analytical chemistry.

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin – Unité de recherche œnologie EA 4577

210 Chemin de Leysotte CS 50008 - 33882 Villenave d'Ornon Cedex

### REMERCIEMENTS

Monsieur Axel Marchal, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux, m'a confié ce sujet de recherche fascinant et original. Je le remercie infiniment de la confiance qu'il m'a témoignée en me permettant de poursuivre ses travaux de thèse. Ses conseils éclairés et précieux ainsi que ses grandes connaissances scientifiques ont permis d'orienter ce projet, tout en me laissant une grande liberté de travail. Ses encouragements et son soutien ont été des éléments indispensables à la bonne réalisation de ces travaux. J'aimerais également le remercier d'avoir partagé sa passion du vin et pour les discussions intéressantes qui en ont émané.

La qualité de la relation avec son directeur de thèse est un facteur déterminant pour mener à bien un tel projet. Je me réjouis que celle-ci fût toujours fructueuse et enrichissante. Qu'il soit assuré de mon entière reconnaissance.

Monsieur Philippe Darriet, Directeur de l'Unité de Recherche Œnologie, m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir encouragée tout au long de ce projet de thèse.

Madame Céline Rivière, Maître de Conférences à l'Université de Lille, et Monsieur Jean-Hugues Renault, Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne, ont accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. J'en suis très honorée et les remercie vivement.

Monsieur Eric Frérot, de la société Firmenich, a accepté de participer à l'évaluation de ce travail en tant qu'examinateur. Je le remercie vivement pour sa collaboration, son aide et ses précieux conseils. Je lui exprime ma plus profonde gratitude.

Monsieur Loïc Briand, Directeur de Recherche au Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation à Dijon, a montré un vif intérêt pour mon travail et a permis une collaboration fructueuse. Je suis heureuse qu'il ait accepté de juger cette thèse. Je le remercie également pour ses encouragements et sa gentillesse.

Je remercie la tonnellerie Seguin-Moreau et la maison Rémy-Martin qui ont permis le financement de cette thèse. Plus particulièrement, je remercie très chaleureusement Andréi Prida, Jean-Charles Mathurin et Louise Urruty, pour leur implication tout au long de ces trois ans.

Je remercie le professeur Jean-Michel Mérillon d'avoir permis une collaboration avec l'axe Molécule d'Intérêt Biologique de l'unité de Recherche Œnologie. Je remercie plus particulièrement Pierre Waffo-Téguo, Professeur à l'Université de Bordeaux, avec qui nous avons pu réaliser les expériences de résonance magnétique nucléaire. Je salue sa disponibilité, son aide et sa gentillesse. Je tiens également à remercier Eric Pédrot et Grégory Da Costa, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux, pour leur aide. Je remercie chaleureusement Warren Albertin, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux, qui m'a aidée pour les traitements statistiques. Je salue ses qualités humaines, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je suis reconnaissante envers Valérie Lavigne, chercheuse détachée à l'unité de Recherche Œnologie, pour avoir acceptée d'être présente à toutes les dégustations durant ces trois années et pour son expertise. Je la remercie également pour ses encouragements et sa gentillesse.

Les mesures de l'activation des récepteurs à l'amertume au contact des extraits de bois ont été réalisées par le Docteur Christine Belloir du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation de Dijon. Je la remercie fortement pour le temps consacré à ce travail et pour sa gentillesse.

Le Docteur Sophie Tempère, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux, m'a apportée son aide précieuse pour les traitements statistiques associés aux analyses sensorielles. Je la remercie vivement.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à tous les membres du laboratoire, qui ont partagé mon quotidien, de près ou de loin, pendant ces trois ans et qui m'ont soutenue dans les bons et les mauvais jours. Merci à Marine, Blandine, Philippine, Marie LS, Charlotte, Ariane, Anita, Liang, Marion, Marie C, Syntia, Fannie, Cécile et Alexandre.

Je remercie particulièrement Pascaline Redon, technicienne de recherche à l'ISVV, pour son aide, sa gentillesse et son amitié. Nos nombreux échanges ont rendu cette thèse plus agréable.

Ces résultats ne seraient pas les mêmes sans l'aide de Delphine Bahammou, Marie André, Armance Richard, François Clavero, Eric Gautier et Matteo Zazzarini. Ils ont consacré quelques mois de leurs études à l'avancement de ces travaux de thèse et je leur en suis extrêmement reconnaissante.

Delphine, je te souhaite bon courage pour ta thèse et te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Elodie Guittard et Virginie Teninge, je vous remercie pour votre aide, votre gentillesse et le temps que vous avez pu m'accorder.

Une pensée amicale pour le bureau 2C27. Et surtout un immense merci à Marine pour ces trois années passées ensemble. Merci pour ton soutien sans faille, ton aide et ton écoute mais, également pour ton amitié et tes encouragements.

Merci à Philippine pour m'avoir supportée pendant cette dernière année et pour m'avoir fait rire ! Bien évidemment, mes dernières pensées vont pour Jean-Noël...

Un grand merci à Blandine pour son soutien durant ces quatre dernières années et pour tous les bons moments passés ensemble. Merci pour ta joie de vivre, ta bonne humeur et ton amitié.

Je remercie bien évidemment Alicia Jouin pour son soutien de tous les jours, son amitié et ses éclats de rire. Ensemble nous avons réussi à surmonter les épreuves de la thèse. Nos rigolades, nos discussions, autour d'un verre ou non, et nos voyages ont été très enrichissants. Sans toi, ces trois ans n'auraient définitivement pas eu la même saveur !

Merci également à mes autres collègues de thèse qui sont devenus des amis au cours de ces trois dernières années. Merci à Justine, Mathilde, Clément, Edouard et Bastien pour votre soutien indispensable, votre bonne humeur et pour tous les bons moments.

Un merci particulier à Alicia, Pauline et Louis, mes « coéquipiers » de la JDD, pour les nombreux éclats de rire.

Marie LS, padawan, que la force soit avec toi !

Jérémy et Dorian, cette fois, je ne vous oublie pas ! Je vous remercie également pour votre soutien et les bons moments passés ensemble.

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

Je salue amicalement tous les membres de l'ISVV qui m'ont accueillie au cours de ces trois ans. J'ai eu un grand plaisir à travailler avec vous.

Je suis extrêmement reconnaissante envers mes parents qui ont toujours été là pour moi. C'est grâce à vous, votre éducation, votre amour inconditionnel et votre confiance indéfectible que j'en suis là aujourd'hui.

« Les mots manquent aux émotions », Victor Hugo.

J'aimerais également remercier ma deuxième famille, mes amis, ceux qui me supportent et me soutiennent depuis plus de dix ans. Merci à Tatum, Amélie, Nina, Justine, Emilie, Lucas, Manu, Théo, Adrien, Loïc, Chooby, Paul et Alex. Votre soutien, votre joie de vivre et votre amour ont été des éléments indispensables à la réussite de mes études.

Enfin, merci Edouard pour ton soutien indispensable, ton réconfort, ta bienveillance et ta gentillesse. Merci pour tout ce que tu m'apportes chaque jour.

## SOMMAIRE

ABREVIATIONS	i
LISTE DES FIGURES	iii
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES ANNEXES	xvi
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	4
I. État des connaissances sur l'apport des composés du bois de chêne à la qu organoleptique des vins et des eaux-de-vie	ıalité 4
A. Généralités	4
B. Influence de l'élevage en barriques sur les propriétés sensorielles du vin	5
1. Contribution à la couleur des vins	5
2. Contribution à l'arôme des vins	6
3. Contribution à l'astringence des vins	6
4. Contribution à la saveur sucrée et amère des vins	9
a. Effet sur l'amertume	9
b. Effet sur la sucrosité	9
C. Influence du bois de chêne sur l'élevage des spiritueux	10
1. Contribution à la couleur des eaux-de-vie	11
2. Contribution à l'arôme et au goût des spiritueux	12
II. État des connaissances sur la diversité structurale des molécules sapides et récepteurs	leurs 13
A. Les récepteurs du goût	14
B. La saveur amère et ses récepteurs	15
1. Diversité structurale des molécules amères	15
2. Les récepteurs à l'amertume	17
C. La saveur sucrée et son récepteur	18
1. Diversité structurale des molécules sucrées	18
2. Les récepteurs au goût sucré	20
PARTIE EXPÉRIMENTALE GÉNÉRALE	23
I. Produits chimiques utilisés	23

II.	Tech	niques analytiques utilisées	24
А	. M	éthodes de fractionnement et de purification	24
	1.	Extraction solide-liquide	24
	2.	Extraction liquide-liquide	24
	3.	Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)	24
	a.	Principe	24
	b.	Avantages et limites de la méthode	27
	c.	Appareillage	28
	4.	Chromatographie Liquide Haute Performance à l'échelle semi-Prépa	arative
	(HPI	-C-Prep)	29
	a.	Principe	29
	b.	Appareillage	30
В	EI	ucidation structurale	30
	1. Spec	Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance couplée trométrie de Masse à Transformée de Fourier-Orbitrap (LC-HRMS)	à la 30
	a.	Principe de l'Orbitrap	31
	b.	Système Exactive <sup>TM</sup>	32
	c.	Appareillage	34
	2.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	35
	a.	Principe	35
	b.	Appareillage	36
	3.	Polarimétrie	36
	a.	Principe	36
	b.	Appareillage	37
III.	Anal	yse sensorielle	37
А	. De	égustation « exploratoire »	37
	1.	Principe	37
	2.	Conditions de la dégustation	38
В	. De	égustation de validation	38
	1.	Conditions de la dégustation	38
	2.	Tests d'analyse sensorielle et traitements statistiques utilisés pour	r leur
	inter	pretation	38
	a.	Test triangulaire	38
	b.	Profil sensoriel	40
	с.	I est de classement	41
	3.	Entraînement du panel de dégustateurs à l'eau-de-vie	42
	a.	Matériels et méthodes	42
	b.	Résultats et discussion	42

# **PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES LIGNANES ET DES COUMARINES DU BOIS DE CHÊNE AU GOÛT DU VIN ET DES EAUX-DE-VIE**... 44

CHAPITRE I. ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ CHIMIQUE DES LIGNANES DU BOIS DE CHÊNE ET DES PROPRIÉTÉS SENSORIELLES DU LYONIRESINOL DANS LES EAUX-DE-VIE
I. Diversité chimique des lignanes du bois de chêne dans les spiritueux
A. Matériels et méthodes46
B. Résultats et Discussion
II. Etude de la contribution sensorielle du lyonirésinol au goût des eaux-de-vie 50
A. Entraînement et validation du panel de dégustateurs
B. Détermination du seuil de détection du lyonirésinol dans les eaux-de-vie 50
1. Matériels et méthodes 50
2. Résultats et discussion
III. Quantification du lyonirésinol dans diverses eaux-de-vie
A. Développement d'une méthode de dosage du lyonirésinol52
1. Méthodologie
a. Préparation des échantillons52
b. Préparation des solutions de calibration52
c. Analyse par LC-FTMS et traitement des résultats52
2. Validation de la méthode de quantification
a. Sensibilité55
b. Linéarité55
c. Spécificité56
d. Répétabilité et justesse56
B. Dosage du lyonirésinol dans des eaux-de-vie commerciales
1. Nature et origine des eaux-de-vie
2. Résultats et discussion
C. Dosage du lyonirésinol dans plusieurs eaux-de-vie de Cognac
1. Effet de l'âge sur la teneur en lyonirésinol
a. Nature et origine des échantillons59
b. Résultats et discussion
2. Influence des paramètres de tonnellerie sur une même eau-de-vie de Cognac
a. Nature et origine des eaux-de-vie analysées
b. Traitements statistiques61
c. Influence de l'essence et de l'origine géographique du bois sur la teneur en lyonirésinol
d. Influence de la sélection gros grain/grain fin sur la teneur en lyonirésinol 63

CHAPIT CHÊNE	RE II. ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES COUMARINES DU BOIS DI AU GOÛT DU VIN ET DES EAUX-DE-VIE6	Е 6
I. R	echerches de coumarines dans le bois de chêne par criblage LC-HRMS6	8
А.	Matériels et méthodes	8
B.	Résultats et discussion	9
II. É vie de	tude de la présence des six coumarines dans un vin rouge boisé et dans une eau-de Cognac - Caractérisation sensorielle7	;- 3
А.	Matériels et méthodes	3
1.	Analyse LC-HRMS d'un vin rouge boisé et d'une eau-de-vie de Cognac7	3
2.	Analyse sensorielle	3
	a. Dégustation préliminaire7	3
	b. Détermination du seuil de détection gustative de l'esculétine, la scopolétin et de la 4-méthylombelliférone	e 3
	1) Dans un vin blanc non boisé	3
	2) Dans une eau-de-vie blanche	4
B.	Résultats et discussion	4
1.	Recherche de la présence des six coumarines par LC-HRMS	4
2.	Analyse sensorielle	7
	a. Dégustation préliminaire7	7
	b. Détermination du seuil de détection gustative de l'esculétine, de l scopolétine et de la 4-méthylombelliférone	a 7
3.	Discussion	8
III. Q l'influe	uantification des six coumarines dans les vins et les eaux-de-vie ; étude d ence des paramètres de tonnellerie	e 0
А.	Développement d'une méthode de dosage des six coumarines par LC-HRMS 8	0
1.	Conditions chromatographiques et paramètres spectrométriques	0
2.	Préparation des échantillons et des solutions de calibration	1
	a. Préparation des échantillons	1
	b. Préparation des solutions de calibration	1
3.	Traitement des résultats	2
4.	Validation de la méthode de quantification	2
	a. Sensibilité	2
	b. Linéarité	3
	c. Répétabilité	3
	d. Justesse	3
	e. Spécificité	3
B.	Dosage des coumarines dans les vins	б
1.	Origine des vins analysés8	б

2.	Résultats du dosage des six coumarines dans les vins et discussion	
C. Do	osage des coumarines dans les eaux-de-vie	
1.	Nature et origine des eaux-de-vie analysées	
2.	Résultats et discussion	
a.	Eaux-de-vie commerciales	
b.	Eaux-de-vie de Cognac millésimes	
IV. Infludde-vie	ence des six coumarines en mélange sur l'équilibre gustatif des vins e	t des eaux- 93
A. Ar	alyses sensorielles et traitements statistiques	
1.	Dégustation préliminaire	
2.	Profil descriptif	
a. eai	Détermination du profil sensoriel d'un vin rouge, d'un vin blan u-de-vie jeune avant et après ajout de coumarines	c et d'une 94
b.	Traitement statistique	95
B. Ré	sultats et discussion	95
1.	Profil descriptif des vins supplémentés en coumarines	95
2.	Profil descriptif des eaux-de-vie supplémentées en coumarines	97
3.	Discussion	97
C. Do	osage des coumarines dans des macérats de bois de chêne	
1.	Nature et origine des macérats de bois de chêne analysés	
2. discu	Résultats du dosage des six coumarines dans les macérats d	le bois et 99
a.	Influence de l'espèce de chêne	
b.	Influence de la température de chauffe	
DEUXIÈME MOLÉCULAI L'ÉLEVAGE	PARTIE : RECHERCHE DE NOUVEAUX MAR IRES DES SAVEURS SUCRÉE ET AMÈRE CONFÉRÉ SOUS BOIS DE CHÊNE	QUEURS XES PAR 104
CHAPITRE D'EXTRAII	III. DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE FRACTION IS DE BOIS DE CHÊNE GUIDÉ PAR LA DÉGUSTATION	NEMENT 104

I.	Р	résentation de la stratégie inductive mise en œuvre	. 104
	A.	Principe général	. 104
	B.	Suivi du fractionnement	. 105
	C.	Protocole des dégustations réalisées lors du suivi du fractionnement	. 107
II	. P	réparation des échantillons	. 107
	A.	Matériel végétal	. 107
	B.	Protocole d'extraction solide-liquide	. 108

C. Pré-purificatio	on par extraction liquide-liquide	109
1. Choix des	solvants et mise en œuvre	109
2. Résultats		111
a. Extractio	ons liquide-liquide	111
b. Dégustat	tion des extraits pré-purifiés	112
3. Discussion	1	113
III. Isolement de fra (BCF_MtBE)	actions sapides à partir de l'extrait MtBE du Bois Chaut	ffe Forte
A. Fractionnemer Centrifuge (CPC)	nt de l'extrait BCF_MtBE par Chromatographie de	Partage
1. Principes e	et mise en œuvre	
2. Choix du s la dégustation et	système de CPC pour l'extrait BCF_MtBE : utilisation con de la LC-HRMS	jointe de 115
3. Méthode de	le fractionnement par CPC	116
4. Résultats d	lu fractionnement par CPC	117
5. Discussion	1	118
B. Second fractio	onnement des extraits issus du BCF_MtBE par CPC	119
1. Fractionne	ment des fractions BCF_MtBE_F2 et F4	119
2. Fractionne	ment des fractions BCF_MtBE_F1, F3 et F5	123
C. Purification par Préparative (HPLC-	ar Chromatographie Liquide Haute Performance à l'échel 2-Prep)	lle semi- 125
1. Mise au po	oint des méthodes et fractionnement des échantillons	126
2. Résultats		127
a. Résultats	s des purifications	127
b. Résultats	s de la dégustation réalisée lors du suivi de fractionnement.	129
3. Discussion	1	
D. Optimisation d $m/z$ 641	les méthodes de fractionnement en vue de la purification du	composé 132
1. Principe et	t mise en œuvre	
2. Optimisatio	on des étapes de fractionnement et de purification	132
IV. Isolement de fra (BNC_MtBE)	actions sapides à partir de l'extrait MtBE du Bois Non	Chauffé 135
A. Fractionnemer	nt des extraits par CPC	135
B. Purification pa	ar HPLC-Prep des fractions BNC_MtBE_F5 et F6	137
C. Optimisation composés $m/z$ 639-	des méthodes de fractionnement en vue de la purifica 1 et 639-2	tion des
1. Purification BNC_Am_MtBE	n des composés $m/z$ 639-1 et 639-2 à partir des E_F-III et F-V	extraits 141

2. Purification du composé $m/z$ 639-3 à partir de l'extrait BNC_An VI.	n_MtBE_F- 142
V. Isolement de fractions sapides à partir de l'extrait BuOH du Bois N (BNC_BuOH)	on Chauffé 144
A. Fractionnement de l'extrait BNC_BuOH par CPC	144
B. Second fractionnement par CPC de l'extrait BNC_BuOH_F6	147
C. Purification par HPLC-Prep des fractions BNC_BuOH_F2, F3 et F4	150
D. Optimisation des méthodes de fractionnement en vue de la purif composés $m/z$ 807 et 783	ication des 154
CHAPITRE IV. IDENTIFICATION DE COMPOSÉS SAPIDES DU CHÊNE	BOIS DE 159
I. Etude des propriétés sensorielles des composés purifiés	159
II. Caractérisation structurale des composés purifiés	160
A. Composés de la fraction BCF_MTBE	
1. Identification des composés $m/z$ 169-pos, 183 et 209	
2. Identification du composé $m/z$ 641	165
B. Composés de la fraction BNC_MtBE	171
1. Identification des isomères $m/z$ 639	171
a. Identification des composés $m/z$ 639-1 et 639-2	
b. Hypothèses d'identification du $m/z$ 639-3	174
2. Hydrolyse enzymatique des composés $m/z$ 639-1 et 639-2	175
a. Matériels et méthodes	175
1) Hydrolyse enzymatique des isomères $m/z$ 639	175
2) Analyse en Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Sp de Masse (GC-MS)	ectrométrie
b. Résultats et discussion	177
C. Composés de la fraction BNC_BuOH	179
1. Identification du composé $m/z$ 169-neg	179
2. Identification du composé $m/z$ 807	
3. Identification du composé $m/z$ 783	
4. Identification du composé $m/z$ 539	

# CHAPITRE V. EXPLORATION DE NOUVELLES APPROCHES POUR LA RECHERCHE DE COMPOSÉS SAPIDES DES VINS ET DES EAUX-DE-VIE ........... 191

I.	С	Criblage des fractions par mesure de l'activation de récepteurs gustatifs	191
	A.	Principe	191
]	B.	Application à des extraits de bois de chêne	192

	1.	Ν	Matériels et méthodes	193
	8	a.	Fractionnement guidé par la dégustation	193
		1)	Extraction solide-liquide	193
		2)	Extraction liquide-liquide et CPC	193
	ł	).	Mesure de l'activité fonctionnelle des récepteurs à l'amertume	193
	2.	R	Résultats et discussion	194
	8	a.	Test de l'activation des Tas2Rs par un extrait de chêne sessile	194
	ł	Э.	Test de l'activation du Tas2R7 par les extraits BNC, BCN et BCF	196
	( 2	e. aque	Test de l'activation du Tas2R7 par les extraits MtBE, AcOEt, BuOH et peuse du BNC	ohase 197
	с 1	l. 'ext	Test de l'activation du Tas2R7 par les fractions obtenues après CP rait BNC_BuOH	C de 199
II.	Ap	proc	che par analyse différentielle non-ciblée	201
A. État de l'art			de l'art	201
B. Application de l'analyse différentielle non-ciblée à des extraits d chêne			lication de l'analyse différentielle non-ciblée à des extraits de boi	is de 202
	1.	Ν	Matériels et méthodes	202
	8	a.	Nature et origine des macérats de bois de chêne analysés	202
	ł	э.	Analyse par LC-MS/MS (Q-Exactive <sup>TM</sup> Plus Orbitrap)	202
	C	с.	Traitement des données avec MZmine	205
	(	1.	Traitements statistiques	207
	2.	R	Résultats et discussion des différents traitements de données	208
	8	ì.	Analyse des données métabolomiques des extraits de bois de chêne	208
	ł	o. chên	Application aux molécules d'intérêt purifiées à partir des extraits de bo	ois de 211

# 

CHAPITR VIE DE C	RE VI. SÉLECTION DE COMPOSÉS D'INTÉRÊT DANS DES EAU OGNAC PAR ANALYSE DIFFERENTIELLE NON-CIBLÉE	JX-DE- 215
I. An	alyse non-ciblée par HRMS d'eaux-de-vie de Cognac de différents âges	215
<b>A.</b> 1	Matériels et méthodes	215
1.	Nature et origine des eaux-de-vie analysées	215
2.	Analyse par LC-MS/MS (Q-Exactive <sup>TM</sup> Plus Orbitrap)	216
3.	Traitement des données avec MZmine	216
4.	Traitements statistiques	217
<b>B</b> . 1	Résultats et discussion des traitements statistiques	217

II.	Utilisation de l'analyse non-ciblée pour sélectionner des molécules d'intérêt en vu	le
de le	eur purification	1

HAPITRE VII. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSÉS CIBLÉ	ÉS 24
KOVENANT D'EAUX-DE-VIE DE COONAC	2 <del>4</del>
I. Développement d'un protocole de purification des composés ciblés	24
A. Suivi de fractionnement	24
B. Purification du composé $m/z$ 331 à partir d'extraits de bois de chêne 22	25
1. Criblage d'extraits de bois de chêne22	25
2. Fractionnements par CPC	27
3. Purification du composé $m/z$ 331 par HPLC-Prep	29
C. Purification du composé $m/z$ 703 à partir d'une eau-de-vie boisée de Cogna (EDV).	ac 30
1. Préparation des échantillons	30
2. Fractionnement de l'extrait EDV_BuOH par CPC	32
3. Purification du composé $m/z$ 703 par HPLC-Prep	36
II. Caractérisation structurale et sensorielle des composés purifiés	37
A. Etude de la molécule $m/z$ 331	37
1. Etude des propriétés sensorielles du composé $m/z$ 331	37
2. Caractérisation structurale	37
B. Etude de la molécule $m/z$ 703	40
1. Détermination de la formule brute par LC-HRMS	40
2. Fragmentation par HCD	40
3. Utilisation du logiciel Sirius	43

#### 

CHAPITRE VIII. CARACTÉRISATION SENSORIELLE DU SYRINGAL DE L'ACIDE GALLIQUE DANS LES VINS ET LES EAUX-DE-VIE	DÉHYDE ET 246
I. Détermination des seuils de détection gustative du syringaldéhyde gallique dans deux matrices	et de l'acide 246
A. Dans un vin blanc non boisé	
B. Dans une eau-de-vie blanche	
II. Résultats et discussion	

CHAPITRE IX. QUANTIFICATION DES COMPOSÉS PURIFIÉS DANS LES LES EAUX-DE-VIE ; ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES PARAMÈT TONNELLERIE	VINS ET RES DE 249
I. Développement de deux méthodes de dosage par LC-HRMS des purifiés	composés 249
A. Composés quantifiés	
B. Préparation des échantillons et des solutions de calibration	
1. Préparation des échantillons	
2. Préparation des solutions de calibration	250
C. Conditions chromatographiques et spectrométriques	
D. Traitement des résultats	
E. Validation de deux méthodes de quantification	
1. Sensibilité	
2. Linéarité	
3. Spécificité	
4. Répétabilité et justesse	
II. Application de la méthode à l'analyse des vins	
A. Origine des vins analysés	
1. Vins commerciaux	
2. Vins issus du même cru sur plusieurs millésimes	
B. Résultats et discussion	
1. Vins commerciaux	
2. Vins issus du même cru sur plusieurs millésimes	
III. Application de la méthode à l'analyse des spiritueux	
A. Nature et origine des eaux-de-vie analysées	
B. Résultats et discussion	
1. Eaux-de-vie commerciales	
2. Eaux-de-vie millésimes	
IV. Étude de l'influence des paramètres de tonnellerie	
A. Origine et préparation des échantillons	
B. Résultats et discussion	
1. Influence de l'espèce de chêne	
2. Influence de la température de chauffe	
<i>, ,</i>	

## ABRÉVIATIONS

### Abréviations générales

$^{1}\mathrm{H}$	Proton
<sup>13</sup> C	Carbone 13
$[\alpha]^{\mathrm{D}}$	Pouvoir rotatoire spécifique (en degré Celcius)
δ	Déplacements chimiques (en ppm)
eV	Electron-volt
EDV	Eau-de-vie
μg, mg, g	Microgramme, milligramme, gramme
μL, mL, L	Microlitre, millilitre, litre
ANOVA	Analyse de variance
CV	Coefficient de Variation
Da	Dalton
LOD	Limite de Détection
LOQ	Limite de Quantification
m/z	Rapport masse/charge
ppm	Partie par million
rpm	Rotation par minute
Sd	Seui de détection
TAV	Titre Alcoométrique Volumique
Th	Thomson
Solvants et molécules	
A CNI	A sátonitrila
ACN	Actionation A cátata d'áthala
RuOH	n-Butanol
BuOHsat	n-Butanol saturá en equ
FtOH	Fthanol
H <sub>2</sub> O	Eau
Hept	Heptane
НСООН	Acide formique
iPrOH	Iso-propanol
MeOH	Méthanol
MtBE	Méthyl <i>tert</i> -butyl Ether
Alc-diHDDC	Alcool dihydrodéhydrodiconiféryle
P-WL	Précurseur de la whisky-lactone
QTT	Quercotriterpénoside
WL	Whisky-lactone
Techniques analytiques	

C18	Silice à polarité de phase inversée (greffée C18)
COSY	COrrelated SpectroscopY
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge

GC-MS	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie
	de Masse
ELL	Extraction Liquide-Liquide
ESI	Ionisation par éléctro-nébulisation
ELSD	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
HCD	Dissociation induite par collision
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
Kd	Coefficient de partage
LC-préparative	Chromatographie Liquide préparative
RMN 1D et 2D	Résonance Magnétique Nucléaire mono- et bi-dimensionelle
ROESY	Rotating-frame nuclear Overhauser Effect correlation
	SpectroscopY
TIC	Chromatogramme des ions totaux en LC-HRMS
UV	Ultraviolet
VCD	Dichroïsme circulaire vibrationnel
XIC	Chromatogramme des ions extraits en LC-HRMS

Nomenclature des fractions obtenues

B_S_F1_1	<b>B</b> : Type de bois utilisé (Bois Chauffe Forte, Bois Chauffe
	Normale, Bois Non Chauffé)
	S : Solvant d'extraction
	<b>F1</b> : Fraction 1 obtenue à l'issue d'un 1 <sup>er</sup> fractionnement en CPC
	1 : Fraction 1 obtenue à l'issue d'un 2 <sup>ème</sup> fractionnement en CPC

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de composés volatils et non volatils impliqués dans l'élevage en
barriques
Figure 2 : Structure chimique de quelques composés amers17
Figure 3 : Structure chimique de quelques composés sucrés
Figure 4 : Représentation schématique du récepteur Tas1R au goût sucré et des sites de fixation
des principaux composés sucrants (d'après Behrens et al. 2018)21
Figure 5 : 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)
Figure 6 : Schématisation des deux modes d'introduction des solvants dans la colonne (d'après
Toribio, 2007)
Figure 7 : Coupe schématique d'un analyseur Orbitrap décrivant le mouvement des ions autour
de l'électrode centrale (Hu et al. 2005). r et z sont des coordonnées cylindriques
Figure 8 : Présentation schématique de la géométrie du spectromètre de masse Exactive <sup>TM</sup>
(d'après Wieghaus <i>et al.</i> 2006)
Figure 9 : Structure chimique des lignanes 1 à 11. Xyl, Glu et Gall correspondent,
respectivement, au $\beta$ -xylopyranose, $\beta$ -glucopyranose et galloyle
Figure 10 : XIC en ionisation négative correspondant aux ions [M-H] <sup>-</sup> du lyonirésinol et des
lignanes 1 à 11 (du haut vers le bas) dans un extrait de bois de chêne (a) et dans une eau-de-vie
de Cognac (b)
Figure 11 : Spectre HRMS du lyonirésinol en ionisation positive
Figure 12 : Concentrations en lyonirésinol dans 24 eaux-de-vie commerciales. La ligne en
rouge représente le seuil de détection gustative (Sd) dans l'eau-de-vie
Figure 13 : Teneurs en lyonirésinol dans des eaux-de-vie de Cognac de différents millésimes
provenant de la même distillerie
Figure 14 : Teneurs en lyonirésinol dans des eaux-de-vie de Cognac élevées dans des fûts de
différentes origines. « a », « b » et « c » représentent des groupes de significativité ; NS : Non
Significatif
Figure 15 : Teneurs en lyonirésinol dans des eaux-de-vie de Cognac élevées dans des fûts à
gros grain ou à grain fin. Significatif au risque de 0,1 % (***)
Figure 16 : Structure des différentes familles de coumarines

Figure 17 : XIC en ionisation positive correspondant aux ions $[M+H]^+$ des 11 coumarines
ciblées dans un extrait de bois de chêne71
Figure 18 : Structure chimique des six coumarines ciblées
Figure 19 : XIC en ionisation positive correspondant aux ions $[M+H]^+$ des six coumarines
ciblées (injection des standards, à gauche) dans un vin rouge boisé (au milieu) et dans une eau-
de-vie boisée de Cognac (à droite). S/N : signal sur bruit proposé par Xcalibur76
Figure 20 : Concentrations moyennes en esculétine, fraxétine, ombelliférone, scopolétine et
coumarine dans 43 vins rouges et 47 vins blancs commerciaux. Les barres d'erreurs indiquent
un intervalle de confiance de 95 %
Figure 21 : Concentration en esculétine dans 43 vins rouges commerciaux. La ligne en rouge
représente son seuil de détection gustative (Sd) dans les vins. Les barres d'erreurs indiquent la
précision de la méthode
Figure 22 : Variations des concentrations de l'esculétine (E), la fraxétine (F), la scopolétine (S),
l'ombelliférone (Om), la coumarine (C) et de la 4-méthylombelliférone (4-Meom) dans 28 eaux-
de-vie commerciales. Les barres d'erreurs indiquent les valeurs minimales et maximales 89
Figure 23 : Concentration en scopolétine dans 28 eaux-de-vie commerciales. La ligne en rouge
représente son seuil de détection gustative (Sd) dans l'eau-de-vie. Les barres d'erreurs indiquent
la précision de la méthode90
Figure 24 : Concentrations moyennes des six coumarines dans 10 millésimes d'eaux-de-vie de
Cognac provenant de la même distillerie. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de
confiance de 95 %
Figure 25 : Courbe de tendance exponentielle reflétant le rapport de la somme des
concentrations moyennes obtenues en esculétine et scopolétine sur les concentrations moyennes
obtenues en 4-méthylombelliférone93
Figure 26 : Notes moyennes et intervalles de confiance (95 %) des intensités de l'amertume
perçues pour les quatre modalités dans un vin blanc. NS : Non Significatif ; Significatif au
risque de 5 % (*)
Figure 27 : Notes moyennes et intervalles de confiance (95 %) des intensités de l'amertume
perçues pour les quatre modalités dans un vin rouge. NS : Non Significatif ; Significatif au
risque de 5 % (*)96
Figure 28 : Notes moyennes et intervalles de confiance (95 %) des intensités de l'amertume
perçues pour les quatre modalités dans une eau-de-vie blanche. NS : Non Significatif ;
Significatif au risque de 5 % (*)

Figure 29 : Concentrations moyennes (± intervalles de confiance à 95 %) en esculétine, fraxétine, scopolétine, coumarine et 4-méthylombelliférone (4-Me) pour les échantillons de bois des espèces sessile et pédonculé. NS : Non Significatif ; Significatif au risque de 5 % (\*), Figure 30 : Variations des concentrations en esculétine (E), fraxétine (F), scopolétine (S), coumarine (C) et 4-méthylombelliférone (4-Meom) pour les échantillons de bois des espèces sessile et pédonculé avec trois types de chauffe. « a », « b » et « c » représentent des groupes Figure 31 : Schéma du protocole d'extractions liquide-liquide appliquées aux extraits de bois Figure 32 : Chromatogrammes, en mode « Base Peak », en ionisation négative des extraits pré-Figure 33 : Profil chromatographique UV de la CPC de l'extrait BCF\_MtBE (absorbance à 280 Figure 34 : Chromatogrammes, en mode « Base Peak », des fractions F1, F2, F3, F4 et F5 de Figure 35 : Chromatogrammes, en mode « Base Peak », des fractions injectées en HPLC-Prep ionisation négative (BCF\_MtBE\_F2\_2 et BCF\_MtBE\_F4\_3) en et positive Figure 37 : Fractionnement de l'extrait BCF\_MtBE en vue de la purification du composé m/zFigure 38 : Profil chromatographique UV de la CPC de l'extrait BNC\_MtBE (absorbance à 280 Figure 39 : Chromatogrammes, en mode « Base Peak », LC-HRMS en ionisation négative des Figure 40 : XIC, en mode « Base Peak », en ionisation négative de l'extrait BNC Am MtBE Figure 41 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait BNC\_Am\_MtBE (ELL : Figure 42 : Profil chromatographique UV de la CPC de l'extrait BNC\_BuOH (absorbance à Figure 43 : Chromatogrammes, en mode « Base Peak », des fractions F2, F3, F4, F5 et F6 de 

Figure 44 : Chromatogrammes, en mode « Base Peak », des fractions injectées en HPLC-Prep
en ionisation négative (BNC_BuOH_F2, BNC_BuOH_F3 et BNC_BuOH_F4)151
Figure 45 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait BNC_BuOH154
Figure 46 : Fractionnement de l'extrait BNC_BuOH en vue de la purification des composés
<i>m</i> / <i>z</i> 807 et 783
<b>Figure 47</b> : Structure chimique de l'acide vanillique ( $m/z$ 169-pos), du syringaldéhyde ( $m/z$ 183)
et du sinapaldéhyde ( $m/z$ 209)164
<b>Figure 48</b> : Spectre HRMS de la molécule $m/z$ 641165
Figure 49 : Structure chimique de l'HDPP-syringarésinol ( <i>m/z</i> 641)
Figure 50 : Spectre HRMS correspondant aux composés $m/z$ 639-1, 639-2 et 639-3 172
Figure 51 : Structure chimique des composés $m/z$ 639-1 et 639-2 174
Figure 52 : Chromatogrammes GC-MS correspondant au standard de la WL (à gauche) et à
l'hydrolyse enzymatique du $m/z$ 639-1 (au milieu) et du $m/z$ 639-2 (à droite) ; trans-WL (t <sub>R</sub> =
14,34 min) et <i>cis</i> -WL ( $t_R = 15,07$ min)
<b>Figure 53</b> : Structure chimique de l'acide gallique ( $m/z$ 169-neg)
Figure 54 : Structure chimique de la Quercusnine A ( $m/z$ 807)180
<b>Figure 55</b> : Structure chimique de la Pédunculagine ( <i>m</i> / <i>z</i> 783)
Figure 56 : Spectre HRMS correspondant au composé <i>m/z</i> 539183
<b>Figure 57</b> : Structure du groupement hexose-gallate présent dans la molécule $m/z$ 539 185
Figure 58 : Détail du spectre ROESY. Les corrélations présentées permettent de déterminer la
position du deuxième fragment ( <sup>1</sup> H à 4,48 ppm) sur l'hexose (H-2')
<b>Figure 59</b> : Structure hypothétique du groupement $C_{11}H_{14}O_5$ du composé <i>m</i> / <i>z</i> 539 188
<b>Figure 60</b> : Hypothèse de structure pour le composé $m/z$ 539
Figure 61 : Stratégies de détection pour la sélection des fractions, par gustatométrie et par
mesure de l'activation des récepteurs à l'amertume
Figure 62 : Représentation de l'activation des 25 récepteurs à l'amertume en fonction des
concentrations croissantes en extrait brut de bois de chêne sessile
Figure 63 : Réponse du récepteur Tas2R7 aux extraits BNC, BCN et BCF du chêne sessile. n.d
= non déterminé
Figure 64 : Réponse du récepteur Tas2R7 aux extraits MtBE, AcOEt, BuOH et phase aqueuse
du BNC. n.d = non déterminé
Figure 65 : Réponse du récepteur Tas2R7 aux fractions F1 à F6 de l'extrait BNC_BuOH. n.d
= non déterminé

Figure 66 : Spectromètres de masse à analyseur Orbitrap. Différences entre l'Exactive et le Q-
Exactive (d'après Michalski et al. 2011)
Figure 67 : Résumé du protocole pour le traitement des données métabolomiques (d'après
Katajamaa et Orešič 2005)
Figure 68 : Représentation des données métabolomiques pour l'effet espèce (1), l'effet chauffe
(2) et les interactions chauffe-espèce (3), en mode d'ionisation négatif (à gauche) et positif (à
droite). ACP réalisées sur 312 et 326 ions des modes négatif et positif respectivement 209
Figure 69 : Représentation des différents profils observés pour les composés influencés
significativement par la chauffe (mode négatif en haut et mode positif en bas) et exprimés en
pourcentage. « a », « b » et « c » représentent des groupes de significativité. BCF : bois chauffe
forte ; BCN : bois chauffe normale ; BNC : bois non chauffé
Figure 70 : Evolution des composés d'intérêt ( <i>m/z</i> 641, 639, 807, 783, 169-neg et 539 – de
gauche à droite et de haut en bas) en fonction des 3 modalités de chauffe (BCF à gauche, BCN
au milieu et BNC à droite) pour le chêne sessile (courbe en vert) et le chêne pédonculé (courbe
en bleu). Les groupes de significativité « a », « b » et « c » (test de Tukey) sont mentionnés au-
dessus des graphiques
Figure 71 : Représentation des données métabolomiques pour les eaux-de-vie de Cognac en
mode d'ionisation négatif (en haut) et positif (en bas)
Figure 72 : Représentation des différents groupes de composés en fonction de leurs évolutions
dans les eaux-de-vie de Cognac pour le mode d'ionisation négatif (à gauche) et positif (à droite).
Figure 73 : Evolution des composés $m/z$ 331 (en haut) et $m/z$ 703 (en bas) dans des eaux-de-
vie allant de 2015 à 1970. Les barres d'erreur représentent l'écart type des différents réplicats.
Figure 74 : TIC (en haut) et XIC (en bas) en ionisation positive correspondant à l'ion $m/z$ 331
de l'extrait de bois de chêne BNC_Am_MtBE_F-II
Figure 75 : Fractionnement de l'extrait BNC_Am_MtBE en vue de la purification du composé
<i>m/z</i> 331
Figure 76 : TIC (en haut) et XIC (en bas) en ionisation négative correspondant à l'ion $m/z$ 703
dans l'extrait sec de l'eau-de-vie de Cognac
Figure 77 : TIC (en haut) et XIC (en bas) en ionisation négative correspondant à l'ion $m/z$ 703
dans l'extrait EDV_BuOH_F1_1235
<b>Figure 78</b> : Fractionnement de l'extrait EDV_BuOH en vue de la purification du composé $m/z$
703

Figure 79 : Spectre HRMS de la molécule $m/z$ 331 (sans fragmentation)
Figure 80 : Structure chimique de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle ( <i>m/z</i> 331)239
Figure 81 : Détail du spectre de masse du composé $m/z$ 703 en mode négatif
<b>Figure 82</b> : Spectre HRMS du composé <i>m/z</i> 703 (HCD 35 eV)
Figure 83 : Arbre de fragmentation généré par le logiciel Sirius pour la molécule $m/z$ 703.
L'intensité relative des fragments est exprimée en pourcentage
Figure 84 : Structure du 3,4,8,9,10-pentahydroxy-6H-benzo[c]chromén-6-one ( $m/z$ 275) 244
Figure 85 : Concentrations moyennes en acide gallique, syringaldéhyde, Alc-diHDDC et
HDPP-syringarésinol dans 43 vins rouges et 47 vins blancs commerciaux. Les barres d'erreurs
indiquent un intervalle de confiance de 95 %
Figure 86 : Concentrations en acide gallique, syringaldéhyde, Alc-diHDDC et HDPP-
syringarésinol dans 17 millésimes issus du même cru. Les barres d'erreurs indiquent la
précision de la méthode. Sd : seuil de détection gustative
Figure 87 : Concentrations moyennes (mg/L) en syringaldéhyde, sinapaldéhyde, acide gallique,
composé $m/z$ 539, HDPP-syringarésinol et Alc-diHDDC dans 24 eaux-de-vie commerciales (de
gauche à droite et de haut en bas). Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de
95 %
Figure 88 : Concentrations ( $\mu$ g/L) en P-WL-1 et P-WL-2 dans les 24 eaux-de-vie
commerciales. Les barres d'erreurs indiquent la précision de la méthode
Figure 89 : Concentrations moyennes ( $\mu$ g/L) en pédunculagine (à gauche) et en quercusnine A
(à droite) dans les 12 eaux-de-vie de Cognac commerciales. Les barres d'erreurs indiquent un
intervalle de confiance de 95 %
Figure 90 : Concentrations moyennes ( $n = 5$ de 2015 à 1990 ; $n = 4$ pour 1973 et 1970) en
syringaldéhyde (mg/L), acide gallique (mg/L), sinapaldéhyde (mg/L), Alc-diHDDC (mg/L),
composé m/z 539 (mg/L), HDPP-syringarésinol (mg/L), quercusnine A (µg/L), pédunculagine
( $\mu$ g/L), P-WL-1 ( $\mu$ g/L) et P-WL-2 ( $\mu$ g/L) dans dix millésimes d'eaux-de-vie de Cognac de la
même distillerie (de gauche à droite et de haut en bas). Les barres d'erreurs indiquent un
intervalle de confiance de 95 %. Sd : Seuil de détection
Figure 91 : Concentrations moyennes ( $\mu g/g$ de bois sec, $n = 27$ ) en syringaldéhyde, acide
gallique, quercusnine A, pédunculagine, composé $m/z$ 539, Alc-diHDDC, HDPP-syringarésinol
et sinapaldéhyde pour les échantillons de bois de chêne des espèces sessile et pédonculé (de
gauche à droite et de haut en bas). NS : Non Significatif. Les barres d'erreurs indiquent un
intervalle de confiance de 95 %

**Figure 92** : Concentrations moyennes ( $\mu$ g/g de bois sec, n = 27) en P-WL-1 et P-WL-2 pour les échantillons de bois de chêne des espèces sessile et pédonculé, avec une macération réalisée à 12 % d'alcool (à gauche) et à 50 % d'alcool (à droite). Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %. NS : Non Significatif ; Significatif au risque de 0,1 % (\*\*\*).

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Types de récepteurs associés à chaque goût.14
Tableau 2 : Liste des colonnes analytiques et préparatives de même phase stationnaire
disponibles au laboratoire
Tableau 3 : Conditions chromatographiques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne et de
l'eau-de-vie de Cognac
Tableau 4 : Conditions spectrométriques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne et de
l'eau-de-vie de Cognac
Tableau 5 : Conditions d'ionisation et paramètres spectrométriques pour la quantification du
lyonirésinol dans diverses eaux-de-vie
Tableau 6 : Paramètres de validation de la méthode de quantification du lyonirésinol dans
l'eau-de-vie. La justesse a été mesurée dans trois échantillons d'eaux-de-vie
<b>Tableau 7</b> : Conditions chromatographiques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne 68
<b>Tableau 8</b> : Conditions spectrométriques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne 69
Tableau 9 : Liste des coumarines ciblées pour le criblage LC-HRMS.  70
Tableau 10 : Caractérisation sensorielle des six coumarines dans une solution hydro-
éthanolique77
Tableau 11 : Seuils de détection de l'esculétine, la scopolétine et la 4-méthylombelliférone
dans un vin blanc non boisé et une eau-de-vie jeune
Tableau 12 : Conditions chromatographiques utilisées pour la quantification des six
coumarines
Tableau 13 : Conditions d'ionisation et paramètres spectrométriques utilisés pour la
quantification des six coumarines
Tableau 14 : Caractéristiques des ions utilisés pour la quantification des six coumarines ciblées.
Tableau 15 : Paramètres de validation de la méthode de quantification des six coumarines. La
justesse a été mesurée dans un vin blanc et un vin rouge non boisés et une eau-de-vie blanche.
Tableau 16 : Concentrations en coumarines utilisées pour la détermination des profils
sensoriels dans un vin blanc, un vin rouge et une eau-de-vie jeune pour chaque modalité ( $\mu$ g/L).
Tableau 17 : Conditions chromatographiques utilisées au cours du fractionnement des extraits
de bois de chêne

Tableau 18 : Conditions spectrométriques utilisées au cours du fractionnement des extraits de
bois de chêne106
<b>Tableau 19</b> : Valeurs des indices triterpéniques (IT) des trois extraits de bois de chêne 108
Tableau 20 : Quantités obtenues pour chaque modalité de chauffe après les extractions liquide-
liquide successives
Tableau 21 : Gustatogramme des extraits de bois de chêne pré-purifiés par extraction liquide-
liquide
<b>Tableau 22</b> : Systèmes testés pour le fractionnement par CPC de l'extrait BCF_MtBE 115
Tableau 23 : Gustatogramme des tests de système G, H et J de l'extrait BCF_MtBE.    116
Tableau 24 : Méthode de fractionnement de l'extrait BCF_MtBE par CPC
Tableau 25 : Gustatogramme des 8 fractions de l'extrait BCF_MtBE
Tableau 26 : K <sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour les fractions F2
et F4 du BCF_MtBE
Tableau 27 : Méthodes de fractionnement 2 et 3 pour les extraits BCF_MtBE_F2 et F4 par
CPC
Tableau 28 : Gustatogramme des six fractions obtenues après CPC pour les fractions F2
(deuxième injection) et F4 de l'extrait BCF_MtBE
Tableau 29 : K <sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour les fractions F1,
F3 et F5 du BCF_MtBE
Tableau 30 : Méthode de fractionnement des fractions F1, F3 et F5 de l'extrait BCF_MtBE par
CPC
Tableau 31 : Gustatogramme des six fractions obtenues après CPC pour les fractions F1, F3 et
F5 de l'extrait BCF_MtBE125
<b>Tableau 32</b> : Gradients utilisés pour la purification par HPLC-Prep des composés présents dans
les fractions BCF_MtBE_F2_2, BCF_MtBE_F3_1 et BCF_MtBE_F4_3126
<b>Tableau</b> 33:PurificationdesfractionsBCF_MtBE_F2_2,BCF_MtBE_F4_3et
BCF_MtBE_F3_1 par HPLC-Prep128
<b>Tableau 34</b> : Gustatogramme des molécules pures et des extraits après HPLC-Prep129
<b>Tableau 35</b> : Gradient utilisé pour la purification du composé $m/z$ 641.133
<b>Tableau 36</b> : Gustatogramme de l'extrait MtBE du BNC_MtBE après CPC
<b>Tableau 37</b> : Gradient utilisé pour la purification par HPLC-Prep des composés présents dans
les fractions BNC_MtBE_F5 et BNC_MtBE_F6
Tableau 38 : Gustatogramme des molécules pures après HPLC-Prep pour les fractions
BNC_MtBE_F5 et BNC_MtBE_F6

Tableau 39 : K <sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait
BNC_Am_MtBE140
Tableau 40 : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait BNC_Am_MtBE.
Tableau 41 : Gradients utilisés pour la purification par HPLC-Prep des composés présents dans
les fractions BNC_Am_MtBE_F-III et BNC_Am_MtBE_F-V141
Tableau 42 : Masses obtenues après extraction liquide-liquide de l'extrait BNC_Am_MtBE_F-
VI142
<b>Tableau 43</b> : Gustatogramme de la molécule pure $m/z$ 639-3 après HPLC-Prep142
Tableau 44 : Systèmes testés de type « pont » pour le fractionnement de l'extrait BNC_BuOH.
Tableau 45 : K <sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait
BNC_BuOH
Tableau 46 : Méthode de fractionnement de l'extrait BNC_BuOH par CPC
Tableau 47 : Gustatogramme des 6 fractions de l'extrait BNC_BuOH.  146
Tableau 48 : K <sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait
BNC_BuOH_F6148
Tableau 49 : Méthode de fractionnement pour l'extrait BNC_BuOH_F6 par CPC.  148
<b>Tableau 50</b> : Gustatogramme des 4 fractions rassemblées de l'extrait BNC_BuOH_F6 149
Tableau 51 : Gradients utilisés pour la purification par HPLC-Prep des composés présents dans
les fractions BNC_BuOH_F2, BNC_BuOH_F3 et BNC_BuOH_F4150
Tableau 52 : Résultats obtenus après HPLC-Prep pour les fractions BNC_BuOH_F2,
BNC_BuOH_F3 et BNC_BuOH_F4
Tableau 53 : Gustatogramme des molécules pures et des extraits après HPLC-Prep pour les
fractions BNC_BuOH_F2, BNC_BuOH_F3 et BNC_BuOH_F4
<b>Tableau 54</b> : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait BNC_BuOH 155
<b>Tableau 55</b> : Gradient utilisé pour la purification par HPLC-Prep des composés $m/z$ 807 et 783
dans les fractions BNC_BuOH_F-III et BNC_BuOH_F-IV156
Tableau 56 : Propriétés gustatives des composés d'intérêt dans de l'eau et dans un vin blanc
non boisé
Tableau 57 : Données HRMS en ionisation négative et pouvoir rotatoire spécifique des
composés purifiés à partir de l'extrait de bois de chêne
Tableau 58 : Données HRMS en ionisation positive et pouvoir rotatoire spécifique des
composés purifiés à partir de l'extrait de bois de chêne

<b>Tableau 59</b> : Données RMN $^{1}$ H des composés $m/z$ 169-pos, 183 et 209.163
<b>Tableau 60</b> : Données RMN $^{1}$ H et $^{13}$ C du composé $m/z$ 641.169
<b>Tableau 61</b> : Données RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du groupement hexose des $m/z$ 639-1 et 639-2 173
Tableau 62 : Conditions chromatographiques utilisées pour les échantillons en GC-MS 177
<b>Tableau 63</b> : Données RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du groupement hexose-gallate du composé $m/z$ 539.
Tableau 64 : Valeurs hypothétiques attribuées aux protons et aux carbones du groupement
C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> du composé <i>m/z</i> 539
<b>Tableau 65</b> : Comparaison entre les données obtenues par la dégustation et celles de l'activation
du Tas2R7 pour les extraits pré-purifiés du BNC
<b>Tableau 66</b> : Comparaison entre les données obtenues par la dégustation et celles de l'activation
du Tas2R7 pour les extraits BNC_BuOH
Tableau 67 : Conditions chromatographiques pour l'analyse en LC-MS/MS des extraits de bois
de chêne
Tableau 68 : Conditions spectrométriques pour l'analyse en LC-MS/MS des extraits de bois
de chêne
Tableau 69 : Conditions utilisées pour le traitement des données métabolomiques des extraits
de bois de chêne. Les paramètres sont écrits en anglais, comme sur le logiciel MZmine 2207
Tableau 70 : Conditions utilisées pour le traitement des données métabolomiques des eaux-de-
vie de Cognac. Les paramètres sont écrits en anglais, comme sur le logiciel MZmine 2 216
Tableau 71 : Concentration en extrait sec (g/L) dans dix millésimes d'eaux-de-vie de Cognac.
Tableau 72 : Conditions chromatographiques utilisées au cours du fractionnement des extraits
de bois de chêne et d'eau-de-vie
Tableau 73 : Conditions spectrométriques utilisées au cours du fractionnement des extraits de
bois de chêne et d'eau-de-vie
Tableau 74 : Criblage des extraits obtenus après le fractionnement par CPC de l'extrait
BNC_Am_MtBE, en vue de la purification du composé $m/z$ 331. Gradient LC-MS : 1 227
Tableau 75 : Systèmes de solvants testés pour le fractionnement par CPC de l'extrait
BNC_Am_MtBE_F-II
Tableau 76 : K <sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait
BNC_Am_MtBE_F-II
Tableau 77 : Méthode de fractionnement de la fraction II de l'extrait BNC_Am_MtBE 228

Tableau 78 : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait
BNC_Am_MtBE_F-II
<b>Tableau 79</b> : Gradient utilisé pour la purification par HPLC-Prep du composé $m/z$ 331 dans la
fraction BNC_Am_MtBE_F-II_5229
Tableau 80 : Quantités obtenues après les extractions liquide-liquide successives de l'extrait
sec de Cognac
Tableau 81 : Systèmes testés de type « pont » pour le fractionnement de l'extrait EDV_BuOH.
Tableau 82 : K <sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait
EDV_BuOH
Tableau 83 : Méthode de fractionnement de l'extrait EDV_BuOH
Tableau 84 : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait EDV_BuOH233
Tableau 85 : K <sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait
EDV_BuOH_F1
Tableau 86 : Méthode de fractionnement de l'extrait EDV_BuOH_F1.  234
<b>Tableau 87</b> : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait EDV_BuOH_F1.
<b>Tableau 88</b> : Gradient utilisé pour la purification par HPLC-Prep du composé $m/z$ 703 dans la
fraction EDV_BuOH_F1_1

Tableau 96 : Paramètres de validation de la méthode de quantification 2 (mode positif). La
justesse a été mesurée dans un vin blanc non boisé et une eau-de-vie blanche
Tableau 97 : Concentrations en acide gallique dans les 43 vins rouges commerciaux (mg/L).
Tableau 98 : Concentrations en Alc-diHDDC dans les vins rouges et vins blancs commerciaux
(µg/L)
Tableau 99 : Concentrations en HDPP-syringarésinol dans les vins rouges et vins blancs
commerciaux (µg/L)
Tableau 100 : Concentrations en syringaldéhyde dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).
Tableau 101 : Concentrations en acide gallique dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).
Tableau 102 : Concentrations en Alc-diHDDC dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).
Tableau 103 : Concentrations en HDPP-syringarésinol dans les eaux-de-vie commerciales
(mg/L)
<b>Tableau 104</b> : Concentrations en composé $m/z$ 539 dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).

#### LISTE DES ANNEXES

**ANNEXE 1 :** Exemple d'une fiche d'analyse sensorielle.

ANNEXE 2 : Caractéristiques des eaux-de-vie commerciales.

**ANNEXE 3 :** Données brutes de quantification du (±)-lyonirésinol dans les divers spiritueux analysés.

**ANNEXE 4 :** Données brutes de quantification des coumarines dans les vins, les spiritueux et les extraits de bois de chêne analysés.

**ANNEXE 5 :** Données RMN des composés m/z 517-1 (acide barrinique) et 517-2 (acide bartogénique).

**ANNEXE 6 :** Données RMN de l'HDPP-syringarésinol.

ANNEXE 7 : Données RMN des précurseurs de la whisky-lactone (P-WL-1 et P-WL-2).

ANNEXE 8 : Données RMN de la quercusnine A.

ANNEXE 9 : Données RMN de la pédunculagine.

ANNEXE 10 : Données RMN du composé *m/z* 539.

ANNEXE 11 : Données RMN de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle.

ANNEXE 12 : Données brutes de quantification de la Partie IV.

### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Dans le langage courant, les mots tels que « saveur », « odeur », « arôme » ou « flaveur », sont appliqués, de façon indifférenciée et parfois inappropriée, pour décrire le goût. Pour le physiologiste, le goût désigne un système de détection chimique permettant d'évaluer le contenu nutritif des aliments et de se protéger contre d'éventuelles intoxications. Le gastronome ou l'œnophile y voient davantage un ensemble de perceptions sensorielles intimement liées à leur plaisir lors de la dégustation d'un mets ou d'un vin. Selon Brillat-Savarin, « la sensation du goût est une opération chimique qui se fait par voie humide, c'est-à-dire qu'il faut que les molécules sapides soient dissoutes dans un fluide quelconque, pour pouvoir ensuite être absorbées par les houppes nerveuses, papilles ou suçoirs, qui tapissent l'intérieur de l'appareil dégustateur » (Brillat-Savarin 1825). Les connaissances, relatives à la physiologie du goût, acquises depuis le XIXème siècle ont permis de préciser les propos de Brillat-Savarin. De nos jours, les mécanismes perceptifs associés à la gustation ont été largement établis (Lindemann 2001 ; Chandrashekar et al. 2006). La chimie des substances du goût suscite également un vif intérêt, tant dans le domaine académique qu'industriel. De nouveaux composés sapides, principalement sucrés, mais aussi amers, ont été identifiés dans diverses plantes (Kinghorn 1987). Ces molécules appartiennent à différentes familles chimiques et leurs propriétés sensorielles sont fortement affectées par de légères modifications structurales. Par conséquent, la recherche de nouveaux composés sapides dans une matrice donnée apparaît souvent comme un défi majeur pour les chimistes. Ces études sont particulièrement pertinentes en œnologie, car elles permettent de mieux comprendre l'origine du goût du vin et des eaux-de-vie.

Depuis plusieurs années, la recherche œnologique a permis la caractérisation moléculaire des arômes intervenant dans la qualité, mais également dans les défauts des vins et des eaux-de-vie (Ribéreau-Gayon *et al.* 2017). Les composés non-volatils, déterminant la perception des sensations tactiles ainsi que des saveurs, ont également fait l'objet de plusieurs études. En effet, la qualité du vin dépend non seulement de sa typicité aromatique, mais également de son équilibre gustatif. Selon le célèbre œnologue Emile Peynaud, ces équilibres s'articulent autour des saveurs moelleuses et acides dans les vins blancs, et entre les saveurs moelleuses, acides et amères dans les vins rouges (Peynaud 1980). Les composés clés de l'acidité sont bien connus, il s'agit des acides organiques, en particulier l'acide tartrique, mais aussi les acides malique, lactique ou citrique (Ribéreau-Gayon *et al.* 2017). Les vins moelleux, dont le goût sucré est dû au glucose et au fructose du raisin, non transformés par les levures, se

distinguent des vins secs. Ces derniers présentent un caractère moelleux qui ne peut être attribué aux oses, dont les teneurs sont inférieures à leur seuil de détection. Le terme de « sucrosité » sans sucre est alors employé. Les déterminants moléculaires associés à ce goût n'ont été que partiellement élucidés. Cette perception sucrée est notamment liée à la présence de plusieurs composés appartenant à diverses familles chimiques et libérés, au cours de l'élaboration du vin, par les raisins (Cretin *et al.* 2019), les levures (Marchal, Marullo, *et al.* 2011) ou encore le bois de chêne (Marchal, Waffo-Téguo, *et al.* 2011 ; Marchal *et al.* 2013 ; Gammacurta *et al.* 2019). La perception de l'amertume dans les vins et les eaux-de-vie est classiquement reliée à la présence de composés phénoliques. Toutefois, il existe peu de données reliant structure moléculaire, seuil de détection et concentrations dans ces matrices. Parmi celles-ci, les propriétés amères du lyonirésinol, un lignane extrait du bois, ont été récemment caractérisées (Arramon 2001 ; Marchal, Cretin, *et al.* 2015).

Malgré ces acquisitions significatives, de nombreuses perceptions gustatives demeurent inexpliquées d'un point de vue moléculaire. Une meilleure compréhension de l'effet de l'élevage en fûts sur le goût des vins et des spiritueux constitue un enjeu majeur pour les professionnels de la filière. Elle requiert une plus grande connaissance des molécules nonvolatiles, sucrées ou amères, apportées par l'élevage.

La première partie de cette thèse s'inscrira dans la continuité des travaux réalisés antérieurement au laboratoire sur l'influence gustative du bois de chêne. En particulier, le rôle des lignanes et des coumarines du chêne dans le goût des vins et des eaux-de-vie a été étudié. Une approche de criblage d'un extrait de bois par LC-HRMS a permis de rechercher des dérivés du lyonirésinol et de la coumarine. La mise en évidence des propriétés amères de certains de ces composés a justifié un développement analytique permettant de les quantifier.

Le second axe du travail sera consacré à l'isolement de déterminants moléculaires provenant du bois de chêne et contribuant à l'amertume et à la sucrosité des vins et des eaux-devie. Dans un premier temps, une approche inductive guidée par la dégustation sera utilisée. L'élucidation structurale et la caractérisation sensorielle des composés purifiés seront détaillées. Dans un second temps, des approches complémentaires à la sélection des fractions par gustatométrie seront développées. Une stratégie de détection de ces fractions par mesure de l'activation des récepteurs à l'amertume sera notamment proposée. Cette approche originale a été mise en œuvre en collaboration avec l'équipe du Dr Loïc Briand, au CSGA de Dijon. Parallèlement, une approche par analyse différentielle non-ciblée d'extraits de bois de chêne sera discutée pour la recherche de nouveaux composés sapides. La troisième partie présentera le développement d'un protocole de purification consécutif à une analyse non-ciblée par HRMS, réalisée sur plusieurs millésimes d'eaux-de-vie boisées de Cognac issues de la même distillerie. Si les deux derniers axes de cette thèse traitent de matrices et de composés différents, les techniques séparatives (extraction liquide-liquide, chromatographie de partage centrifuge, HPLC semi-préparative) et spectroscopiques (HRMS, RMN, polarimétrie) nécessaires à leur réalisation sont similaires. Le principe général et la description des équipements utilisés sont détaillés dans une partie expérimentale générale. En revanche, la présentation de la démarche employée ainsi que les méthodes développées spécifiquement pour chaque expérience sont décrites dans les chapitres qui leur sont dédiés.

La dernière partie de ce travail exposera le développement d'une méthode de dosage par LC-HRMS des composés purifiés. Leur quantification dans les vins et les eaux-de-vie sera détaillée. La contribution sensorielle de certains composés sera également discutée. Des applications pratiques seront envisagées par l'établissement de l'effet de la chauffe du bois sur les teneurs des composés sapides.
# **BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE**

# I. État des connaissances sur l'apport des composés du bois de chêne à la qualité organoleptique des vins et des eaux-de-vie

# A. Généralités

Le chêne est le nom vernaculaire donné à plusieurs espèces appartenant à la famille des Fagacées et plus précisément au genre Quercus. Ce genre compte plus de 250 espèces situées principalement dans les zones tempérées de l'hémisphère nord (Amérique du Nord, Europe et Asie) (Keller 1987). Aujourd'hui, les tonneliers utilisent principalement trois types de chêne appartenant à la section Lepidobalanus : le chêne pédonculé (Quercus robur L., 1753), le chêne sessile ou rouvre (Quercus petraea (Matt.) Liebl., 1784), tous deux d'origine européenne, et le chêne blanc d'Amérique (Quercus alba L., 1753). En œnologie, on parle habituellement de chêne « français » pour désigner les arbres provenant d'une forêt française et appartenant au genre sessile ou pédonculé (Feuillat et al. 1999). Le bois de ces chênes a des propriétés physiques compatibles avec la confection de tonneaux, qui sont utilisés depuis l'Antiquité pour le transport puis la maturation de certains vins et spiritueux. Plus particulièrement, c'est le bois de cœur appelé duramen, qui est utilisé pour la fabrication des barriques. Il est constitué majoritairement de trois composés macromoléculaires : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (avec des teneurs en pourcentage massique variables selon l'espèce mais de l'ordre de 40-45, 20-35 et 15-35 % respectivement). Les autres molécules présentes dans le bois sont des composés dits extractibles et représentent jusqu'à 10 % de la masse sèche.

Après la sélection du bois, les merrains de chêne subissent en premier lieu une étape de maturation à l'air libre, généralement pendant 18 à 36 mois. A l'issue de cette phase, ils sont fendus (pour le chêne « français ») ou sciés (pour le chêne américain), afin d'être transformés en douelles. Puis, la fabrication des fûts débute par le montage des douelles, ou « mise en rose ». La barrique ainsi assemblée est prête pour la chauffe. Il s'agit d'une étape fondamentale puisqu'elle permet de faire évoluer la composition chimique des fûts. Elle se décompose en deux étapes. D'abord, la chauffe de cintrage facilite la courbure des douelles à l'origine de la forme particulière de la barrique. La deuxième étape, appelée la chauffe de brûlage ou « bousinage », permet, d'une part, de fixer la forme définitive du fût, et d'autre part d'entraîner des modifications de la structure et de la composition du bois (Chatonnet 1995). La fabrication se termine par l'ajustement des deux fonds de la barrique. Ainsi sont obtenus des fûts à la fois solides, étanches et aptes à transférer des arômes et des saveurs particuliers aux vins et aux

spiritueux. Leur forme et leur volume varient en fonction des régions et des traditions. A titre d'exemple, à Bordeaux, leur contenance est habituellement de 225 L, contre 228 L en Bourgogne ou 350 L à Cognac.

Longtemps utilisés pour le transport, les tonneaux de chêne sont aujourd'hui essentiellement réservés à l'élaboration des vins et des spiritueux, en raison des changements organoleptiques qu'ils provoquent. Les déterminants moléculaires associés à certaines réactions physico-chimiques telles qu'une modification de la couleur, des arômes, des sensations tactiles et du goût, lors de l'élevage des vins et des spiritueux ont été étudiés durant les dernières décennies (**Figure 1**).

# B. Influence de l'élevage en barriques sur les propriétés sensorielles du vin

### 1. Contribution à la couleur des vins

Les composés phénoliques jouent un rôle indispensable en œnologie puisqu'ils sont notamment responsables de la couleur des vins rouges (Ribéreau-Gayon 1973). Parmi ces composés, les anthocyanes sont des pigments largement présents dans les fleurs et les fruits, comme le raisin noir. Leur pigmentation varie du rouge au bleu en fonction de divers facteurs, tels que le pH, la complexation avec des ions métalliques ou bien encore des phénomènes de copigmentation avec d'autres flavonoïdes (Goto et Kondo 1991 ; Harborne 2013). Les anthocyanes, situés principalement dans la pellicule du raisin (Souquet et al. 1996), sont extraits durant la fermentation alcoolique et la macération post-fermentaire. Cependant, ces composés disparaissent progressivement au cours de la vinification, surtout pendant le vieillissement en fûts de chêne, et sont remplacés par des pigments plus stables, spécifiques au vin (Somers 1971). D'autres composés présents dans le vin sont impliqués dans des réactions chimiques, comme les flavanols, et forment des composés présentant des teintes plus bleues ou plus orangées (Fulcrand, dos Santos, et al. 1996 ; Liao, Cai, et Haslam 1992). Des études se sont portées sur l'influence de l'élevage en fûts de chêne sur la modulation de la couleur du vin. Notamment, il a été établi que la microporosité du bois permettait de maintenir une interface vin/air favorisant l'oxygénation. En contact avec l'éthanol, des ions métalliques et des composés phénoliques, l'oxygène mène à la formation d'acétaldéhyde (Wildenradt et Singleton 1974), ce qui provoque des réactions de copolymérisation entre anthocyanes et tannins. Il en découle une augmentation et une stabilisation de la couleur des vins (Ribéreau-Gayon, Pontallier, et Glories 1983). Cependant, l'oxygénation n'est pas le seul phénomène à intervenir pendant l'élevage en barriques.

Parmi les différentes substances libérées par le bois de chêne dans le vin, les ellagitannins *C*-glycosidiques, c'est-à-dire dont la chaîne aliphatique dérivée du glucose forme une liaison carbone-carbone avec un des noyaux aromatiques, participent à des réactions avec les anthocyanes, affectant ainsi les propriétés du vin (Vivas et Glories 1996). En effet, ces composés, comme la vescalagine, réagissent avec les flavanols ou les anthocyanes pour former des adduits tels que des flavano-ellagitannins ou des anthocyano-ellagitannins (Chassaing *et al.* 2010; Quideau *et al.* 2005; 2003). Les pigments résultant de ces réactions présentent des teintes pourpres, avec une longueur d'onde qui diffère de celle de l'anthocyane de départ (notamment l'oenine **8**). Cette réaction contribue à expliquer la modification de la couleur, du rouge au violet, lors de l'élevage en barriques et à mettre en évidence le rôle des ellagitannins dans la stabilisation de la couleur des vins.

# 2. Contribution à l'arôme des vins

De nombreux travaux ont porté sur l'identification et le dosage des substances aromatiques conférées au vin par l'élevage en barriques. Un certain nombre de molécules volatiles contribuant de manière plus ou moins significative au caractère boisé des vins est aujourd'hui connu (Ribéreau-Gayon *et al.* 2017). Parmi elles, on peut définir quelques composés clés comme la vanilline (**1**, note de vanille), la *trans*- et la *cis-β*-méthyl- $\gamma$ -octalactone (**2**, nommées whisky-lactone) qui apportent une odeur de noix de coco et des phénols volatils comme l'eugénol (**3**, note de clou de girofle) ou le gaïacol (**4**, arôme fumé) (Chatonnet 1995). L'influence des paramètres de tonnellerie, tels que les origines botaniques et géographiques du chêne, les conditions de maturation du bois et le type de chauffe utilisé, sur la teneur de ces molécules clés a été établie (Chatonnet 1991 ; Chatonnet et Dubourdieu 1988 ; Feuillat et Moio 1997 ; Guchu *et al.* 2006).

Les arômes torréfiés, souvent en relation avec l'élevage en fûts de chêne neufs et la chauffe des douelles, ont été expliqués plus tardivement. Dans les vins, le composé qui en est responsable est un thiol volatil extrêmement odorant, le 2-furaneméthanethiol (**5**), formé à partir du furfural libéré par le bois (Tominaga *et al.* 2000).

#### 3. Contribution à l'astringence des vins

L'essentiel des travaux sur les non-volatils a jusqu'ici été consacré aux ellagitannins du bois (Chira *et al.* 2015 ; Jourdes *et al.* 2011 ; Saucier *et al.* 2006). En outre, il a été démontré que ces polyphénols peuvent participer à l'astringence des vins (Quinn et Singleton 1985), qui a été reconnue en 1993 comme étant une sensation buccale et non un goût (Breslin *et al.* 1993). Le mécanisme associé à cette sensation provient en partie des interactions tannins-protéines

(Bajec et Pickering 2008 ; Haslam 1974 ; Lu et Bennick 1998). Les ellagitannins majoritaires du bois de chêne purifiés et identifiés dans le bois de chêne sont la vescalagine (**6**), la castalagine (**7**), les roburines A à E, la grandinine et la 33-déoxy-33-carboxyvescalagine (Herve Du Penhoat *et al.* 1991). La détermination de leur seuil de détection gustative combinée à leur quantification dans des vins rouges a permis d'établir leur contribution à l'astringence (Glabasnia et Hofmann 2006 ; Stark *et al.* 2010). Une corrélation entre les teneurs en ellagitannins et la sensation d'astringence ressentie dans des vins élevés en fûts de chêne a par ailleurs été mise en évidence récemment (Chira et Teissedre 2013 ; Michel *et al.* 2016). Néanmoins, d'autres études tendent à montrer que l'influence directe de ces ellagitannins reste limitée (Chira *et al.* 2015 ; Masson, Moutounet, et Puech 1995 ; Puech, Feuillat, et Mosedale 1999).



11 Esculétine : R=OH

**Figure 1 :** Structure chimique de composés volatils et non volatils impliqués dans l'élevage en barriques.

#### 4. Contribution à la saveur sucrée et amère des vins

Contrairement aux substances aromatiques, les déterminants moléculaires des saveurs amère et sucrée provenant du bois de chêne ont fait l'objet de peu d'études jusqu'à présent. Certains composés non-volatils, dont la nature chimique est encore largement inconnue (Ribéreau-Gayon *et al.* 2017), peuvent être libérés pendant l'élevage en barriques et ainsi modifier le goût du vin.

#### a. Effet sur l'amertume

L'élevage en barriques peut modifier la perception de l'amertume des vins et conduire à une dépréciation gustative du produit. Ce phénomène est généralement attribué aux ellagitannins, dont les caractéristiques amères ont été suggérées. Néanmoins, Glabasnia et Hofmann ont montré que les seuils de détection gustative des principaux tannins hydrolysables étaient beaucoup plus élevés que ceux de l'astringence, et significativement supérieurs à leur concentration dans les vins. Ces résultats suggèrent que ces composés ont une faible influence sur l'amertume des vins (Glabasnia et Hofmann 2006). Ainsi, aucune corrélation significative n'a été établie entre l'amertume perçue et les ellagitannins du bois de chêne jusqu'à présent.

Plus récemment, les propriétés amères du lyonirésinol (**9**), un lignane extrait du bois, ont été démontrées (Arramon 2001 ; Marchal, Waffo-Téguo, *et al.* 2011). Il a été découvert dans les vins à des concentrations supérieures à son seuil de détection gustative, ce qui démontre sa participation significative à l'amertume du vin (Marchal, Cretin, *et al.* 2015). Si d'autres lignanes ont également été isolés des extraits de duramen de *Quercus petraea*, le lyonirésinol apparait à la fois comme le plus amer et le plus abondant dans les vins. Par ailleurs, la purification et la caractérisation de la configuration absolue de ses énantiomères ont mis en évidence que seul le (8R,  $8^{*}R$ ,  $7^{*}S$ )-(+)-lyonirésinol possède une forte amertume, alors que la forme lévogyre est insipide (Cretin *et al.* 2015).

Des coumarines ont également été identifiées dans le bois de chêne, comme la scopolétine (**10**) et l'esculétine (**11**). Leur goût amer a également été évoqué (Vivas 1997) mais leur influence sur le goût des vins boisés reste discutée, au vue de leur faible concentration dans cette matrice (Chatonnet 1995 ; Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987).

# b. Effet sur la sucrosité

Empiriquement, des observations des vinificateurs ont suggéré une augmentation de la sucrosité des vins lors de l'élevage en barriques. Récemment, des expérimentations ont permis

de démontrer que ce gain de saveur n'était pas lié à des composés volatils, suggérant l'existence de molécules non-volatiles sucrées dans le bois de chêne (Marchal *et al.* 2013). En outre, l'extraction des sucres n'est pas à l'origine de ce phénomène puisque le bois de chêne n'en libère que de faibles teneurs. Cette observation a pu être interprétée au niveau moléculaire ; elle est due à la libération de triterpénoïdes glucosylés et galloylés, nommés Quercotriterpénosides (QTT), dont la saveur douce atténue l'amertume des autres constituants du bois. Cette famille chimique, jusqu'ici méconnue dans le bois de chêne, a été découverte par Marchal *et al.* en 2010 et a fait l'objet de plusieurs études par la suite (Gammacurta *et al.* 2019 ; Marchal 2010 ; Marchal, Génin, *et al.* 2015 ; Marchal, Waffo-Téguo, *et al.* 2011). Le développement d'une méthode de quantification a permis d'établir leur contribution sensorielle dans les vins. En outre, la valeur obtenue pour le seuil de détection gustative du composé le plus sucré de cette famille, le QTT I (**12**), est très faible pour une molécule non-volatile. En effet, à 590 µg/L, ce composé modifie le goût des vins.

Les propriétés sensorielles des QTT ont permis d'envisager des applications en tonnellerie. Ainsi, des teneurs plus élevées en triterpènes sucrés ont été mesurées dans le bois de chêne sessile que dans le chêne pédonculé. Cette observation peut être reliée à l'utilisation traditionnellement privilégiée du chêne sessile pour la fabrication des barriques destinées à l'élevage des vins (Marchal, Prida, et Dubourdieu 2016).

# C. Influence du bois de chêne sur l'élevage des spiritueux

L'eau-de-vie de vin est le fruit d'un processus complexe de distillation suivi d'une longue étape de vieillissement. Le vin destiné à la production du cognac est issu de raisins blancs pauvres en caractères aromatiques provenant principalement de la variété Ugni-blanc (*Vitis vinifera Trebbiano*). Une première distillation, à l'aide d'alambic en cuivre, est réalisée sur le vin non filtré pour obtenir un premier distillat que l'on nomme le « brouillis » et dont le taux d'alcool se situe aux alentours de 30 %. Ce dernier est par la suite mis en chaudière pour une seconde distillation, dans le même alambic ; c'est ce qu'on appelle l'étape de la « bonne chauffe ». A la sortie de l'alambic en cuivre, l'eau-de-vie de vin, nommée eau-de-vie blanche, est transparente et a une forte concentration en éthanol (72 % au maximum). A ce stade, l'eau-de-vie est riche en composés volatils mais est dépourvue de composés organiques non-volatils. La suite de son élaboration nécessite une période de maturation en fûts de bois de chêne, pendant deux ans au minimum. C'est lors de cette étape que l'eau-de-vie se transforme en un produit singulier, gagnant en flaveur et révélant sa couleur. L'élevage en fûts de chêne joue ainsi un rôle clé dans la perception sensorielle de l'eau-de-vie (Cantagrel *et al.* 1992).

Pendant cette étape, plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine des modifications physico-chimiques et sensorielles (Baldwin *et al.* 1967 ; Piggott 1983 ; Piggott *et al.* 1992 ; Puech 1984 ; Singleton 1995). En particulier, il se produit une libération des extractibles du bois, et une dégradation de composés macromoléculaires insolubles comme la lignine suivie de la libération des produits de dégradation. Par ailleurs, les eaux-de-vie sont le siège de nombreuses réactions chimiques pouvant impliquer ces derniers ainsi que les extractibles pour aboutir à la formation de nouvelles espèces chimiques. Enfin, l'évaporation de l'alcool et de l'eau ayant lieu durant l'élevage conduit à un phénomène de concentration des molécules du bois de chêne. Plus spécifiquement, des travaux réalisés depuis plusieurs décennies ont montré le rôle crucial joué par des composés phénoliques de faible poids moléculaire et des tannins dans la qualité des eaux-de-vie boisées (J. -L Puech, Jouret, et Goffinet 1985). Tous les composés identifiés jusqu'à présent sont uniquement des non-flavonoïdes coexistent (Buglass 2015).

#### 1. Contribution à la couleur des eaux-de-vie

D'un point de vue sensoriel, des études ont mis en évidence une évolution de la couleur des spiritueux au cours du vieillissement en barriques, définie par une diminution de la luminosité et une augmentation de la saturation des teintes rouge et jaune (Canas, Belchior, *et al.* 2000 ; Schwarz *et al.* 2011). Il a été démontré que les caractéristiques chromatiques des eaux-de-vie boisées sont étroitement liées aux essences de bois utilisées pour l'élevage. En effet, les spiritueux élevés dans du bois de châtaignier (*Castanea sativa*) ont révélé des teintes plus évoluées. Des résultats similaires ont été obtenus pour le chêne pédonculé contrairement au chêne sessile qui a des propriétés colorantes plus faibles (Canas, Belchior, *et al.* 2000). Cette observation peut être reliée à l'utilisation traditionnellement privilégiée du chêne pédonculé pour la fabrication des barriques destinées à l'élevage des spiritueux.

En outre, des corrélations positives ont été observées entre la composition phénolique et la couleur des eaux-de-vie boisées (Canas *et al.* 2019 ; Canas, Belchior, *et al.* 2000 ; Rodríguez-Solana *et al.* 2014 ; Schwarz *et al.* 2011). Notamment, des teneurs plus élevées en ces composés ont été obtenues pour des spiritueux élevés dans *Quercus robur*, ce qui confirme l'observation précédente et peut être mis en relation avec la plus grande richesse de cette espèce en ellagitannins (Prida *et al.* 2006).

11

D'autre part, des réactions d'oxydation peuvent également être à l'origine de la différence de couleur des spiritueux au cours de l'élevage, par une diffusion lente et continue de l'oxygène (Cantagrel *et al.* 1992 ; Litchev 1989 ; Mosedale et Puech 1998).

# 2. Contribution à l'arôme et au goût des spiritueux

Durant l'élevage en barriques, la teneur en éthanol diminue par évaporation. La perte de volume qui en résulte est appelée « la part des anges » et représente 2 à 4 % par an (Lafon, Couillud, et Gaybellile 1973). En revanche, les concentrations en composés moins volatils que l'éthanol, tels que les alcools supérieurs, augmentent (Cantagrel *et al.* 1992 ; J. -L Puech *et al.* 1984). Ainsi, les équilibres chimiques régulés par l'éthanol sont modifiés et la puissance aromatique des spiritueux augmente (Lurton, Ferrari, et Snakkers 2012).

De nouveaux composés, comme pour le vin, sont extraits du bois de chêne vers les spiritueux (Lee *et al.* 2001 ; Piggott 1983). Ils apportent des notes boisées, vanillées, épicées et empyreumatiques (**1**, **2**, **3**, **4**, **5** - **Figure 1**). Ces descripteurs olfactifs, combinés à des notes fruitées et florales, sont caractéristiques des eaux-de-vie boisées de Cognac et sont connus sous l'expression « rancio charentais » (Marche et Joseph 1975). L'influence des paramètres de tonnellerie sur la teneur des molécules clés associées à ces notes a également été établie (Prida and Puech, 2006 ; Snakkers *et al.*, 2003).

Des molécules non-volatiles susceptibles de contribuer aux sensations buccales ou aux goûts des eaux-de-vie boisées ont fait l'objet de peu d'études jusqu'à présent. Les tannins ellagiques, tels que la vescalagine (6) et la castalagine (7), ont été identifiés dans les spiritueux (Puech *et al.* 1990). Les seuils gustatifs de détection des principaux ellagitannins ont été calculés par Glabasnia et Hofmann (Glabasnia et Hofmann 2006). Par comparaison avec les concentrations obtenues dans divers spiritueux, aucune corrélation claire n'a pu être établie entre ces composés et l'astringence ou l'amertume parfois perçues dans ces eaux-de-vie boisées (Canas, Casanova, et Pedro Belchior 2008 ; Glabasnia et Hofmann 2006 ; Viriot *et al.* 1993).

Le lyonirésinol (9) a également été identifié et quantifié dans des eaux-de-vie (Arramon 2001 ; Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016 ; Koga *et al.* 2007 ; Marchal 2010 ; Nabeta, Yonekubo, et Miyake 1987). Le seuil de détection gustatif de cette molécule a été déterminé dans le vin, comme décrit précédemment au paragraphe **I.B.4.a**. Bien que les concentrations obtenues pour ce composé dans les spiritueux soient supérieures au seuil de détection calculé dans les vins, la détermination de son seuil dans les eaux-de-vie permettrait de clarifier son impact gustatif dans cette matrice.

En ce qui concerne l'autre versant de l'équilibre gustatif, la saveur douce, les QTT ont également été identifiés dans des eaux-de-vie (Marchal 2010). La quantification de ces composés dans divers spiritueux a permis de mesurer des teneurs plus importantes dans cette matrice que dans des vins boisés. Il semblerait que les concentrations augmentent au cours du vieillissement, au même titre que la perception de la sucrosité. Ainsi, ces molécules pourraient avoir un impact dans les eaux-de-vie boisées.

Ces recherches ont conduit à des acquisitions significatives. Néanmoins, de nombreuses perceptions gustatives demeurent inexpliquées d'un point de vue moléculaire. Une meilleure compréhension de l'effet de l'élevage en fûts sur le goût des vins et des spiritueux requiert une plus grande connaissance des molécules non-volatiles, sucrées ou amères, qui les composent.

# II. État des connaissances sur la diversité structurale des molécules sapides et leurs récepteurs

Le sens du goût est un système de détection chimique permettant d'évaluer le contenu nutritif des aliments et de se protéger contre d'éventuelles intoxications. On considère classiquement que l'Homme est capable de distinguer cinq saveurs fondamentales : salé, acide, amer, sucré et umami (Lindemann 2001). Récemment, une autre saveur, le goût du gras, a été proposée (Besnard, Passilly-Degrace, et Khan 2016 ; Laugerette 2005). Les molécules sapides sont des molécules au moins partiellement hydrophiles, puisque leur perception implique une dissolution dans la salive. Elles activent le système gustatif et sont détectées par des récepteurs situés dans la membrane plasmique des cellules gustatives (Abe 2008 ; Adler et al. 2000). Ces dernières sont regroupées en amas sphériques appelés bourgeons du goût et sont réparties dans la cavité orale, principalement sur la langue mais aussi sur le voile du palais, le pharynx ou l'épiglotte. Les bourgeons du goût peuvent être localisés dans trois des quatre types de papilles : les fongiformes, les caliciformes et les foliées (Maitrepierre, Sigoillot, et Briand 2001 ; Roper et Chaudhari 2017 ; Scott 2005). L'activation de ces récepteurs va engendrer une cascade de transduction responsable de la perception gustative finale dans le cerveau. La détection des molécules sucrées et des acides aminés a permis d'identifier et de choisir des aliments riches en nutriments et aux saveurs agréables (Schlienger et Monnier 2014). A l'inverse, la détection de l'amertume est associée à des saveurs désagréables et permet d'éviter des composés toxiques ou dangereux pour l'organisme (Mueller et al. 2005 ; Zhang et al. 2003).

L'étude des interactions entre les composés sapides et les récepteurs, la connaissance de la diversité moléculaire associée à ces composés ainsi que des différences de perception liées à

la génétique de l'Homme, permettent de rendre compte de la complexité du codage de l'information chimiosensorielle gustative.

# A. Les récepteurs du goût

Chaque saveur possède des récepteurs et un mécanisme de transduction propre (**Tableau 1**). Les molécules sapides sont perçues par deux groupes de détecteurs connus. On distingue la détection des ions de la détection des molécules organiques. Les cations Na<sup>+</sup> et H<sup>+</sup>, qui suscitent des goûts respectivement salé et acide, traversent la membrane cellulaire par des canaux ioniques spécifiques (Chandrashekar *et al.* 2010 ; Huang *et al.* 2006). Ils provoquent une dépolarisation de la membrane de la cellule, suivie d'une entrée d'ions Ca<sup>2+</sup> puis d'une libération de neurotransmetteur dans la synapse sous-jacente.

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) signalent des molécules organiques sucrées, amères ou umami. L'existence de domaines transmembranaires hydrophobes et un mécanisme d'activation impliquant une protéine G sont des caractéristiques communes à ces récepteurs. La perception est induite par l'activation d'un récepteur de type Tas1R (sucré et umami) ou Tas2R (amer) couplé à des protéines G, par les composés sapides (Chandrashekar *et al.* 2006 ; 2000 ; Lindemann 2001 ; Nelson *et al.* 2001). L'activation des récepteurs Tas1R et Tas2R entraîne des cascades de transduction similaires (Chandrashekar *et al.* 2006) mais se déroulant dans des cellules gustatives distinctes (Scott 2005). En effet, certaines d'entre elles expriment des Tas2R et sont sensibles à l'amertume, et d'autres expriment des Tas1R et sont sensibles au sucré ou à l'umami. Pour autant, il n'existe pas de cartographie universelle de la langue, contrairement à certaines fausses idées, et la sensibilité aux saveurs des différentes parties de la bouche dépend des individus (Collings 1974 ; Faurion 2000).

Goût	Nature des récepteurs	Nombre de récepteurs	Type de récepteurs
Acide	Canaux ioniques	1	Canal ionique (Na <sup>+</sup> )
Salé		1	Canal ionique (H <sup>+</sup> )
Sucré	Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	1	Dimère Tas1R2/Tas1R3
Umami		1	Dimère Tas1R1/Tas1R3
Amer		25	Famille des Tas2R

 Tableau 1 : Types de récepteurs associés à chaque goût.

#### B. La saveur amère et ses récepteurs

#### 1. Diversité structurale des molécules amères

Des centaines de composés amers, définis par un caractère amer et/ou l'activation d'au moins un récepteur Tas2R humain, ont été rapportés (Figure 2) (Drewnowski et Gomez-Carneros 2000 ; Meyerhof et al. 2010). La plupart sont résumés dans une base de données, nommée « BitterDB » (Dagan-Wiener et al. 2019). Ces molécules appartiennent à des classes chimiques très différentes. En particulier, on retrouve des ions métalliques (Wang et al. 2019; Yang et Lawless 2005), des acides aminés (13) et des peptides (Desportes et al. 2001 ; Nishimura et Kato 1988), des alcaloïdes (14-15) (Brockhoff et al. 2007 ; Ong et al. 2018 ; Scharbert et Hofmann 2005), des phénols et des polyphénols (16) (Laaksonen, Sandell, et Kallio 2010; Marchal, Cretin, et al. 2015; Soares et al. 2013) dont des flavonoïdes (17-18) (Dea et al. 2013; Gaffield et al. 1975; Rouseff, Martin, et Youtsey 1987), des lactones et des terpènes (19-20) (Valenta et al. 1962; Van Beek et al. 1990). Ces composés amers (Figure 2) sont en grande majorité des substances naturelles qui ont été identifiées dans des fruits et des légumes, notamment dans les agrumes (Dagulo et al. 2010 ; Rouseff, Martin, et Youtsey 1987 ; Tatum et Robert 1977), la roquette (Bell et al. 2018; Pasini et al. 2011), le chou (Bhandari, Jo, et Lee 2015 ; Cartea et Velasco 2008), le concombre (Horie et al. 2007) et la laitue (Horie 2009 ; Mai et Glomb 2016), et dans des aliments, comme le chocolat (Matissek 1997), la poudre de cacao (Serra Bonvehí et Ventura Coll 2000), le fromage (Mojarro-Guerra et al. 1991) et l'huile d'olive (Gutiérrez et al. 1989 ; Gutiérrez-Rosales, Ríos, et Gómez-Rey 2003). Les composés responsables de l'amertume ressentie dans les boissons ont également été étudiés, c'est le cas du café (Frank et al. 2007 ; Ong et al. 2018), du thé (Narukawa et al. 2011 ; Scharbert et Hofmann 2005), de la bière (Haseleu, Intelmann, et Hofmann 2009 ; Sakamoto et Konings 2003), du vin (Hufnagel et Hofmann 2008; Marchal, Cretin, et al. 2015; Noble 1994; Soares et al. 2013) et du cidre (Alonso-Salces et al. 2004 ; Riekstina-Dolge, Kruma, et Karklina 2012). D'autres composés ont pu être identifiés suite à des réactions de Maillard entre des glucides et des acides aminés lors de la cuisson d'un aliment, le quinizolate (21) en est un exemple (Frank et Hofmann 2002). Certaines molécules de synthèse sont également connues pour leur goût amer ; à titre d'exemple le benzoate de dénatonium (22), découvert en 1958, a un seuil gustatif de détection très faible (de l'ordre du 10<sup>-8</sup> mol/L) (Schiffman et al. 1994).

Le seuil de détection gustative varie fortement d'une molécule à une autre en fonction de leur nature chimique (Schiffman *et al.* 1994). L'influence de la stéréochimie sur les propriétés gustatives d'un composé a notamment été étudiée (Cretin *et al.* 2015 ; Gaffield *et al.* 

1975). En outre, la perception du goût diffère énormément d'une personne à une autre. Des études génétiques ont pu mettre en évidence des pertes de sensibilité gustative pour certains composés pouvant résulter d'un polymorphisme génétique d'un récepteur gustatif. Par exemple, de grandes différences de perception au 6-*n*-propylthiouracil (PROP) et au phénylthiocarbamide (PTC) entre les individus ont été démontrées (Bartoshuk, Duffy, et Miller 1994 ; Harris et Kalmus 1949). L'origine de l'agueusie à ces molécules viendrait d'un gène codant pour un des récepteurs de l'amertume (Duffy *et al.* 2004). Ce polymorphisme est souvent héréditaire et peut varier en fonction des populations (Reed, Tanaka, et McDaniel 2006). Il est spécifique à chaque composé et peut avoir un impact sur nos préférences et notre régime alimentaire (Bartoshuk 2000).



Figure 2 : Structure chimique de quelques composés amers.

# 2. Les récepteurs à l'amertume

La perception de l'amertume est assurée par une famille multigène de récepteurs, les Tas2R (Adler *et al.* 2000 ; Chandrashekar *et al.* 2000). Leur nombre diffère significativement en fonction de l'espèce de vertébrés, de 3 chez la Poule à 51 chez la Grenouille par exemple (Li et Zhang 2014). Chez l'Homme, on en dénombre 25 (Montmayeur et Matsunami 2002 ; Singh *et al.* 2011). La grande diversité des composés amers peut s'expliquer par cette multiplicité de récepteurs (**Tableau 1**).

Les Tas2R sont des GPCR à sept hélices transmembranaires longues de 290 à 333 acides aminés, avec une courte extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (Adler *et al.* 2000 ; Scott 2005 ; 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). En outre, il y a deux types de récepteurs, ceux à spectre large, c'est-à-dire qu'ils vont pouvoir détecter plusieurs composés amers, et ceux plus spécialisés, qui vont détecter un seul composé amer (Behrens *et al.* 2018 ; Di Pizio et Niv 2015 ; Meyerhof *et al.* 2010).

### C. La saveur sucrée et son récepteur

# 1. Diversité structurale des molécules sucrées

Pour le goût sucré, il existe également une grande diversité chimique des molécules (**Figure 3**). De nos jours, la molécule de référence pour ce goût est le saccharose (**23**), extrait de la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) et de la betterave sucrière (*Beta vulgaris L*) (Kinghorn 1987). Les glucides (**23-25**) restent les composés organiques les plus connus pour ce goût. Les autres composés non-volatils à saveur sucrée sont qualifiés d'édulcorants. Des acides aminés (**26**) (Sáenz-Navajas, Fernández-Zurbano, et Ferreira 2012 ; Schiffman et Sennewald 1981), des polyols (**27**) (Schiffman et Gatlin 1993), des dipeptides (**28-29**) (Chattopadhyay, Raychaudhuri, et Chakraborty 2014), des glycosides de diterpènes (**30**) (Mogra et Dashora 2009), des composés phénoliques, dont des proanthocyanidines (**31**) (Baek *et al.* 1993) et des flavonoïdes (**32-33**) (Kinghorn *et al.* 2010 ; Zehnter et Gerlach 1995), et quelques rares protéines végétales (Gibbs, Alli, et Mulligan 1996) ont également été identifiés avec un goût sucré. D'autres composés formés par des réactions de Maillard ont pu être identifiés ; c'est le cas du (+)-alapyridaine (**34**) (Ottinger, Soldo, et Hofmann 2003).

Certains composés sont des substances naturelles, comme les stéviosides (**30**) présents dans *Stevia rebaudiana*, tandis que d'autres résultent exclusivement d'une synthèse chimique, comme l'aspartame (**28**) par exemple. Le premier édulcorant de synthèse a été découvert en 1879, il s'agit de la saccharine qui est 400 fois plus sucrée que le saccharose. Le dernier édulcorant trouvé par hasard par les organiciens est le sucralose en 1976, qui est 600 fois plus sucré que le saccharose, 3 fois plus que l'aspartame et 1,5 fois plus que la saccharine (Chattopadhyay, Raychaudhuri, et Chakraborty 2014).



Figure 3 : Structure chimique de quelques composés sucrés.

En fonction de leur nature chimique, les seuils de détection gustative varient fortement d'une molécule sucrée à une autre, bien que certaines études montrent un lien structure/goût des molécules (Shin *et al.* 1995). En effet, une faible modification de la structure chimique d'un composé peut engendrer des propriétés sensorielles distinctes. C'est notamment le cas de la néohespéridine dihydrochalcone (**32**), édulcorant avec un pouvoir sucrant puissant (Winnig *et al.* 2007), obtenu par hémisynthèse à partir de la néohespéridine (**18**), composé amer (Rouseff, Martin, et Youtsey 1987). Par ailleurs, la stéréochimie peut également influencer de manière considérable le goût d'une molécule (Bassoli *et al.* 2000 ; Ottinger, Soldo, et Hofmann 2003). Par exemple, une étude a mis en évidence que l'énantiomère dextrogyre de la phylloducine est sucré alors que sa forme lévogyre est insipide (Zehnter et Gerlach 1995).

La perception de la saveur sucrée peut varier d'un individu à un autre mais également d'une population à une autre (Simmen et Hladik 1993). Des seuils gustatifs de détection du saccharose varient d'un facteur 10 dans l'ensemble de la population française, par exemple. Ces observations sont en partie dues à des mutations génétiques qui touchent les récepteurs gustatifs et réduisent leur capacité à détecter des molécules sucrées (Raliou *et al.* 2009). En cas d'agueusie, une invalidation du récepteur gustatif peut être impliquée. Par exemple, les Félidés, comme le Chat, sont insensibles au goût sucré. Une étude génétique a expliqué ce phénomène ; le gène codant la sous-unité Tas1R2, principalement impliqué dans la détection de molécule sucrée, est devenu un pseudogène, c'est-à-dire qu'il n'aboutit pas à une protéine fonctionnelle (Li *et al.* 2005).

En outre, certaines molécules ne développent pas qu'une seule saveur. En effet, selon leur concentration, certains édulcorants peuvent paraître soit amer soit sucré (Schiffman *et al.* 1995). C'est le cas par exemple du stévioside ; la dégustation, réalisée par un panel entraîné, de solutions croissantes de ce composé a été corrélée à une augmentation de la saveur amère (Schiffman *et al.* 1995). D'autres études sur la relation structure-activité de molécules amères et sucrées ont montré que certains composés pouvaient activer les deux types de récepteurs (Froloff, Faurion, et Mac Leod 1996), ce qui peut expliquer pourquoi une molécule peut être perçue à la fois amère et sucrée (Kuhn *et al.* 2004). C'est notamment le cas de l'éthanol (Scinska *et al.* 2000).

#### 2. Les récepteurs au goût sucré

La structure des récepteurs au goût sucré, Tas1R, est aujourd'hui bien connue (**Tableau 1**). Il s'agit d'un hétérodimère constitué de deux sous-unités : Tas1R2 et Tas1R3. Ce sont également des GPCR à sept hélices transmembranaires, appartenant à la classe C, avec un domaine N-terminal extracellulaire, de grande taille et composé de deux lobes, impliqué dans la reconnaissance et la liaison du ligand (Chandrashekar *et al.* 2006). Il comporte plusieurs sites de fixation et différents modes d'interaction avec les principaux édulcorants (**Figure 4**) (Behrens *et al.* 2018 ; 2011).



**Figure 4 :** Représentation schématique du récepteur Tas1R au goût sucré et des sites de fixation des principaux composés sucrants (d'après Behrens *et al.* 2018).

Plusieurs mécanismes de transduction ont été décrits, soit par l'intermédiaire de la dégradation de la phosphatidylinositol-tri-phosphate en inositol-triphosphate par la phospholipase C  $\beta$ 2 (Chandrashekar *et al.* 2006), soit par l'activation de l'enzyme adénylate cyclase, qui entrainerait la hausse d'AMPc dans la cellule (Gilbertson, Damak, et Margolskee 2000). Ces deux mécanismes conduisent à une dépolarisation et à la libération de neurotransmetteur. Bien qu'il n'existe qu'un récepteur unique pour le goût sucré, la multitude de sites de liaison sur leur partie extracellulaire permet de détecter un grand nombre de molécules appartenant à diverses familles chimiques (Zhao *et al.* 2003). En corollaire, la sensibilité d'un individu n'est donc pas générale au goût sucré mais elle varie d'un composé à un autre (Faurion, Saito, et Leod 1980).

Des découvertes récentes suggèrent que le récepteur au goût sucré Tas1R2/Tas1R3, qui est exprimé dans de nombreux tissus extra-oraux, tels que l'intestin et le pancréas, joue un rôle important dans la détection des nutriments et la régulation des processus métaboliques impliquant la sécrétion d'insuline (Kyriazis, Soundarapandian, et Tyrberg 2012 ; Laffitte, Neiers, et Briand 2014).

Cet état de l'art a permis de mettre en évidence la diversité moléculaire des substances actives, la multiplicité des récepteurs du goût ainsi que des mécanismes de transduction. Ces éléments permettent d'expliquer en partie la complexité de la recherche des molécules sapides. Pour ces raisons, il demeure difficile de prévoir à coup sûr le goût d'une molécule à partir de sa structure. Pour tenter de pallier ce problème, des chercheurs ont mis au point des modèles de prédiction *in silico* pour rechercher de nouveaux composés sucrés (Chéron, Casciuc, *et al.* 2017). En œnologie, il serait intéressant de préciser les modes de fixation des composés sapides du vin et des eaux-de-vie. Ainsi, ce modèle pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre les composés et les récepteurs du goût (Chéron, Golebiowski, *et al.* 2017 ; G. Sanz *et al.* 2008).

# PARTIE EXPÉRIMENTALE GÉNÉRALE

La recherche de molécules sapides a consisté à mettre au point des méthodes d'extraction puis à développer un protocole de fractionnement et de purification. De ce fait, de nombreuses techniques analytiques ont été utilisées. En parallèle, diverses techniques d'analyse sensorielle ont permis l'évaluation organoleptique de ces échantillons (extraits, molécules, vin et eau-de-vie). Cette partie expérimentale vise tout d'abord à expliquer les principes et les équipements des techniques employées au sein de l'unité de recherche œnologie. Puis, les techniques d'analyses sensorielles et les traitements statistiques permettant leur interprétation sont décrits. Seules les méthodologies générales sont traitées dans cette section. Les détails expérimentaux spécifiques à chaque partie seront précisés au sein de celles-ci, pour plus de cohérence dans la présentation de la démarche.

### I. Produits chimiques utilisés

L'acétate d'éthyle, l'acétonitrile, l'éthanol, le butan-1-ol, l'heptane, le méthanol et le propan-2-ol ont été fournis par VWR International (Pessac, France) et possèdent une pureté supérieure à 99 %. Le méthyl *tert*-butyl éther a été fourni par Scharlab S.L (Barcelone, Espagne). L'eau ultrapure a été obtenue grâce à un système de purification Milli-Q<sup>®</sup> (Merck Millipore, France) et possède une résistivité de 18,2 M $\Omega$ .com. L'acide formique de qualité HPLC utilisé pour L'HPLC semi-préparative possède une pureté supérieure à 99 % (VWR International, Pessac, France). L'acétonitrile, utilisé pour la séparation chromatographique, ainsi que l'acide formique, utilisé pour l'acidification des solvants, sont de qualité LC-MS avec une pureté supérieure ou égale à 99 % (Fisher Chemicals, Illkirch, France).

Les produits chimiques mentionnés ci-après ont été utilisés dans la **Partie I – Chapitre II**. L'esculétine ( $\geq$  98 %), la scopolétine ( $\geq$  99 %), la coumarine ( $\geq$  99 %) et la 4méthylombelliférone ont été fournies par la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'ombelliférone ( $\geq$  98 %) a été fournie par Fluka (Seelze, Allemagne) et la fraxétine ( $\geq$  99 %) a été fournie par Extrasynthèse (Genay, France).

Les produits chimiques indiqués ci-après ont été utilisés dans la **Partie II – Chapitre IV**. Le dichlorométhane a été fourni par Fisher Scientific (Illkirch, France) et possède une pureté supérieure à 99 %. L'acétate de sodium trihydraté a été fourni par la société Acros Organic (New Jersey, Etats-Unis) et le sulfate de sodium anhydre par la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). La Rapidase® AR 2000 a été fournie par DSM Food

Specialties (Delft, Pays-Bas). L'octan-3-ol a été fourni par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

#### II. Techniques analytiques utilisées

# A. Méthodes de fractionnement et de purification

# 1. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide permet de solubiliser les composants extractibles de matières solides à l'aide d'un solvant. Dans le cadre de cette thèse, la phase solide est constituée par du bois de chêne. Le solvant utilisé pour cette extraction est une solution hydro-éthanolique afin de mimer les conditions œnologiques. Ainsi, les molécules extraites, présentes dans cette solution, sont les mêmes que celles libérées dans un vin ou une eau-de-vie élevés en fûts de chêne.

L'objectif de la chimie extractive est d'obtenir une extraction aussi rapide et complète que possible. La méthode nécessite de grandes surfaces d'échange entre le solvant et la phase solide. A cette fin, le bois de chêne a été broyé pour le réduire en sciure.

# 2. Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une technique de fractionnement basée sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases liquides non miscibles, généralement aqueuse et organique. Un bon solvant d'extraction doit remplir deux conditions ; il ne doit pas être miscible avec le solvant contenant le soluté d'intérêt et il doit avoir une meilleure affinité avec le soluté d'intérêt que le solvant de départ. Lorsque le soluté X est mis en contact avec ces deux phases, il s'établit un équilibre de partage, notée K<sub>D</sub>X, caractérisé par le rapport des concentrations du soluté dans chacune d'entre elles. Cette constante se calcule de la façon suivante :

$$K_D X = \frac{[X]inf}{[X]sup}$$

où [X]inf et [X]sup désignent les concentrations de X, respectivement dans les phases inférieure et supérieure. Cet équilibre est constant à variables d'état égales.

# 3. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

#### a. Principe

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide sans support solide, mise au point par Nunigaki (Murayama *et al.* 1982). Elle est fondée sur la différence de partage de divers solutés entre deux phases liquides non miscibles préparées par mélange de deux solvants ou plus. L'appareil est constitué d'une colonne (rotor), formée par la superposition de disques contenant de nombreuses cellules interconnectées. L'une des deux phases liquides de ce système est utilisée comme phase stationnaire et est maintenue dans le rotor (colonne) grâce à la force centrifuge. Les cellules sont d'abord remplies avec cette première phase. Puis, la deuxième phase du système est utilisée comme phase mobile, qui est alors pompée au travers de la phase stationnaire jusqu'à atteindre un équilibre stable entre les volumes de ces deux phases (**Figure 5**). Les volumes totaux de phase stationnaire V<sub>stat</sub> et de phase mobile V<sub>mob</sub> restent constants dans la colonne au cours de l'expérience de CPC. Les solutés du mélange à fractionner sont distribués dans les deux phases en fonction de leur affinité pour chacune d'entre elles. La différence de partage entre les divers composés est à l'origine de leur séparation (Foucault et Chevolot 1998).

Le champ centrifuge permet d'utiliser le rotor de la CPC dans deux modes différents dans lesquels la phase stationnaire est soit la phase la plus dense, le mode est dit ascendant, soit la phase la plus légère, le mode est dit descendant. Ainsi, en mode ascendant, la phase mobile est introduite dans chaque cellule en sens inverse de la force centrifuge, à l'inverse du mode descendant (**Figure 6**). L'appareil de CPC est équipé d'une vanne de commutation qui permet de modifier le sens d'introduction des solvants dans le rotor. Au cours de l'expérimentation, la constitution des phases peut être inversée par cette vanne à tout instant.



**Figure 5 :** 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).



**Figure 6 :** Schématisation des deux modes d'introduction des solvants dans la colonne (d'après Toribio, 2007).

L'échantillon à fractionner est dissous dans un mélange des deux phases liquides non miscibles puis injecté dans le système. Les solutés se répartissent dans les deux phases et se séparent en fonction de leur affinité pour chacune d'entre elles. Chaque soluté X du mélange possède sa propre constante de partage, notée K<sub>D</sub>X, et se calcule selon la formule suivante :

$$K_D X = \frac{[X]stat}{[X]mob}$$

où [X]stat et [X]mob désignent les concentrations de X respectivement dans les phases stationnaire et mobile.

Le meilleur système pour le fractionnement d'un extrait complexe est celui pour lequel les solutés se répartissent entre les deux phases avec un coefficient de partage proche de 1. En effet, des  $K_DX$  très faibles correspondent à une élution très rapide tandis que des  $K_DX$  très élevés se traduisent par une très grande rétention. Ces deux situations sont peu propices au fractionnement de l'extrait. Par ailleurs, il est intéressant d'avoir des différences de  $K_DX$  entre composés, afin de pouvoir les séparer.

La qualité de la séparation en CPC dépend notamment du choix du système de solvants. En effet, le système choisi doit être stable, solubiliser correctement l'échantillon à injecter et ne doit pas former d'émulsion au contact de ce dernier. Ces paramètres permettent d'éviter une déstabilisation du système nuisible à la séparation. La plupart des systèmes biphasiques utilisés sont des mélanges de 3 à 5 solvants différents, ce qui permet de moduler la polarité des phases mobile et stationnaire pour l'expérimentation en CPC. La construction de diagrammes ternaires permet de prévoir le comportement des systèmes et de définir ceux qui peuvent être utilisés en CPC (Renault *et al.* 2002). Cependant, l'étude des mélanges de solvants ainsi que leur caractérisation ne constituent pas l'objet de ce travail.

Des gammes de systèmes biphasiques prédéfinis et décrites dans la littérature ont été testées et utilisées. Les gammes nommées « Arizona » ou « HEMWat » permettent notamment de balayer une large gamme de polarité et sont constituées majoritairement d'un mélange d'heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau (Foucault 1995 ; Maciuk 2005 ; Oka, Oka, et Ito 1991 ; Renault *et al.* 2002). D'autres systèmes dérivés de la gamme Arizona (Bisson 2012), consistant à remplacer, de façon équimolaire, le méthanol ou l'acétate d'éthyle respectivement par de l'acétonitrile ou du méthyl *tert*-butyl éther, ont également été testés.

Une autre grande catégorie de systèmes a été testée au cours de ce travail. Il s'agit des systèmes dits « ponts », qui sont formés de deux solvants non miscibles et d'un troisième solvant miscible avec les deux autres ; il se répartit dans les deux phases et assure le transfert des molécules de l'une vers l'autre. A titre d'exemple, le système AcOEt/iPrOH/H<sub>2</sub>O fait partie de cette catégorie.

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 méthode

La CPC présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques chromatographiques préparatives, et notamment l'HPLC. La quantité d'échantillons dépend du volume de la colonne et de la solubilité dans le système de solvants. Par exemple pour le rotor d'1 L, la capacité de charge est élevée, jusqu'à 10 g d'échantillon pouvant être injectés. En outre, l'absence de support solide permet de s'affranchir des phénomènes d'adsorption irréversibles ou de dégradation des analytes. Cela constitue donc un atout qui permet d'obtenir de meilleurs rendements (~ 90 %) qu'avec certaines techniques. Par ailleurs, par rapport à la chromatographie liquide à basse pression, la CPC permet une bonne résolution chromatographique. Le temps de manipulation est également assez réduit ; une séparation en CPC dure en général entre 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 répond à des enjeux économiques et environnementaux non négligeables. Par rapport à l'HPLC, la CPC dispose d'une grande variabilité de phase stationnaire, causée notamment par la multitude de systèmes de solvants. Bien que reposant sur des phénomènes d'interactions moléculaires, le principe de

la CPC est différent de l'HPLC et conduit à une séparation différente des solutés. Il s'agit d'une technique complémentaire à l'HPLC et les deux peuvent donc être utilisées successivement dans un protocole de fractionnement et de purification.

En revanche, l'expérience en CPC nécessite en amont une optimisation importante. Notamment, le choix des solvants est une étape cruciale afin d'obtenir une séparation maximale des solutés. Par rapport à l'HPLC, la résolution chromatographique est généralement plus basse. L'utilisation de la CPC est ainsi à privilégier au début du protocole de purification. Par ailleurs, cette technique repose sur une utilisation exclusive de liquides ; il est nécessaire que la colonne soit parfaitement étanche.

Malgré ces inconvénients, cette technique est un outil particulièrement intéressant dans le cadre d'un protocole de fractionnement, en raison notamment de ses performances à l'échelle préparative et de ses capacités de séparation orthogonale à celles de l'HPLC. Son utilisation a conduit à la purification et à l'isolement de nombreuses molécules naturelles (Degenhardt *et al.* 2001 ; Hubert *et al.* 2015 ; Marchal, Waffo-Téguo, *et al.* 2011 ; Renault *et al.* 1997 ; Toribio *et al.* 2007 ; Toribio, Nuzillard, et Renault 2007).

#### c. Appareillage

Les expériences sont réalisées grâce à un système Spot prep II LC équipé d'un SCPC-100+1000 (Armen Instrument, Saint-Avé, France). Un rotor de 100 mL (11 disques, 90 cellules « twin cells » de 0,101 mL par disque) a été utilisé pour fractionner des échantillons de masses inférieures à 1 g et un rotor de 1 L (21 disques, 72 cellules « twin cells » de 0,555 mL) a été utilisé pour des échantillons de masses comprises entre 1 et 10 g. Une pompe quaternaire à haute pression permet de gérer le flux de solvants. L'injection est manuelle, 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 (254 et 280 nm). 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 V5.1 (Armen Instrument, Saint-Avé, France).

# 4. Chromatographie Liquide Haute Performance à l'échelle semi-Préparative (HPLC-Prep)

a. Principe

L'HPLC à l'échelle semi-préparative est une chromatographie liquide sur phase solide, qui est généralement utilisée en dernière étape de purification d'échantillons. Elle permet notamment la purification totale de molécules.

Cette technique présente un nombre élevé de plateaux théoriques, ce qui lui confère un grand pouvoir de séparation et une meilleure résolution que la CPC. Elle nécessite la mise au point de gradients de phase mobile adaptés pour obtenir une séparation satisfaisante des composés en un temps minimum. Plusieurs colonnes sont disponibles au laboratoire (Tableau 2), ce qui a permis de tester différents types de phases stationnaires 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 Milli-Q (phase A) et d'ACN (phase B), selon des gradients optimisés en fonction des échantillons à traiter. Les phases A et B ont pu être acidifiées avec de l'acide formique afin d'améliorer la résolution chromatographique et la forme des pics. Des variations du pourcentage d'acétonitrile ont été réalisées en fonction de l'impact observé sur le profil chromatographique de l'échantillon d'intérêt. En effet, si le pourcentage d'acétonitrile augmente, les composés auront tendance à présenter des temps de rétention plus faibles. Ensuite, suivant l'allure du chromatogramme obtenu, la pente du gradient peut être augmentée ou diminuée pour optimiser la séparation des solutés. Les gradients d'élution ont été préalablement choisis à l'aide de la LC-HRMS grâce à l'utilisation de colonnes analytiques de même phase stationnaire que les colonnes préparatives (technique du « scale-up ») (Tableau 2).

Fournisseur	Colonne analytique	Colonne préparative
Thermo Fisher	Hypersil Gold C18	Hypersil Gold Prep C18
Scientific	2,1 x 100 mm, 1,9 µm	21,2 x 250 mm, 5 µm
Waters	Sunfire C18 OBD 2,1 x 100 mm, 3,5 μm	Sunfire Prep C18 OBD 19 x 250 mm, 5 μm
Waters	Acquity UPLC HSS T3 2,1 x 100 mm, 1,8 μm	Atlantis T3 OBD Prep 19 x 250 mm, 5 μm
Waters	Acquity UPLC BEH C18 2,1 x 100 mm, 1,7 μm	Xbridge C18 OBD Prep 19 x 250 mm, 5 μm
Phenomenex	Kinetex UPLC XB-C18 2,1 x 100 mm, 1,7 μm	Kinetex Prep XB C18 21,2 x 250 mm, 5 μm

**Tableau 2 :** Liste des colonnes analytiques et préparatives de même phase stationnaire disponibles au laboratoire.

# b. Appareillage

Le laboratoire est équipé d'un appareil Waters Prep 150 LC associé à une pompe quaternaire 2545, un détecteur UV/Visible 2489 (Waters, Guyancourt, France) et un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD) 2424 (Waters, Guyancourt, France). Le système est contrôlé par le logiciel Chromscope (Waters, Guyancourt, France).

Le détecteur UV, non destructeur, est utilisé par défaut. Lorsque l'absorbance des molécules est nulle ou insuffisante aux longueurs d'onde choisies, le détecteur évaporatif à diffusion de lumière 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.

# **B.** Élucidation structurale

1. Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse à Transformée de Fourier-Orbitrap (LC-HRMS)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Un spectromètre de masse est généralement composé de trois parties : une source d'ionisation, un analyseur, qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et un détecteur, qui mesure les ions sortant de l'analyseur. Différents types d'analyseurs de masse sont disponibles sur le marché et leur champ d'utilisation varie avec leurs spécificités. Ils se différencient par leur gamme de masse, leur vitesse de balayage, leur pouvoir de résolution mais également leur précision de mesure de masse.

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 a été inventé par Makarov (Hardman et Makarov 2003 ; Makarov 2000 ; 1999) sur la base de la théorie développée par Kingdon en 1923 décrivant un piégeage électronique induit uniquement par un champ électrostatique (Kingdon 1923). Il s'agit de l'analyseur de masse le plus récent équipant des instruments commerciaux. En effet, sa première version commerciale a été présentée seulement en 2005 par la société Thermo Fischer. L'analyseur Orbitrap se compose d'une électrode creuse, en forme de tonneau, à l'intérieur de laquelle est placée coaxialement une électrode en forme de fuseau. La forme particulière de ces deux électrodes permet l'imposition d'un champ électrostatique quadripolaire suivant l'axe z des électrodes (**Figure 7**). Le mouvement des ions dans l'Orbitrap adopte un mouvement harmonique oscillatoire auto-entretenu, résultant de la composition d'un mouvement circulaire et d'un mouvement d'oscillation le long de l'axe z.



**Figure 7 :** Coupe schématique d'un analyseur Orbitrap décrivant le mouvement des ions autour de l'électrode centrale (Hu *et al.* 2005). r et z sont des coordonnées cylindriques.

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  $\omega_z$  ne dépend que du rapport m/z des ions (k étant une constante instrumentale). Elle est définie par :

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

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 (< 3 ppm). Ainsi, cet analyseur permet une détermination précise des formules brutes des ions observés et permet notamment le criblage d'extraits complexes.

Par ailleurs, l'Orbitrap se distingue par la conservation de la précision de mesure de masse sur une vaste gamme dynamique intrascan (supérieure à 3 décades) et pour une large gamme de rapports m/z (50 à 6000 Th). Ce mode de balayage est utilisé pour l'analyse d'un mélange complexe ; des spectres complets sont enregistrés (par comptage d'ions) dans une fenêtre de masse choisie, à fréquence répétée pendant toute la durée de l'analyse. Un traitement *a posteriori* des résultats permet de construire des chromatogrammes d'ions extraits (XIC) dans des fenêtres plus réduites, autour d'un rapport m/z donné par exemple. En raison de ces spécificités, l'analyseur Orbitrap peut notamment être utilisé pour le dosage de molécules d'intérêt dans une matrice complexe.

Cette technique peut donc être employée autant pour des applications qualitatives que quantitatives.

# b. Système Exactive<sup>TM</sup>

Le laboratoire est équipé d'un système Exactive<sup>TM</sup> (Thermo Fischer Scientific, Les Ulis, France). Il se compose 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) (**Figure 8**).



**Figure 8 :** Présentation schématique de la géométrie du spectromètre de masse Exactive<sup>TM</sup> (d'après Wieghaus *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). L'ESI est basée sur la formation d'un spray qui permet d'envoyer l'échantillon dans le spectromètre de masse sans le polluer. Cette source d'ionisation permet une très bonne sensibilité ; elle permet d'étudier des substances peu polaires à très polaires avec une large gamme de masses (formation d'ions multichargées). Les ions sont ensuite transmis vers la Ctrap par une optique de transfert, constituée de lentilles et guides quadrupolaires, au cours de laquelle un vide croissant, permettant le libre parcours des ions, 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, en raison de sa forme, permet la focalisation et le transfert des ions vers l'Orbitrap. La quantité d'ions piégés dans l'Orbitrap doit rester constante. Le système de contrôle de gain automatique (AGC) permet la régulation du nombre d'ions pour atteindre une quantité fixe, prédéterminée par l'utilisateur (5.10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> ou 3.10<sup>6</sup>). L'Orbitrap est maintenu à un niveau de vide poussé de l'ordre de 10<sup>-10</sup> 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. Ce processus est nommé fragmentation des ions totaux. En effet, l'ion précurseur n'a pas été sélectionné au préalable comme c'est le cas dans une expérience en MS/MS. L'analyse de molécules pures (ou bien séparées chromatographiquement) permet toutefois de résoudre en partie ce problème. Différentes énergies de fragmentation peuvent être appliquées et les fragments obtenus apportent des informations sur la nature, le nombre et éventuellement la position des groupements fonctionnels.

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

Le laboratoire dispose pour l'analyse d'un système Accela U-HPLC composé de pompes quaternaires et d'un passeur d'échantillons automatique HTC PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suisse). Il est relié au spectromètre de masse Exactive<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) et équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation chauffée « HESI-II » (Heated ElectroSpray Ionisation) connectée à un analyseur Exactive<sup>TM</sup> Orbitrap. La détection peut également être réalisée avec un détecteur UV à barrette de diodes Accela PDA 1 cm LightPipe Flow Cell. Les données obtenues ont été traitées à l'aide des applications Qualbrowser et Quanbrowser du logiciel Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

La calibration de l'appareil est effectuée toutes les semaines avec deux solutions de calibration, une pour le mode d'ionisation négatif « Pierce<sup>®</sup> ESI Negative Ion Calibration » (Thermo Fisher Scientific) ainsi qu'une solution pour le mode d'ionisation positif « Pierce<sup>®</sup> ESI Positive Ion Calibration » (Thermo Fisher Scientific).

La seringue et la boucle d'injection sont lavées trois fois avec une solution hydrométhanolique (50/50, v/v) acidifiée à 1 % d'acide formique puis trois fois avec une solution d'acétonitrile, avant et après chaque injection.

# 2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)a. Principe

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique analytique qui permet la caractérisation structurale de molécules purifiées. Elle est fondée sur la mesure de l'absorption de la radiation de radiofréquence (RF) par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. L'absorption de la radiation pousse le spin nucléaire à se réaligner ou à retourner dans la direction de la plus haute énergie. Après avoir absorbé l'énergie, les noyaux atomiques réémettront une radiation RF et retourneront à leur état initial de moindre niveau d'énergie. Seuls les éléments dont le noyau possède un moment magnétique de spin non nul peuvent être aimantés et donc visibles en RMN. Par exemple, le proton <sup>1</sup>H et le carbone <sup>13</sup>C sont des noyaux sensibles au champ magnétique ; ils possèdent un spin nucléaire I égal à <sup>1</sup>/<sub>2</sub> et ont une circulation de charge sphérique. Soumis à un champ magnétique B<sub>0</sub>, un noyau de spin I non nul peut prendre 2I+1 orientations par rapport à la direction de ce champ. A titre d'exemple, le proton <sup>1</sup>H qui possède un spin nucléaire I =  $\frac{1}{2}$  prend 2 orientations, celles-ci correspondent au nombre quantique m :  $+\frac{1}{2}$  lorsque le spin nucléaire est dans la même direction que le champ appliqué ou  $-\frac{1}{2}$  lorsqu'il y a une orientation antiparallèle au champ. L'apparition de ce mouvement de rotation des spins est appelée mouvement de précession. L'application d'un champ magnétique B<sub>1</sub> perpendiculaire à B<sub>0</sub> 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). L'application d'une transformée de Fourrier permet de passer du signal temporel au signal fréquentiel et d'obtenir ainsi les spectres RMN.

Les spectres obtenus en RMN permettent de déterminer la structure de la molécule analysée. Le spectre unidimensionnel du proton (<sup>1</sup>H) indique le nombre de protons de la molécule en solution. La nature des signaux met en évidence leur environnement chimique. Le déplacement chimique qui se traduit par l'intensité du blindage apporte des informations sur la nature chimique du groupement sur lequel chaque proton est fixé.

Les expériences bidimensionnelles (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) comme les spectres COSY (COrrelatedd SpectroscopY) et ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY) permettent l'étude des corrélations homonucléaires. Ainsi, ils peuvent déterminer la proximité, de liaison ou spatiale, des protons entre eux et obtenir des informations sur la stéréochimie d'une molécule. Les expériences HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) sont basées sur l'étude des corrélations hétéronucléaires entre <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. Les spectres HSQC permettent d'associer un proton à l'atome de carbone auquel il est directement lié (couplage <sup>1</sup>J). Les spectres HMBC permettent quant à eux de déterminer les carbones voisins du carbone portant le proton considéré (couplages <sup>2</sup>J et <sup>3</sup>J). À partir des spectres RMN, la structure semi-développée et la configuration relative des composés étudiés peuvent être déterminées avec certitude.

# b. Appareillage

Les expériences de RMN ont été réalisées en collaboration avec les chercheurs de l'axe Molécules d'Intérêt Biologique (MIB) de l'unité de recherche œnologie EA 4577 et en particulier avec le Pr. Pierre Waffo-Téguo.

Les analyses RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker UltraShield<sup>TM</sup> System Avance 600 NMR, opérant à 600 MHz pour le <sup>1</sup>H, équipé d'une sonde TXI (Triple détection Inverse noyaux X) de 5 mm. Les spectres ont été réalisés, sauf indication contraire, à 300 K dans du méthanol-*d*<sub>4</sub>. Au laboratoire, seuls les spectres bidimensionnels <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC ainsi que le spectre unidimensionnel <sup>1</sup>H sont réalisés. Le traitement des données est réalisé sur le logiciel NMRnotebook (NMRTEC, Illkirch-Graffenstaden, France).

Les spectres <sup>13</sup>C des molécules purifiées ne sont pas disponibles puisqu'ils n'ont pas été réalisés par les opérateurs de RMN à qui les produits étaient confiés.

#### 3. Polarimétrie

#### a. Principe

La polarimétrie est une technique basée sur la mesure de la déviation du plan de polarisation d'une lumière polarisée traversant une solution composée d'une ou de plusieurs molécules chirales. Celles-ci sont optiquement actives, ce qui cause la rotation du plan de polarisation de la lumière quand cette dernière traverse l'échantillon. Pour une substance optiquement active en solution liquide dans un solvant inactif, le pouvoir rotatoire pour une radiation donnée est proportionnel à la concentration *C* de la solution, à la longueur *l* traversée et au pouvoir rotatoire spécifique  $\alpha(\lambda)$  de la substance active dissoute. Ce pouvoir rotatoire, défini comme l'angle de rotation (en degrés) du plan de polarisation de la lumière incidente, est donné par la loi de Biot :

$$\alpha = [\alpha]_T^{\lambda} . l . C$$

La grandeur  $[\alpha]_T^{\lambda}$  est le pouvoir rotatoire spécifique, exprimé en deg.mL.g<sup>-1</sup>.dm<sup>-1</sup>, définie à une température T et mesurée pour une longueur d'onde  $\lambda$ .

Si,  $\alpha = 0$ , alors l'échantillon est optiquement inactif (c'est le cas des mélanges racémiques par exemple)

 $\alpha < 0$ , alors l'échantillon contient plus de formes lévogyres (-)

 $\alpha > 0$ , alors l'échantillon contient plus de formes dextrogyres (+)

# 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 ont été effectuées dans le méthanol et ont été menées à 25 °C. Les données sont traitées sur le logiciel Spectra Manager II (Jasco).

# III. Analyse sensorielle

La recherche de molécules naturelles sapides nécessite le recours à l'analyse sensorielle. Lors de ce travail, deux types de dégustations ont été mis en place : des dégustations dites exploratoires, avec un petit nombre de dégustateurs, et des dégustations de validation avec un panel plus large.

# A. Dégustation « exploratoire »

#### 1. Principe

Dans la **Partie II** de cette thèse, la recherche de composés sapides a été basée sur une stratégie inductive, faite de fractionnements successifs en utilisant des techniques de séparation complémentaires. Le recours à l'analyse sensorielle a permis de guider la purification ; à l'issue de chaque étape, les différentes fractions obtenues ont été dégustées et les plus intéressantes ont été conservées pour la suite du projet. Les composés purs mentionnés dans les autres parties de cette thèse ont également pu être caractérisés. Leurs propriétés organoleptiques ont été établies par analyse sensorielle, ouvrant la voie à l'étude de leur impact dans les vins et les eaux-de-vie.

En revanche, les quantités disponibles pour ces fractions et pour les molécules pures étaient faibles. L'analyse sensorielle étant une technique destructive, un panel de cinq experts, entraîné à la perception des saveurs du vin, a été choisi pour ces dégustations « exploratoires ». Ils ont été informés au préalable de la nature et des risques de l'étude. Des travaux antérieurs ont démontré l'absence de solvants détectables dans les fractions après évaporation à sec et lyophilisation.

Pour chaque fraction et chaque molécule, l'intensité de l'amertume, de la douceur et de l'acidité ont été notées sur une échelle de 0 (non détecté) à 5 (fortement détecté) par ce panel.

### 2. Conditions de la dégustation

Les dégustations se sont déroulées au laboratoire, climatisé à 20 °C. Les fractions et les molécules obtenues ont été dégustées dans des verres standardisés AFNOR (ISO 3591:1977 1977). Les fractions ont été dégustées dans une solution hydro-alcoolique titrant 12 % v/v d'alcool réalisée en diluant un distillat de vin rouge titrant 36 % v/v d'alcool avec de l'eau de source de Montagne Laqueuille, très faiblement minéralisée. En guise de référence, une solution témoin sans ajout a été présentée. Les molécules pures ont été dégustées à une concentration fixe dans deux matrices : de l'eau de source et dans un vin blanc non boisé.

#### **B.** Dégustation de validation

# 1. 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 (ISO 8589:2010 2010) et équipée de postes individuels. Les solutions d'entraînement, les vins et les eaux-de-vie ont été dégustés dans des verres AFNOR noirs (ISO 3591:1977 1977). Sauf indication contraire, les tests ont été réalisés en fin de matinée, c'est-à-dire le moment le plus propice à la dégustation.

Les panels utilisés étaient constitués de chercheurs en œnologie et d'œnologues ayant tous suivi une formation à la dégustation de vin. La composition exacte des panels peut varier d'une analyse sensorielle à une autre. Elle sera, pour la suite de ce travail, précisée dans la partie consacrée à chaque expérience.

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

# a. Test triangulaire

Selon l'organisation internationale de normalisation, le test triangulaire (ISO 4120:2007 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 (**ANNEXE 1**).

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<sub>0</sub>, 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.

Les tests triangulaires ont notamment été utilisés pour la détermination des seuils de détection gustative de molécules purifiées. Le traitement statistique de ce test est basé sur le calcul de la moyenne géométrique  $\overline{G}$  de tous les seuils de détection individuels, selon la formule suivante :

$$\overline{G} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n x_i}$$

Pour chaque session, des concentrations croissantes de la molécule d'intérêt ont été présentées au panel. Chaque seuil individuel a été calculé selon la moyenne géométrique entre la plus basse concentration trouvée appartenant à une suite continue de bonnes réponses et la concentration qui lui est juste inférieure.
#### b. Profil sensoriel

Selon l'organisation internationale de normalisation, l'établissement d'un profil sensoriel (ISO 13299:2016 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 (**ANNEXE 1**). 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 (qui peut être testée à l'aide d'un test de Bartlett ou de Levene)
- l'hypothèse de normalité des résidus (qui peut être testée à l'aide d'un test de Shapiro-Wilks).

L'ANOVA teste les hypothèses suivantes :

$$H_0: m_1 = m_2 = \dots = m_{k1} = m$$
$$H_1: \exists (i, j) tel que m_i \neq m_i$$

- Si la *p-value* > α de se tromper en rejetant H<sub>0</sub>, alors on accepte H<sub>0</sub>. Les modalités ont des moyennes qui ne sont pas différentes les unes des autres.
- Si la *p-value* < α de se tromper en rejetant H<sub>0</sub>, alors on rejette H<sub>0</sub>. 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. Les probabilités calculées (*p-value*) ont été corrigées pour les tests multiples (correction de Benjamini-Hochberg dite FDR – False Discovery Rate) (Benjamini et Hochberg 1995).

#### c. Test de classement

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. Lorsqu'il n'existe pas de hiérarchie supposée entre les différents échantillons, le test statistique à appliquer est le test de Friedman, selon la norme NF ISO 8587:2006.

Les p modalités sont classées par ordre croissant par les n sujets et les sommes des rangs R1, R2, R3..., Rp sont déterminées. On calcule la valeur F:

$$F = \frac{12.\sum_{i=1}^{p} Ri^{2}}{n.p (p+1)} - .n. (p+1)$$

On compare ensuite F aux valeurs critiques de la loi du  $\chi^2$  à (p - 1) degré de liberté :

- Si F >  $\chi^2$  (5 %), les produits sont considérés comme étant significativement différents.
- Si F  $\leq \chi^2$  (5 %), les produits sont considérés comme n'étant pas différentiables.

Dans le cas où une différence globale entre les échantillons est statistiquement prouvée, un test supplémentaire de comparaison multiple des sommes des rangs peut permettre de déterminer la différence éventuelle des échantillons deux à deux. On calcule la plus petite différence significative (PPDS) que l'on compare à la valeur absolue de la différence entre les sommes de rangs de deux produits :

$$PPDS = 1,96 \sqrt{n.p (p+1)/6}$$

- Si | Ri Rj | > PPDS, les modalités i et j sont considérées comme différentes au risque de 5 %.
- Si | Ri Rj | < PPDS, les modalités i et j sont considérées comme non différentiables.

#### 3. Entraînement du panel de dégustateurs à l'eau-de-vie

Le panel de l'ISVV était déjà entraîné à la dégustation des vins, mais pas à celle des eaux-de-vie. L'objectif de cette session d'entraînement était, d'une part, d'habituer le panel aux perceptions sucrées et amères et, d'autre part, de familiariser tous les panélistes à une nouvelle matrice à forte concentration en alcool (40 %, v/v).

#### a. Matériels et méthodes

Le panel était composé de 24 dégustateurs, 7 hommes et 17 femmes, âgés de 20 à 45 ans. Tout d'abord, deux solutions aqueuses contenant respectivement du glucose et du fructose à 10 g/L et du sulfate de quinine à 20 mg/L ont été présentées aux dégustateurs pour illustrer les goûts sucré et amer. Ces solutions ont été réalisées avec de l'eau déminéralisée (eau de source de Montagne, Laqueuille, France). Dans une deuxième séance, des solutions contenant ces composés aux mêmes concentrations, mais dans une eau-de-vie jeune (40 %, v/v), ont été présentées aux dégustateurs. Par la suite, il a été demandé au panel d'évaluer l'intensité des perceptions sucrée et amère de chaque solution sur une échelle de 0 à 10.

#### b. Résultats et discussion

Pour chaque descripteur et pour chaque séance, les hypothèses d'homogénéité des variances ont été confirmées à l'aide du test de Levene (p-value > 0,05). Le traitement des résultats a été réalisé par une analyse de variance à un facteur (ANOVA), dont le principe a été décrit précédemment. Le test statistique a montré des résultats significatifs pour les deux solutions, amères et sucrées, pour chaque séance d'entraînement. Notamment, les p-value associées à la deuxième session étaient de 0,003 pour la solution amère et de 0,0001 pour la solution sucrée. Ainsi, les séances d'entraînement ont permis de montrer la fiabilité et l'aptitude du panel à détecter les goûts sucré des hexoses et amer du sulfate de quinine, et ce même dans une matrice complexe. Ce panel a été choisi par la suite pour déterminer le seuil de détection de molécules sapides dans les eaux-de-vie.

## PREMIÈRE PARTIE

# ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES LIGNANES ET DES COUMARINES DU BOIS DE CHÊNE AU GOÛT DU VIN ET DES EAUX-DE-VIE

#### **PREMIÈRE PARTIE :**

### ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES LIGNANES ET DES COUMARINES DU BOIS DE CHÊNE AU GOÛT DU VIN ET DES EAUX-DE-VIE

#### CHAPITRE I. ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ CHIMIQUE DES LIGNANES DU BOIS DE CHÊNE ET DES PROPRIÉTÉS SENSORIELLES DU LYONIRESINOL DANS LES EAUX-DE-VIE

#### Introduction

La qualité sensorielle d'une eau-de-vie est fortement influencée par les différentes étapes de son élaboration (Cantagrel *et al.* 1992), détaillées dans la bibliographie générale de ce manuscrit. D'un point de vue chimique, les spiritueux constituent une matrice très complexe caractérisée par une forte concentration en éthanol, entre 36 et 55 % v/v d'alcool, et une teneur élevée en composés volatils et non-volatils.

Au cours des dernières décennies, des centaines de composés volatils ont été identifiés dans les spiritueux grâce au développement de techniques analytiques de plus en plus sensibles et résolutives, telles que la Chromatographie Gazeuse couplée à l'Olfactométrie (GC-O) et la Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS) (Lafon, Couillud, et Gaybellile 1973 ; Ledauphin *et al.* 2010 ; 2006 ; Piggott 1983 ; Puentes *et al.* 2018). Ces composés volatils sont principalement des esters, des alcools, des aldéhydes, des acides volatils et des acétals qui proviennent du raisin ou qui ont été formés pendant la fermentation (Lurton, Ferrari, et Snakkers 2012 ; Thibaud, Shinkaruk, et Darriet 2019).

Contrairement aux composés aromatiques, les molécules non-volatiles présentes dans l'eau-de-vie sont acquises exclusivement après la distillation. La plupart d'entre elles sont libérées par le bois de chêne pendant le vieillissement des eaux-de-vie. En effet, comme expliqué dans la bibliographie générale, l'élevage en barriques est une étape cruciale au cours de laquelle les propriétés organoleptiques des spiritueux sont améliorées (MacNamara *et al.* 2011). Plus particulièrement, la couleur, la structure, l'arôme et le goût de l'eau-de-vie sont généralement modifiés (Mosedale et Puech 1998 ; Piggott *et al.* 1993 ; Puech 1987 ; 1984). Alors que les arômes clés de l'élevage en barriques ont largement été identifiés (Chatonnet 1995 ; Tominaga *et al.* 2000), les modifications des propriétés gustatives durant cette étape n'ont été que partiellement expliquées.

Toutefois, un certain nombre d'études ont examiné la composition phénolique des spiritueux. Des composés phénoliques non flavonoïdes ont principalement été identifiés et quantifiés dans des eaux-de-vie âgées, la plupart d'entre eux étant de faible poids moléculaires (Puech 1988 ; 1981). Parmi ceux-ci, il a été reporté que les acides phénols tels que l'acide gallique sont les plus abondants dans les spiritueux, suivis des aldéhydes phénols, des lignanes et des coumarines (Moutounet, Puech, et Rabier 1989 ; Nabeta, Yonekubo, et Miyake 1987 ; Puech et Moutonnet 1992 ; Ribéreau-Gayon *et al.* 2017 ; Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987).

Parmi ces composés non-volatils présents dans les spiritueux, les lignanes occupent une place particulière puisque des études antérieures ont démontré les propriétés amères du lyonirésinol (Arramon 2001 ; Marchal, Waffo-Téguo, et al. 2011) et de divers dérivés (Marchal, Cretin, et al. 2015). Plusieurs travaux ont par la suite été consacrés à ces composés du bois de chêne, qui avaient été peu étudiés jusqu'alors. Les lignanes constituent une classe de métabolites secondaires et proviennent de la voie des phénylpropanoïdes via l'acide shikimique. Ils sont présents dans toutes les parties de la plante mais plus particulièrement dans les pépins, les fruits, les parties lignifiées des plantes vasculaires et les racines (Ayres et Loike 1990). De nombreux aliments et boissons contiennent également des lignanes. Par ailleurs, une étude de 2005 a montré que le vin était la boisson courante la plus riche en lignanes, en particulier en seco-isolaricirésinol, matairésinol, laricirésinol, syringarésinol et isolaricirésinol (Milder et al. 2005). Ces composés proviennent essentiellement du raisin, mais depuis quelques années, les lignanes provenant du bois de chêne ont également été étudiés. En particulier, le lyonirésinol a été décrit comme le lignane le plus abondant dans le bois de chêne et son seuil de détection gustative a été établi à 1,5 mg/L dans le vin (Marchal, Cretin, et al. 2015). Une étude complémentaire a montré que seul le (+)-lyoniresinol était amer (Cretin et al. 2015), avec un seuil de détection de 0,5 mg/L dans les vins (Cretin, Dubourdieu et Marchal 2016). Cet énantiomère a été quantifié dans divers vins à des concentrations supérieures à cette valeur, démontrant sa contribution significative à l'amertume des vins (Cretin, Dubourdieu et Marchal 2016).

Néanmoins, les propriétés sensorielles d'une molécule, et en particulier son seuil de détection, peuvent être fortement influencées par la nature de la matrice d'un point de vue olfactif ou gustatif (Chatonnet *et al.* 1992 ; Gammacurta *et al.* 2018 ; Mackey et Valassi 1956 ; Poisson et Schieberle 2008). La contribution sensorielle des lignanes au goût des eaux-de-vie ne peut donc être présumée à partir des résultats obtenus dans le vin. Une meilleure

connaissance de la composition du bois de chêne et des spiritueux apparaît stratégique pour améliorer la qualité de ces produits à fort intérêt économique. Ainsi, cette thèse vise dans un premier temps à préciser l'incidence gustative des lignanes du bois de chêne dans les eaux-devie.

#### I. Diversité chimique des lignanes du bois de chêne dans les spiritueux

Plusieurs lignanes ont déjà été identifiés dans le bois de chêne utilisé pour la fabrication des fûts destinés à l'élevage des eaux-de-vie. Ces composés étant extractibles, il est plausible qu'ils soient libérés au cours de la maturation des eaux-de-vie, de façon similaire à ce qui a été observé pour les vins. Toutefois, la nature de la matrice et les conditions de l'élevage différant sensiblement entre les vins et les spiritueux, il nous a semblé nécessaire d'étudier dans un premier temps la présence des principaux lignanes du bois de chêne dans les eaux-de-vie.

#### A. Matériels et méthodes

Un extrait de bois de chêne et une eau-de-vie de Cognac ont été utilisés afin de comparer la présence des lignanes dans ces deux matrices. Pour le premier échantillon, une extraction solide-liquide de copeaux de bois de chêne sessile « non-chauffé » a été réalisée. A cette fin, 25 g de sciure ont été macérés dans 250 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/EtOH (50:50 ; v:v), pendant deux semaines, à température ambiante. L'eau-de-vie de Cognac, fournie par la maison Rémy-Martin, a été élevée pendant 23 ans en barriques. Ces deux échantillons ont été dilués par cinq avec de l'eau ultra pure puis filtrés à 0,45  $\mu$ m avant d'être injectés en LC-HRMS.

A partir des données bibliographiques et de précédentes études réalisées au laboratoire, une liste de onze lignanes a été établie. Les rapports m/z théoriques des ions quasi-moléculaires correspondant à ces composés ont été calculés à partir de leur formule brute puis recherchés à l'aide de l'application Qualbrowser du logiciel Xcalibur.

Les conditions chromatographiques et les paramètres spectrométriques précédemment décrits (Cretin, Dubourdieu et Marchal 2016 ; Marchal, Cretin, *et al.* 2015), sont rappelés dans les **Tableau 3** et **Tableau 4**.

**Tableau 3 :** Conditions chromatographiques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne et de l'eau-de-vie de Cognac.

Appareil : U-HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific)										
Logicie	Logiciel : Xcalibur 3.0 pour Exactive									
Colonn	e : Hypersil Gold	C18;	100 x 2	2,1 mm	; Taill	e des p	articul	es 1,9 j	um	
Phase r	nobile : Débit à 60	0 μL/1	min							
	Solvant A : H <sub>2</sub> O ultrapure									
	Solvant B : ACN LC-MS Optima									
	Gradient :									
Temps (min): 0 0,5 1,5 2,0 4,5 4,6 6,9 7,0 8,6										
% de B : 14 14 19 19 38 98 98 14 14										
Injection : 5 µL										

**Tableau 4 :** Conditions spectrométriques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne et de l'eau-de-vie de Cognac.

Paramètre	Mode négatif
Débit du « sheath gas » <sup>a</sup>	75
Débit du gaz auxiliaire <sup>a</sup>	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 <sup>b</sup>	25 000
AGC <sup>c</sup>	$10^6$ ions
Gamme de masses	200 - 800 Th

<sup>a</sup> Les débits du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires

<sup>b</sup> Résolution  $m/\Delta m$ , fwhm à m/z 200 Th

<sup>c</sup> Contrôle automatique de gain

#### **B.** Résultats et Discussion

A l'aide d'un protocole de purification guidé par LC-HRMS, onze lignanes (composés 1 à 11, **Figure 9**), dérivés naturels du lyonirésinol, avaient été isolés et identifiés au laboratoire à partir d'un extrait de bois de chêne (Marchal, Cretin, *et al.* 2015 ; Sindt *et al.* 2016). En outre, la présence de ces 11 lignanes avait été établie par criblage LC-HRMS dans des vins boisés, ce qui confirmait leur libération au cours de l'élevage ainsi que leur stabilité dans le vin. Une semiquantification avait permis d'estimer leurs teneurs, exprimées en équivalent de lyonirésinol, selon la méthode décrite par Marchal *et al.* (Marchal, Cretin, *et al.* 2015). Les résultats ont montré que le lyonirésinol est le plus abondant des lignanes, tant dans le bois de chêne que dans les vins boisés (Cretin 2016). En outre, certains dérivés galloylés, glucosylés et xylosylés ont été décrits comme étant amers, mais avec une intensité inférieure à celle du lyonirésinol (Marchal, Cretin, *et al.* 2015).



Figure 9 : Structure chimique des lignanes 1 à 11. Xyl, Glu et Gall correspondent, respectivement, au  $\beta$ -xylopyranose,  $\beta$ -glucopyranose et galloyle.

La présence de ces 11 lignanes a été recherchée en criblant une eau-de-vie de Cognac. La LC-HRMS est une technique performante pour le criblage d'extraits complexes. Elle permet de rechercher des ions m/z caractéristiques de composés cibles de façon spécifique, en raison de sa grande précision de mesure de masse (< 5 ppm). Des chromatogrammes d'ions extraits (XIC) correspondant aux rapports m/z des ions déprotonés ([M-H]<sup>-</sup>) du (±)-lyonirésinol et des lignanes 1 à 11 ont été obtenus pour un extrait de bois de chêne et pour une eau-de-vie de Cognac (**Figure 10**).



**Figure 10 :** XIC en ionisation négative correspondant aux ions [M-H]<sup>-</sup> du lyonirésinol et des lignanes 1 à 11 (du haut vers le bas) dans un extrait de bois de chêne (a) et dans une eau-de-vie de Cognac (b).

Des signaux similaires ont été détectés pour les deux matrices. En effet, la comparaison des temps de rétention (< 0,02 min), des masses précises des ions  $[M-H]^-$  (< 5 ppm) et des

produits de fragmentation non-résonante HCD ont démontré que les lignanes 1 à 11 étaient tous présents dans l'eau-de-vie analysée.

La présence du lyonirésinol avait déjà été établie dans des extraits de bois de chêne (Arramon 2001 ; Seikel, Hostettler, et Niemann 1971) et dans des spiritueux (Arramon 2001 ; Koga *et al.* 2007 ; MacNamara *et al.* 2011 ; Nabeta, Yonekubo et Miyake 1987), tout comme les lignanes 7 et 8 (Sindt *et al.* 2016). En revanche, les lignanes 1-6 et 9-11 avaient déjà été décrits dans les vins (Marchal, Cretin, *et al.* 2015 ; Sindt *et al.* 2016), mais jamais dans les spiritueux. En outre, la comparaison de l'intensité du signal de tous les composés suggère que le lyonirésinol est le lignane le plus abondant dans les spiritueux, confirmant de précédentes études sur le vin (Cretin 2016 ; Marchal, Cretin, *et al.* 2015).

Le seuil de détection gustative d'un composé est la concentration au-delà de laquelle cette molécule est perçue par la moitié d'un panel. En fonction de la molécule, la nature de la matrice peut avoir un effet plus ou moins fort sur ce seuil. Par exemple, le seuil de détection de la caféine, un composé amer, a été calculé dans deux matrices distinctes : dans de l'eau et dans une boisson alimentaire à 94 et 184 mg/kg, respectivement (Mackey et Valassi 1956). Ces résultats soulignent l'importance de calculer, pour chaque matrice, le seuil de détection de la molécule ciblée. Dans le cas présent, le seuil de détection gustative du lyonirésinol doit donc être évalué dans les eaux-de-vie.

#### II. Étude de la contribution sensorielle du lyonirésinol au goût des eaux-de-vie

#### A. Entraînement et validation du panel de dégustateur

L'entraînement et la validation du panel de dégustateur pour les eaux-de-vie ont été décrits dans la **partie expérimentale générale III. B. 3**. C'est ce panel qui a été choisi pour la détermination du seuil de détection gustative du lyonirésinol dans les eaux-de-vie.

#### B. Détermination du seuil de détection du lyonirésinol dans les eaux-de-vie

#### 1. Matériels et méthodes

Le seuil de détection du lyonirésinol a été déterminé dans une eau-de-vie blanche dont le taux d'alcool volumique a été réduit à 40 %. Afin d'éviter d'éventuels phénomènes de saturation ou de rémanence dus à la matrice forte en alcool, deux sessions différentes ont été organisées. Pour chacune d'elle, des tests triangulaires ont été présentés aux dégustateurs, selon la méthodologie décrite par les normes ISO 4120:2007 (ISO 4120:2007 2007). Trois concentrations croissantes ont été présentées au panel lors de la première session : 2, 4 et 8 mg/L. Les concentrations présentées à chaque dégustateur lors de la seconde session dépendaient de leurs résultats lors de la première session. En effet, si le panéliste donnait des réponses correctes, il dégustera à nouveau la concentration la plus basse pour laquelle il a donné une bonne réponse, afin de confirmer son jugement, ainsi que 2 concentrations inférieures (0,5 et 1 mg/L). En revanche, si le panéliste ne trouvait aucune bonne réponse, trois concentrations plus hautes lui étaient présentées (8, 16 et 32 mg/L), en suivant également la progression géométrique de raison 2. Les conditions de la dégustation et le traitement des résultats sont expliqués dans la **partie expérimentale générale III. B**.

#### 2. Résultats et discussion

Le seuil de détection gustative du lyonirésinol a déjà été établi précédemment dans un vin blanc par Marchal *et al.* (Marchal, Cretin, *et al.* 2015) et a été estimé à 1,5 mg/L. Par ailleurs, la purification et la caractérisation de la configuration absolue de ses énantiomères ont mis en évidence que seul le (+)-lyonirésinol possède une forte amertume, alors que la forme lévogyre est insipide (Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016 ; Cretin *et al.* 2015). Le (+)-lyoniresinol n'étant pas disponible, en quantité suffisante dans le laboratoire, pour déterminer son seuil de détection dans les eaux-de-vie, les études sensorielles présentées dans ce travail ont été réalisées avec le mélange racémique, naturellement présent dans le bois de chêne (Nabeta, Yonekubo, et Miyake 1987).

Dans les eaux-de-vie, le seuil du lyonirésinol a été établi à 2,6 mg/L, avec des variabilités interindividuelles très importantes allant de 0,35 à 32 mg/L. La même tendance avait été décrite pour le vin blanc, avec des seuils de détection individuels qui s'étalaient de 0,125 à 11,3 mg/L (Marchal, Cretin, *et al.* 2015). Néanmoins, les valeurs obtenues pour l'eaude-vie sont globalement plus élevées que celles dans le vin. Ces variations pourraient être dues en partie à la concentration plus élevée en éthanol dans la matrice eau-de-vie. En outre, ces résultats confirment une étude préliminaire réalisée sur une eau-de-vie d'Armagnac où une valeur proche avait été évoquée (Arramon 2001). Cependant, la méthodologie employée dans cette étude n'avait pas permis une analyse statistique, due au faible nombre de dégustateurs (5), ce qui affecte la robustesse de ce résultat. Il s'agissait davantage d'une estimation que d'un seuil fiable.

Afin de déterminer l'influence du lyonirésinol sur l'amertume des eaux-de-vie, il est nécessaire de réaliser un dosage de ce dernier dans divers échantillons d'eaux-de-vie et de comparer les concentrations obtenues à son seuil de détection.

#### III. Quantification du lyonirésinol dans diverses eaux-de-vie

#### A. Développement d'une méthode de dosage du lyonirésinol

1. Méthodologie

#### a. Préparation des échantillons

Les échantillons d'eaux-de-vie destinés à l'analyse quantitative présentaient des pourcentages d'alcool de 71 à 38 % v/v. Afin de prévenir une éventuelle détérioration de la séparation chromatographique, les échantillons ont été dilués avec de l'eau ultra-pure pour ramener leur taux d'alcool volumique à 8 %, puis filtrés à 0,45 µm avant d'être injectés en LC-HRMS. Cette dilution permet également de ramener toutes les concentrations en analytes dans la plage de travail. Le facteur de dilution appliqué est pris en compte pour le calcul de la concentration finale.

#### b. Préparation des solutions de calibration

Une solution mère à 1 g/L de (±)-lyoniresinol a été préparée dans de l'éthanol. Une gamme d'étalonnage a été réalisée par dilutions successives de cette solution mère dans une solution hydro-éthanolique (8 %, v/v) pour obtenir les concentrations suivantes : 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 500  $\mu$ g/L, 200  $\mu$ g/L, 100  $\mu$ g/L, 50  $\mu$ g/L, 20  $\mu$ g/L, 10  $\mu$ g/L, 5  $\mu$ g/L, 2  $\mu$ g/L et 1  $\mu$ g/L.

#### c. Analyse par LC-FTMS et traitement des résultats

Des études antérieures ont montré la pertinence de l'utilisation de la LC-HRMS pour quantifier le lyonirésinol dans les vins et les macérats de bois de chêne (Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016 ; Marchal, Cretin, *et al.* 2015).

Les conditions chromatographiques décrites dans le **Tableau 3** ont été utilisées pour la quantification du lyonirésinol dans les eaux-de-vie. La méthode LC-HRMS décrite dans le **Tableau 4** avait été utilisée pour la quantification de ce lignane dans les vins ; et impliquait une ionisation en mode négatif (Marchal, Cretin, *et al.* 2015). Des tests préliminaires ont été effectués dans les mêmes conditions et ont montré des résultats insuffisants en ce qui concerne la linéarité et la précision avec des échantillons d'eaux-de-vie. Par conséquent, une méthode de quantification basée sur le mode d'ionisation positive a été développée pour cette matrice. La quantification LC-HRMS a été effectuée en mode de balayage total, la sélectivité de la détection étant assurée par la précision de la mesure de masse de l'analyseur Orbitrap (< 3 ppm) et la répétabilité du temps de rétention.

Le spectre HRMS du lyonirésinol ( $C_{22}H_{28}O_8$ ) présentait plusieurs ions correspondant à des adduits ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ) ; des pseudo-dimères ( $[2M+H]^+$ ,  $[2M+Na]^+$ ) ; et des fragments ( $C_{14}H_{17}O_4^+$ ,  $C_{14}H_{19}O_5^+$ ). En revanche, le signal correspondant à l'ion protoné ( $C_{22}H_{29}O_8^+$ ) était très faible, quels que soient les paramètres d'ionisation (**Figure 11**). Par conséquent, la quantification a été effectuée à partir de l'ion le plus intense, l'ion fragment de m/z 249,1121 ( $C_{14}H_{17}O_4^+$ ). Cette espèce chimique pourrait résulter d'une perte d'un groupement diméthoxyphénol ( $C_8H_{10}O_3$ ) et d'une déshydratation. De telles réactions de fragmentation sont bien connues pour les dérivés de la lignine (Li *et al.* 2016) et peuvent être causées par des températures élevées (Jenkins, Sutton, et Robichaud 2016). Ainsi, les paramètres spectrométriques ont été ajustés pour optimiser l'intensité du signal de l'ion m/z 249,1121 (**Tableau 5**). Toutes les données ont été traitées automatiquement par l'application Quanbrowser du logiciel Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Les XIC ont été créés, avec une fenêtre de 3 ppm, autour de la masse m/z théorique de l'ion  $C_{14}H_{17}O_4^+$  et de son temps de rétention à 2,9 minutes.

Tableau 5	<b>5</b> : Conditions	d'ionisation	et paramètres	spectrométriques	pour la	quantification	1 du
lyonirésin	ol dans divers	es eaux-de-vie	e.				

Paramètre	Mode positif
Débit du « sheath gas » <sup>a</sup>	75
Débit du gaz auxiliaire <sup>a</sup>	20
Débit du « sweep gas »	0
Tension du spray	3,5 kV
Température du capillaire	350 °C
Tension du capillaire	35 V
Tension du tube lens	120 V
Tension du skimmer	18 V
Température de la source	320 °C
Résolution <sup>b</sup>	25 000
AGC <sup>c</sup>	$10^6$ ions
Gamme de masses	200 - 800  Th

<sup>a</sup> Les débits du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires

<sup>b</sup> Résolution  $m/\Delta m$ , fwhm à m/z 200 Th

<sup>c</sup> Contrôle automatique de gain



Figure 11 : Spectre HRMS du lyonirésinol en ionisation positive.

#### 2. Validation de la méthode de quantification

La méthode de quantification du lyonirésinol dans les eaux-de-vie doit être validée en étudiant la sensibilité, la linéarité, la répétabilité, la justesse et la spécificité. Le **Tableau 6** récapitule toutes les données étudiées.

#### a. Sensibilité

Compte tenu de la grande sélectivité de mesure de masse de l'analyseur Orbitrap, la notion de rapport signal sur bruit, classiquement utilisée, est discutable pour cette technique. La limite de détection d'une molécule est définie comme la plus faible concentration de cette molécule pour laquelle un signal fiable et reproductible est observé. En outre, le signal doit être différent de celui d'un blanc réalisée dans les mêmes conditions. Pour déterminer la sensibilité, la méthodologie décrite par De Paepe *et al.* a été utilisée (De Paepe *et al.* 2013). Les cinq niveaux les plus bas de la gamme de calibration (de 2 à 50  $\mu$ g/L) ont été injectés cinq fois. La précision (% Coefficient de Variation) et la justesse (ratio de recouvrement) ont été calculées pour chaque concentration.

La limite de détection (LOD) du lyonirésinol a été définie comme la concentration la plus basse pour laquelle un signal fiable et répétable a été observé. En outre, le signal doit être différent d'un blanc réalisé dans les mêmes conditions. Cette limite de détection a été établie ici à 5  $\mu$ g/L. La limite de quantification (LOQ) est définie comme la concentration la plus basse de la molécule pouvant être déterminée quantitativement par la méthode avec une variabilité mesurée, soit avec une précision inférieure à 10 % et une justesse supérieure à 90 %. Dans ces conditions, elle a été établie à 10  $\mu$ g/L. La sensibilité est suffisante au regard des concentrations.

#### b. Linéarité

La linéarité a été étudiée sur une gamme de concentration comprise entre la limite de quantification déterminée précédemment et le standard le plus élevé (10 mg/L), de telle sorte que tous les échantillons analysés se situent entre ces limites. Une courbe de calibration quadratique, avec une pondération en 1/x, a été obtenue avec un bon coefficient de corrélation (R<sup>2</sup> de 0,9999) pour une gamme de concentration allant de 10 µg/L à 10 mg/L. Le rapport de recouvrement entre la concentration mesurée et celle attendue était supérieur à 90 %. Ces résultats établissent la linéarité de la méthode.

#### c. Spécificité

La spécificité de l'Orbitrap a été évaluée par la précision de mesure des masses et la répétabilité des temps de rétention. Les paramètres ont été vérifiés pour chaque injection des solutions de calibration ainsi que pour tous les échantillons. Des faibles variations du temps de rétention ont été observées (< 0,04 min). Des écarts entre la masse théorique et la masse mesurée inférieurs à 2,2 ppm ont été enregistrés pour les différentes concentrations en lyonirésinol. La spécificité de la méthode est donc validée.

#### d. Répétabilité et justesse

Pour déterminer la répétabilité intra-journalière (% Coefficient de Variation), cinq réplicats de deux solutions de calibration (100  $\mu$ g/L et 1 mg/L) ont été injectés successivement. Des valeurs inférieures à 3,5 % ont été obtenues pour les deux concentrations, garantissant la répétabilité de la méthode.

La justesse a été déterminée en calculant le rapport de recouvrement entre la concentration mesurée et celle attendue pour trois échantillons d'eaux-de-vie de Cognac, dans lesquels un ajout dosé de 100  $\mu$ g/L, 1 et 2 mg/L de lyonirésinol a été réalisé. Ces ratios de recouvrement variaient de 85 % à 98 %. Ces légères variations pourraient s'expliquer par la matrice très complexe des spiritueux. Toutefois, les résultats sont restés conformes aux spécifications communes (Guidance for Industry 2018) et ont permis d'établir la justesse de la méthode.

La répétabilité inter-journalière a été estimée par injection des mêmes solutions étalons pendant 5 jours consécutifs. Comme on l'observe fréquemment pour l'analyse LC-ESI-MS, les valeurs des coefficients de variation étaient assez élevées. Pour résoudre ce problème, toutes les solutions de calibration ont été injectées pour chaque analyse quantitative d'un échantillon inconnu.

Tous ces résultats permettent de valider la méthode LC-HRMS pour quantifier le lyonirésinol dans tous les spiritueux (**Tableau 6**).

Paramètres	Matrice – Eau-de-vie					
G	LOD	(µg/L)	<b>LOQ (μg/L)</b> 10			
Sensibilite	5	5				
T :	Gamme d	e linéarité	<b>R</b> <sup>2</sup>			
Linearite	10 µg/L –	- 10 mg/L	0,9999			
Spácificitá	Variat	tion t <sub>R</sub>	Exactitude de la masse			
specificite	< 0,04	4 min	< 2,2 ppm			
	Répétabilité intra-journalière					
	100	µg/L	1 mg/L			
	3,35	5 %	3,43 %			
Répétabilité et	Justesse					
justesse	Echantillons	100 µg/L	1 mg/L	2 mg/L		
	EDV-C7	94 %	91 %	98 %		
	EDV-C8	87 %	85 %	97 %		
	EDV-1995	88 %	86 %	87 %		

**Tableau 6 :** Paramètres de validation de la méthode de quantification du lyonirésinol dans

 l'eau-de-vie. La justesse a été mesurée dans trois échantillons d'eaux-de-vie.

LOD : Limite de détection ; LOQ : Limite de quantification ; EDV : eau-de-vie.

#### B. Dosage du lyonirésinol dans des eaux-de-vie commerciales

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

Le lyonirésinol a été quantifié dans 24 eaux-de-vie commerciales, incluant 12 cognacs (C), 4 eaux-de-vie de vin (B), 3 rhums (R), 4 whiskies (W) et 1 bourbon (Bo). Toutes ces eauxde-vie ont été élevées en fûts de chêne, avec des durées d'élevage non précisées mais variables. L'ANNEXE 2 résume l'ensemble des caractéristiques de ces spiritueux, qui ont été choisis au hasard parmi ceux disponibles dans le commerce, pour les grandes catégories de produits élevés sous bois de chêne, bien distribuées en France.

#### 2. Résultats et discussion

Plusieurs spiritueux commerciaux ont été analysés pour évaluer les teneurs en lyonirésinol, selon la méthode LC-HRMS préalablement validée. Ce lignane a été détecté dans tous les échantillons, à des concentrations allant de 0,2 à 11,8 mg/L avec une valeur moyenne de 3,3 mg/L (**ANNEXE 3**). Les résultats sont illustrés à la **Figure 12**.

Les spiritueux, présentant des teneurs en lyonirésinol les plus élevées, étaient majoritairement des cognacs (C-2 et C-5 à C-11) suivi de deux eaux-de-vie de vin (B-1 et B-2), un rhum (R-3) et un whisky (W-3). La comparaison avec les données sensorielles a montré que la concentration en lyonirésinol était supérieure au seuil de détection gustative (Sd) pour 12 de ces spiritueux. Ces résultats démontrent la pertinence sensorielle du lyonirésinol puisqu'il est susceptible de contribuer à l'amertume des eaux-de-vie élevées en barriques.



**Figure 12 :** Concentrations en lyonirésinol dans 24 eaux-de-vie commerciales. La ligne en rouge représente le seuil de détection gustative (Sd) dans l'eau-de-vie.

Par ailleurs, toutes les eaux-de-vie analysées ont été élevées en barriques, et les écarts observés pourraient ainsi être liés aux conditions de vieillissement. En effet, une précédente étude a mis en évidence un effet du type de contenant sur la teneur en lyonirésinol dans des vins blancs, plus élevée si le fût est neuf (Marchal, Cretin, *et al.* 2015). La disparité des concentrations observées dans les eaux-de-vie analysées pourrait donc être reliée à la proportion de barriques neuves utilisées pendant leur vieillissement.

Parmi les autres facteurs susceptibles d'affecter la composition chimique du bois de chêne, il est bien connu que l'espèce botanique joue un rôle important, pour certaines molécules (De Rosso, Cancian, *et al.* 2009 ; Marchal, Prida et Dubourdieu 2016 ; Prida *et al.* 2006). Cependant, Cretin *et al.* ont démontré que ce paramètre n'avait pas d'effet significatif sur la teneur en lyonirésinol (Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016).

Par ailleurs, lors de la fabrication des fûts, le bois subit une série d'étapes qui influencent sa qualité œnologique, comme le séchage des merrains ou la chauffe des douelles. Ces caractéristiques œnologiques affectent la structure et la composition chimique du bois, et par conséquent la matrice avec laquelle il est en contact (Canas *et al.* 2006 ; Chatonnet *et al.* 1994 ; Brígida Fernández de Simón *et al.* 2010 ; Mosedale, Puech et Feuillat 1999 ; Snakkers *et al.* 2003). Une de ces observations a été confirmée par Cretin *et al.* (Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016). En effet, ces auteurs ont montré que le lyonirésinol n'était dégradé qu'au-delà de 250 °C, rejoignant en partie les conclusions d'une autre étude (Sarni *et al.* 1990).

#### C. Dosage du lyonirésinol dans plusieurs eaux-de-vie de Cognac

#### 1. Effet de l'âge sur la teneur en lyonirésinol

#### a. Nature et origine des échantillons

Ces eaux-de-vie de Cognac ont été fournies par la maison Rémy-Martin. Dix millésimes, de 1970 à 2015, ont été sélectionnés pour cette étude. Pour chaque millésime, un échantillon a été prélevé dans cinq barriques différentes, pour limiter les écarts liés à l'hétérogénéité du bois de chêne d'une barrique à une autre. En outre, ces eaux-de-vie sont toujours en cours d'élevage. Elles ne résultent donc pas d'un assemblage et ne sont pas commercialisées pour le moment. Les échantillons proviennent de la même distillerie et sont élevés selon les mêmes conditions.

#### b. Résultats et discussion

Pour chaque millésime, un échantillon a été prélevé sur 5 barriques différentes puis les eaux-de-vie ont été analysées en LC-HRMS. Les concentrations présentées à la **Figure 13** correspondent aux valeurs moyennes de ces 5 réplicats.

Les teneurs moyennes mesurées variaient de 1,6 mg/L (millésime 2015) à 12 mg/L (millésime 1995). Pour chaque millésime, le coefficient de variation entre les 5 réplicats était relativement faible (de 5,7 % à 33,2 %), révélant une assez bonne homogénéité entre les barriques sélectionnées (**ANNEXE 3**).



**Figure 13 :** Teneurs en lyonirésinol dans des eaux-de-vie de Cognac de différents millésimes provenant de la même distillerie.

De 2015 à 1995, les résultats montrent que plus l'eau-de-vie est vieillie, plus les teneurs en lyonirésinol sont élevées, confirmant de précédentes études (Arramon 2001 ; Cretin *et al.* 2015 ; Koga *et al.* 2007). A l'inverse, pour les plus vieux millésimes, des concentrations plus faibles en lyonirésinol ont été mesurées. Cette observation pourrait suggérer une dégradation du lyonirésinol après un long vieillissement en fûts. D'autre part, le vieillissement en fûts usagés implique un potentiel d'extractibilité des composés inférieur à celui des barriques neuves, ce qui pourrait influencer la teneur en lyonirésinol dans ces eaux-de-vie millésimes. Toutefois, cette hypothèse doit être étudiée plus en détail, car ces résultats pourraient également être dus à des modifications des pratiques de vieillissement de la distillerie ou à des changements dans l'approvisionnement en barriques.

En comparant l'analyse quantitative avec l'analyse sensorielle, les résultats ont démontré que le lyonirésinol contribue significativement à l'amertume des eaux-de-vie. Or, il est bien connu que les spiritueux se bonifient pendant l'élevage en barriques, et notamment que leur saveur douce augmente. L'influence d'autres composés sapides a également été mise en évidence. A titre d'exemple, les quercotriterpénosides (QTT) à saveur sucrée (Marchal, Waffo-Téguo, *et al.* 2011), sont libérés par le bois de chêne en même temps que le lyonirésinol et peuvent en moduler l'effet sur l'équilibre gustatif des eaux-de-vie. Il serait intéressant par la suite d'étudier les interactions perceptives entre effecteurs du goût pour déterminer si de tels effets de masquage ou de synergie se produisent, et quelle est leur incidence sur le goût des spiritueux.

#### 2. Influence des paramètres de tonnellerie sur une même eau-de-vie de Cognac

La méthode de quantification développée précédemment a également été appliquée à des eaux-de-vie faisant l'objet d'expérimentation par la maison Rémy-Martin. Deux paramètres de tonnellerie, la taille des grains et l'origine du bois, ont été étudiés sur une même eau-de-vie de Cognac, afin d'évaluer leur influence sur les teneurs en lyonirésinol dans cette matrice et ainsi limiter une dépréciation de l'équilibre gustatif.

#### a. Nature et origine des eaux-de-vie analysées

Deux séries d'eaux-de-vie ont été fournies par la maison Rémy-Martin, provenant de deux essais différents. La première étude s'est portée sur la sélection de barriques à gros grain ou à grain fin pour l'élevage des spiritueux. Pour chaque modalité, un échantillon a été prélevé dans dix barriques différentes, pour limiter les écarts liés à l'hétérogénéité du bois de chêne d'une barrique à une autre. Ces 20 eaux-de-vie de Cognac ont subi un élevage en barriques pendant 36 mois.

Pour la deuxième étude, cinq types de fûts différents ont été étudiés. Les modalités correspondent à deux essences différentes, le chêne et le châtaignier, ainsi qu'à quatre origines géographiques distinctes pour le bois de chêne (France, Europe, Caucase, Etats-Unis). Pour chaque modalité, un échantillon a été prélevé dans trois barriques différentes. Ces mêmes eauxde-vie ont été prélevées à trois dates distinctes au cours de l'élevage en barriques, au bout de 6 mois, 12 mois et 23 mois.

#### b. Traitements statistiques

Le test de Kruskal-Wallis est souvent utilisé comme une alternative à l'ANOVA dans le cas où l'hypothèse de normalité n'est pas acceptable. C'est un test non paramétrique à utiliser quand il y a k échantillons indépendants, afin de déterminer s'ils proviennent d'une même population ou si au moins un échantillon provient d'une population différente des autres. Son principe est le suivant :

Si on désigne par  $M_i$  le paramètre de position l'échantillon i, les hypothèses nulle  $H_0$  et alternative  $H_a$  du test de Kruskal-Wallis sont

$$H_0: m_1 = m_2 = \dots = m_{k1} = m$$
$$H_1: \exists (i,j) tel que m_i \neq m_j$$

- Si la *p-value* > α de se tromper en rejetant H<sub>0</sub>, alors on accepte H<sub>0</sub>. Les modalités ont des moyennes qui ne sont pas différentes les unes des autres.
- Si la *p-value* < α de se tromper en rejetant H<sub>0</sub>, alors on rejette H<sub>0</sub>. Il existe au moins une modalité dont la moyenne est différente des autres moyennes.

Si la *p-value* est telle que l'on doit rejeter l'hypothèse  $H_0$ , alors au moins un échantillon (ou groupe) est différent d'un autre. Afin d'identifier quels échantillons sont responsables du rejet de  $H_0$ , il est possible d'utiliser une procédure de comparaisons multiples. Celui utilisé tout au long de la thèse est le test de Dunn (comparaison des moyennes des rangs).

### c. Influence de l'essence et de l'origine géographique du bois sur la teneur en lyonirésinol

Des travaux antérieurs ont montré que l'essence ainsi que l'origine botanique avaient un fort impact sur la composition chimique du bois (Canas, Leandro, *et al.* 2000 ; Brigda Fernández de Simón *et al.* 2014 ; Brígida Fernández de Simón, Martínez, *et al.* 2014). La sélection des bois constitue ainsi une étape importante de la fabrication des barriques. Une meilleure connaissance des marqueurs affectés par cette sélection permettrait de l'orienter avec plus d'acuité.

Les valeurs présentées à la **Figure 14** correspondent aux concentrations moyennes obtenues pour les 3 réplicats de chaque modalité. Elles oscillent entre 0,09 mg/L à 1,8 mg/L (**ANNEXE 3**). Après le dosage de ces échantillons, un test de Kruskal-Wallis avec la procédure de Dunn (comparaison multiple par paires) a été effectué. Les résultats ont montré une augmentation significative des teneurs en lyonirésinol au cours du vieillissement dans toutes les eaux-de-vie élevées en fûts de chêne, confirmant une étude antérieure (Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016). A l'inverse, des concentrations constantes et faibles en ce composé ont été mesurées pour les eaux-de-vie élevées en barriques de châtaignier (**Figure 14**) ; des tendances similaires ont été observées pour d'autres composés non-volatils (De Rosso, Panighel, *et al.* 2009). En outre, il n'y a pas d'effet significatif de l'origine botanique du bois de chêne sur la teneur en lyonirésinol dans les diverses eaux-de-vie de Cognac au même temps d'élevage, ce qui rejoint les résultats de précédentes études sur l'influence des espèces de chêne (Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016).



**Figure 14 :** Teneurs en lyonirésinol dans des eaux-de-vie de Cognac élevées dans des fûts de différentes origines. « a », « b » et « c » représentent des groupes de significativité ; NS : Non Significatif.

Les valeurs obtenues pour les teneurs en lyonirésinol, après 23 mois d'élevage en barriques, sont inférieures à son seuil de détection gustative dans cette matrice. Ainsi, le lyonirésinol ne semble pas contribuer à l'équilibre gustatif des eaux-de-vie en dessous de ce temps de vieillissement.

#### d. Influence de la sélection gros grain/grain fin sur la teneur en lyonirésinol

La qualité du bois de chêne dépend de l'épaisseur de son grain. Celui-ci se définit comme la largeur moyenne et la régularité des cernes d'accroissement (Collardet et Besset 1992).

Les concentrations présentées à la **Figure 15** correspondent aux valeurs moyennes obtenues pour les 10 réplicats pour chaque modalité. Les valeurs s'élèvent respectivement à 5,2 mg/L et à 3,4 mg/L pour les modalités « gros grain » et « grain fin » (**ANNEXE 3**). Une ANOVA à un facteur a mis en évidence une différence significative, au seuil de 0,1 %, entre les deux modalités pour les concentrations en lyonirésinol. En outre, le coefficient de variation entre les 10 réplicats était faible pour chaque modalité (5,4 % pour la sélection gros grain et 10,1 % pour la sélection grain fin), ce qui révèle une bonne homogénéité entre les barriques sélectionnées.





Les résultats montrent que les barriques à gros grain libèrent plus de lyonirésinol que celles à grain fin. Empiriquement, le type de grain était souvent associé à l'origine botanique du bois de chêne. En effet, des travaux ont démontré que le chêne sessile possède un grain fin tandis que le chêne pédonculé possède un grain plus épais (Feuillat, Huber, et Keller 1992). Cependant, Cretin *et al.* ont démontré qu'il n'y avait aucun effet significatif de l'espèce de chêne sur la teneur en lyonirésinol (Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016).

Parallèlement, les barriques à grain fin conviendraient davantage à l'élevage des vins et celles à gros grain à l'élevage des eaux-de-vie (Ribéreau-Gayon *et al.* 2017). En outre, il a été démontré que les chênes à gros grain sont plus riches en composés extractibles (ellagitannins, lignines) et plus pauvres en composés aromatiques que les chênes à grain fin (Vivas 1997), ce qui semble être en accord avec les résultats du dosage. Ainsi, l'utilisation de barriques à grain fin pourrait permettre de limiter les teneurs en lyonirésinol dans les eaux-devie après 3 années de maturation. Il est délicat d'extrapoler ces résultats pour des durées d'élevage plus importantes, car la cinétique de libération du lyonirésinol peut être différentielle entre les deux modalités. La poursuite de l'expérimentation mise en place permettra de répondre à cette interrogation.

En résumé, les expérimentations menées dans les chais ont permis de mettre en évidence plusieurs paramètres affectant significativement la teneur en lyonirésinol des eaux-de-vie. Le choix de l'essence influence sensiblement sa concentration ; un élevage en fûts de châtaignier permettrait également de limiter ses teneurs. Enfin, la sélection gros grain/grain fin semble être un élément pertinent pour réussir à moduler l'apport amer du lyonirésinol, au même titre que la durée de la maturation sous bois.

#### Conclusion Chapitre I

L'utilisation de techniques analytiques et sensorielles a permis d'étudier l'importance gustative des lignanes du bois de chêne dans les spiritueux. Dans un premier temps, une approche de criblage ciblée par LC-HRMS a révélé la présence de 11 lignanes du bois de chêne dans une eau-de-vie de Cognac, le lyonirésinol étant le plus abondant d'entre eux. Compte tenu de la forte amertume induite par ce composé, son seuil de détection a été évalué dans une matrice de type « eau-de-vie » et établi à 2,6 mg/L. Après le développement et la validation d'une méthode par LC-HRMS, un mélange racémique du lyonirésinol a été quantifié dans différents échantillons d'eaux-de-vie commerciales et expérimentales afin d'étudier son impact sensoriel ainsi que l'influence des paramètres œnologiques sur son contenu. Ces travaux ont démontré un impact significatif du lyonirésinol sur l'équilibre gustatif des spiritueux, par augmentation de leur amertume. Par ailleurs, il a été établi que l'essence ainsi que le type de grain du bois pouvait avoir un effet important sur les teneurs en lyonirésinol.

Ces travaux ont apporté de nouvelles connaissances et une meilleure compréhension de l'origine moléculaire associée au goût des eaux-de-vie. Une stratégie analytique similaire pourra être menée afin de déterminer la contribution sensorielle du (+)-lyonirésinol, qui présente un goût amer intense, dans les eaux-de-vie. Des travaux antérieurs ont toutefois montré que le ratio énantiomérique du lyonirésinol était relativement constant dans le bois de chêne ; il est donc fortement probable qu'il en soit de même dans les spiritueux.

# CHAPITRE II. ÉTUDE DE LA CONTRIBUTION DES COUMARINES DU BOIS DE CHÊNE AU GOÛT DU VIN ET DES EAUX-DE-VIE

#### Introduction

En œnologie, plusieurs travaux ont été consacrés aux coumarines du bois de chêne (Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987; Tricard, Salagoïty, et Sudraud 1987). Notamment, quelques études ont examiné l'influence des paramètres de tonnellerie sur les concentrations en coumarines d'extraits de chêne, comme le type de séchage de bois ou la température de chauffe (Chatonnet et al. 1994 ; Brígida Fernández de Simón et al. 1999). D'un point de vue gustatif, certains auteurs décrivent les coumarines, sous forme glycosylées, comme amères tandis que les formes aglycones sont perçues comme acides (Joseph et Marché 1972 ; Vivas 1997). Lors d'une de ces études, leur seuil de détection a été estimé à 2 µg/L dans un vin rouge (Vivas 1997), ce qui semble étonnamment bas, mais la méthodologie employée, et en particulier le nombre de dégustateurs, ne sont pas décrits, ce qui affecte la robustesse de ce résultat. Si le seuil des coumarines était effectivement aussi bas, ces molécules seraient susceptibles d'avoir un effet gustatif important. Or, cette hypothèse a été contestée par d'autres auteurs au regard des très faibles concentrations mesurées pour ces molécules et de leurs propriétés sensorielles (Chatonnet et al. 1994). Ces contradictions, conjuguées au manque de données dans la littérature, ont justifié d'examiner plus en détail la contribution des coumarines du bois de chêne au goût des vins et des spiritueux.

Les coumarines constituent une classe de métabolites secondaires et proviennent de la voie des phénylpropanoïdes *via* l'acide *t*-cinnamique (Bourgaud *et al.* 2006). Ces molécules, largement présentes dans le règne végétal, résultent de la lactonisation de l'acide orthohydroxycinnamique. En outre, les coumarines sont classées selon quatre catégories : les coumarines simples, formées d'un cycle benzène et d'un noyau lactone (benzo- $\alpha$ -pyrone) ; les furocoumarines, formées par la fusion d'un hétérocycle furane et du noyau de la coumarine simple ; les pyranocoumarines, formées par la fusion d'un hétérocycle pyrane et du noyau de la coumarine simple et les phénylcoumarines, formées d'un cycle phényl et du noyau de la coumarine simple (**Figure 16**).



#### Figure 16 : Structure des différentes familles de coumarines.

Ces molécules sont sujettes à de nombreuses modifications comme des hydroxylations, des O-méthylations ou encore des glycosylations, entraînant la formation de nombreux dérivés dont plus de 700 ont déjà été caractérisés dans les plantes (Bourgaud *et al.* 2006). Notamment, ils ont été identifiés dans une trentaine de familles différentes comprenant plus de 150 espèces. Les coumarines et furanocoumarines sont généralement présentes dans toutes les parties de la plante mais plus particulièrement dans les graines, les fruits, les feuilles et les racines (Atta-ur-Rahman *et al.* 1997 ; Ehlers *et al.* 1995 ; Rosselli *et al.* 2009 ; Tatum et Robert 1977). Ces molécules sont qualifiées de phytoalexines, c'est-à-dire qu'elles protègent la plante des attaques de divers pathogènes (Beier et Oertli 1983). En outre, elles possèdent des activités biologiques potentiellement intéressantes pour la santé humaine, telles que des propriétés antiinflammatoires, anticoagulantes, antibactériennes, antifongiques, antivirales, anticancéreuses et ont des effets neuroprotecteurs (Venugopala, Rashmi, et Odhav 2013).

Afin de préciser le rôle éventuel de cette classe de molécules dans les propriétés gustatives du vin et des eaux-de-vie, un criblage par LC-HRMS d'extraits de bois de chêne a d'abord été mis en œuvre pour repérer les coumarines majoritaires. Puis, une méthode de dosage a été mise en place pour quantifier les molécules sélectionnées dans les vins et les eaux-de-vie. La détermination de leur seuil de détection gustative suivie de la comparaison avec les teneurs mesurées ont finalement permis d'étudier leur contribution sensorielle et leur pertinence comme marqueur lors de la fabrication des barriques.

#### I. Recherches de coumarines dans le bois de chêne par criblage LC-HRMS

#### A. Matériels et méthodes

Une extraction solide-liquide de copeaux de bois de chêne sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl., 1784) a été réalisée. A cette fin, 25 g de copeaux ont été macérés dans 250 mL d'une solution hydro-éthanolique 50:50 (v:v), pendant deux semaines, à température ambiante, sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière.

Le criblage de l'extrait de bois de chêne a été réalisé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à Transformée de Fourier (LC-HRMS).

L'extrait de bois de chêne a été dilué, filtré (0,45  $\mu$ m, 13 mm, PTFE, Agilent Captiva) puis 5  $\mu$ L de la solution ainsi obtenue ont été injectés en LC-HRMS. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne de silice à polarité de phase inversée de type C18 avec un gradient de solvant composé d'eau et d'acétonitrile, acidifiés à 0,1 % d'acide formique, selon les conditions décrites dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7 :** Conditions chromatographiques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne.

Appareil : U-HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific)								
Logiciel	Logiciel : Xcalibur 3.0 pour Exactive							
Colonne	: Hypersil Gold Cl	8;100	x 2,1 mr	n ; Taille	des parti	icules 1,9	μm	
Phase m	obile : Débit à 600	µL/min						
	Solvant A : H <sub>2</sub> O ultrapure + 0,1 % HCOOH							
	Solvant B : ACN LC-MS Optima + 0,1 % HCOOH							
	Gradient :							
Temps (min): 0 1,0 5,0 5,3 6,0 6,15 7,0								
% de B : 10 10 50 98 98 10 10						10		
Injection : 5 µL								

Les conditions spectrométriques utilisées pour ce criblage sont détaillées dans le **Tableau 8**.

Paramètre	Mode positif		
Débit du « sheath gas » <sup>a</sup>	70		
Débit du gaz auxiliaire <sup>a</sup>	15		
Débit du « sweep gas »	0		
Tension du spray	3,5 kV		
Température du capillaire	350 °C		
Tension du capillaire	25 V		
Tension du tube lens	120 V		
Tension du skimmer	20 V		
Température de la source	320 °C		
Résolution <sup>b</sup>	25 000		
AGC <sup>c</sup>	$10^6$ ions		
Gamme de masses	100 - 1000  Th		

Tableau 8 : Conditions spectrométriques pour le criblage de l'extrait de bois de chêne.

<sup>a</sup> Les débits du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires <sup>b</sup> Résolution  $m/\Delta m$ , fwhm à m/z 200 Th

<sup>c</sup> Contrôle automatique de gain

La présence des différentes espèces chimiques dans l'extrait de bois a été étudiée par construction de chromatogrammes d'ions extraits à l'aide de l'application Qualbrowser du logiciel Xcalibur, avec une fenêtre de 5 ppm autour du rapport m/z théorique.

#### **B.** Résultats et discussion

La LC-HRMS a été utilisée dans cette partie pour le criblage d'extraits complexes. Afin de se rapprocher des conditions de l'élevage des vins et spiritueux, les copeaux de bois de chêne utilisés pour cette étude ont d'abord subi une chauffe, similaire à celle mise en œuvre lors de la fabrication des barriques, puis ont été macérés dans une solution hydro-éthanolique.

Une liste non exhaustive d'analogues structuraux à la coumarine a été établie à partir d'une étude bibliographique des composés de cette famille déjà identifiés dans des substances naturelles. Très répandues dans le règne végétal, les coumarines simples ont été plus particulièrement étudiées. En outre, elles se trouvent majoritairement sous forme glycosylée dans les plantes. Dans une boisson acide comme le vin ou les spiritueux, ces hétérosides sont susceptibles d'être hydrolysés pour former l'aglycone correspondant. Par conséquence, les formes aglycones et hétérosides des coumarines simples ont été recherchées.

L'esculétine, l'esculine, la scopolétine, la scopoline, l'ombelliférone et la 4méthylombelliférone ont déjà été décrites dans le domaine de l'œnologie (Brígida Fernández de Simón *et al.* 1999 ; Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987 ; Vivas 1997). Pour cette raison, ces molécules ont été choisies pour le criblage LC-HRMS. Comme expliqué en introduction, les coumarines ont été répertoriées dans plusieurs familles de plantes, dont les Fabacées, les Rutacées, les Oléacées mais aussi les Thyméléacées. Les coumarines majoritaires de ces quatre familles ont été recherchées. Ainsi, la coumarine, identifiée dans la fève tonka (*Dipteryx odorata*) (Ehlers *et al.* 1995), la scoparone, identifiée dans le genre *Citrus* (Tatum et Robert 1977), la fraxétine et l'isofraxidine, identifiées dans le genre *Fraxinus* (Tsukamoto, Hisada, et Nishibe 1985), et la daphnétine, identifiée dans le *Daphne odora* (Baba *et al.* 1986), ont également été sélectionnées pour le criblage LC-HRMS. Par la suite, les rapports *m/z* des ions protonés des coumarines ciblées ont été calculés sur la base de leur formule brute (**Tableau 9**).

Nom de la molécule	Formule brute	$m/z$ théorique du $[M+H]^+$
Coumarine	$C_9H_6O_2$	147,0441
Scopolétine	$C_{10}H_8O_4$	193,0495
Scopoline	$C_{16}H_{18}O_9$	355,1024
Scoparone	$C_{11}H_{10}O_4$	207,0652
Esculétine	$C_9H_6O_4$	179,0339
Esculine	$C_{15}H_{16}O_9$	341,0867
Fraxétine	$C_{10}H_8O_5$	209,0445
Isofraxidine	$C_{11}H_{10}O_5$	223,0601
Ombelliférone	$C_9H_6O_3$	163,0390
4-Méthylombelliférone	$C_{10}H_8O_3$	177,0546
Daphnétine	$C_9H_6O_4$	179,0339

**Tableau 9 :** Liste des coumarines ciblées pour le criblage LC-HRMS.

L'analyse en LC-HRMS a permis de cibler les onze ions listés dans le **Tableau 9** afin de valider ou non leur présence dans l'extrait de bois de chêne.



**Figure 17 :** XIC en ionisation positive correspondant aux ions  $[M+H]^+$  des 11 coumarines ciblées dans un extrait de bois de chêne.

Des chromatogrammes d'ions extraits en ionisation positive correspondant aux rapports m/z des ions  $[M+H]^+$  ont été obtenus (Figure 17). L'analyse a révélé la présence de plusieurs pics chromatographiques, ce qui pourrait correspondre aux molécules recherchées. L'abondance relative de ces signaux dans un extrait de bois de chêne a également été mesurée. Pour la suite de l'étude, six coumarines ont été retenues parmi la liste initiale, sur la base de deux critères : une abondance significative de signaux correspondant à leur formule brute dans l'extrait de bois de chêne ainsi que la disponibilité des standards dans le commerce. Ainsi, les standards correspondant à l'esculétine, la fraxétine, l'ombelliférone, la scopolétine, la 4méthylombelliférone et la coumarine ont été commandés puis injectés en LC-HRMS. Les signaux obtenus pour l'isofraxidine (NL: 5,12 E4) et la daphnétine (NL: 1,58 E4) étaient significatifs donc potentiellement intéressants. Cependant, les standards de ces deux coumarines étaient peu disponibles dans le commerce et il était difficile de s'en procurer. En outre, parmi les molécules observées, celles avec les intensités les plus faibles correspondent à la scopoline (NL : 6,83 E3) et à l'esculine (NL : 4,65 E3), c'est-à-dire des glycosides. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle des réactions d'hydrolyse se produisent au cours du vieillissement pour former les aglycones correspondants.

Les temps de rétention obtenus pour les six coumarines ciblées coïncident avec ceux observés dans l'extrait de bois de chêne. En outre, on observe une co-élution lors du dopage d'un extrait de bois avec ces standards et les spectres HRMS/MS (en mode HCD) coïncident. La présence dans l'extrait de bois de chêne des six coumarines initialement sélectionnées est donc bien confirmée. Parmi ces composés, l'esculétine, l'ombelliférone, la scopolétine, la 4-méthylombelliférone et la coumarine ont déjà été identifiés dans le bois de chêne (Baldwin *et al.* 1967 ; Brígida Fernández de Simón *et al.* 1999 ; Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987 ; Silva *et al.* 2009). La fraxétine a déjà été reportée dans diverses espèces végétales, comme le frêne, le marronnier d'Inde ou encore le pin argenté (Liu *et al.* 2005 ; Reppel 1954 ; Rudman 1963 ; Venugopala, Rashmi, et Odhav 2013) mais jamais dans le genre *Quercus.* Puisque ces molécules sont présentes dans le bois, il est possible qu'elles soient libérées dans les vins et les eaux-de-vie au cours de l'élevage en barriques.

### II. Étude de la présence des six coumarines dans un vin rouge boisé et dans une eau-devie de Cognac - Caractérisation sensorielle

A. Matériels et méthodes

#### 1. Analyse LC-HRMS d'un vin rouge boisé et d'une eau-de-vie de Cognac

Le vin rouge utilisé pour cette étude (Margaux, 2011) a été élevé au minimum pendant 16 mois dans des barriques de chêne français. L'eau-de-vie de Cognac a été élevée pendant dix ans en fûts et a été fournie par la maison Rémy-Martin. Ces deux échantillons ont été dilués par cinq avec de l'eau ultra pure puis filtrés à 0,45  $\mu$ m avant d'être injectés en LC-HRMS, selon les conditions décrites au paragraphe précédent **I. A**. Pour ces deux matrices, un chromatogramme d'ions extraits a été construit pour chaque coumarine ciblée grâce au logiciel XCalibur, avec une tolérance de 5 ppm autour de la masse théorique de l'ion [M+H]<sup>+</sup>.

#### 2. Analyse sensorielle

#### a. Dégustation préliminaire

La caractérisation sensorielle des six coumarines a été réalisée selon les conditions décrites dans la partie expérimentale générale au paragraphe « dégustation exploratoire » (**III. A.**) Les molécules ont été dégustées à une concentration de 1 mg/L dans une solution hydroalcoolique titrant 12 % v/v d'alcool réalisée en diluant un distillat de vin rouge titrant 36 % v/v d'alcool avec de l'eau de source de Montagne Laqueuille.

# b. Détermination du seuil de détection gustative de l'esculétine, la scopolétine et de la 4-méthylombelliférone

#### 1) Dans un vin blanc non boisé

Le seuil de détection de l'esculétine, la scopolétine et de la 4-méthylombelliférone ont été déterminés dans un vin blanc sec (Pays d'Oc ; 12 % vol. ; pH 3,43 ; AT = 3,62 g/L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ce vin, élaboré sans contact avec le bois de chêne, a été au préalable injecté en LC-HRMS afin de valider l'absence de ces coumarines.

Pour chaque concentration, trois verres ont été 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 (test à choix forcé de 1 parmi 3). Cinq concentrations ont été présentées aux dégustateurs, dans un ordre croissant et suivant une progression géométrique de raison 4 : 10, 40, 160, 640 et 2560  $\mu$ g/L. Le panel était constitué de 25 personnes, appartenant au personnel des laboratoires de l'ISVV, entraînées à la dégustation des vins et sensibilisées à la perception des différentes saveurs.

#### 2) Dans une eau-de-vie blanche

Une séance d'entraînement a été organisée au préalable selon les conditions expliquées dans la partie expérimentale générale **III. B. 3**.

Les seuils de détection de l'esculétine, de la scopolétine et de la 4-méthylombelliférone ont été déterminés dans une eau-de-vie jeune réduite à 40 % d'alcool. Afin d'éviter d'éventuels phénomènes de saturation ou de rémanence dus à la matrice, deux sessions différentes ont été organisées. Pour chacune d'elle, des tests triangulaires ont été présentés aux dégustateurs, selon la méthodologie décrite par les normes ISO 4120:2007 (ISO 4120:2007 2007).

Pour la première session, trois concentrations croissantes ont été présentées au panel : 200, 400 et 800  $\mu$ g/L. Les concentrations présentées à chaque dégustateur lors de la seconde session dépendaient de leurs résultats lors de la première session. Si le panéliste donnait des réponses correctes, trois nouvelles concentrations lui étaient présentées : deux plus basses (40 et 160  $\mu$ g/L) et une supérieure (640  $\mu$ g/L) à la concentration la plus basse pour laquelle il avait donné une bonne réponse lors de la première session, afin de valider son jugement. Si le panéliste ne trouvait aucune bonne réponse, trois nouvelles concentrations lui étaient présentées : deux plus hautes (1000 et 2000  $\mu$ g/L) et une plus basse (500  $\mu$ g/L), afin de mettre en évidence ou non des phénomènes de saturation liés à la matrice lors de la première session. Les conditions de la dégustation et le traitement des résultats sont expliqués dans la partie expérimentale générale **III. B. 1**.

#### **B.** Résultats et discussion

#### 1. Recherche de la présence des six coumarines par LC-HRMS

Les standards des six coumarines ciblées (**Figure 18**), décrits dans la partie expérimentale générale, ont été injectés en LC-HRMS selon les conditions chromatographiques utilisées pour le criblage de l'extrait de bois de chêne (**Tableau 7**).

		R <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	R1 O R4	Õ
	R1	R2	R3	R4
Esculétine	Η	OH	OH	Н
Fraxétine	Η	O-CH <sub>3</sub>	OH	OH
Ombelliférone	Н	Н	OH	Н
Scopolétine	Н	O-CH <sub>3</sub>	OH	Н
4-Méthylombelliférone	$\mathrm{CH}_3$	Н	OH	Н
Coumarine	Н	Н	Н	Н

Figure 18 : Structure chimique des six coumarines ciblées.

Des chromatogrammes d'ions extraits ont été construits pour chaque coumarine, avec une forte spécificité liée à la précision de mesure de masse (moins de 5 ppm d'écart avec le rapport m/z théorique). Des signaux d'intensité significative, c'est-à-dire caractérisés par un rapport signal/bruit supérieur à 3, ont ainsi été observés, aux temps de rétention caractéristiques de certaines des six coumarines (< 0,07 min). C'est notamment le cas pour l'esculétine, la fraxétine, l'ombelliférone et la coumarine dans le vin rouge boisé, et pour l'esculétine, la fraxétine, la scopolétine, la coumarine et la 4-méthylombelliférone dans l'eau-de-vie boisée. En outre, les mêmes ions fragments ont été obtenus suite à l'analyse des spectres de fragmentation MS<sup>2</sup> pour ces temps de rétention. Ces éléments démontrent la présence des coumarines concernées dans le vin rouge et l'eau-de-vie injectés (Figure 19). En effet, la scopolétine et la 4-méthylombelliférone n'ont pas été détectées dans le vin rouge étudié, pas plus que l'ombelliférone dans l'eau-de-vie (S/N < 3). Cinq de ces composés, l'esculétine, l'ombelliférone, la scopolétine, la 4-méthylombelliférone et la coumarine avaient déjà été observés dans des vins et des spiritueux (Barnaba et al. 2015 ; Bi et al. 2018 ; Brígida Fernández de Simón et al. 1999 ; Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987). En revanche, la fraxétine n'avait jamais été identifiée dans l'une ou l'autre de ces deux matrices. Pour vérifier cette information, les fragments majoritaires (m/z 194,0212, 177,0187, 149,0224) présents sur les spectres HRMS/MS ont été comparés à ceux de la littérature (Zhao et al. 2014).
Cette étude permet ainsi de confirmer la présence des six principales coumarines du bois de chêne, dont la fraxétine jamais observée jusqu'à présent, dans les vins et les eaux-de-vie. Bien que cette présence ait été partiellement décrite dans quelques travaux, leur contribution sensorielle demeure à préciser.



**Figure 19 :** XIC en ionisation positive correspondant aux ions  $[M+H]^+$  des six coumarines ciblées (injection des standards, à gauche) dans un vin rouge boisé (au milieu) et dans une eaude-vie boisée de Cognac (à droite). S/N : signal sur bruit proposé par Xcalibur.

#### 2. Analyse sensorielle

#### a. Dégustation préliminaire

D'après la littérature, les coumarines sont présentes dans les vins et les eaux-de-vie à des concentrations de l'ordre du  $\mu$ g/L (Barnaba *et al.* 2015 ; Canas 2017). Afin d'exacerber leurs propriétés sensorielles, celles-ci ont été dégustées à une concentration d'1 mg/L en solution hydro-alcoolique, par comparaison avec la solution témoin. Si l'amertume perçue diffère par rapport à cette solution contrôle, l'intensité de cette perception est évaluée sur une échelle de 1 à 5. Le **Tableau 10** récapitule les résultats de la dégustation.

 

 Tableau 10 : Caractérisation sensorielle des six coumarines dans une solution hydroéthanolique.

Molécules	Goût dans une solution hydro-éthanolique à 12 % alc. vol.	Intensité de l'amertume <sup>a</sup>
Esculétine	Amer	3/5
Fraxétine	Acide	-
Ombelliférone	Amer	1/5
Scopolétine	Amer	3/5
4-Méthylombelliférone	Amer	5/5
Coumarine	Amer	2/5

<sup>a</sup> L'intensité a été évaluée sur une échelle de 0 (non détecté) à 5 (fortement détecté).

Cinq des six coumarines ciblées ont été décrites comme amères. La 4méthylombelliférone était la plus intense, suivie par l'esculétine, la scopolétine, la coumarine et l'ombelliférone. L'amertume perçue pour la coumarine confirme de précédentes observations (Burdock et Fenaroli 2005 ; Meyerhof *et al.* 2010). La fraxétine présentait une acidité moyennement intense. Cette dégustation préliminaire a permis de mettre en évidence l'amertume de certaines coumarines. L'esculétine, la scopolétine et la 4-méthylombelliférone sont les plus amères d'entre elles, leur seuil de détection gustative a donc été établi.

# b. Détermination du seuil de détection gustative de l'esculétine, de la scopolétine et de la 4-méthylombelliférone

Les seuils de détection gustative de l'esculétine, de la scopolétine et de la 4méthylombelliférone ont été déterminés dans un vin blanc non boisé et dans une eau-de-vie blanche réduite à 40 % d'alcool. Le **Tableau 11** récapitule les résultats de toutes les dégustations.

**Tableau 11 :** Seuils de détection de l'esculétine, la scopolétine et la 4-méthylombelliférone

 dans un vin blanc non boisé et une eau-de-vie jeune.

Molécules	Seuil de détection dans un vin blanc non boisé	Seuil de détection dans une eau-de-vie jeune		
Esculétine	125 µg/L	1108 μg/L		
Scopolétine	702 µg/L	789 µg/L		
4-Méthylombelliférone	320 µg/L	397 µg/L		

Dans le vin, les seuils de détection gustative de l'esculétine, de la scopolétine et de la 4méthylombelliférone ont été évalués à 125, 702 et 320  $\mu$ g/L, respectivement, avec des variabilités interindividuelles très importantes. En effet, les seuils de détection individuels pour cette matrice et pour chaque coumarine s'étalaient de 5 à 5120  $\mu$ g/L.

Dans l'eau-de-vie, la même tendance a été observée. Les seuils de détection gustative de l'esculétine, de la scopolétine et de la 4-méthylombelliférone ont été évalués à 1108, 789 et 397  $\mu$ g/L, respectivement, avec des seuils de détection individuels allant de 80 à 2828  $\mu$ g/L pour l'esculétine et de 20 à 2828  $\mu$ g/L pour les deux autres coumarines.

#### 3. Discussion

Les résultats de cette étude mettent en évidence la présence des six coumarines, et en particulier de la fraxétine qui n'avait jamais été observée jusqu'à présent, dans les vins et les eaux-de-vie élevés sous bois de chêne. L'analyse sensorielle a permis de montrer des différences gustatives en fonction de la structure chimique des coumarines ciblées. Notamment, une différence notable a été observée entre l'ombelliférone et la 4-méthylombelliférone. L'ajout d'un groupement –CH<sub>3</sub> en position 4 a fortement influencé la perception sensorielle de cette molécule, en augmentant son amertume. Néanmoins, le nombre trop faible de composés étudiés ne permet pas de généraliser cette observation ni d'établir une relation claire entre la structure et le goût des coumarines.

La méthode développée au laboratoire depuis quelques années (Cretin, Dubourdieu, et Marchal 2016 ; Marchal, Cretin, *et al.* 2015) pour la détermination des seuils de détection a permis de limiter les effets de rémanence et de saturation, souvent observés pour les molécules

sapides. En outre, le panel a été entraîné aux matrices « vin » et « eau-de-vie », ce qui confère davantage de robustesse aux résultats obtenus. La dégustation étant une méthode destructrice, des quantités importantes des composés ciblés sont nécessaires afin de pouvoir déterminer leur contribution sensorielle. Néanmoins, disposer d'un panel identique et entraîné est un avantage permettant de réduire les quantités utilisées lors de la dégustation.

En œnologie, des seuils de détection ont été mesurés, principalement sur des composés olfactifs, dans différentes matrices telles que l'eau, le vin ou les spiritueux (Chatonnet et al. 1992 ; Gammacurta et al. 2018 ; Poisson et Schieberle 2008). Ces études ont démontré que la nature de la matrice pouvait avoir un impact significatif sur les propriétés olfactives d'un composé. Pour les composés sapides également, la perception est susceptible d'être fortement influencée par la matrice, comme nous l'avons montré pour le lyonirésinol. Pour cette raison, le seuil des coumarines a été déterminé à la fois dans le vin et dans les eaux-de-vie. Les valeurs obtenues sont relativement faibles pour des composés non-volatils, de l'ordre de la centaine de µg/L. Elles sont toutefois bien supérieures à celles d'une précédente étude (Vivas 1997), pour laquelle la méthodologie utilisée n'avait cependant pas été décrite, ce qui affecte sensiblement la confiance accordée à ces données et limite l'intérêt de la comparaison. De façon générale, les résultats ont montré que les seuils de détection des trois coumarines ciblées dans un vin blanc non boisé étaient inférieurs à ceux mesurés dans une eau-de-vie jeune. Le seuil de la scopolétine et de la 4-méthylombelliférone ne semble pas être significativement influencé par la nature de la matrice. A l'inverse, l'esculétine a un seuil de détection très bas dans les vins alors que dans les eaux-de-vie cette valeur est presque neuf fois plus grande. Compte tenu de cette différence de comportement surprenante avec les autres coumarines, les seuils de l'esculétine ont été mesurés une seconde fois, mais les mêmes résultats ont été obtenus. Cette étude confirme ainsi que l'on ne peut présumer de la contribution sensorielle d'un composé dans une matrice à partir de ses propriétés dans une autre matrice. En outre, on remarque une variabilité forte des seuils individuels pour chaque molécule, confirmant ce que l'on a pu déjà observer pour d'autres molécules telles que le lyonirésinol (Marchal, Cretin, et al. 2015 ; Winstel et Marchal 2019). D'autres études ont été menées sur ces différences interindividuelles de sensibilité et les auteurs ont montré que pour certains composés volatils un facteur 1000 était fréquemment observé entre les personnes les plus sensibles et les moins sensibles (Takagi 1989 ; Tempere *et al.* 2011). En outre, cette observation souligne l'importance de travailler avec un panel large et entraîné pour déterminer, de la façon la plus juste possible, le seuil de détection d'une molécule odorante ou sapide.

Les seuils étant déterminés, il convient alors de les comparer aux concentrations en esculétine, en scopolétine et en 4-méthylombelliférone retrouvées dans les vins et les eaux-devie pour évaluer leur incidence sensorielle.

# III. Quantification des six coumarines dans les vins et les eaux-de-vie ; étude de l'influence des paramètres de tonnellerie

La mesure des teneurs en coumarines dans les vins et les eaux-de-vie nécessite le développement d'une méthode de dosage robuste et fiable. La LC-HRMS semble être une technique de choix pour quantifier des composés peu abondants dans des matrices complexes.

#### A. Développement d'une méthode de dosage des six coumarines par LC-HRMS

#### 1. Conditions chromatographiques et paramètres spectrométriques

Par rapport au criblage initial des extraits de bois, les conditions chromatographiques ont été optimisées afin d'améliorer la séparation des six coumarines. Le **Tableau 12** récapitule ces données.

 Tableau 12 : Conditions chromatographiques utilisées pour la quantification des six coumarines.

Appareil : U-HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific)							
Logiciel : Xcalibur 3.0 pour Exactive							
Colonne : Hypersil Gold C18 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules 1,9 $\mu m$							
Phase mobile : Débit à 600 µL/min							
Solvant A : H <sub>2</sub> O ultrapure + 0,1 % HCOOH							
Solvant B : ACN LC-MS Optima + 0,1 % HCOOH							
Gradient :							
Temps (min): 0 1.6 5.0 9.0 9.3 10.3 10.4 12.0							
% de B · 15 15 20 25 98 98 15 15							
Injection : 5 $\mu$ L							

Les paramètres spectrométriques ont également été adaptés à la détection des six coumarines. L'optimisation des valeurs de gaz, des tensions ainsi que des températures appliquées pour l'ionisation et le transfert des ions a été réalisée en mode positif par injection directe des standards et en utilisant comme référence les intensités des signaux de rapport m/z 147,0441 ; 193,0495 ; 179,0339 ; 209,0445 ; 177,0546 ; 163,0390.

Le Tableau 13 récapitule les paramètres optimisés.

Paramètre	Mode positif
Débit du « sheath gas » <sup>a</sup>	68
Débit du gaz auxiliaire <sup>a</sup>	15
Débit du « sweep gas »	0
Tension du spray	4,5 kV
Température du capillaire	310 °C
Tension du capillaire	52,5 V
Tension du tube lens	110 V
Tension du skimmer	30 V
Température de la source	305 °C
Résolution <sup>b</sup>	10 000
AGC <sup>c</sup>	3.10 <sup>6</sup> ions
Gamme de masses	100 - 400  Th

**Tableau 13 :** Conditions d'ionisation et paramètres spectrométriques utilisés pour laquantification des six coumarines.

<sup>a</sup> Les débits du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires

<sup>b</sup> Résolution  $m/\Delta m$ , fwhm à m/z 200 Th

<sup>c</sup> Contrôle automatique de gain

# Préparation des échantillons et des solutions de calibration a. Préparation des échantillons

Pour la quantification, les vins et les macérats de bois ont été dilués par cinq avec de l'eau ultra-pure puis filtrés à 0,45  $\mu$ m avant d'être injectés en LC-HRMS. Comme pour la quantification du lyonirésinol, le taux d'alcool volumique des échantillons d'eaux-de-vie, initialement compris 38 et 71 % v/v, a été réduit à 8 % par addition d'eau. Le facteur de dilution ainsi appliqué a été pris en compte dans le calcul de la concentration finale.

#### b. Préparation des solutions de calibration

Une solution mère des six coumarines à 1 g/L a été préparée dans de l'éthanol. Une gamme d'étalonnage a été ensuite réalisée par dilutions successives de cette solution mère dans

de l'eau ultrapure afin d'atteindre les concentrations suivantes : 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 500  $\mu$ g/L, 200  $\mu$ g/L, 100  $\mu$ g/L, 50  $\mu$ g/L, 20  $\mu$ /L, 10  $\mu$ g/L, 5  $\mu$ g/L, 2  $\mu$ g/L et 1  $\mu$ g/L.

#### 3. Traitement des résultats

L'analyse a été réalisée en mode de balayage total. La détection des coumarines a été faite à partir de la masse exacte de leur ion protoné [M+H]<sup>+</sup> et de leur temps de rétention (**Tableau 14**). L'intégration des pics chromatographiques a été traitée automatiquement grâce à l'application Quanbrowser du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

Molécules	Ion quasi-moléculaire [M+H] <sup>+</sup>	Masse exacte théorique	Temps de rétention (min)
Esculétine	$C_9H_7O_4^+$	179,0339	2,5
Fraxétine	$C_{10}H_9O_5^+$	209,0445	3,3
Ombelliférone	$C_9H_7O_3^+$	163,0390	4,4
Scopolétine	$C_{10}H_9O_4^+$	193,0495	4,6
Coumarine	$C_9H_7O_2^+$	147,0441	6,6
4-Méthylombelliférone	$C_{10}H_9O_3^+$	177,0546	6,8

Tableau 14 : Caractéristiques des ions utilisés pour la quantification des six coumarines ciblées.

#### 4. Validation de la méthode de quantification

La méthode de quantification des coumarines doit être étudiée en validant sa sensibilité, sa linéarité, sa répétabilité, sa justesse et sa spécificité. Les données sont présentées dans le **Tableau 15**.

#### a. Sensibilité

La sensibilité a été déterminée pour chaque coumarine selon la méthode décrite au **Chapitre I** paragraphe **III. A. 2. a**. La limite de détection de chaque molécule a été définie comme la concentration la plus basse de cette molécule pour laquelle un signal fiable et répétable a été observé. En outre, le signal doit être différent d'un blanc réalisé dans les mêmes conditions. Cette limite de détection a été établie ici à 2  $\mu$ g/L pour toutes les coumarines.

Des tests préalables de justesse ont permis de montrer qu'il n'y avait pas d'effet matrice significatif. De ce fait, la gamme de calibration a été réalisée dans de l'eau ultra pure. La limite de quantification est définie comme la concentration la plus basse de la molécule pouvant être déterminée quantitativement par la méthode avec une variabilité mesurée, soit avec une précision inférieure à 10 % et une justesse supérieure à 90 %. Dans ces conditions, elle a été

établie à 5  $\mu$ g/L pour toutes les coumarines. La sensibilité est suffisante au regard des concentrations observées dans les vins, les eaux-de-vie et dans le bois de chêne.

#### b. Linéarité

La gamme de travail a été choisie en prenant en compte la limite de quantification déterminée précédemment. Elle a été fixée de 5  $\mu$ g/L à 10 mg/L pour toutes les coumarines. Une courbe de calibration quadratique, avec une pondération en 1/x, a été obtenue avec des coefficients de corrélation corrects pour chaque coumarine (R<sup>2</sup> > 0,999). Le rapport de recouvrement entre la concentration mesurée et celle attendue était supérieur à 90 %. Ces résultats établissent la linéarité de la méthode.

#### c. Répétabilité

La répétabilité a été déterminée en injectant cinq réplicats de trois points de la gamme de calibration (10  $\mu$ g/L, 200  $\mu$ g/L et 10 mg/L). Pour chaque concentration et pour chaque molécule, le coefficient de variation est inférieur à 7 %, ce qui valide la répétabilité de la méthode.

#### d. Justesse

La justesse a été déterminée en calculant le ratio de recouvrement pour trois échantillons différents (un vin rouge, un vin blanc et une eau-de-vie jeune) dans lesquels un ajout dosé de 10  $\mu$ g/L, 200  $\mu$ g/L et 10 mg/L des six coumarines a été réalisé. Ces ratios de recouvrement allaient de 85 à 114 %. Ces légères variations pourraient être expliquées par la matrice très complexe des vins et des spiritueux. Cependant, ces résultats restent conformes aux spécifications communes (Guidance for Industry 2018), ce qui valide 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. Les paramètres ont été vérifiés pour chaque injection des solutions de calibration ainsi que pour tous les échantillons. Des faibles variations du temps de rétention ont été observées (< 0,07 min) et des écarts entre masse théorique et masse expérimentale inférieurs à 2 ppm ont été enregistrés pour les différentes concentrations en coumarines, ce qui garantit la spécificité de la méthode.

Des valeurs de répétabilité d'un jour sur l'autre insuffisantes ont été obtenues. Pour pallier cet écueil, une nouvelle gamme de calibration a été injectée lors de chaque série d'analyse.

Tous ces résultats permettent de valider la méthode de quantification par LC-HRMS des six coumarines ciblées. L'utilisation d'un étalon interne n'est pas nécessaire, ce qui facilite sa mise en œuvre. La méthode a donc pu être appliquée au dosage des coumarines dans des vins et des eaux-de-vie.

Tableau 15 : Paramètres d	le validation de la méthode	de quantification des s	six coumarines.	La justesse a été	mesurée dans un vi	n blanc et un vin
rouge non boisés et une eau	u-de-vie blanche.					

Molécules	Sensibilité		Linéarité		Spécificité		Répétabilité et justesse											
	LOD	100	Gamme de		Variation	Exactitude	R	épétabilit	é		Justesse Vin bland	2		Justesse Vin roug	e e	1	Justess Eau-de-v	e vie
	(µg/L)	(μg/L)	linéarité	R <sup>2</sup>	$t_R$ (min)	de la masse (ppm)	10 μg/L	200 µg/L	10 mg/L	10 μg/L	200 μg/L	10 mg/L	10 μg/L	200 μg/L	10 mg/L	10 μg/L	200 μg/L	10 mg/L
Coumarine	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9997	0,06	0,52	6,9 %	3,6 %	2,0 %	95 %	108 %	98 %	98 %	105 %	92 %	86 %	95 %	100 %
Scopolétine	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9998	0,05	0,03	1,3 %	4,5 %	1,1 %	91 %	99 %	105 %	91 %	86 %	111 %	85 %	86 %	97 %
Esculétine	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9997	0,05	0,02	6,2 %	5,5 %	2,4 %	105 %	87 %	97 %	91 %	85 %	90 %	85 %	91 %	99 %
Fraxétine	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9994	0,07	0,72	6,0 %	5,4 %	3,9 %	95 %	91 %	92 %	90 %	97 %	89 %	87 %	98 %	99 %
Ombelliférone	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9998	0,05	1,12	3,1 %	4,3 %	1,3 %	85 %	86 %	110 %	86 %	88 %	110 %	87 %	98 %	100 %
4-Méthylombelliférone	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9996	0,07	0,68	2,3 %	5,7 %	1,9 %	85 %	113 %	114 %	89 %	85 %	100 %	85 %	95 %	86 %

#### **B.** Dosage des coumarines dans les vins

#### 1. Origine des vins analysés

Les six coumarines ont été dosées dans 90 vins commerciaux, 43 vins rouges (24 de diverses appellations de Bordeaux, 6 de Bourgogne, 2 du Languedoc-Roussillon, 2 de la Vallée du Rhône, 1 du Beaujolais, 7 d'Espagne et 1 d'Allemagne) et 47 vins blancs (13 provenant de divers vignobles de Bourgogne, 11 d'Alsace, 9 de Bordeaux, 6 du Val de Loire, 4 du Languedoc-Roussillon et 4 de la Vallée du Rhône). Les millésimes s'étendaient de 1995 à 2017. La grande majorité de ces vins a été élevée en barriques mais les informations sur les durées d'élevage et les pourcentages de barriques neuves n'étaient pas disponibles.

#### 2. Résultats du dosage des six coumarines dans les vins et discussion

Des teneurs différentes en coumarines ont été observées dans les vins blancs et rouges analysés. De façon générale, des concentrations plus élevées en coumarines ont été obtenues dans les vins rouges, allant de quelques  $\mu$ g/L à plus d'une centaine de  $\mu$ g/L (**Figure 20**). Tous les résultats de la quantification sont reportés à l'**ANNEXE 4**.





Le 4-méthylombelliférone n'a pas pu être dosée dans les vins car toutes les valeurs étaient en dessous de la limite de quantification, calculée précédemment. A titre de référence, Salagoity-Auguste *et al.* avaient identifié et quantifié cette molécule par fluorescence dans des

vins rouges, avec des valeurs allant de 0,4 à 0,8  $\mu$ g/L (Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987). Malgré une forte amertume de ce composé et un seuil de détection assez bas, les faibles teneurs en cette molécule dans les vins permettent de conclure à son absence d'impact gustatif dans cette matrice.

En utilisant la même méthode de quantification, ces auteurs ont décrit des teneurs en ombelliférone, oscillant entre 1,5 et 1,7  $\mu$ g/L, dans des vins rouges (Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987). Dans le cadre de notre travail, les résultats obtenus dans le vin étaient proches de cette étude mais avec des variations plus importantes (de 0 à 94,6  $\mu$ g/L). Celle-ci peut s'expliquer par le nombre d'échantillons analysés. En effet, leur étude porte sur deux vins, contre 90 ici.

La coumarine a déjà été identifiée dans le vin (Bi *et al.* 2018) mais n'avait jamais été quantifiée. Les valeurs mesurées dans le vin rouge sont largement supérieures à celles dans le vin blanc, 146,8  $\mu$ g/L en moyenne contre 9,2  $\mu$ g/L. Les différences constatées entre les deux matrices pourraient s'expliquer par une durée d'élevage sous bois généralement plus longue et un pourcentage de barriques neuves plus important pour les vins rouges que pour les vins blancs. En outre, la coumarine est connue pour avoir une odeur caractéristique semblable à celle des gousses de vanille mais aussi de l'amande, mariée au foin coupé. Son seuil de détection olfactif a été estimé dans de l'eau à 11  $\mu$ g/L (Wagner, Granvogl, et Schieberle 2016). De ce fait, la coumarine pourrait contribuer à l'arôme des vins. La détermination de son seuil de détection olfactive dans les vins permettrait la clarification de son impact. Il en va de même pour son seuil de détection gustative.

La fraxétine n'a jamais été quantifiée dans les vins auparavant. La valeur moyenne observée pour cette molécule était de 9,8  $\mu$ g/L dans les vins blancs (de 3,3 à 36,6  $\mu$ g/L) et quasiment le double pour les vins rouges, 20,4  $\mu$ g/L avec des valeurs allant de 3,4 à 77,0  $\mu$ g/L. En outre, sur les 15 vins rouges qui étaient supérieurs à la moyenne mesurée, 13 provenaient de la région bordelaise. Cette observation pourrait être expliquée par un pourcentage de barriques neuves plus élevé dans les chais de cette région que dans les autres.

Les vins rouges analysés présentaient une concentration moyenne de 98,6  $\mu$ g/L en esculétine (de 12,3 à 268,9  $\mu$ g/L) et une concentration moyenne de 13,1  $\mu$ g/L en scopolétine (de 0 à 307,2  $\mu$ g/L). Globalement, des valeurs plus faibles ont été mesurées pour les vins blancs avec une teneur moyenne de 40,8  $\mu$ g/L en esculétine et 15,5  $\mu$ g/L en scopolétine. L'ordre de grandeur de ces résultats semble cohérent avec de précédentes études (Barnaba *et al.* 2015 ;

Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987 ; Tricard, Salagoïty et Sudraud 1987). En ce qui concerne la scopolétine, des concentrations bien inférieures à son seuil de détection gustative dans les vins ont été mesurées.

Pour l'esculétine, des teneurs inférieures à son seuil ont été observées dans tous les vins blancs et dans certains vins rouges. Pour 12 d'entre eux, des concentrations supérieures au seuil de détection ont été enregistrées (**Figure 21**), suggérant une possible contribution sensorielle de l'esculétine à l'amertume de ces vins.



**Figure 21 :** Concentration en esculétine dans 43 vins rouges commerciaux. La ligne en rouge représente son seuil de détection gustative (Sd) dans les vins. Les barres d'erreurs indiquent la précision de la méthode.

Les concentrations retrouvées dans les différents vins sont globalement inférieures au seuil de détection gustative de la 4-méthylombelliférone et de la scopolétine et à proximité du seuil pour l'esculétine, ce qui suggère *a priori* une incidence gustative limitée des coumarines. Toutefois, il est envisageable que des interactions perceptives existent entre ces composés et les autres coumarines. Cette famille chimique pourrait ainsi influencer la perception sensorielle des vins boisés *via* des phénomènes de synergie. Cette hypothèse sera étudiée par la suite afin de conclure sur le réel impact des coumarines.

#### C. Dosage des coumarines dans les eaux-de-vie

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

Deux séries de spiritueux ont été utilisées pour cette étude. Les coumarines ont d'abord été quantifiées dans 28 eaux-de-vie commerciales, comprenant 12 cognacs, 4 eaux-de-vie de vin, 3 rhums, 5 whiskies et 4 bourbons. Toutes ces eaux-de-vie ont été élevées en fûts de chêne, avec des durées d'élevage non précisées mais variables (ANNEXE 2).

La deuxième série de spiritueux a été fournie par Rémy-Martin et comprenait dix millésimes, de 1970 à 2015, toujours en cours d'élevage dans des barriques à gros grains de 350 litres. Il s'agit des mêmes échantillons que présentés au **Chapitre I – III. C. 1. a**.

#### 2. Résultats et discussion

#### a. Eaux-de-vie commerciales

Des concentrations variables en coumarines ont été trouvées dans les différentes eauxde-vie commerciales (ANNEXE 4). Les teneurs moyennes obtenues pour l'esculétine, la fraxétine, la scopolétine, la coumarine et la 4-méthylombelliférone étaient, respectivement, de 131,1  $\mu$ g/L, 31,5  $\mu$ g/L, 363,8  $\mu$ g/L, 127,6  $\mu$ g/L et de 87,4  $\mu$ g/L, avec de fortes variations d'une référence à l'autre (**Figure 22**). Les concentrations trouvées pour l'ombelliférone étaient en dessous de la limite de quantification exceptées pour deux spiritueux. De manière générale, les résultats du dosage ont montré des teneurs plus élevées en coumarines dans les eaux-de-vie que dans les vins. Puisque les eaux-de-vie ont un temps d'élevage en barriques plus long que les vins, les écarts observés pourraient être causées par ce temps de vieillissement. En outre, l'extraction des composés peut être influencée par le degré alcoolique de la matrice, ainsi les spiritueux possèdent un pouvoir extracteur plus fort que les vins. Les eaux-de-vie résultent d'un assemblage de plusieurs millésimes dont la composition peut varier légèrement d'un tirage à un autre. Par conséquent, des variations pourraient être observées d'une bouteille à une autre d'un même spiritueux si celle-ci sont issus de deux tirages différents.



**Figure 22 :** Variations des concentrations de l'esculétine (E), la fraxétine (F), la scopolétine (S), l'ombelliférone (Om), la coumarine (C) et de la 4-méthylombelliférone (4-Meom) dans 28 eaux-de-vie commerciales. Les barres d'erreurs indiquent les valeurs minimales et maximales.

Les seuils de détection gustative de l'esculétine et de la 4-méthylombelliférone ont été estimés à 1,1 mg/L et à 397  $\mu$ g/L, respectivement. Les teneurs en ces deux molécules mesurées dans des eaux-de-vie commerciales sont inférieures à leur seuil de détection gustative. Bien que ces composés possèdent un goût amer marqué, individuellement ils ne possèdent pas d'impact sensoriel.

Pour la scopolétine, des concentrations très variables d'une référence à l'autre ont été observées, allant de 40,1 µg/L à 1,5 mg/L (**Figure 23**). En fonction de la nature de l'eau-devie, des teneurs plus ou moins similaires ont été remarquées entre les cognacs et *brandies* d'une part, et entre les whiskies, rhums et bourbons d'autre part. Ces écarts de concentrations pourraient venir de l'origine botanique du bois utilisé pour le vieillissement en barriques. En effet, les cognacs et *brandies* sont généralement vieillis dans des fûts de chêne français, sessile ou pédonculé, alors que les bourbons sont vieillis dans des fûts de chêne américain. Le rhum (R-3), où la concentration en scopolétine atteint 1,5 mg/L, a également été élevé dans des fûts de chêne blanc d'Amérique qui avaient précédemment accueilli du whisky américain. Ces observations confirment de précédentes études qui ont mis en évidence une teneur en scopolétine plus élevée dans les chênes américains que dans les chênes français (Canas, Leandro, *et al.* 2000 ; Puech et Moutounet 1988). En outre, ce composé peut agir comme un marqueur chimique de cette espèce de chêne (Baldwin *et al.* 1967 ; Canas 2017).



**Figure 23 :** Concentration en scopolétine dans 28 eaux-de-vie commerciales. La ligne en rouge représente son seuil de détection gustative (Sd) dans l'eau-de-vie. Les barres d'erreurs indiquent la précision de la méthode.

Une comparaison avec les données sensorielles révèle que les concentrations en scopolétine étaient supérieures au seuil de détection gustative (789  $\mu$ g/L) dans les cinq eauxde-vie élevées en fût de chêne américain (**Figure 23**). Ces résultats établissent la pertinence sensorielle de la scopolétine, susceptible de contribuer à l'amertume de ces spiritueux.

#### b. Eaux-de-vie de Cognac millésimes

Les six coumarines ont été dosées dans une série de 10 millésimes d'eaux-de-vie de Cognac, provenant de la même distillerie et élevés selon les mêmes conditions (**ANNEXE 4**). Les concentrations calculées pour chaque molécule, représentées à la **Figure 24**, correspondent à la moyenne des cinq réplicats de chaque millésime.



**Figure 24 :** Concentrations moyennes des six coumarines dans 10 millésimes d'eaux-de-vie de Cognac provenant de la même distillerie. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Les teneurs en esculétine et scopolétine sont plus élevées dans les eaux-de-vie âgées, respectivement jusqu'à 338  $\mu$ g/L et 264  $\mu$ g/L pour le millésime 1970. De précédentes études ont déjà mis en évidence des concentrations en scopolétine plus élevées au cours du vieillissement en barriques (Otsuka et Zenibayashi 1974 ; Salagoity-Auguste, Tricard et Sudraud 1987). En outre, les valeurs décrites dans la littérature coïncident avec celles obtenues lors de ce dosage des 10 millésimes (Canas 2017 ; Da Porto *et al.* 2000 ; Rodríguez Dodero *et al.* 2010). Les résultats obtenus pour l'esculétine confirment également des études antérieures (Barnaba *et al.* 2015 ; Rodríguez Dodero *et al.* 2010).

#### Première partie : Etude de la contribution des lignanes et des coumarines

Les teneurs en coumarine sont également plus élevées dans les eaux-de-vie âgées, jusqu'à 209  $\mu$ g/L pour le millésime 1995. Cette molécule a été peu étudiée dans les spiritueux. Cependant, les résultats obtenus sont en accord avec ceux décrits dans la littérature, concernant la quantification de plusieurs polyphénols dans la cachaça (Rodrigues *et al.* 2016) ainsi que dans des eaux-de-vie issues du sucre de canne (Silva *et al.* 2009).

La concentration en fraxétine semble suivre une distribution en cloche ; faible dans les échantillons de 2015 (19  $\mu$ g/L), elle est maximale dans l'eau-de-vie de 1995 (204  $\mu$ g/L) puis retrouve des valeurs plus basses dans les millésimes les plus anciens (118  $\mu$ g/L pour le millésime 1973). Ces teneurs pourraient suggérer une dégradation du composé après un long temps en barriques. La fraxétine n'avait jamais été décrite dans des eaux-de-vie de Cognac.

De 2015 à 2008, les résultats ont montré que plus l'eau-de-vie était vieillie, plus la concentration en 4-méthylombelliférone était élevée, confirmant une étude de 2014 (Santiago *et al.* 2014). A l'inverse, pour les plus vieux millésimes, de plus faibles concentrations en ce composé ont été mesurées. Le vieillissement en fûts usés implique un potentiel extractible des composés inférieur à celui des fûts de chêne neufs, ainsi ce paramètre pourrait influer sur la teneur en 4-méthylombelliférone dans les diverses eaux-de-vie. Cependant, cette hypothèse doit être étudiée plus en détails, car les résultats pourraient également être dus à des changements de pratiques pour le vieillissement des eaux-de-vie ou à des changements de fûts lors de ces 50 dernières années.

L'ombelliférone n'a été dosée que dans quatre millésimes anciens (1995, 1993, 1990 et 1973), à de faibles concentrations (de 5,5  $\mu$ g/L à 67,8  $\mu$ g/L). A titre de référence, Rodríguez Dodero *et al.* avaient quantifié cette molécule par fluorescence dans plusieurs spiritueux, avec des valeurs allant jusqu'à 5,4  $\mu$ g/L (Rodríguez Dodero *et al.* 2010). Il est possible que la cinétique d'extraction de ce composé soit très lente, qu'il soit formé lors du vieillissement ou que la composition du bois ait changé au cours de ces 20 dernières années.

Un rapport entre la somme des concentrations moyennes des molécules les plus abondantes dans les vieux millésimes, soit l'esculétine et la scopolétine, et la concentration moyenne en molécule la moins présente dans les vieux millésimes, soit la 4-méthylombelliférone, a été calculé. En tentant de relier ce rapport à l'âge des eaux-de-vie, une courbe de tendance exponentielle a été obtenue avec un coefficient de corrélation de 0,9579 (**Figure 25**). Ce ratio est quasiment linéaire entre 2015 et 1995, ce qui montre que les concentrations en esculétine, scopolétine et 4-méthylombélliférone évoluent dans le même sens

et dans les mêmes proportions. A partir du millésime 1993, le ratio augmente d'une façon exponentielle, ce qui pourrait suggérer une cinétique d'extraction de l'esculétine et de la scopolétine différente de celle de la 4-méthylombelliférone ou une formation des deux premiers composés au cours du temps.



**Figure 25 :** Courbe de tendance exponentielle reflétant le rapport de la somme des concentrations moyennes obtenues en esculétine et scopolétine sur les concentrations moyennes obtenues en 4-méthylombelliférone.

D'un point de vue sensoriel, les teneurs en esculétine, scopolétine et 4méthylombelliférone obtenues pour ces échantillons de cognacs sont inférieures à leur seuil de détection gustative. Ces résultats corroborent ceux obtenus précédemment pour les eaux-de-vie commerciales. Ces molécules ne semblent pas participer individuellement au goût des cognacs analysés, mais seulement à celui des bourbons. Néanmoins, des phénomènes de masquage, d'addition et de synergie ont déjà été observés en œnologie, principalement pour des molécules aromatiques (de-la-Fuente-Blanco, Sáenz-Navajas et Ferreira 2016 ; Lytra *et al.* 2013 ; Niu *et al.* 2019 ; Pineau *et al.* 2007). De ce fait, il serait possible que les coumarines, *via* des interactions perceptives, influencent le goût des vins et des eaux-de-vie. Pour vérifier cette hypothèse, de nouvelles analyses sensorielles ont été mises en place.

### IV. Influence des six coumarines en mélange sur l'équilibre gustatif des vins et des eauxde-vie

#### A. Analyses sensorielles et traitements statistiques

Comme expliqué précédemment au paragraphe **III. B. 2.**, la coumarine possède une odeur détectable de l'ordre du  $\mu$ g/L. Afin que le panel ne soit pas influencé par cette molécule, des pince-nez ont été utilisés pour toutes les dégustations.

#### 1. Dégustation préliminaire

Les six coumarines ont été dégustées dans une solution hydro-alcoolique (H<sub>2</sub>O/EtOH : 88/12) d'abord séparément à 1 mg/L puis en mélange, chacune d'entre elle à 1 mg/L également. La dégustation a été réalisée avec un panel de cinq experts, avec les conditions décrites dans la partie expérimentale **III. B. 1**.

L'amertume a été perçue de façon plus intense dans le mélange que dans les verres contenant une seule coumarine. Cette dégustation préliminaire a permis de suggérer l'existence de phénomènes synergiques entre les six coumarines. Afin de valider cette observation avec un panel plus large et d'en mesurer l'ampleur plus précisément, des profils sensoriels ont été mis en place.

#### 2. Profil descriptif

L'objectif de ces dégustations est de déterminer la contribution des six coumarines en mélange sur l'équilibre des vins et des eaux-de-vie et de mesurer à partir de quelle concentration un effet significatif est observable. Pour cela, deux dégustations ont été organisées : la première dans la matrice vin et la deuxième dans la matrice eau-de-vie. Le panel était constitué de 20 dégustateurs (15 femmes et 5 hommes) âgés de 20 à 37 ans pour la première expérimentation et de 22 dégustateurs (12 femmes et 10 hommes) âgés de 20 à 37 ans (panel formé) pour la deuxième. Les dégustations se sont déroulées dans la salle d'analyse sensorielle de l'ISVV, dans les conditions décrites dans la partie expérimentale générale.

### a. Détermination du profil sensoriel d'un vin rouge, d'un vin blanc et d'une eau-de-vie jeune avant et après ajout de coumarines

Pour la première dégustation, deux vins secs non boisés ont été choisis : un blanc (Pays d'Oc ; 12 % vol. ; pH 3,43 ; AT = 3,6 g/L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et un rouge (Blaye Côtes de Bordeaux ; 12,7 % vol. ; pH 3,7 ; AT = 3,2 g/L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Pour la deuxième dégustation, une eau-de-vie jeune réduite à 40 % d'alcool, fournie par la société Rémy-Martin, a été utilisée. Comme précédemment, ces trois matrices ont été analysées en LC-HRMS pour confirmer l'absence des six coumarines.

Pour chaque matrice, cinq modalités différentes ont été présentées aux dégustateurs. La modalité témoin correspond à la matrice sans ajout de molécules et les quatre autres modalités correspondent à des concentrations croissantes en coumarines. Les valeurs ont été choisies suite aux résultats des dosages dans les vins et les spiritueux. Ainsi, les concentrations ajoutées pour chaque modalité correspondent au 1<sup>er</sup> quartile (M1), à la médiane (M2), au 3<sup>ème</sup> quartile (M3)

et au maximum (M4) calculés pour chaque coumarine (**Tableau 16**). Il a été demandé au panel de réaliser un profil sensoriel et de noter l'intensité de l'amertume et de la douceur sur une échelle linéaire de 0 à 10 pour le verre témoin et le verre supplémenté. Ainsi, pour chaque matrice, le panel devait déguster 8 verres (4 témoins et 4 supplémentés).

**Tableau 16 :** Concentrations en coumarines utilisées pour la détermination des profils sensoriels dans un vin blanc, un vin rouge et une eau-de-vie jeune pour chaque modalité ( $\mu$ g/L).

		1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
		(M1)	(M2)	(M3)	(M4)
	Esculétine	24,61	38,82	54,22	98,51
	Scopolétine	2,70	10,15	22,38	56,30
Vin Blanc	Coumarine	0,00	0,90	15,60	55,55
( <b>VB</b> )	Fraxétine	4,48	7,75	11,54	36,55
	Ombelliférone	0,00	0,00	0,00	25,33
	4-Méthylombelliférone	0,00	0,00	0,00	0,00
	Esculétine	51,01	79,18	130,05	268,86
	Scopolétine	0,00	2,89	7,51	307,25
Vin rouge	Coumarine	50,62	135,13	226,13	397,81
(VR)	Fraxétine	5,74	8,97	24,10	77,03
	Ombelliférone	0,00	5,00	9,54	94,57
	4-Méthylombelliférone	0,00	0,00	0,00	0,00
	Esculétine	83,92	148,91	268,56	407,59
	Scopolétine	81,26	172,90	265,55	1640,92
Eau-de-vie	Coumarine	80,53	111,16	141,39	465,64
(EDV)	Fraxétine	22,07	62,87	101,84	269,07
	Ombelliférone	0,00	0,00	0,00	249,52
	4-Méthylombelliférone	51,98	102,94	201,51	690,16

#### b. Traitement statistique

Le test sensoriel utilisé pour cette dégustation est le test de classement par rangs, par conséquent le test de Friedman a été choisi pour le traitement statistique. Son principe a été décrit dans la partie expérimentale générale paragraphe **III. B. 2. c**.

#### B. Résultats et discussion

#### 1. Profil descriptif des vins supplémentés en coumarines

Les résultats du test statistique ont montré des tendances similaires entre le vin blanc et le vin rouge. Pour les deux matrices, seul le descripteur amer a présenté des différences significatives entre les modalités témoin et supplémentées. En effet, toutes les *p-value* associées au descripteur sucré étaient largement au-dessus de 0,05. En outre, l'étude a mis en évidence des effets significatifs de l'amertume pour deux modalités, M3 et M4 avec des *p-value* égales à 0,032 et 0,025, respectivement, pour le vin blanc et des *p-value* égales à 0,033 et 0,039 pour le vin rouge (**Figure 26** et **Figure 27**). Les modalités M1 et M2 n'ont pas été distinguées de la modalité témoin.



**Figure 26 :** Notes moyennes et intervalles de confiance (95 %) des intensités de l'amertume perçues pour les quatre modalités dans un vin blanc. NS : Non Significatif ; Significatif au risque de 5 % (\*).



**Figure 27 :** Notes moyennes et intervalles de confiance (95 %) des intensités de l'amertume perçues pour les quatre modalités dans un vin rouge. NS : Non Significatif ; Significatif au risque de 5 % (\*).

#### 2. Profil descriptif des eaux-de-vie supplémentées en coumarines

Comme pour le vin, le descripteur sucré n'a montré aucun effet significatif entre les différentes modalités dans une eau-de-vie blanche, avec des *p-value* > 0,05. Cependant, pour le descripteur amer, le test de Friedman a pu mettre en évidence une distinction entre les échantillons. Les dégustateurs ont été capables de différencier les modalités M2, M3 et M4 par rapport à la modalité témoin, avec des *p-value* de 0,039, 0,033 et 0,028, respectivement. La modalité M1 n'a en revanche pas pu être distinguée du témoin (**Figure 28**).







#### 3. Discussion

Lors de ces deux dégustations, le panel devait évaluer l'intensité de l'amertume et de la sucrosité des vins et des eaux-de-vie présentés. Le test statistique a démontré que les dégustateurs n'ont pas décelé de modification du caractère sucré après ajout des coumarines. En revanche, des différences significatives d'amertume ont été perçues entre les différentes modalités. Un ajout de coumarines à des concentrations observées dans plus de la moitié des vins et des eaux-de-vie analysés entraîne une augmentation de la saveur amère. Ces résultats montrent que si les coumarines ne contribuent pas individuellement au goût des vins et des eaux-de-vie, elles sont néanmoins susceptibles de jouer un rôle *via* des effets de synergie en augmentant la perception amère.

En œnologie, ces phénomènes ont déjà été observés, principalement pour des molécules aromatiques (de-la-Fuente-Blanco, Sáenz-Navajas et Ferreira 2016 ; Lytra *et al.* 2013 ; Niu *et* 

*al.* 2019 ; Pineau *et al.* 2007). Notamment, Pineau *et al.* ont étudiés le rôle de certains esters éthyliques d'acide gras, présents dans les vins à des concentrations inférieures à leurs seuils olfactifs mais qui contribuent significativement à l'effet sensoriel fruité des vins rouges (Pineau *et al.* 2009). D'un point de vue gustatif, ces effets d'interaction ont peu été étudiés en œnologie. Des travaux se sont essentiellement portés sur l'effet d'addition de molécules sapides sur la perception olfactive des vins (Arvisenet, Guichard et Ballester 2016 ; Jones *et al.* 2008 ; Symoneaux *et al.* 2015). En outre, il a été rapporté que la complexité chimique d'un mélange gustatif pouvait influencer la nature des interactions perceptives (Stevens 1997). Cette même étude a mis en évidence que le seuil de détection d'un seul composé sapide est réduit dès lors qu'il est en mélange avec au moins trois autres composés sapides, impliquant une intégration neuronale pendant le processus de perception (Dalton *et al.* 2000).

Compte tenu de l'influence gustative de ces composés en mélange, il est intéressant de chercher à limiter leur teneur dans le bois afin d'éviter une dépréciation de l'équilibre gustatif des vins et des spiritueux que leur amertume pourrait provoquer. Leur dosage a ainsi été réalisé dans différents extraits de bois de chêne.

#### C. Dosage des coumarines dans des macérats de bois de chêne

#### 1. Nature et origine des macérats de bois de chêne analysés

Les échantillons de bois de chêne proviennent de la tonnellerie Seguin-Moreau. Deux paramètres ont été étudiés : l'influence de l'espèce de chêne et l'effet de la chauffe sur les concentrations en coumarines. Pour le premier paramètre, deux chênes français ont été étudiés. Pour cela, 9 échantillons de chêne sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl., 1784) et 9 échantillons du chêne pédonculé (*Quercus robur* L., 1753) ont été sélectionnés. Ces échantillons ont été analysés au préalable par LC-HRMS, selon la méthode développée par Marchal *et al.* (Marchal, Prida et Dubourdieu 2016), afin de déterminer l'espèce de chêne sur la base de leur composition triterpénique. Pour le deuxième paramètre, trois modalités de chauffe ont été étudiés : du bois non-chauffé, du bois chauffé dans les conditions de la fabrication des barriques (aux alentours de 180 °C) et du bois plus fortement chauffé (200 °C pendant 4 h). Le bois non-chauffé (BNC) provient de la face externe de la douelle, le bois « chauffe normale » (BCN) est collecté sur la face interne, tandis que le reste de la douelle est chauffé dans une étuve, ce qui correspond à la « chauffe forte » (BCF). Les 18 échantillons des deux espèces botaniques de chêne, précédemment décrits, ont subi les trois types de chauffe.

Par la suite, ces 54 échantillons ont été broyés sous forme de poudre puis mis à macérer dans une solution modèle de vin (H<sub>2</sub>O/EtOH : 88/12, 5 g/L d'acide tartrique, pH 3,5) à 50 g/L pendant 48 h. Ils ont ensuite été dilués et filtrés à 0,45  $\mu$ m avant d'être injectés. Toutes les concentrations ont été exprimées en  $\mu$ g/g de bois sec.

#### 2. Résultats du dosage des six coumarines dans les macérats de bois et discussion

La méthode de quantification développée précédemment a été appliquée à des extraits de bois de chêne afin d'étudier l'influence des différents paramètres de tonnellerie sur la composition en coumarines. Pour les deux paramètres étudiés, l'ombelliférone n'a pas pu être détectée ou quantifiée, validant des observations de précédentes études (Canas *et al.* 2011 ; Canas, Leandro, *et al.* 2000). Tous les résultats de la quantification sont reportés à l'**ANNEXE 4**.

#### a. Influence de l'espèce de chêne

Les résultats de la quantification sont présentés à la **Figure 29**. Un test statistique de Kruskal-Wallis, dont le principe a été expliqué dans la partie expérimentale, a été utilisé. L'objectif est de déterminer si, pour chaque molécule, une différence significative est observée entre les deux espèces de chêne.

Les résultats ont montré un effet espèce significatif pour l'esculétine, la fraxétine et la scopolétine au seuil de 0,1 % (*p-value* < 0,0001 pour les trois molécules). A l'inverse, les concentrations en coumarine et en 4-méthylombelliférone ne sont pas influencées par l'origine botanique du chêne, avec des *p-value* égales à 0,966 et 0,484 respectivement (**Figure 29**).



**Figure 29 :** Concentrations moyennes ( $\pm$  intervalles de confiance à 95 %) en esculétine, fraxétine, scopolétine, coumarine et 4-méthylombelliférone (4-Me) pour les échantillons de bois des espèces sessile et pédonculé. NS : Non Significatif ; Significatif au risque de 5 % (\*), de 1 % (\*\*) et de 0,1 % (\*\*\*).

Les teneurs en esculétine varient de 0,04  $\mu$ g/g de bois à 2,98  $\mu$ g/g de bois pour le chêne sessile et de 0,04 à 0,267 pour le chêne pédonculé, ce qui rejoint des résultats déjà publiés (Brígida Fernández de Simón *et al.* 1999 ; 1996). L'influence du bois de chêne sur la concentration en esculétine n'a jamais été décrite à ce jour. Les vins sont généralement élevés dans des barriques constituées de chêne sessile et dans une moindre mesure de chêne pédonculé. Il a été montré dans le paragraphe **III. C. 2**. que l'esculétine pouvait contribuer au goût de certains vins rouges. Cette contribution pourrait être expliquée par la concentration plus importante en esculétine trouvée dans le chêne sessile que dans le chêne pédonculé.

Des concentrations moyennes en scopolétine de 1,47  $\mu$ g/g de bois sec (allant de 0,02 à 5,4  $\mu$ g/g) pour le chêne sessile et de 0,15  $\mu$ g/g de bois pour le chêne pédonculé (avec des valeurs allant de 0,02 à 0,56  $\mu$ g/g) ont été obtenues, ce qui est cohérent avec de précédentes études (Canas *et al.* 2011 ; Canas, Leandro, *et al.* 2000 ; Brígida Fernández de Simón *et al.* 1996). Toutefois, l'influence de l'origine botanique sur la teneur en scopolétine n'avait jamais été mise en évidence.

Les concentrations moyennes en fraxétine dans le bois de chêne ont été mesurées à 0,73  $\mu g/g$  (de 0,10 à 2,26  $\mu g/g$ ) et 0,26  $\mu g/g$  (de 0,10 à 0,77  $\mu g/g$ ), respectivement, pour le chêne sessile et le chêne pédonculé. A titre de référence, la fraxétine est l'un des composés majoritaires du genre *Fraxinus*, avec une teneur proche de 9 mg/g d'extrait sec (Wu *et al.* 2007). Ainsi, les valeurs mesurées pour le genre *Quercus* sont bien plus faibles que pour le frêne. Il s'agit néanmoins de la première quantification de la fraxétine dans le genre *Quercus*. En outre, la mise en évidence d'un effet significatif entre deux espèces de bois du même genre n'a jamais été décrite dans la littérature pour cette molécule.

Pour tous les composés, de forts écarts interindividuels au sein d'une même espèce ont été observés, à l'instar d'autres composés, comme la whisky-lactone (Prida *et al.* 2007) ou les ellagitannins (Prida *et al.* 2006). Même si l'origine botanique a un effet significatif sur la teneur en scopolétine, esculétine et fraxétine, ces composés ne peuvent être utilisés pour discriminer sans ambigüité l'espèce de chêne, en raison de cette forte variabilité qui demeure par ailleurs inexpliquée.

#### b. Influence de la température de chauffe

Parmi les principales étapes de la fabrication des fûts en tonnellerie, la chauffe du bois est fondamentale puisqu'elle permet de faire évoluer la composition chimique de celui-ci (Cadahía *et al.* 2001 ; Chatonnet 1995 ; Gimenez Martinez *et al.* 1996 ; Sarni *et al.* 1990). Ainsi, l'intensité de la chauffe constitue un paramètre important à contrôler.

Pour les trois types de chauffe, neuf réplicats biologiques ont été réalisés et ce pour les deux espèces de chêne. Après le dosage de ces échantillons, un test de Kruskal-Wallis avec la procédure de Dunn a été effectué. Les résultats n'ont montré aucune influence significative de la température de chauffe pour l'esculétine, la fraxétine et la scopolétine, pour les deux espèces de chêne (*p-value* > 0,05). A l'inverse, les analyses ont montré que les teneurs en coumarine et en 4-méthylombelliférone augmentaient significativement au cours de la chauffe, au seuil de 0,1 %. Le test de Dunn a permis de classer les modalités en plusieurs groupes pour chaque molécule. Pour la coumarine, la modalité non chauffée (BNC), groupe « a », est différenciée des deux autres chauffes, groupe « b ». En effet, la teneur moyenne en coumarine, pour les deux chênes, passe de 0,2  $\mu$ g/g pour le BNC à 4,3  $\mu$ g/g pour la modalité forte (BCF), et la modalité chauffe normale (BCN) et la modalité chauffe forte (BCF), pour les deux espèces de chêne (**Figure 30**). Une chauffe poussée n'augmente donc pas la teneur en coumarine. Si l'effet de la température sur cette molécule n'avait jamais étudié, les valeurs mesurées sont en accord avec la littérature (Silva *et al.* 2009).



**Figure 30 :** Variations des concentrations en esculétine (E), fraxétine (F), scopolétine (S), coumarine (C) et 4-méthylombelliférone (4-Meom) pour les échantillons de bois des espèces sessile et pédonculé avec trois types de chauffe. « a », « b » et « c » représentent des groupes de significativité.

Pour la 4-méthylombelliférone, deux tendances ont été observées en fonction de l'origine botanique du chêne. Pour le chêne sessile, le test statistique a montré une différence significative pour les trois modalités de chauffe. Les teneurs moyennes de cette molécule augmentent de 0,1 à 7,9 puis à 13,8  $\mu$ g/g, respectivement pour le BNC (groupe « a »), BCN (groupe « b ») et BCF (groupe « c »). Pour le chêne pédonculé, seule la modalité BNC a été distinguée des deux autres. Cette coumarine a déjà été quantifiée dans le bois mais en fonction de la technique analytique utilisée les valeurs obtenues étaient en dessous de sa limite de quantification (Canas, Leandro, *et al.* 2000). En outre, l'effet de la chauffe sur les teneurs en cette coumarine n'avait jamais été étudié auparavant.

Pour la scopolétine et l'esculétine, des travaux antérieurs avaient déjà mis en évidence qu'elles n'étaient pas impactées par la chauffe (Cadahía *et al.* 2001 ; Canas 2017 ; Snakkers *et al.* 2003).

Suite à l'étude de deux paramètres de tonnellerie, des différences significatives ont été constatées en fonction des coumarines ciblées. La sélection de l'espèce de chêne ou le contrôle de la chauffe semblent être des éléments pertinents afin de réussir à moduler l'apport de certaines molécules. En effet, le chêne sessile semble contenir plus d'esculétine, de fraxétine et de scopolétine par rapport au chêne pédonculé. En outre, la chauffe semble augmenter la concentration en coumarine et en 4-méthylombelliférone, ce qui serait susceptible de modifier la contribution olfactive et gustative.

#### Conclusion Chapitre II

Les coumarines sont des molécules naturelles, libérées par le bois lors de l'élevage en barriques. Une approche de criblage a permis de rechercher des analogues structuraux de la coumarine. Six molécules ont été ciblées puis dosées dans divers échantillons de vins, d'eauxde-vie et d'extraits de bois de chêne. Cela a conduit notamment à l'identification de la fraxétine qui n'avait encore jamais été observée dans ces trois matrices.

La dégustation a permis de valider le goût amer des coumarines pures. Puis, les seuils de détection des trois coumarines notées comme les plus amères ont été déterminés dans un vin blanc et une eau-de-vie jeune. Ces seuils ont été établis à l'aide d'un panel entraîné à la dégustation, afin d'obtenir des valeurs les plus justes possibles. La confrontation des données sensorielles et quantitatives a permis de montrer que ces trois coumarines ne contribuaient pas, individuellement, à l'amertume des vins et des eaux-de-vie. Cependant, la dégustation de l'ensemble des coumarines en mélange a démontré la contribution gustative significative de ces composés à des concentrations observées dans les vins et les eaux-de-vie. Ce résultat suggère une action synergique des coumarines du bois de chêne. D'autres travaux devront être menés pour étudier plus précisément ce phénomène.

Enfin, l'étude des paramètres de tonnellerie a permis de mettre en évidence l'influence de l'origine botanique du bois de chêne et de la température de chauffe sur la présence des différentes coumarines du bois. Le contrôle de ces paramètres devrait permettre de moduler l'apport des coumarines et ainsi de maîtriser davantage la contribution amère de l'élevage en barriques

## **DEUXIÈME PARTIE**

## RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS MOLÉCULAIRES DES SAVEURS SUCRÉE ET AMÈRE CONFÉRÉES PAR L'ÉLEVAGE SOUS BOIS DE CHÊNE

#### **DEUXIÈME PARTIE :**

### RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS MOLÉCULAIRES DES SAVEURS SUCRÉE ET AMÈRE CONFÉRÉES PAR L'ÉLEVAGE SOUS BOIS DE CHÊNE

#### CHAPITRE III. DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT D'EXTRAITS DE BOIS DE CHÊNE GUIDÉ PAR LA DÉGUSTATION

#### Introduction

La contribution gustative de l'élevage en fûts de chêne a été mise en évidence lors de précédents travaux. Plusieurs déterminants moléculaires responsables de ce phénomène ont été décrits dans la partie bibliographie générale. Au-delà de ces éléments, de nombreuses perceptions gustatives demeurent toutefois inexpliquées d'un point de vue moléculaire. C'est notamment le cas de la modulation de l'amertume et/ou de la sucrosité des vins et eaux-de-vie boisés induite par l'intensité de la chauffe des douelles. Il est bien connu que la composition en volatils du bois de chêne évolue pendant cette étape. Des observations sensorielles suggèrent qu'il en serait de même pour les composés sapides, ultérieurement libérés dans les vins et les spiritueux.

Cette deuxième partie vise à rechercher des molécules non-volatiles du bois de chêne possédant un goût sucré ou amer. Compte tenu du sujet d'étude, une double approche est utilisée, en adoptant conjointement des techniques analytiques et sensorielles. En effet, la nature chimique des molécules sapides potentiellement présentes dans le bois de chêne est *a priori* inconnue ; par conséquent, leur recherche est basée sur une stratégie inductive. Leur identification nécessite le développement d'un protocole de fractionnement et de purification.

#### I. Présentation de la stratégie inductive mise en œuvre

#### A. Principe général

Afin d'isoler des molécules sapides du bois de chêne, sans préjuger de leur nature chimique, une démarche inductive a été mise en place. Elle implique dans un premier temps une étape d'extraction suivie du développement d'un protocole de fractionnement. A l'issue de chaque étape de séparation, les différentes fractions obtenues sont dégustées. Celles présentant la plus grande intensité du caractère gustatif ciblé sont conservées pour la poursuite du fractionnement. Depuis quelques années, cette stratégie, inspirée des purifications bio-guidées couramment utilisées en pharmacognosie, a été mise en œuvre pour la recherche de composés

sapides, notamment au sein du laboratoire du Pr. Hofmann (Czepa et Hofmann 2004 ; Frank, Zehentbauer et Hofmann 2005 ; Kaneko *et al.* 2006 ; Salger, Stark et Hofmann 2019 ; Scharbert et Hofmann 2005 ; Spreng et Hofmann 2018). Dans ces travaux, l'analyse sensorielle est utilisée pour guider le fractionnement de divers aliments et boissons, dont le vin (Glabasnia et Hofmann 2006 ; Hufnagel et Hofmann 2008). Cette approche est employée au laboratoire depuis une dizaine d'années ; elle a permis d'isoler des composés sapides provenant de bois de chêne non chauffé, des pépins ou encore du vin (Cretin *et al.* 2019 ; Marchal, Waffo-Téguo *et al.* 2011).

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) et la Chromatographie Liquide Haute Performance à l'échelle préparative (HPLC-Prep) ont été utilisées afin de purifier des composés. Le recours à l'analyse sensorielle a permis de guider la purification, comme expliqué dans la partie expérimentale générale. L'objectif final de cette étude est d'obtenir des quantités suffisantes (de l'ordre du mg) de molécules pures pour les caractériser au niveau sensoriel et structural. La dégustation nécessite des quantités d'extraits importantes puisqu'une partie est consommée lors de l'analyse sensorielle. L'élucidation structurale des molécules pures a été conjointement effectuée par LC-HRMS et par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Leurs propriétés organoleptiques ont été établies par des tests psychophysiques, ouvrant la voie à l'étude de leur impact dans les vins et les eaux-de-vie.

Empiriquement, les tonneliers et les vinificateurs observent une diminution de l'amertume et une augmentation de la sucrosité au cours du « bousinage ». Tout au long de cette partie, une étude comparative entre trois modalités de chauffe (bois non chauffé – BNC, bois de chauffe normale – BCN et bois de chauffe forte – BCF) a été effectuée afin de percevoir les différences gustatives liées à ce procédé et ainsi cibler des molécules susceptibles d'être modifiées.

#### B. Suivi du fractionnement

La LC-HRMS a été utilisée pour analyser la composition chimique des fractions obtenues et pour suivre le fractionnement. Tous les échantillons ont été injectés en mode positif et négatif. Les conditions chromatographiques et les paramètres spectroscopiques utilisés sont détaillés dans les tableaux suivants (**Tableau 17** et **Tableau 18**).

**Tableau 17 :** Conditions chromatographiques utilisées au cours du fractionnement des extraits de bois de chêne.

Appareil : U-HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific)									
Colonne : Hypersil Gold C18 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules 1,9 µm									
Phase mobile : Débit à 600 μL/min Solvant A : H <sub>2</sub> O ultrapure + 0,1 % HCOOH Solvant B : ACN LC-MS Optima + 0,1 % HCOOH									
Temps (min) : % de B :	0 20	1,0 20	5,0 50	5,3 98	6,0 98	6,15 20	7,0 20		
Temps (min) : % de B :	0 10	1,0 10	5,0 50	5,3 98	6,0 98	6,15 10	7,0 10		
	(Thermo Fischer 8 ; 100 x 2,1 mm μL/min - 0,1 % HCOOH ptima + 0,1 % HC Temps (min) : % de B : Temps (min) : % de B :	(Thermo Fischer Scien 8 ; 100 x 2,1 mm ; Tai μL/min - 0,1 % HCOOH ptima + 0,1 % HCOOF Temps (min) : 0 % de B : 20 Temps (min) : 0 % de B : 10	<ul> <li>(Thermo Fischer Scientific)</li> <li>8 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des</li> <li>μL/min</li> <li>0,1 % HCOOH</li> <li>ptima + 0,1 % HCOOH</li> <li>Temps (min) : 0 1,0</li> <li>% de B : 20 20</li> <li>Temps (min) : 0 1,0</li> <li>% de B : 10 10</li> </ul>	(Thermo Fischer Scientific)         8 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des parti         μL/min         -0,1 % HCOOH         ptima + 0,1 % HCOOH         Temps (min) :       0         % de B :       20       20         50         % de B :       10       5,0         % de B :       10       10       50	(Thermo Fischer Scientific)         8 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules         μL/min         - 0,1 % HCOOH         ptima + 0,1 % HCOOH         Temps (min) :       0         0       1,0       5,0         % de B :       20       20       50         % de B :       10       1,0       5,0       5,3	<ul> <li>(Thermo Fischer Scientific)</li> <li>8 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules 1,9 μm</li> <li>μL/min</li> <li>0,1 % HCOOH</li> <li>ptima + 0,1 % HCOOH</li> <li>Temps (min) : 0 1,0 5,0 5,3 6,0</li> <li>% de B : 20 20 50 98 98</li> <li>Temps (min) : 0 1,0 5,0 5,3 6,0</li> <li>% de B : 10 10 50 98 98</li> </ul>	(Thermo Fischer Scientific)         8 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules 1,9 μm         μL/min         -0,1 % HCOOH         ptima + 0,1 % HCOOH         Temps (min) :       0         0       1,0       5,0         % de B :       20       20       50         % de B :       10       10       50       98       98       10	(Thermo Fischer Scientific).8 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules 1,9 $\mu$ m $\mu$ L/min- 0,1 % HCOOHptima + 0,1 % HCOOHTemps (min) :001,05,05,36,06,157,0% de B :20205098982020Temps (min) :01,05,05,36,06,157,0% de B :1010509898101010	<ul> <li>(Thermo Fischer Scientific)</li> <li>8 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules 1,9 μm</li> <li>μL/min</li> <li>-0,1 % HCOOH</li> <li>ptima + 0,1 % HCOOH</li> <li>Temps (min) : 0 1,0 5,0 5,3 6,0 6,15 7,0</li> <li>% de B : 20 20 50 98 98 20 20</li> <li>Temps (min) : 0 1,0 5,0 5,3 6,0 6,15 7,0</li> <li>% de B : 10 10 50 98 98 10 10</li> </ul>

**Tableau 18 :** Conditions spectrométriques utilisées au cours du fractionnement des extraits de bois de chêne.

Paramètre	Mode négatif	Mode positif
Débit du « sheath gas » <sup>a</sup>	70	70
Débit du gaz auxiliaire <sup>a</sup>	15	15
Débit du « sweep gas »	0	0
Tension du spray	- 3,5 kV	3,5 kV
Température du capillaire	350 °C	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	320 °C
Résolution <sup>b</sup>	25 000	25 000
AGC <sup>c</sup>	$10^6$ ions	$10^6$ ions
Gamme de masses	100 - 1500  Th	$100 - 1500 \; Th$

<sup>a</sup> Les débits du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires

<sup>b</sup> Résolution  $m/\Delta m$ , fwhm à m/z 200 Th

<sup>c</sup> Contrôle automatique de gain

La préparation des échantillons, en vue de l'analyse en LC-HRMS, a été réalisée de la façon suivante : une aliquote (0,5 mg) de chaque fraction a été reprise dans 1 mL de méthanol, 100  $\mu$ L ont été prélevés puis complétés avec 900  $\mu$ L d'eau Milli-Q. Ils ont été ensuite filtrés à 0,45  $\mu$ m avant injection.

#### C. Protocole des dégustations réalisées lors du suivi du fractionnement

A l'issue de chaque étape de fractionnement, les extraits ont été évaporés à sec afin d'éliminer les solvants. Ils ont ensuite été suspendus dans une large quantité d'eau puis lyophilisés. Une deuxième lyophilisation est réalisée afin d'éliminer les dernières traces éventuelles de solvants.

Le principe et les conditions de ces dégustations ont été expliqués dans la **partie expérimentale générale III.** A. Afin de préparer les solutions à déguster, les concentrations ont été calculées au *prorata* des quantités obtenues pour chaque fraction. Après pesée, les extraits ont été dissous dans 100  $\mu$ L d'éthanol puis dilués dans la solution hydro-alcoolique utilisée pour ces dégustations. L'éthanol permet de dissoudre préalablement les extraits pouvant présenter une faible solubilité dans la solution aqueuse. Afin de percevoir des différences entre les échantillons, une solution témoin a été réalisée en ajoutant 100  $\mu$ L d'EtOH à la solution hydro-alcoolique de base.

#### II. Préparation des échantillons

#### A. Matériel végétal

Le bois de chêne utilisé dans ce travail a été fourni par la tonnellerie Seguin-Moreau. Les trois modalités de chauffe correspondent à un bois non chauffé, à du bois chauffé dans les mêmes conditions que celles du « bousinage » des barriques (aux alentours de 180 °C pendant quelques minutes) et à du bois plus fortement chauffé (200 °C pendant 4 heures). Des travaux antérieurs ont mis en évidence une hétérogénéité de la composition du bois en fonction de son origine. Afin de s'affranchir des artefacts liés à la variabilité du matériel végétal, plusieurs douelles constituant une barrique ont été prélevées juste après l'étape de chauffe. Le bois nonchauffé provient ainsi de la face externe de la douelle, le bois « chauffe normale » est collecté en raclant la face interne, tandis que le reste de la douelle est chauffé au four, ce qui correspond à la « chauffe forte ». La préparation de cette dernière modalité vise à accentuer les effets de la chauffe, ce qui pourrait permettre de faciliter la purification des composés cibles. Tous les extraits de bois de chêne ont été réduits sous forme de sciure afin d'avoir un matériel végétal homogène. L'origine botanique de chêne sélectionné pour cette étude est le *Quercus petraea* (chêne sessile), puisqu'il est traditionnellement privilégié pour la fabrication des barriques destinées à l'élevage des vins. Afin de vérifier si les échantillons fournis correspondaient à l'espèce souhaitée, les extraits ont été analysés par LC-HRMS selon la méthode développée par Marchal *et al.* (Marchal, Prida et Dubourdieu 2016). L'indice triterpénique (IT) a permis de déterminer si les extraits provenaient du chêne sessile ou du chêne pédonculé, selon la formule suivante :

$$IT = \log \frac{[QTT I] + [QTT II] + [QTT III]}{[Glu - AB]}$$

où [QTT I], [QTT II], [QTT III] et [Glu-AB] correspondent respectivement aux concentrations des Quercotriterpénosides I, II et III ainsi que la concentration de l'acide bartogénique dans ces extraits.

Si, IT est supérieur à 0,5, alors l'extrait provient du chêne sessile

IT est inférieur à - 0,5, alors l'extrait provient du chêne pédonculé

Les résultats obtenus pour les échantillons fournis sont reportés dans le **Tableau 19**. L'IT est positif pour les trois modalités de bois de chêne ; le bois utilisé provient donc du chêne sessile. Ces échantillons sont sélectionnés pour toute la durée de l'étude.

**Tableau 19 :** Valeurs des indices triterpéniques (IT) des trois extraits de bois de chêne.

Type de chauffe	Bois Non Chauffé	Bois Chauffe Normale	Bois Chauffe Forte
	(BNC)	(BCN)	(BCF)
IT	2,3	2,3	1,7

#### **B.** Protocole d'extraction solide-liquide

Les macérations ont été réalisées, pour les trois modalités, en utilisant une solution hydro-éthanolique 50:50 (v:v) afin de mimer les conditions œnologiques (Marchal 2010). Ainsi, les molécules extraites, présentes dans cette solution, sont les mêmes que celles libérées dans un vin ou une eau-de-vie élevés en fûts de chêne. Ceci garantit *a priori* l'innocuité des fractions dégustées.

Pour chaque modalité, 600 g de copeaux ont été macérés dans 6 L de solution (soit une concentration massique en bois de 100 g/L), pendant deux semaines, à température ambiante, sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière. A l'issue de cette étape, les macérats ont été

filtrés afin d'éliminer les particules solides puis les copeaux ont été pressés pendant quinze minutes à une pression de 6 bars à l'aide d'un pressoir pneumatique. Ainsi, un filtrat de 5,5 L a été obtenu pour chaque modalité. Ces extraits ont été concentrés à l'évaporateur rotatif pour éliminer l'éthanol, susceptible de perturber les extractions liquide-liquide ultérieures. Après cette étape, un volume final de 900 mL a été atteint pour chaque modalité.

#### C. Pré-purification par extraction liquide-liquide

#### 1. Choix des solvants et mise en œuvre

La première étape du protocole de fractionnement consistait en des extractions liquideliquide, dont l'intérêt repose sur le choix des solvants. Après élimination de l'éthanol, les filtrats subissent alors des extractions liquide-liquide successives à l'aide de solvants de polarité croissante, ce qui permet de pré-purifier les extraits de bois. Pour chaque modalité, deux ampoules à décanter ont été utilisées, contenant chacune 450 mL d'extrait aqueux. Tout d'abord, une extraction liquide-liquide à l'heptane (Hept) a permis d'éliminer les composés les plus apolaires. Après agitation et dégazage, les deux phases ont été séparées par décantation. La phase organique, très peu abondante et ne possédant pas de propriétés gustatives selon des études antérieures, n'a pas été récupérée. Puis, la phase aqueuse a été extraite successivement avec du méthyl tert-butyl éther (MtBE), de l'acétate d'éthyle (AcOEt) et du butan-1-ol (BuOH). Le choix de ces solvants repose sur des travaux antérieurs pour fractionner l'extrait de bois en fonction de l'affinité des molécules pour chacun d'entre eux. Ces extractions ont été répétées plusieurs fois afin d'optimiser le rendement de récupération. La Figure 31 schématise le protocole mis en place. A la fin des extractions, quatre phases ont été conservées : les phases organiques des extractions au MtBE, à l'AcOEt, au BuOH (désignées par le nom de leur solvant) et la phase aqueuse résiduelle. Après évaporation à sec et lyophilisation des différentes phases, des poudres sèches et homogènes ont été obtenues. Ce protocole a été appliqué pour les trois modalités de chauffe, de telle sorte que les profils gustatifs des fractions obtenues puissent être comparés. Les 12 extraits ont par la suite été analysés en LC-HRMS.



**Figure 31 :** Schéma du protocole d'extractions liquide-liquide appliquées aux extraits de bois de chêne.
#### 2. Résultats

## a. Extractions liquide-liquide

Les macérats du bois non chauffé, chauffe normale et chauffe forte, ainsi que tous les extraits secs obtenus ont été analysés par LC-HRMS (**Figure 32**). La séparation chromatographique a été réalisée avec le gradient 1 (**Tableau 17**).



**Figure 32 :** Chromatogrammes, en mode « Base Peak », en ionisation négative des extraits prépurifiés de bois de chêne.

La **Figure 32** montre des profils chromatographiques différents entre les extraits bruts et les extraits pré-purifiés de la modalité « non chauffée » et des modalités « chauffe normale » et « chauffe forte ». En outre, les chromatogrammes des extraits bruts BCN et BCF ne semblaient pas présenter de différences majeures alors que des variations significatives du profil chromatographique ont été observées entre les deux modalités des extraits pré-purifiés MtBE et AcOEt. Cette observation confirme la pertinence de cette étape de fractionnement.

Après lyophilisation, les extraits ont été obtenus sous forme de poudres, différentiables de par leur couleur ; celle du BCF est nettement plus foncée que celle du BNC. Pour une macération de 600 g de copeaux de bois de chêne dans 6 L de solution, les masses obtenues vont de 1,54 à 19,51 g en fonction des phases et du type de chauffe. Le **Tableau 20** répertorie toutes les quantités obtenues.

Extraits pré-purifiés	BNC (g)	BCN (g)	BCF (g)
Phase MtBE	1,54	5,52	4,38
Phase AcOEt	1,63	6,04	2,54
Phase BuOH	3,55	7,51	2,62
Phase Aqueuse	14,55	19,51	10,81
Pourcentage d'extractibles	3,5 %	6,4 %	3,4 %

**Tableau 20 :** Quantités obtenues pour chaque modalité de chauffe après les extractions liquideliquide successives.

#### b. Dégustation des extraits pré-purifiés

Le MtBE, l'AcOEt et le BuOH sont des solvants de classe 3, selon la Pharmacopée Européenne. Ainsi, ils peuvent être considérés comme des solvants de moindre toxicité, ne présentant que peu de dangers pour la santé, notamment dans le cas d'exposition aigüe. En outre, la double lyophilisation permet d'éliminer les traces de solvants, ce qui permet de déguster des échantillons non-contaminés.

La dégustation a permis d'évaluer les différents extraits pré-purifiés. Le **Tableau 21** répertorie les résultats obtenus. L'extrait MtBE issu du BCF a présenté une douceur plus

importante que celle perçue dans le BCN et BNC. Une amertume plus marquée dans la phase BuOH du BNC a également été perçue.

Extraits pré-purifiés	BNC	BCN	BCF
Phase MtBE	Sucré : 2/5	Sucré : 3/5	Sucré : 4/5
Phase AcOEt	Sucré : 1/5	/	/
Phase BuOH	Sucré : 2/5 Amer : 3/5	Amer : 1/5	/
Phase Aqueuse	Amer : 2/5 Astringent : 4/5	Amer : 1/5 Sucré : 1/5	

**Tableau 21 :** Gustatogramme des extraits de bois de chêne pré-purifiés par extraction liquide 

 liquide.

/: Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec la solution témoin.

### 3. Discussion

Des différences d'extractibilité sont observées en fonction du type de chauffe. Il semblerait que pour une solution à 50 % d'éthanol, le BCN extraie davantage de composés non-volatils que le BNC et BCF en deux semaines. D'autres études pourront être menées afin de valider cette observation. Néanmoins, ces résultats tendent à confirmer que les composés du bois extraits dans les vins et les eaux-de-vie lors de l'élevage subissent des transformations majeures lors de la chauffe des douelles.

Au vu des différences perçues sur les divers profils chromatographiques, l'extraction liquide-liquide semble être une méthode adéquate pour fractionner une grande quantité d'échantillon. En outre, les rendements sont bons puisque les deux phases liquides sont récupérées.

La dégustation a permis de mettre en évidence des goûts différents en fonction des fractions. Les composés édulcorants identifiés au laboratoire, les Quercotriterpénosides, provenaient d'un extrait de bois de chêne non-chauffé et sont partiellement dégradés avec la chauffe. Or, une douceur plus marquée a été perçue dans le bois chauffe forte ; ces résultats tendent à montrer que d'autres composés sapides peuvent être responsables de cette sensation.

En outre, les observations empiriques des tonneliers et des vinificateurs concordent avec les perceptions perçues lors de cette dégustation, c'est-à-dire que la sensation de sucrosité augmente lors de la chauffe des douelles. Deux hypothèses pourraient permettre d'expliquer ce phénomène : la première serait que le bois chauffé libèrerait plus de composés sucrés, la seconde que le bois non chauffé libèrerait plus de composés amers. Ainsi, ces résultats de dégustation ont orienté la suite de la démarche. L'extrait pré-purifié BCF\_MtBE présentant la saveur douce la plus intense a été choisi pour la suite du fractionnement.

# III. Isolement de fractions sapides à partir de l'extrait MtBE du Bois Chauffe Forte (BCF\_MtBE)

# A. Fractionnement de l'extrait BCF\_MtBE par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

### 1. Principes et mise en œuvre

Plusieurs systèmes ont été testés afin de fractionner les extraits pré-purifiés du bois de chêne. Chaque système de solvants testé a été préparé en petite quantité (environ 10 mL), puis 800  $\mu$ L de chaque phase ont été transférés dans des vials contenant chacun 1 mg d'échantillon. Après homogénéisation manuelle, dissolution complète de la poudre et séparation des phases, 100  $\mu$ L de chaque phase ont été prélevés, évaporés à sec au RapidVap et analysés en LC-HRMS. Afin de choisir le système le mieux adapté au fractionnement, deux stratégies ont été utilisées. Dans un premier temps, le recours à l'analyse sensorielle a permis la détermination des conditions de séparation pour les extraits pré-purifiés. Cette approche originale, décrite au paragraphe suivant, est adaptée à la problématique de ce travail, c'est-à-dire l'isolement de molécules inconnues avec une activité gustative donnée. Toutefois, elle consomme des masses d'extraits importantes et ne peut donc être mise en œuvre qu'au début du protocole de fractionnement, quand les quantités disponibles sont encore suffisantes. Pour les fractionnements réalisés ultérieurement, le système a été choisi en calculant les coefficients de partage (K<sub>D</sub>X) des composés majoritaires des fractions considérées par LC-HRMS, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale.

Une fois le système choisi et en fonction de la quantité de l'échantillon, la séparation par CPC a été réalisée avec le rotor de 100 mL ou d'1 L. Pour le rotor de 100 mL, environ 1 L de solvant a été préparé et pour le rotor d'1 L, environ 10 L de solvant ont été préparés. Après une agitation vigoureuse, dégazage et séparation des phases, celles-ci ont été récupérées dans des flacons puis placées pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons afin de les dégazer. Pour le rotor d'1 L, les extraits ont été dissous dans environ 30 mL du système choisi (20 mL de phase inférieure et 10 mL de phase supérieure) puis filtrés à 0,45 µm avant d'être injectés. L'élution a été effectuée à 30 mL/min et l'extrusion à 50 mL/min, en mode ascendant. La rotation de la colonne a été fixée à 1200 rpm. La collecte a été réalisée dans des tubes à essais de 30 mL à raison de 25 mL par tube. Un tube sur dix a été prélevé de 200 µL, qui ont été évaporés à sec et repris dans 1 mL de solution hydro-méthanolique 95:5 (v:v) afin d'être analysés par LC-HRMS. Pour le rotor de 100 mL, les extraits ont été dissous dans environ 10 mL du système choisi (7 mL de phase inférieure et 3 mL de phase supérieure) puis filtrés à 0,45 µm avant d'être injectés. L'élution a été effectuée à 5 mL/min et l'extrusion à 10 mL/min, en mode ascendant. La rotation de la colonne a été fixée à 2300 rpm. La collecte a été réalisée dans des tubes à essais de 30 mL à raison de 5 mL par tube. Le prélèvement d'échantillon en vue de l'analyse LC-HRMS a été réalisé de la même manière que pour les expériences effectuées sur le rotor de 1 L. Une détection UV à 254 et 280 nm a permis de suivre le profil de l'élution en temps réel.

# 2. Choix du système de CPC pour l'extrait BCF\_MtBE : utilisation conjointe de la dégustation et de la LC-HRMS

L'extrait BCF\_MtBE présentait un profil chromatographique complexe. La suite du fractionnement a donc été nécessaire. Compte tenu de la quantité importante de cette fraction, la CPC a été utilisée pour la suite du protocole.

Le choix du système est un élément clé de la réussite d'un fractionnement en CPC. Il est généralement basé sur la mesure des coefficients de partage de plusieurs composés. Différents systèmes de la gamme Arizona ont été testés afin de fractionner le BCF\_MtBE (**Tableau 22**), selon le protocole décrit précédemment.

Tableau 22 : Systèmes testés pour le fractionnement par CPC de l'extrait BCF\_MtBE.

Systèmes	F	G	Н	J	K	L	М	Ν
Hept	1	1	1	2	1	2	5	1
AcOEt	5	4	3	5	2	3	6	1
MeOH	1	1	1	2	1	2	5	1
$H_2O$	5	4	3	5	2	3	6	1

Les systèmes les plus intéressants en matière de séparation des composés majoritaires étaient G, H et J, selon les chromatogrammes obtenus.

Dans cette étude, une nouvelle approche de choix des solvants a toutefois été mise en œuvre, de façon complémentaire à la méthode par LC-HRMS décrite ci-dessus. En effet, pour choisir le système le mieux adapté au partage des composés sapides, une dégustation des phases inférieures et supérieures de chaque système a été réalisée. Pour cela, les 3 systèmes ont été préparés de manière à disposer de 5 mL de chaque phase. Puis, ce volume a été transféré dans des piluliers contenant 5 mg de l'extrait BCF\_MtBE. Ces 6 extraits ont été évaporés à sec, lyophilisés puis dégustés. Les résultats de la dégustation sont présentés dans le **Tableau 23**.

Systèmes	G	Н	J
Phase supérieure	Sucré : 2/5	Sucré : 4/5	Sucré : 1/5
Phase inférieure	Sucré : 1/5 Amer : 2/5	Sucré : 2/5 Amer : 3/5	Amer : 4/5

**Tableau 23 :** Gustatogramme des tests de système G, H et J de l'extrait BCF MtBE.

A la vue des résultats, les systèmes G et H ont semblé présenter une meilleure partition de la douceur. En particulier, la dégustation a démontré que le système H avait une phase supérieure très douce et une phase inférieure avec une attaque douce mais une fin de bouche amère. Le système G avait une phase supérieure légèrement douce et une phase inférieure avec une attaque douce et une fin de bouche un peu moins amère que H. L'expérience de CPC sera donc réalisée d'abord avec le système H puis en mettant en place un gradient vers le système G. Ainsi, les molécules sucrées devraient théoriquement sortir au début de l'élution tandis que les molécules amères sortiraient pendant l'extrusion.

#### 3. Méthode de fractionnement par CPC

Au vu des quantités d'extrait BCF\_MtBE à traiter (3,5 g après les tests réalisés), l'utilisation du rotor d'1 L était nécessaire. La séparation par CPC a été réalisée en mode ascendant. La phase inférieure du système H constitue la phase stationnaire (voie A), composée essentiellement de méthanol et d'eau Milli-Q, et les phases supérieures du système H (voie B) et du système G (voie C) constituent la phase mobile, composées essentiellement d'heptane et d'acétate d'éthyle. La phase supérieure du système G a été préparée selon les proportions décrites par Bisson (Bisson 2012) afin de limiter la consommation de solvant. Ainsi, cette phase contient, en pourcentage volumique, 20,3 % d'heptane, 74,73 % d'acétate d'éthyle, 2,33 % de méthanol et 2,64 % d'eau. L'expérience de CPC commence avec le système H, puis évolue progressivement vers le système G, selon la méthode d'analyse 1 décrite dans le **Tableau 24**. Dans un premier temps, la phase A est pompée dans le rotor, dont la vitesse de rotation est fixée à 1200 rpm. Puis la phase B est pompée afin de procéder à l'équilibration de la colonne.

Méthode de fractionnement 1 : Rotor 1 L ; Mode ascendant								
	Début	Fin	Débit	Rotor	0/ <b>A</b>	0/ D	04 C	
	(min)	(min)	(mL/min)	(rpm)	% A	% <b>D</b>	% C	
	0	20	50	0	100	0	0	
Equilibration	20	40	50	500	100	0	0	
	40	45	30	1200	100	0	0	
	45	70	30	1200	0	100	0	
	0	66	30	1200	0	100	0	
Elution	66	100	30	1200	0	0	100	
	100	145	30	1200	0	0	100	
Extrusion	145	190	50	1200	100	0	0	

Tableau 24 : Méthode de fractionnement de l'extrait BCF\_MtBE par CPC.

Les tubes ont ensuite été regroupés selon leur profil chromatographique en LC-HRMS. De cette façon, l'extrait BCF\_MtBE a été décomposé en 8 fractions.

### 4. Résultats du fractionnement par CPC

La pression et le volume à l'équilibre étaient de 69 bars et de 315 mL, respectivement. Ce volume indique une bonne rétention de la phase inférieure dans la colonne, ce qui peut garantir la bonne séparation de l'extrait.

Après solubilisation de l'extrait dans 30 mL de mélange phase inférieure/phase supérieure et après filtration de celui-ci, l'échantillon s'est correctement répartit entre les deux phases ; ce qui permet de limiter les déstabilisations de l'équilibre dans le rotor.

En outre, le profil chromatographique UV de l'extrait BCF\_MtBE a présenté des signaux tout au long de l'expérience, ce qui suggère un bon partage des composés (**Figure 33**). Les profils des tubes injectés en LC-HRMS ont également montré des différences de profil, ce qui confirme un bon fractionnement de l'extrait. Ainsi, les extraits obtenus, après le rassemblement des tubes, sont différents.



**Figure 33 :** Profil chromatographique UV de la CPC de l'extrait BCF\_MtBE (absorbance à 280 nm).

Après évaporation et lyophilisation, les 8 fractions ont été dégustées en solution hydroalcoolique. Le **Tableau 25** récapitule les résultats de la dégustation.

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Goût
F1	23-25	310,1	Sucré : 3/5 Amer : 3/5
F2	26-31	1134	Amer : 4/5
F3	32-36	580,9	Amer : 3/5
F4	37-41	272,8	Sucré : 4/5
F5	42-48	180,3	Amer : 1/5
F6	49-56	102,5	/
F7	57-72	116,5	/
F8	73-220	190,8	/

Tableau 25 : Gustatogramme des 8 fractions de l'extrait BCF\_MtBE.

/: Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec la solution témoin.

#### 5. Discussion

La chromatographie de partage centrifuge présente un bon rendement (92 %), comme pour les extractions liquide-liquide. Les pertes sont en grande partie dues à la filtration de l'échantillon et aux transferts de verrerie. Le système utilisé a permis un bon fractionnement de l'extrait, avec huit nouvelles fractions différentes d'un point de vue analytique et sensoriel. En revanche, le fractionnement a révélé que la répartition des composés sapides est moins nette que celle suggérée par la dégustation des extraits bruts. Ce phénomène peut s'expliquer par un masquage du goût de certains composés par d'autres dans l'extrait initial. Cinq fractions se sont avérées intéressantes pour leur goût, sucré ou amer, avec des intensités variables. Leurs profils chromatographiques sont représentés dans la **Figure 34**. Malgré la présence de fractions amères, le fractionnement par CPC a permis de mettre en évidence une fraction (F4) avec un goût sucré intense, rappelant le goût perçu pour l'extrait BCF\_MtBE.

Pour la suite du fractionnement, les cinq extraits présentant un goût ont subi un deuxième fractionnement par CPC. L'étude a tout d'abord été orientée vers les fractions où l'intensité du goût était la plus importante, soit la fraction 2 (F2) pour l'amertume et la fraction 4 (F4) pour la sucrosité. Les fractions F1, F3 et F5 ont été fractionnées dans un second temps.



**Figure 34 :** Chromatogrammes, en mode « Base Peak », des fractions F1, F2, F3, F4 et F5 de l'extrait BCF\_MtBE (gradient LC : **1**).

#### **B.** Second fractionnement des extraits issus du BCF\_MtBE par CPC

#### 1. Fractionnement des fractions BCF\_MtBE\_F2 et F4

Les fractions F2 et F4 rassemblaient chacune deux critères intéressants : une saveur intense et une masse significative. En revanche, leur profil chromatographique comprenait un nombre important de pics, incompatible avec une purification directe par LC-préparative. Par

conséquent, un deuxième fractionnement par CPC a été entrepris. Les tests de partage ont été réalisés sur six systèmes différents pour les deux fractions. Il s'agit des systèmes de J à M de la gamme Arizona. L'objectif était de rechercher le système adéquat afin d'avoir un bon fractionnement des échantillons. Les  $K_D$  ont donc été calculés pour F2 et F4 (**Tableau 26**). Pour des raisons de simplification, les composés de ce travail seront désignés par leur masse nominale m/z de leur ion déprotonné [M-H]<sup>-</sup>.

					K <sub>D</sub>	
	Elution	Composés (m/z)	J	K	L	М
	Début	433	1,95	2,94	6,92	31,28
DCE MIDE ET	Milieu	397	0,52	1,17	5,53	13,3
DCT_MIDL_F2	Milieu	533	0,64	1,37	4,21	16,3
	Fin	517	0,18	0,37	1,07	3,99
	Début	467	0,66	1,22	6,85	39,72
BCF_MtBE_F4	Milieu	641	1,06	2,49	11,27	63,38
	Fin	917	1,04	3,86	31,72	94,67

**Tableau 26 :** K<sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour les fractions F2 et F4 du BCF\_MtBE.

Afin de pouvoir séparer correctement les composés, il est intéressant d'avoir des différences de  $K_D$  entre composés. Sur ces bases, un gradient du système L vers le système K a été choisi pour fractionner la fraction F2 de l'extrait BCF\_MtBE. Cependant, le temps d'élution a été rallongé afin que les composés ayant des  $K_D$  élevés (m/z 433 et 533) soient correctement séparés. Afin de confirmer la pertinence du système choisi pour fractionner par CPC, une première injection de 400 mg de la F2 a d'abord été réalisée sur le rotor de 100 mL en mode ascendant, selon la méthode d'analyse 2 décrite dans le **Tableau 27**.

Méthode de fractionnement 2 (BCF_MtBE_F2) : Rotor 100 mL ; Mode ascendant								
	Début	Fin	Débit	Rotor	0/ 1	0/ <b>D</b>	0/ C	
	(min)	(min)	(mL/min)	(rpm)	% A	% <b>D</b>	% C	
	0	15	10	0	100	0	0	
Davilibastica	15	30	10	500	100	0	0	
Equinoration	30	35	5	2300	100	0	0	
	35	60	5	2300	0	100	0	
	0	40	5	2300	0	100	0	
Elution	40	70	5	2300	0	0	100	
	70	130	5	2300	0	0	100	
Extrusion	130	165	10	2300	100	0	0	

**Tableau 27 :** Méthodes de fractionnement 2 et 3 pour les extraits BCF\_MtBE\_F2 et F4 par CPC.

Méthode de fractionnement 3 (BCF_MtBE_F4) : Rotor 100 mL ; Mode ascendant							
	Début	Fin	Débit	Rotor	0/ <b>A</b>	0/ <b>P</b>	
	(min)	(min)	(mL/min)	(rpm)	70 A	70 D	
	0	15	10	0	100	0	
Equilibration	15	30	10	500	100	0	
Equilibration	30	35	5	2300	100	0	
	35	60	5	2300	0	100	
Elution	0	60	5	2300	0	100	
Extrusion	60	90	10	2300	100	0	

La vitesse du rotor a été fixée à 2300 rpm. La phase A, soit la phase inférieure du système L, correspondait à la phase stationnaire et les phases B et C, soit les phases supérieures du système L et du système K respectivement, constituaient la phase mobile. Comme pour le fractionnement de l'extrait BCF\_MtBE, la phase supérieure du système K a été préparée selon les proportions décrites par Bisson (Bisson 2012). La pression et le volume à l'équilibre étaient de 76 bars et de 50 mL respectivement, ce qui indique une rétention acceptable des phases inférieures dans la colonne. En outre, le profil chromatographique UV présentait plusieurs pics. Après analyse en LC-HRMS, l'extrait F2 a pu être décomposé en six fractions distinctes, confirmant un bon fractionnement. Au vu des bons résultats obtenus, une deuxième expérience a été réalisée sur le reste de la fraction F2 (700 mg) avec la même méthode d'analyse. La pression et le volume à l'équilibre étaient de 77 bars et de 50 mL respectivement, comme pour la première injection. Le profil UV de la deuxième injection et les profils LC-HRMS sont également semblables à ceux de la première. Ainsi, les mêmes fractions ont été constituées pour les deux CPC.

Pour la fraction F4 de l'extrait BCF\_MtBE, les K<sub>D</sub> calculés étaient proches de 1 pour le système quaternaire J, Hept/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (2:5:2:5). En effet, ce système ne présentait pas des K<sub>D</sub> trop faibles, pouvant correspondre à une élution très rapide des composés, ni des K<sub>D</sub> très élevés, pouvant se traduire par une grande rétention. Celui-ci a donc été adopté pour le fractionnement de l'extrait BCF\_MtBE\_F4 (200 mg). L'expérience a été réalisée en mode ascendant selon la méthode d'analyse 3 détaillée dans le **Tableau 27**. La phase stationnaire (A) correspondait alors à la phase inférieure de J et la phase mobile (B) à la phase supérieure de J. La pression et le volume à l'équilibre étaient de 69 bars et de 55 mL, respectivement. Après un regroupement basé sur les profils chromatographiques, l'extrait F4 a été fractionné en six nouvelles fractions.

Par la suite, les 12 fractions ont été dégustées. Les résultats sont présentés dans **Tableau** 28.

**Tableau 28 :** Gustatogramme des six fractions obtenues après CPC pour les fractions F2(deuxième injection) et F4 de l'extrait BCF\_MtBE.

В	<b>F2</b> (2 <sup>ème</sup> inject	ion)		BCI	F_MtBE_ <b>F4</b>		
Fractions	Tubes	Masses (mg)	Goût	Fractions	Tubes	Masses (mg)	Goût
1	15-28	56	Amer : 1/5	1	20-23	3	Sucré : 1/5
2	29-38	95,7	Amer : 4/5	2	24-33	83,3	Sucré : 1/5
3	39-58	206,6	/	3	34-43	71,6	Sucré : 3/5
4	59-87	131	Amer : 3/5	4	44-51	4,9	/
5	88-116	58.5	/	5	52-56	1,4	Sucré : 2/5
6	117-180	40,6	Amer : 2/5	6	57-100	11,4	/

/: Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec la solution témoin.

Le gustatogramme montre une répartition de l'amertume dans plusieurs fractions issues de F2 et de la douceur dans plusieurs fractions issues de F4. En outre, on observe une certaine disparité des masses obtenues. A l'issue de ce deuxième fractionnement par CPC, certaines fractions avaient des profils chromatographiques avec peu de pics, rendant envisageable la purification des composés sapides par HPLC-Préparative. La sélection des fractions pour la poursuite du protocole de purification s'appuie sur un compromis entre plusieurs critères : intensité du goût sucré ou amer, abondance de la fraction et faible nombre de pics présents dans le profil chromatographique. Sur ces bases, les fractions BCF\_MtBE\_F2\_2 et BCF\_MtBE\_F4\_3, qui présentaient respectivement une amertume d'intensité 4 et une sucrosité d'intensité 3, ont été conservées pour être injectées en HPLC-Préparative.

### 2. Fractionnement des fractions BCF\_MtBE\_F1, F3 et F5

Les fractions F1, F3 et F5 de l'extrait BCF\_MtBE présentaient des goûts moins intenses et des quantités de masses plus faibles que la F2. En outre, elles possédaient des profils chromatographiques complexes et contenaient de nombreux composés. Ainsi, il est possible que des composés de faibles intensités relatives sur le chromatogramme soient masqués par la présence de certains composés majoritaires. D'un point de vue gustatif de tels effets de masquage peuvent également exister. En effet, la perception gustative dépend conjointement de l'abondance des composés et de leur activité gustative. Par exemple, si des composés minoritaires, dans une fraction donnée, présentent une faible amertume, alors ils peuvent être masqués par la sucrosité de certains composés majoritaires. Par conséquent, les fractions F1, F3 et F5 ont également subi un second fractionnement par CPC, malgré leur intensité sapide inférieure à celle des fractions F2 et F4. Préalablement, différents systèmes de solvants de la gamme Arizona ont été testés afin de choisir celui permettant un fractionnement optimal des trois fractions (**Tableau 29**).

		KD				
	Elution	Composés (m/z)	L	Μ	Ν	
	Début	178	0,51	0,74	2,17	
BCF_MtBE_F1	Milieu	517	0,8	2,4	3,3	
	Fin	836	1,2	3,6	4,69	
	Elution	Composés (m/z)	G	Н	J	Κ
	Début	429	0,18	0,38	0,61	1,45
DCE MADE E2	Milieu	493	0,06	0,07	0,22	1,2
BCF_MIBE_F3	Milieu	631	0	0,01	0,11	1,44
	Fin	817	0	0,19	0,81	7,3
	Début	163	/	0,98	4,13	1,86
DCE MADE ES	Milieu	515	/	0,95	6,42	3,55
BCL WITHE L2	Milieu	649	/	1,01	7,04	4,11
	Fin	817	/	0,95	7,11	5,14

**Tableau 29 :** K<sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour les fractions F1, F3 et F5 du BCF\_MtBE.

/: Système non testé.

Le calcul des  $K_D$  a permis de choisir les systèmes adéquats pour le fractionnement des extraits. Ainsi les systèmes L, K et H ont été utilisés pour fractionner les extraits F1, F3 et F5, respectivement. Les trois expériences ont été réalisées avec le rotor de 100 mL en mode ascendant, selon la méthode d'analyse décrite dans le **Tableau 30**.

Méthode de fra	Méthode de fractionnement 4 : Rotor 100 mL ; Mode ascendant							
	Début	Fin	Débit	Rotor	% Δ	% B		
	(min)	(min)	(mL/min)	(rpm)	70 A	70 D		
	0	15	10	0	100	0		
	15	30	10	500	100	0		
Equilibration	30	35	5	2300	100	0		
	35	60	5	2300	0	100		
Elution	0	70	5	2300	0	100		
Extrusion	70	100	10	2300	100	0		

**Tableau 30 :** Méthode de fractionnement des fractions F1, F3 et F5 de l'extrait BCF\_MtBE par CPC.

Chaque extrait a été décomposé en six nouvelles fractions, après analyse de leur profil chromatographique en LC-HRMS. Le **Tableau 31** récapitule les résultats de la dégustation pour ces 18 fractions.

La fraction BCF\_MtBE\_F1 avait été décrite autant sucrée qu'amère. Après le fractionnement, l'analyse sensorielle a permis de révéler une nouvelle fois ce dualisme du goût avec des intensités différentes en fonction des fractions. Malgré un fractionnement du goût intéressant, aucune des 6 fractions n'a été conservée pour être injectée en HPLC-Preparative. Cela est dû soit à leurs profils chromatographiques complexes ou à une quantité insuffisante de l'échantillon. Une deuxième macération avec une plus grande quantité d'extrait de bois de chêne brute permettrait de poursuivre ce protocole de fractionnement.

La fraction BCF\_MtBE\_F3 avait été décrite avec une intensité de 3 pour l'amertume. Après l'expérience de CPC, la dégustation a permis de mettre en évidence deux fractions intensément sucrées et trois amères. Ce résultat confirme, une fois de plus, des effets de masquage de certains composés par d'autres. Par ailleurs, le protocole de fractionnement mis en place est pertinent puisqu'il permet d'illustrer la complexité de la recherche de molécules sapides. Seule la fraction 1, fortement sucrée, a été conservée pour être ultérieurement injectée en HPLC-Préparative. Les autres extraits présentaient des quantités insuffisantes pour la suite du fractionnement.

La fraction BCF\_MtBE\_F5 avait été décrite avec une faible intensité de l'amertume. Après le fractionnement par CPC, la dégustation a révélé trois fractions amères. La fraction 2 présente les critères pour la suite du fractionnement. Cette fraction n'a pas encore été traitée mais elle pourra être injectée en HPLC-Préparative afin de la caractériser au niveau sensoriel. **Tableau 31 :** Gustatogramme des six fractions obtenues après CPC pour les fractions F1, F3 et F5 de l'extrait BCF\_MtBE.

	Fractions	Tubes	Masses (mg)	Goût
	1	10-18	62,4	/
	2	19-24	46,5	Sucré : 3/5
DCE MADE EI	3	25-38	37	Sucré : 1/5 Amer : 2/5
BCF_MIBE_FI	4	39-58	10,8	/
	5	59-73	2,8	Sucré : 1/5
	6 74-128	10	Amer : 4/5 Astringent : 3/5	
	1	23-44	150	Sucré : 5/5
	2	45-51	44,4	Amer : 3/5
DCE MADE E2	3	52-57	52,2	/
DCF_MIDE_F3	4	58-72	38,2	Sucré : 3/5
	5	73-94	9,6	Amer : 2/5
	6	95-127	19,4	Amer : 5/5
	1	15-28	14,8	/
	2	29-41	102,9	Amer : 1/5
DCE MADE ES	3	42-47	10	Amer : 2/5
DUT_WILBE_F5	4	48-75	18,3	/
	5	76-90	4,5	Amer : 1/5
	6	91-115	8,7	/

/: Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec la solution témoin.

Le couplage entre la Chromatographie de Partage Centrifuge et la gustatométrie (CPC-G) a permis d'isoler des fractions sapides à partir de l'extrait MtBE du bois de chêne chauffe forte. Les fractions BCF\_MtBE\_F2\_2, BCF\_MtBE\_F3\_1 et BCF\_MtBE\_F4\_3 ont été conservées pour la suite du protocole.

# C. Purification par Chromatographie Liquide Haute Performance à l'échelle semi-Préparative (HPLC-Prep)

La chromatographie préparative, à la différence de la chromatographie analytique, consiste à traiter une quantité importante de charge injectée et à collecter les solutés séparés sur la colonne. La capacité de charge de la HPLC est plus faible que celle de la CPC, mais sa résolution chromatographique est nettement supérieure. Elle est ainsi utilisée en fin de protocole de fractionnement pour isoler des molécules cibles ou séparer les composés indésirables d'un mélange.

#### 1. Mise au point des méthodes et fractionnement des échantillons

Les gradients d'élution ont été préalablement choisis sur la LC-HRMS grâce à l'utilisation de colonnes analytiques équivalentes aux colonnes préparatives. Les gradients ont été testés en modifiant quelques paramètres, comme expliqué dans la partie expérimentale générale.

Les trois fractions ont été traitées séparément en HPLC-Prep équipée d'une colonne Hypersil Gold (21,2 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Thermo Scientific) pour les fractions BCF\_MtBE\_F3\_1 et BCF\_MtBE\_F4\_3 et d'une colonne Sunfire C18 OBD (19 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Waters) pour la fraction BCF\_MtBE\_F2\_2. La phase mobile était constituée d'un mélange H<sub>2</sub>O + 0,1 % acide formique (phase A) et ACN + 0,1 % acide formique (phase B). Le débit était fixé à 20 mL/min. Les gradients ont été optimisés afin de séparer au mieux les composés des fractions BCF\_MtBE\_F2\_2 (Gradient 3), BCF\_MtBE\_F3\_1 (Gradient 4) et BCF\_MtBE\_F4\_3 (Gradient 5). Les conditions chromatographiques utilisées pour ces fractionnements sont reportées dans le **Tableau 32**.

BCF_MtBE_F2_2	Cradiant 3	Temps (min)	0	5,9	32	39	44,2	45,3	52
Colonne Sunfire	Gradient 3	% B	30	30	70	98	98	30	30
BCF_MtBE_F3_1	Gradient 4	Temps (min)	0	7,4	36,9	39	44,2	45,3	52
Colonne Hypersil Gold		% B	5	5	40	98	98	5	5
BCF_MtBE_F4_3	Gradient 5	Temps (min)	0	13,3	35,4	39	44,2	45,3	52
Colonne Hypersil Gold		% B	28	28	45	98	98	28	28

**Tableau 32 :** Gradients utilisés pour la purification par HPLC-Prep des composés présents dans les fractions BCF\_MtBE\_F2\_2, BCF\_MtBE\_F3\_1 et BCF\_MtBE\_F4\_3.

Les échantillons ont été repris dans 400  $\mu$ L d'une solution hydro-méthanolique (50:50), filtrés à 0,45  $\mu$ m puis injectés manuellement et élués selon un gradient de solvants. Une injection test de 5 mg a permis de contrôler l'efficacité de la séparation et de déterminer les temps de rétention des composés, puis des injections de 10 à 20 mg ont été réalisées successivement pour la purification de l'ensemble de la fraction. Une détection UV à 280 nm et une détection simultanée en ELSD a permis de suivre l'élution des composés et de les collecter manuellement à la sortie du système. Pour chaque tube, une aliquote (100  $\mu$ L) a été prélevée, diluée par 10 avec de l'eau Milli-Q avant d'être injectée en LC-HRMS. Cette analyse

a permis de vérifier la pureté des composés obtenus et de regrouper les tubes de chaque injection. Les composés purifiés ont été directement lyophilisés tandis que le reste de la fraction a d'abord été évaporé avant d'être lyophilisé. Les fractions ont ensuite été dégustées.

## 2. Résultats

#### a. Résultats des purifications

Plusieurs composés majoritaires étaient présents dans les fractions étudiées (**Figure 35**). Pour des raisons de simplification, les composés de cette partie seront désignés par la masse nominale m/z de leur ion déprotoné  $[M-H]^-$  (pour les fractions BCF\_MtBE\_F2\_2 et BCF\_MtBE\_F4\_3) et par la masse nominale m/z de leur ion protoné  $[M+H]^+$  pour la fraction BCF\_MtBE\_F3\_1.



**Figure 35 :** Chromatogrammes, en mode « Base Peak », des fractions injectées en HPLC-Prep en ionisation négative (BCF\_MtBE\_F2\_2 et BCF\_MtBE\_F4\_3) et positive (BCF\_MtBE\_F3\_1).

Les propriétés sensorielles des fractions injectées en HPLC-Prep ont été décrites précédemment. En revanche, la nature des molécules sapides les constituant était inconnue.

L'objectif a été, dans un premier temps, de caractériser les composés majoritaires de ces fractions, visibles sur les chromatogrammes. Pour chaque fraction, ils ont été nommés « Pic » puis numérotés selon leur temps de rétention croissant. La phase mobile éluée entre les pics majoritaires a également été récupérée puis regroupée ; elle a été nommée « Elution ». Ce regroupement est important puisque des composés minoritaires pourraient également contribuer significativement au goût de la fraction.

Il a donc été convenu de chercher à isoler ces composés majoritaires afin d'en déterminer la structure et d'en confirmer les propriétés sensorielles. A cette fin, chaque gradient de solvant a été développé à l'échelle analytique en LC-HRMS afin d'avoir une résolution optimale des pics. Des colonnes à polarité de phase inversée ont été utilisées. Par conséquent, plus les composés sont apolaires plus ils ont tendance à être élués tardivement. Les fractions BCF\_MtBE\_F2\_2 et BCF\_MtBE\_F4\_3 étant plutôt apolaires, le pourcentage d'acétonitrile a été augmenté pour que les composés puissent sortir à des temps de rétention plus faibles. L'inverse a été réalisé pour la fraction BCF\_MtBE\_F3\_1. L'utilisation conjointe de détecteur UV à 280 nm et du détecteur ELSD, présentant un caractère universel, a permis de détecter tous les pics significatifs en vue de la collecte manuelle. Les composés purifiés ainsi que les fractions d'élution collectées ont été répertoriés dans le **Tableau 33**.

Fraction	Pic/Elution	<i>m/z</i> observé	Masse (mg)
DCE MADE E2 2	Pic 1	517-1	6,2
DCF_WIIDE_F2_2	Pic 2	517-2	2,3
Ionisation negative Elution 177	177;151;223	20	
	Pic 1	169-pos	3,4
DCE MADE E2 1	Pic 2	183	40,7
DCF_WIIDE_F3_I	Pic 3	209	20,8
Tomsation positive	Pic 4	421	1,1
	Elution	193;197;235	8,1
BCF_MtBE_F4_3	Pic 1	641	0,5
Ionisation négative	Elution	480;645;631	25,6

**Tableau 33 :** Purification des fractions BCF\_MtBE\_F2\_2, BCF\_MtBE\_F4\_3 etBCF\_MtBE\_F3\_1 par HPLC-Prep.

Les expériences en HPLC-Prep ont permis de purifier sept composés, avec des masses variables en fonction de la quantité injectée et de leur abondance réelle dans la fraction donnée. Les composés présents dans les fractions d'élution sont de nature chimique inconnue.

#### b. Résultats de la dégustation réalisée lors du suivi de fractionnement

Les quantités obtenues après purification par HPLC-prep ont permis de caractériser au niveau sensoriel les composés purs et les différentes fractions d'élution. Leur dégustation a été réalisée en solution hydro-alcoolique à une concentration fixe de 5 mg/L pour les composés purifiés et à 10 mg/L pour les fractions d'élution. Les résultats de la dégustation sont présentés dans le **Tableau 34**.

Fraction	Composé pur et élution	Goût
DCE MADE E2 2	517-1	Amer : 1/5 Astringent : 1/5
BCF_MtBE_F2_2	517-2	Sucré : 1/5
	Elution	Amer : 2/5
	169-pos	Amer : 1/5 Astringent : 2/5
DCE MADE E2 1	183	Sucré : 3/5
BCF_MIBE_F3_1	209	Astringent : 3/5
	421	Amer : 5/5
	Elution	/
DCE MEDE EA 2	641	Sucré : 4/5
BCF_MtBE_F4_3	Elution	Amer : 1/5

**Tableau 34 :** Gustatogramme des molécules pures et des extraits après HPLC-Prep.

/: Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec la solution témoin.

Les composés m/z 517-1 et 517-2 avaient déjà été décrits sensoriellement au laboratoire (*Gammacurta et al., en préparation*). Au regard de la dégustation, ils ne semblent pas participer à l'amertume perçue précédemment pour la fraction BCF\_MtBE\_F2\_2. La fraction d'élution a été décrite comme moyennement amère, ce qui ne permet pas d'expliquer l'amertume de l'extrait avant injection. Il est possible que des effets de synergie entre les composés majoritaires et les composés minoritaires soient à l'origine de ces différentes perceptions.

La fraction BCF\_MtBE\_F3\_1 avait été décrite avec un intense goût sucré. La dégustation a révélé une molécule sucrée, possiblement responsable du goût perçu précédemment, ainsi que deux molécules amères, différentes au niveau de leur intensité. La fraction d'élution n'a présenté aucun goût en comparaison avec la solution témoin, suggérant que seuls les composés majoritaires influençaient le goût de la fraction.

En ce qui concerne la fraction BCF\_MtBE\_F4\_3, la dégustation a révélé une intense sucrosité pour le composé pur m/z 641. La fraction d'élution a été notée comme faiblement

amère. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors de la dégustation de l'extrait de départ.

#### 3. Discussion

L'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance a permis d'isoler plusieurs molécules à partir des fractions d'intérêt. Leur dégustation a révélé que les composés m/z 641, 183, 209, 169-pos, 421, 517-1 et 517-2 présentaient des caractéristiques sensorielles pertinentes.

Présents dans la fraction BCF\_MtBE\_F2\_2, les composés m/z 517-1 et 517-2 ont déjà été caractérisés au niveau structural et sensoriel au laboratoire (Gammacurta et al., en préparation). Une analyse en RMN a permis de déterminer qu'il s'agissait, respectivement, de l'acide barrinique et de l'acide bartogénique (ANNEXE 5). Ces deux composés ont déjà été décrits dans la littérature. L'acide bartogénique (m/z 517-2) a notamment été identifié dans les bois de chêne sessile et pédonculé et dans le vin par Arramon et al. (G. Arramon et al. 2002). L'acide barrinique a été identifié dans un arbre originaire d'Asie tropicale (Barua, Pal, et Dutta 1972), mais jamais dans le genre Quercus. En solution hydro-alcoolique et dans de l'eau, le composé m/z 517-1 présentait une faible amertume et le m/z 517-2 une faible sucrosité. En revanche, l'ajout du m/z 517-1 à un vin blanc non boisé a considérablement modifié l'équilibre gustatif de celui-ci en augmentant son amertume. Il en va de même pour le m/z 517-2. Les notes attribuées pour ce goût sont de 5/5 et de 2/5 respectivement pour le m/z 517-1 et le 517-2. Bien que ces molécules ne semblent pas directement responsables du goût perçu pour la fraction BCF\_MtBE\_F2\_2, elles pourraient agir comme des exhausteurs de goût amer. Il serait alors intéressant d'établir leur seuil de détection gustative dans le vin. Ces composés n'ont pas fait l'objet de recherches plus approfondies dans ce travail.

Parmi les composés majoritaires de la fraction BCF\_MtBE\_F3\_1, une molécule d'ion protoné m/z 421 est observée. La comparaison avec des standards disponibles au laboratoire et les données de la littérature a montré que ce composé correspondait au lyonirésinol. Celui-ci a déjà été décrit dans la **Partie I – Chapitre I**. Son influence sur le goût des vins et des spiritueux a déjà été démontrée. La **Figure 36** résume le protocole de fractionnement mis en place pour la purification de fractions sapides pour l'extrait BCF\_MtBE. Par ailleurs, tous les composés n'ont pas été obtenus en quantité suffisante pour permettre une caractérisation structurale. C'est notamment le cas du composé m/z 641, marqué par une saveur sucrée intense. Dans la suite de ce travail, une optimisation des méthodes de fractionnement de l'extrait de bois de chêne a été mise en place pour purifier ce composé d'intérêt.



Figure 36 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait BCF\_MtBE.

## D. Optimisation des méthodes de fractionnement en vue de la purification du composé m/z 641

#### 1. Principe et mise en œuvre

Une approche ciblée a été mise en place afin de purifier le composé de m/z 641. Pour cela, un criblage a été réalisé à l'aide de la LC-HRMS. La masse précise de l'ion quasimoléculaire du composé d'intérêt, soit 641,2218, a été ciblée avec une précision de masse de  $\pm$ 5 ppm. Tout au long du protocole de fractionnement, les méthodes ont été optimisées pour permettre la purification de ce composé en plus grande quantité. Ainsi, dans cette partie, le fractionnement n'a pas été guidé par la dégustation des fractions mais par leur analyse en spectrométrie de masse.

#### 2. Optimisation des étapes de fractionnement et de purification

Le composé m/z 641 est observé dans les trois types de chauffe de l'extrait de bois de chêne. Cependant, il est essentiellement observé dans le bois « chauffe forte » (BCF). Une extraction solide-liquide de cet extrait a alors été réalisée, selon les conditions décrites dans le paragraphe **II.B** de ce chapitre.

Après filtration, évaporation à sec et lyophilisation, une poudre homogène de l'extrait a été obtenue. Des tests d'extraction liquide-liquide ont été réalisés sur l'extrait afin de sélectionner le meilleur solvant en vue de la purification du composé d'intérêt. Ce dernier a montré une affinité pour deux solvants, le MtBE et l'AcOEt, qui ont des polarités proches. Le composé présentait tout de même une meilleure extraction avec le MtBE. Afin d'améliorer le rendement, une extraction supplémentaire au MtBE a été ajoutée au protocole décrit au paragraphe **II. C. 1.** de ce chapitre.

Par la suite, des tests de systèmes de CPC ont été réalisés sur l'extrait BCF\_MtBE. Des systèmes riches en solvants apolaires ont été privilégiés pour ce fractionnement. La solubilisation de l'extrait, et notamment du composé d'intérêt, a d'abord été prise en compte. Les systèmes G, H, J et K de la gamme Arizona ont été retenus sur ce critère. Puis, les  $K_D$  du m/z 641 ont été calculés pour ces différents systèmes. Les résultats analytiques rejoignent ceux obtenus précédemment sur la base de la dégustation, avec un gradient du système H vers G. A l'issue de cette expérience de CPC, les tubes collectés sont analysés par LC-HRMS et rassemblés pour constituer deux fractions (F-IV et F-V) contenant le composé ciblé, avec une abondance relative plus ou moins élevée.

Un deuxième fractionnement par CPC a été nécessaire afin d'avoir une fraction avec un profil chromatographique simplifié, avec les systèmes J et K pour les fractions F-IV et F-V respectivement. Les fractions d'intérêt en résultant ont été conservées pour la dernière étape de purification (BCF\_MtBE\_F-IV\_2 et BCF\_MtBE\_F-V\_4). Plusieurs types de colonnes chromatographiques, ainsi que les solvants et les gradients d'élution, ont été testés. Une meilleure séparation des composés a été observée en présence d'acide formique à 0,1 % pour les phases A (eau) et B (acétonitrile). Par ailleurs, la colonne Sunfire, permettant une grande capacité de charge, a été choisie pour la purification du composé m/z 641 (t<sub>R</sub> = 30,5 min). Les conditions chromatographiques utilisées pour son fractionnement sont reportées dans le **Tableau 35**.

**Tableau 35 :** Gradient utilisé pour la purification du composé m/z 641.

BCF_MtBE_F-IV_2	Cuedient (	Temps (min)	0	8	52	54	59	60	67
Colonne Sunfire		% B	20	20	50	98	98	20	20

La **Figure 37** résume le protocole de fractionnement mis en place pour la purification du composé m/z 641.

Les purifications réalisées par HPLC-Prep ont permis d'obtenir 4,7 mg du composé m/z 641. Son élucidation structurale est désormais possible. Sa caractérisation sensorielle sera également réalisée dans de l'eau et dans du vin, afin de déterminer son influence dans ces deux matrices. Par ailleurs, sa quantification dans le bois, les vins et les eaux-de-vie pourra être menée en fonction des résultats de la dégustation.



**Figure 37 :** Fractionnement de l'extrait BCF\_MtBE en vue de la purification du composé m/z 641.

Dans cette partie, une stratégie d'extraction et de purification, utilisant des techniques courantes de phytochimie, a été développée à partir d'extrait de bois de chêne chauffe forte. L'étude a été guidée par la dégustation, permettant le criblage des fractions et la sélection de celles présentant un goût pertinent. En outre, le fractionnement des extraits pré-purifiés a révélé des fractions sapides, amères et sucrées, dont l'existence n'était pas forcément suggérée par la dégustation initiale. Une première hypothèse, avancée pour expliquer l'incidence du bois sur le goût, suggérait une formation de composés sucrés lors de la chauffe. Deux molécules sucrées, m/z 641 et 183, ont été isolés à partir de bois « chauffe forte », ce qui tend à confirmer cette hypothèse. Leurs caractéristiques structurales et sensorielles seront décrites ultérieurement.

# IV. Isolement de fractions sapides à partir de l'extrait MtBE du Bois Non Chauffé (BNC\_MtBE)

Lors du paragraphe précédent, le fractionnement guidé par le goût a révélé la pertinence de l'extrait MtBE du bois fortement chauffé, à partir duquel plusieurs composés sucrés ont été isolés. Pour préciser l'effet gustatif de la chauffe du bois, la fraction MtBE obtenue à partir de bois non chauffé a été soumise à un protocole similaire.

#### A. Fractionnement des extraits par CPC

L'extrait BNC\_MtBE présentait un profil chromatographique complexe (**Figure 32**). Le protocole de purification a commencé par un fractionnement par CPC. Afin de pouvoir comparer au mieux les deux modalités, l'extrait BNC\_MtBE (1,1 g) a été fractionné avec le même système de solvants que l'extrait BCF\_MtBE. Ainsi, l'expérience a commencé avec le système H de la gamme Arizona, puis a évolué progressivement vers le système G. La méthode d'analyse décrite dans le paragraphe **III. A. 3.** a également été utilisée (**Tableau 24**). Le rotor d'1 L a été utilisé avec un débit fixé à 1200 rpm. La pression et le volume à l'équilibre étaient de 68 bars et 300 mL, respectivement. Le profil chromatographique UV obtenu pour ce fractionnement par CPC est présenté ci-dessous (**Figure 38**).



**Figure 38 :** Profil chromatographique UV de la CPC de l'extrait BNC\_MtBE (absorbance à 280 nm).

Le profil UV obtenu pour la fraction BNC\_MtBE ressemble fortement à celui obtenu après le fractionnement de l'extrait BCF\_MtBE (**Figure 33**). Cette observation pourrait suggérer que les deux extraits ont une composition chimique relativement similaire.

L'extrait BNC\_MtBE a été décomposé en 10 fractions distinctes. La LC-HRMS a permis de comparer les extraits obtenus après CPC pour les deux types de chauffe. Malgré un profil UV similaire, les fractions des extraits BNC\_MtBE et BCF\_MtBE semblent présenter des profils chromatographiques différents. Ces observations confirment que les composés sapides du bois extraits dans les vins et les eaux-de-vie lors de l'élevage sous bois subissent des transformations pendant le « bousinage ». Une analyse sensorielle a été réalisée afin de vérifier si ces modifications de composition s'accompagnaient de perceptions sensorielles différentes. Les résultats en sont présentés dans le **Tableau 36**.

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Goût
F1	19-23	153	Sucré : 3/5
F2	24-29	99,8	Sucré : 1/5
F3	30-37	79,8	/
F4	38-56	86,8	Amer : 1/5
F5	57-72	51	Sucré : 1/5 Amer : 3/5
F6	73-86	77,2	Amer : 3/5
F7	87-107	87,2	/
F8	108-145	12,4	/
F9	146-185	96,2	/
F10	186-222	132,3	Amer : 1/5

Tableau 36 : Gustatogramme de l'extrait MtBE du BNC\_MtBE après CPC.

Le fractionnement a permis de révéler une répartition des fractions sapides, toutefois moins nette que celle suggérée par la dégustation de l'extrait pré-purifié, avec l'apparition de fractions amères. Six fractions se sont avérées intéressantes pour leur goût, amer ou sucré, avec des intensités variables. Cette séparation des goûts a également été observée pour l'extrait BCF\_MtBE. En revanche, les fractions sapides ne sont pas les mêmes pour l'extrait BNC\_MtBE et BCF\_MtBE. Cette observation suggère une nouvelle fois que ces fractions diffèrent par leur composition.

Pour la suite du fractionnement, les fractions F5 et F6 de l'extrait BNC\_MtBE présentaient un profil chromatographique avec peu de pics. Ainsi, elles ont pu être injectées en HPLC-Prep.

Les autres fractions sapides étaient complexes. Elles n'ont pas été analysées dans le cadre de cette thèse mais le protocole de fractionnement pourra être poursuivi avec un deuxième fractionnement par CPC. La fraction F1 de l'extrait BNC\_MtBE semble notamment intéressante à étudier en raison de son goût sucré.

### B. Purification par HPLC-Prep des fractions BNC\_MtBE\_F5 et F6

Les deux fractions ont été traitées séparément en HPLC-Prep équipée d'une colonne Hypersil Gold (21,2 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Thermo Scientific). La phase mobile était constituée d'un mélange H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique (phase A) et ACN + 0,1 % d'acide formique (phase B). Le débit était fixé à 20 mL/min. Les gradients ont été optimisés afin de séparer au mieux les composés des fractions BNC\_MtBE\_F5 et BNC\_MtBE\_F6 (Gradient 7). Les conditions chromatographiques utilisées pour ces fractionnements ont été répertoriées dans le **Tableau 37**.

**Tableau 37 :** Gradient utilisé pour la purification par HPLC-Prep des composés présents dans les fractions BNC\_MtBE\_F5 et BNC\_MtBE\_F6.

BNC_MtBE_F5	Gradiant 7	Temps (min)	0	5,9	32	39	44,2	45,3	52
Colonne Hypersil Gold	Oraclent 7	% B	25	25	30	98	98	25	25

Les échantillons ont été préparés selon la méthode décrite dans le paragraphe **III.C.1** de ce chapitre. Une détection UV à 280 nm et une détection simultanée en ELSD ont permis de suivre l'élution des composés. Deux composés majoritaires ont été identifiés pour la fraction BNC\_MtBE\_F5 et trois pour la fraction BNC\_MtBE\_F6 (**Figure 39**).

Pour la fraction BNC\_MtBE\_F5, les deux espèces majoritaires avaient pour ions déprotonés m/z 571 et 639-1. Le composé m/z 571 a déjà été identifié au laboratoire, il s'agit du lyonirésinol 9-*O*-gallate (lignane (+)-2) décrit dans la **Partie I – Chapitre I**. Ce composé a été jugé légèrement sucré (Marchal, Cretin, *et al.* 2015). Ainsi, il est susceptible de contribuer faiblement au goût perçu pour cette fraction. La purification s'est alors portée sur le deuxième composé majoritaire m/z 639-1 afin de le caractériser au niveau sensoriel.

Pour la fraction BNC\_MtBE\_F6, l'analyse en LC-HRMS a révélé que les trois espèces majoritaires avaient pour ions déprotonés m/z 487, 639-2 et 817. La comparaison avec des standards disponibles au laboratoire et les données de la littérature a montré que l'espèce m/z 487 correspondait au dérivé 6'-*O*-gallate de l'acide (3*S*,4*S*)-4- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-3-méthyloctanoïque et l'espèce m/z 817 au QTT I. Ces deux molécules avaient précédemment été

purifiées au laboratoire à partir d'extrait de bois de chêne « non-chauffé ». Elles ont été dégustés et présentaient respectivement aucun goût et une saveur sucrée intense (Marchal, Waffo-Téguo, *et al.* 2011). Ainsi, elles ne peuvent être responsables de l'amertume de la fraction. Le troisième composé majoritaire, m/z 639-2, n'a pas encore été décrit au niveau sensoriel. Il a donc été purifié à partir de cet extrait.



**Figure 39 :** Chromatogrammes, en mode « Base Peak », LC-HRMS en ionisation négative des fractions injectées en HPLC-Prep (BNC\_MtBE\_F5 et BNC\_MtBE\_F6).

Les composés purifiés ont été collectés séparément à la sortie du détecteur et lyophilisés. Après injection de toute la fraction, seulement 0,7 mg du composé m/z 639-1 et 1,2 mg du composé m/z 639-2. Ces molécules ont été dégustées à une concentration fixe de 5 mg/L. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 38**.

**Tableau 38 :** Gustatogramme des molécules pures après HPLC-Prep pour les fractionsBNC\_MtBE\_F5 et BNC\_MtBE\_F6.

Fraction	Composé pur	Goût
BNC_MtBE_F5	639-1	Sucré : 3/5
BNC_MtBE_F6	639-2	Amer : 3/5

Ces deux composés présentent le même ion quasi-moléculaire  $[M-H]^- m/z$  639,1914. Ce sont donc des isomères, de formule brute C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>16</sub>. Malgré ces similitudes de composition, la dégustation dans une solution hydro-alcoolique a révélé des goûts complètement différents. Le composé m/z 639-1 a été jugée sucré et le m/z 639-2 amer. Ces composés ont pu contribuer au goût de leur fraction d'origine. C'est notamment le cas pour la fraction F6 ; son profil et les composés majoritaires qu'elle contient suggèrent que le composé m/z 639-2 pourrait contribuer majoritairement à son goût.

La purification des fractions d'intérêt a permis de mettre en évidence des molécules sapides. Les composés m/z 639-1 et 639-2 sont potentiellement intéressants pour la suite de l'étude. Cependant, les quantités obtenues ne sont pas suffisantes pour leur caractérisation structurale. De ce fait, une optimisation des méthodes de fractionnement de l'extrait de bois de chêne a été mise en place pour purifier à nouveau ces composés d'intérêt.

# C. Optimisation des méthodes de fractionnement en vue de la purification des composés m/z 639-1 et 639-2

Une approche ciblée a été mise en place afin de purifier les composés de m/z 639-1 et 639-2, à l'aide de la LC-HRMS. Le criblage a été réalisé à partir d'échantillons de différentes espèces de chêne : chêne sessile, chêne pédonculé et chêne blanc d'Amérique. Deux types de chauffe ont également été étudiés.

Les composés d'intérêt ont été identifiés principalement dans le bois « non-chauffé » du chêne blanc d'Amérique (BNC\_Am). Une extraction solide-liquide de cet extrait a alors été réalisée, dans les conditions décrites dans le paragraphe **II.B** de ce chapitre. Afin de commencer le protocole de fractionnement, un solvant adéquat a été choisi pour extraire au mieux les composés ciblés. Ainsi, 6 extractions liquide-liquide successives au MtBE ont été initiées (avec 400 mL pour chaque extraction) après un lavage avec 400 mL d'Hept. Après évaporation à sec et lyophilisation, 1,8 g de l'extrait a été obtenu.

Les isomères, correspondant à des ions de masse m/z 639,1914, ont alors été recherchés dans l'extrait BNC\_Am\_MtBE. Son analyse a permis de mettre en évidence trois pics, à des temps de rétention de 3,44, 3,75 et 3,82 min, sur le chromatogramme des ions extraits enregistré dans une fenêtre de 5 ppm autour de la masse ciblée (**Figure 40**).



**Figure 40 :** XIC, en mode « Base Peak », en ionisation négative de l'extrait BNC\_Am\_MtBE correspondant à l'ion  $C_{29}H_{35}O_{16}$  (*m/z* 639,1914, précision à 5 ppm).

Par la suite, des tests de systèmes de CPC ont été réalisés sur l'extrait BNC\_Am\_MtBE. Des systèmes fortement apolaires, de la gamme Arizona, ont été privilégiés pour ce fractionnement. Les meilleurs d'entre eux ont été sélectionnés puis les  $K_D$  ont été calculés (**Tableau 39**).

**Tableau 39 :** K<sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait BNC\_Am\_MtBE.

		K <sub>D</sub>			
	Elution	Composés (m/z)	F	G	Н
	Début	300	2,48	1,88	1,91
DNC Am MtDE	Milieu	571	0,7	1,02	2,63
BNC_Am_MtBE	Milieu	639	0,41	0,86	2,19
	Fin	533	0,19	0,26	0,44

L'expérience de CPC pour l'extrait BNC\_Am\_MtBE commence avec le système H, puis évolue vers le système G. Précédemment, ce gradient s'est avéré pertinent pour le fractionnement des phases MtBE. A l'issue de cette expérience de CPC, les tubes collectés sont analysés par LC-HRMS et rassemblés pour constituer des fractions contenant les composés ciblés, avec une abondance relative plus ou moins élevée. Les extraits BNC\_Am\_MtBE\_F-III, BNC\_Am\_MtBE\_F-V et BNC\_Am\_MtBE\_F-VI ont été choisis pour la poursuite du fractionnement (**Tableau 40**).

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Molécule d'intérêt
F-I	20-30	224,4	/
F-II	31-44	333,8	/
F-III	45-61	146,7	<i>m/z</i> 639-1
F-IV	62-67	49,5	<i>m/z</i> 639-1 ; 639-2
F-V	68-89	180	<i>m/z</i> 639-2
F-VI	90-107	88,3	<i>m/z</i> 639-3
F-VII	108-150	276,7	/
F-VIII	151-196	71,5	/
F-IX	197-211	31,5	/
F-X	212-230	134,8	/

Tableau 40 : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait BNC\_Am\_MtBE.

## 1. Purification des composés *m/z* 639-1 et 639-2 à partir des extraits BNC\_Am\_MtBE\_F-III et F-V

Les fractions F-III et F-V de l'extrait BNC\_Am\_MtBE ont injectées en HPLC-Prep pour la purification des composés m/z 639-1 et 639-2. La colonne Sunfire a été utilisée pour les deux fractionnements. La phase A était constituée d'H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique et la phase B d'ACN + 0,1 % d'acide formique. Les conditions chromatographiques ont été optimisées pour une meilleure séparation des composés, selon les méthodes décrites dans le **Tableau 41**.

**Tableau 41 :** Gradients utilisés pour la purification par HPLC-Prep des composés présents dansles fractions BNC\_Am\_MtBE\_F-III et BNC\_Am\_MtBE\_F-V.

BNC_Am_MtBE_F-III	Gradiant 8	Temps (min)	0	5,9	32	39	44,2	45,3	52
Colonne Sunfire	Gradient o	% B	25	25	30	98	98	25	25
BNC_Am_MtBE_F-V	Gradiant 0	Temps (min)	0	13,3	35,4	39	44,2	45,3	52
Colonne Sunfire	Graulein 9	% B	25	25	35	98	98	25	25

Les purifications menées par HPLC-Prep ont permis d'obtenir 6,5 et 4,5 mg des composés ciblés m/z 639-1 et 639-2, respectivement. Leur caractérisation structurale est désormais possible.

#### 2. Purification du composé *m/z* 639-3 à partir de l'extrait BNC\_Am\_MtBE\_F-VI

La fraction BNC\_Am\_MtBE\_F-VI a été analysée pour la purification du troisième isomère de m/z 639 (noté 639-3). Son profil chromatographique présentait plusieurs pics et nécessitait donc un fractionnement supplémentaire avant son injection en HPLC-Prep. La CPC n'a pas été utilisée à cause de la faible quantité disponible de la fraction d'intérêt. De ce fait, une extraction liquide-liquide a été entreprise afin de garantir les rendements de la manipulation et de limiter les pertes éventuelles de la fraction.

La fraction a été extraite deux fois avec 200 mL d'AcOEt ; même si sa polarité est proche de celle du MtBE, sa sélectivité est différente, ce qui permet un nouveau fractionnement. La phase supérieure de l'extraction liquide-liquide de l'extrait BNC\_Am\_MtBE\_F-VI a été conservée pour la poursuite du protocole (**Tableau 42**).

**Tableau 42 :** Masses obtenues après extraction liquide-liquide de l'extrait BNC\_Am\_MtBE\_F-VI.

Fraction	Masses (mg)	Molécule d'intérêt
BNC_Am_MtBE_F-VI_phase-inférieure	18,6	/
BNC_Am_MtBE_F-VI_phase-supérieure	79,6	<i>m/z</i> 639-3

Cette étape a permis de simplifier le profil chromatographique de l'extrait d'intérêt. Par la suite, la fraction BNC\_Am\_MtBE\_F-VI\_phase-supérieure a été injectée en HPLC-Prep. Le gradient 8, décrit précédemment, a été utilisé pour la purification du composé m/z 639-3 (**Tableau 41**). L'expérience a permis d'obtenir 1,5 mg du composé ciblé, ce qui permet d'envisager une caractérisation structurale mais également sensorielle.

Après lyophilisation, ce composé a été dégusté dans une solution hydro-alcoolique à une concentration de 5 mg/L. Les résultats sont reportés dans le **Tableau 43**.

**Tableau 43 :** Gustatogramme de la molécule pure *m/z* 639-3 après HPLC-Prep.

Fraction	Composé pur	Goût
BNC_Am_MtBE_F-VI_phase-supérieure	639-3	Sucré : 1/5

L'analyse sensorielle a permis de mettre en évidence des goûts différents pour les trois isomères. Leur caractérisation sensorielle dans de l'eau et dans un vin sera également conduite afin de déterminer leur influence dans ces deux matrices. Par ailleurs, après leur caractérisation structurale, leur quantification dans le bois, les vins et les eaux-de-vie pourra être menée en fonction des résultats de la dégustation.

La **Figure 41** résume le protocole de fractionnement mis en place pour la purification des composés m/z 639-1, 639-2 et 639-3 à partir de l'extrait BNC Am MtBE.



**Figure 41 :** Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait BNC\_Am\_MtBE (ELL : extraction liquide-liquide).

L'objectif de cette partie était de préciser l'effet de la chauffe du bois sur les propriétés gustatives des fractions de bois. La fraction MtBE, obtenue à partir de bois non chauffé, a été soumise au même protocole que pour la fraction MtBE obtenue à partir de bois chauffe forte. Le fractionnement des extraits pré-purifiés a révélé des fractions sapides, amères et sucrées. En outre, une modulation de l'intensité gustative de ces fractions a été perçue en fonction de la chauffe. Deux molécules sucrées, m/z 639-1 et 639-3, et une amère, m/z 639-2, ont été isolées dans cette partie à partir de bois non chauffé.

# V. Isolement de fractions sapides à partir de l'extrait BuOH du Bois Non Chauffé (BNC\_BuOH)

Une première hypothèse, avancée pour expliquer l'incidence du bois sur le goût, suggérait une formation de composés sucrés lors de la chauffe. Une deuxième hypothèse suggérait une plus grande présence de composés amers dans le bois non chauffé. Or, la dégustation des extraits pré-purifiés avait montré une amertume intense dans l'extrait BuOH du bois non-chauffé. Une démarche inductive similaire à celle présentée précédemment a donc été appliquée à cet extrait pré-purifié.

### A. Fractionnement de l'extrait BNC\_BuOH par CPC

L'extrait BNC\_BuOH présentait un profil chromatographique complexe. Pour le fractionner, l'utilisation de la Chromatographie de Partage Centrifuge a été nécessaire. Les composés extraits dans la fraction butan-1-ol sont *a priori* relativement polaires. De ce fait, des tests de systèmes tertiaires de type « ponts », utilisés fréquemment pour ces composés, ont été réalisés en faisant varier la nature et les proportions des différents solvants. Le **Tableau 44** répertorie les différents systèmes testés dans cette partie pour l'extrait BNC\_BuOH.

Systèmes	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17
MtBE	-	-	-	-	-	-	-	6	4	2	-	-	-	-	-	-	-
AcOEt	50	25	10	5	4	3	2	-	-	-	5	4	3	2	10	5	4
ACN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
iPrOH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
MeOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-
H <sub>2</sub> O	50	25	10	5	4	3	2	6	4	2	5	4	3	2	10	5	4

Tableau 44 : Systèmes testés de type « pont » pour le fractionnement de l'extrait BNC\_BuOH.

Les systèmes qui solubilisaient correctement l'extrait ont été conservés. Les phases inférieures et supérieures de chaque système ont été injectées en LC-HRMS, puis les  $K_D$  ont été calculés (**Tableau 45**).

		K	D			
	Elution	Composés (m/z)	P3	<b>P4</b>	P5	P6
	Début	687	10,34	2,77	2,69	1,43
BNC_BuOH	Milieu	695	1,80	0,98	0,75	0,51
	Fin	979	0,80	0,45	0,30	0,23

**Tableau 45 :** K<sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait BNC\_BuOH.

Le système « pont » P4, composé d'AcOEt, d'iPrOH et d'H<sub>2</sub>O, a été choisi pour le fractionnement de l'extrait BNC\_BuOH. L'expérience de CPC a été réalisée avec le rotor de 1 L en mode ascendant, selon la méthode décrite dans le **Tableau 46**.

Méthode de fractionnement 5 : Rotor 1 L ; Mode ascendant								
	Début (min)	Fin (min)	Débit (mL/min)	Rotor (rpm)	% A	% B		
Equilibration	0	20	50	0	100	0		
	20	40	50	500	100	0		
	40	45	30	1200	100	0		
	45	70	30	1200	0	100		
Elution	0	135	30	2300	0	100		
Extrusion	135	180	50	2300	100	0		

 Tableau 46 : Méthode de fractionnement de l'extrait BNC\_BuOH par CPC.

La pression et le volume à l'équilibre étaient de 51 bars et de 325 mL, respectivement, ce qui indique une rétention satisfaisante de la phase inférieure dans la colonne. Le profil chromatographique UV de l'extrait BNC\_BuOH témoigne d'une élution de composés tout au long de l'expérience, ce qui suggère un fractionnement efficace (**Figure 42**). Les profils des tubes injectés en LC-HRMS ont également montré des distinctions. Ainsi, l'extrait BNC\_BuOH a pu être fractionné en six nouvelles fractions.



**Figure 42 :** Profil chromatographique UV de la CPC de l'extrait BNC\_BuOH (absorbance à 280 nm).

Après évaporation et lyophilisation, les fractions ont été dégustées. Le **Tableau 47** présente les résultats obtenus.

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Goût
F1	20-31	36,5	/
F2	32-38	26,3	Sucré : 1/5 Amer : 2/5
F3	39-67	106,4	Sucré : 3/5
F4	68-86	63,1	Sucré : 2/5
F5	87-185	191,5	Amertume : 3/5
F6	186-215	1358,3	Sucré : 3/5

Tableau 47 : Gustatogramme des 6 fractions de l'extrait BNC\_BuOH.

/: Fractions ne présentant aucun goût en comparaison avec la solution témoin.

L'extrait BNC\_BuOH avait été décrit avec un goût sucré (2/5) mais également amer (3/5). La dégustation des fractions après CPC a révélé une bonne répartition de ces goûts, trois fractions ont été jugées sucrées, une amère et une autre sucrée et amère. Leurs profils chromatographiques sont présentés dans la **Figure 43**.


**Figure 43 :** Chromatogrammes, en mode « Base Peak », des fractions F2, F3, F4, F5 et F6 de l'extrait BNC\_BuOH (gradient LC : 1).

La fraction F6 de l'extrait BNC\_BuOH était abondante. Son fractionnement ultérieur en HPLC-Prep aurait nécessité de nombreuses injections successives. Pour cette raison, un deuxième fractionnement par CPC a été préféré, afin de faciliter la purification de composés sapides.

Les fractions F2, F3 et F4 de l'extrait BNC\_BuOH ont, quant à elle, été injectées directement en HPLC-Prep pour la suite du protocole de purification.

La fraction F5 de l'extrait BNC\_BuOH a été décrite comme amère, donc intéressante pour la suite de l'étude. Par ailleurs, le composé majoritaire de celle-ci, au temps de rétention de 3,28 min, a déjà été identifié au laboratoire et son goût a alors été établi. Il s'agit de l'Arjunglucoside I, qui a été jugé sucré (2/5) dans de l'eau et dans du vin (Gammacurta *et al.* 2019). Ainsi, ce composé ne semble pas participer à l'amertume perçue dans la fraction BNC\_BuOH\_F5. Le reste de l'extrait présente un profil chromatographique complexe et les essais de séparation par HPLC se sont révélés infructueux. Par conséquent, la poursuite du protocole de purification n'a pas été réalisée à ce jour sur cette fraction et nécessitera un développement ultérieur.

# **B.** Second fractionnement par CPC de l'extrait BNC\_BuOH\_F6

La fraction F6 de l'extrait BNC\_BuOH présentait deux critères intéressants : un goût sucré intense et une masse conséquente. Pour réaliser ce deuxième fractionnement par CPC, des systèmes de type « ponts » ont été testés (**Tableau 44**). L'extrait n'était soluble que dans 2

systèmes sur les 17 testés : les systèmes P6 (AcOEt/iPrOH/H<sub>2</sub>O) et P9 (MtBE/iPrOH/H<sub>2</sub>O). Les K<sub>D</sub> ont été calculés par la suite afin de choisir le système adéquat pour cette fraction.

**Tableau 48 :** K<sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait BNC\_BuOH\_F6.

		K <sub>D</sub>		
	Elution	Composés (m/z)	P6	<b>P9</b>
	Début	933	7,68	1,79
DNC D-OU EC	Milieu	300	5,34	1,46
BNC_BuOH_F6	Milieu	581	5,40	1,89
	Fin	915	5,22	1,77

Dans le système P6, les principaux composés de l'extrait présentaient un  $K_D$  élevé, peu compatible avec la mise en œuvre pratique de l'expérience de CPC. Dans le système P9, les  $K_D$  obtenus sont plus proches de 1 ; ces conditions ont été retenues pour le fractionnement. Pour vérifier la pertinence de ce choix, une première injection de 400 mg de l'extrait a été réalisée avec le rotor de 100 mL, en mode ascendant, selon la méthode décrite dans le **Tableau 49**.

Méthode de fractionnement 6 : Rotor 100 mL ; Mode ascendant										
	Début (min)	Fin (min)	Débit (mL/min)	Rotor (rpm)	% A	% B				
	0	15	10	0	100	0				
Equilibration	15	30	10	500	100	0				
Equilibration	30	35	5	2300	100	0				
	35	60	5	2300	0	100				
Elution	0	55	5	2300	0	100				
Extrusion	55	120	10	2300	100	0				

**Tableau 49 :** Méthode de fractionnement pour l'extrait BNC\_BuOH\_F6 par CPC.

La vitesse du rotor a été fixée à 2300 rpm. Les phases A et B correspondaient, respectivement, à la phase inférieure et la phase supérieure du système P9. La pression et le volume à l'équilibre étaient de 93 bars et de 46 mL respectivement. Le profil chromatographique UV présentait plusieurs pics.

Après analyse en LC-HRMS, l'extrait F6 a pu être décomposé en quatre fractions distinctes. Une deuxième expérience a été réalisée sur le reste de cette fraction (900 mg) avec la même méthode d'analyse. La pression et le volume à l'équilibre étaient de 93 bars et de 40

mL respectivement, comme pour la première injection. Le profil UV de la deuxième injection et les profils LC-HRMS des tubes collectés sont similaires à ceux de la première. Ainsi, les mêmes fractions ont été constituées pour les deux CPC. Elles ont ensuite été dégustées (**Tableau 50**).

	Fraction	Masses (mg)	Goût
	1	2,4	Sucré : 3/5
BNC BuOH F6	2	4	Sucré : 2/5 Amer : 2/5
Dive_Duoni_i o	3	66,4	Amer : 4/5
	4	1165,9	Amer : 5/5

Tableau 50 : Gustatogramme des 4 fractions rassemblées de l'extrait BNC\_BuOH\_F6.

Malgré une répartition inégale des masses après le fractionnement, l'analyse sensorielle a permis de révéler des extraits sucrés et amers. Deux fractions ont notamment été notées intensément amères et une sucrée. Le protocole de purification n'a pas encore été poursuivi sur ces fractions. Néanmoins, quelques hypothèses ont pu être émises.

La fraction BNC\_BuOH\_F6\_1 présente un faible nombre de pics chromatographiques. Le pic majoritaire de cette fraction a été identifié comme l'ion déprotoné ( $C_{14}H_5O_8^-$ ) de l'acide ellagique (m/z 301). En effet, les mêmes ions fragments ont été obtenus suite à l'analyse des spectres de fragmentation HCD que ceux décrits dans la littérature (Fernandes *et al.* 2011 ; Regalado *et al.* 2011). Au vu de la faible masse obtenue pour cette fraction, il est probable que le goût sucré perçu provienne de ce composé majoritaire. Des études ultérieures viseront à valider cette hypothèse.

Les fractions BNC\_BuOH\_F6\_3 et BNC\_BuOH\_F6\_4 pourront être injectées en HPLC-Préparative afin de les caractériser au niveau sensoriel. En revanche, deux composés majoritaires de l'extrait BNC\_BuOH\_F6\_4 ont été identifiés. Il s'agit de lignanes glycosylés décrit dans la **Partie I – Chapitre I** : le (+)-lyonirésinol 9'-*O*- $\beta$ -glucopyranoside (lignane (+)-5) et le (-)-lyonirésinol 9'-*O*- $\beta$ -glucopyranoside (lignane (-)-**6**). Ces molécules ont été purifiées au laboratoire et ont été jugées amères (Marchal, Cretin, *et al.* 2015). Ainsi, elles sont potentiellement responsables de l'amertume perçue pour cette fraction. Le fractionnement devra être continué afin de valider cette hypothèse.

# C. Purification par HPLC-Prep des fractions BNC\_BuOH\_F2, F3 et F4

Les fractions BNC\_BuOH\_F2, BNC\_BuOH\_F3 et BNC\_BuOH\_F4 ont été injectées en HPLC-Prep pour la poursuite du protocole de purification.

Les trois fractions ont été traitées séparément en HPLC-Prep équipée d'une colonne Hypersil Gold (21,2 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Thermo Scientific) pour la fraction BNC\_BuOH\_F2 et d'une colonne Sunfire C18 OBD (19 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Waters) pour les fractions BNC\_BuOH\_F3 et BNC\_BuOH\_F4. La phase mobile était constituée d'un mélange H<sub>2</sub>O + 0,1 % acide formique (phase A) et ACN + 0,1 % acide formique (phase B). Le débit était fixé à 20 mL/min. Les gradients ont été optimisés afin de séparer au mieux les composés des fractions BNC\_BuOH\_F2 (Gradient **10**), BNC\_BuOH\_F3 (Gradient **11**) et BNC\_BuOH\_F4 (Gradient **12**). Les conditions chromatographiques utilisées pour ces fractionnements sont reportées dans le **Tableau 51**.

**Tableau 51 :** Gradients utilisés pour la purification par HPLC-Prep des composés présents dansles fractions BNC\_BuOH\_F2, BNC\_BuOH\_F3 et BNC\_BuOH\_F4.

BNC_BuOH_F2	Crediant 10	Temps (min)	0	5,9	32	39	44,2	45,3	52	
Colonne Hypersil Gold		% B	25	25	45	98	98	25	25	
BNC_BuOH_F3	Gradiant 11	Temps (min)	0	11	22,1	44,2	46,4	52	54	59
Colonne Sunfire		% B	15	15	25	30	98	98	15	15
BNC_BuOH_F4	Gradient 12	Temps (min)	0	13,3	35,4	39	44,2	45,3	52	
Colonne Sunfire		% B	5	5	20	98	98	5	5	

Les échantillons ont été préparés selon la méthode décrite dans le paragraphe **III.C.1** de ce chapitre. Une détection UV à 280 nm et une détection simultanée en ELSD ont permis de suivre l'élution des composés pour les trois fractions.

Pour des raisons de simplification, les composés de cette partie seront désignés par la masse nominale m/z de leur ion déprotoné [M-H]<sup>-</sup>. Plusieurs composés majoritaires, présents dans les fractions étudiées, ont été purifiés (**Figure 44**).



**Figure 44 :** Chromatogrammes, en mode « Base Peak », des fractions injectées en HPLC-Prep en ionisation négative (BNC\_BuOH\_F2, BNC\_BuOH\_F3 et BNC\_BuOH\_F4).

Le **Tableau 52** répertorie les masses obtenues pour les fractions d'élution ainsi que les composés purs. Les expériences en HPLC-Prep ont permis de purifier quatre composés, avec des masses variables en fonction de la quantité injectée. Les composés présents dans les fractions d'élution ne peuvent être facilement associés à des structures connues sur la base de ces données.

Fraction	Pic/Elution	<i>m/z</i> observé	Masse (mg)
BNC_BuOH_F2	Pic 1	979	1,7
Ionisation négative	Elution	503;695;679	17,4
	Pic 1	169-neg	2,5
BNC_BuOH_F3	Pic 2	807	1,5
Ionisation négative	Pic 3	539	4,3
	Elution	695 ; 995 ; 537	69,7
BNC_BuOH_F4	Pic 1	783	1,2
Ionisation négative	Elution	907;1011	43,5

**Tableau 52 :** Résultats obtenus après HPLC-Prep pour les fractions BNC\_BuOH\_F2, BNC\_BuOH\_F3 et BNC\_BuOH\_F4.

Les molécules pures ainsi que les fractions d'élution obtenues après HPLC-Prep ont été caractérisées sensoriellement. Les résultats de la dégustation en solution hydro-alcoolique sont présentés dans le **Tableau 53**.

**Tableau 53 :** Gustatogramme des molécules pures et des extraits après HPLC-Prep pour les fractions BNC\_BuOH\_F2, BNC\_BuOH\_F3 et BNC\_BuOH\_F4.

Fraction	Composé pur et élution	Goût
BNC_BuOH_F2	979	Sucré : 2/5
	Elution	Amer : 3/5
	807	Sucré : 2/5
BNC_BuOH_F3	169-neg	Amer : 3/5
	539	Amer : 2/5
	Elution	Sucré : 2/5
BNC BuOH FA	783	Sucré : 1/5
	Elution	Sucré : 2/5

La fraction BNC\_BuOH\_F2 avait été décrite comme étant aussi sucrée qu'amère. Bien que cette fraction n'exprimait pas un goût intense, son profil chromatographique présentait peu de pics. L'expérience de HPLC-Prep a permis de purifier le composé majoritaire m/z 979. Ce composé a déjà été identifié au laboratoire et son goût a alors été établi. Il s'agit du Quercotriterpénoside XI (QTT XI), qui a été jugé sucré (2/5) dans de l'eau, en solution hydroalcoolique et dans du vin (Gammacurta *et al.* 2019). Dans cette publication, la présence de ce composé a également été décrite dans un vin blanc boisé et dans une eau-de-vie de Cognac. Ainsi, il est possible que cette molécule contribue au goût des vins et des eaux-de-vie. Pour vérifier cette hypothèse, son seuil de détection gustative devra être déterminé dans ces matrices puis il conviendra de le comparer aux concentrations retrouvées dans les vins et les spiritueux. Par ailleurs, la fraction d'élution a été décrite comme amère, ce qui démontre l'efficacité de la séparation.

La fraction BNC\_BuOH\_F3 avait été décrite avec un goût sucré intense. Après injection en HPLC-Prep, trois composés majoritaires ont été purifiés. L'un a été jugé sucré (m/z 807) et les deux autres amers (m/z 169-neg et 539). Les résultats de la dégustation suggèrent que le composé m/z 807 puisse participer au goût de la fraction avant injection. Si la fraction d'élution a également été jugée sucrée, les composés m/z 169-neg et 539 se sont révélés moyennement amers, ce qui indique des effets de masquage de certains composés par d'autres. Afin de purifier d'autres composés sapides, la fraction d'élution pourrait être injectée une seconde fois en HPLC-Prep avec un nouveau gradient.

La fraction BNC\_BuOH\_F4 avait été décrite moyennement sucrée. Le composé majoritaire m/z 783 de cette fraction a pu être purifié et été jugé faiblement sucré. Il ne semble pas en mesure d'être responsable de la saveur de la fraction ; des phénomènes de synergie avec d'autres composés pourraient expliquer les différences de perception obtenues.

La **Figure 45** résume le protocole de fractionnement mis en place pour la purification de fractions sapides pour l'extrait BNC\_BuOH.



Figure 45 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait BNC\_BuOH.

La purification des fractions d'intérêt a permis de mettre en évidence des molécules sapides. Les composés m/z 807, 783, 169-neg et 539 sont potentiellement intéressants pour la suite de l'étude. Malheureusement, les quantités disponibles pour les composés m/z 807 et 783, à la suite de la dégustation, ne sont pas suffisantes pour leur caractérisation structurale. De ce fait, une optimisation des méthodes de fractionnement de l'extrait de bois de chêne a été mise en place pour purifier à nouveau ces composés d'intérêt.

# D. Optimisation des méthodes de fractionnement en vue de la purification des composés m/z 807 et 783

Une approche ciblée a été mise en place afin de purifier les composés de m/z 807 et 783. Pour cela, un criblage a été réalisé à l'aide de la LC-HRMS. Les masses précises des ions quasimoléculaires des composés d'intérêt, soit 807,0657 et 783,0662, ont été recherchées avec une précision de masse de  $\pm$  5 ppm. Les méthodes ont été optimisées pour permettre la purification de ces deux composés, en plus grande quantité. Ainsi, dans cette partie, le fractionnement des extraits n'a pas été guidé par leur dégustation mais par leur analyse spectrométrique. Ces deux composés ont principalement été observés dans le BNC. Une extraction solideliquide de cet extrait a alors été réalisée, dans les conditions décrites dans le paragraphe **II.B** de ce chapitre.

Après filtration, évaporation à sec et lyophilisation, une poudre homogène de l'extrait a été obtenue. Des tests d'extraction liquide-liquide ont été réalisés sur l'extrait afin de sélectionner le meilleur solvant en vue de la purification des deux composés d'intérêt. Ils ont montré une meilleure affinité pour le butan-1-ol. Afin d'améliorer le rendement, deux extractions supplémentaires au BuOH saturé ont été ajoutées au protocole mis en place dans le paragraphe **II. C. 1.** de ce chapitre. Les composés étaient également présents dans la phase aqueuse de ces extractions liquide-liquide mais avec une intensité plus faible. Ainsi, la phase BuOH a été conservée pour la poursuite du fractionnement.

Des tests de systèmes de CPC ont été réalisés sur l'extrait BNC\_BuOH (3,5 g). Des systèmes fortement polaires ont été privilégiés pour ce fractionnement, puis les K<sub>D</sub> ont été calculés pour ces deux composés. Le système choisi est le P3, composé d'AcOEt/iPrOH/H<sub>2</sub>O dans les proportions 10/1/10. A l'issue de cette expérience de CPC, les tubes collectés sont analysés par LC-HRMS et rassemblés pour constituer deux fractions enrichies en composé ciblé. Ainsi, la fraction BNC\_BuOH\_F-III est conservée pour la purification du composé m/z 807 et la fraction BNC\_BuOH\_F-IV pour la purification du composé m/z 783 (**Tableau 54**).

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Molécule d'intérêt
F-I	15-37	67,9	/
F-II	38-52	49,9	/
F-III	53-66	44,7	<i>m/z</i> 807
F-IV	67-83	92,9	<i>m/z</i> 783
F-V	84-115	101,1	/
F-VI	116-145	88,4	/
F-VII	146-185	111,7	/
F-VIII	186-202	235,3	/
F-IX	203-230	2124	/

Tableau 54 : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait BNC\_BuOH.

Les profils chromatographiques obtenus pour les deux fractions sélectionnées à l'issue de cette première expérience de CPC étaient simplifiés. La HPLC-Prep a donc pu être utilisée pour achever le protocole de purification. Une meilleure séparation des composés a été observée en utilisant la colonne Sunfire, avec des phases A (eau) et B (acétonitrile) acidifiées. Les conditions chromatographiques utilisées pour les fractionnements sont reportées dans le **Tableau 55**.

**Tableau 55 :** Gradient utilisé pour la purification par HPLC-Prep des composés *m/z* 807 et 783 dans les fractions BNC\_BuOH\_F-III et BNC\_BuOH\_F-IV.

BNC_BuOH_F-III	Cradiant 13	Temps (min)	0	5,9	32	39	44,2	45,3	52
Colonne Sunfire	Gradient 13	% B	10	10	19	98	98	10	10

La **Figure 46** résume le protocole de fractionnement mis en place pour la purification des composés m/z 807 et 783 à partir de l'extrait BNC\_BuOH.



**Figure 46 :** Fractionnement de l'extrait BNC\_BuOH en vue de la purification des composés m/z 807 et 783.

Les purifications réalisées par HPLC-Prep ont permis d'obtenir respectivement 3,5 et 4,2 mg des composés ciblés m/z 807 et 783. Leur élucidation structurale est désormais possible. Leur caractérisation sensorielle dans de l'eau et dans un vin sera également conduite afin d'évaluer leur influence dans ces deux matrices. Par ailleurs, leur quantification dans le bois, les vins et les eaux-de-vie pourra être menée en fonction des résultats de la dégustation.

Dans cette partie, une stratégie d'extraction et de purification a été développée à partir d'extrait de bois de chêne « non-chauffé ». L'étude a été guidée par la dégustation, permettant le criblage des fractions et la sélection de celles présentant un goût. En outre, lors du fractionnement, des fractions sapides, amères et sucrées, ont été retrouvées. Cette observation est en accord avec la dégustation de l'extrait pré-purifié, qui présentait les deux saveurs. La deuxième hypothèse avancée pour expliquer la modulation gustative consécutive à la chauffe, suggérait la présence de composés amers dans le bois non-chauffé. La dégustation a bien permis d'isoler deux molécules amères. Néanmoins, deux composés sucrés ont également été purifiés à partir de ce même extrait.

# Conclusion Chapitre III

L'objectif de ce chapitre était de mettre en place un protocole de purification afin d'isoler des fractions sapides à partir d'extrait de bois de chêne. Une démarche inductive guidée par la dégustation a été adoptée. Cette technique a permis de mettre en évidence plusieurs fractions possédant un goût amer et/ou sucré. En outre, une modulation de l'intensité gustative de ces fractions a été perçue en fonction de la chauffe. Les résultats obtenus ont montré une saveur sucrée plus intense dans l'extrait organique au MtBE du BCF et une amertume plus marquée dans la phase BuOH du BNC. Ces perceptions sont cohérentes avec les observations empiriques.

Les protocoles de fractionnement ont permis de purifier les composés majoritaires des fractions d'intérêt. Ainsi, sept composés sapides ont été purifiés à partir de l'extrait BCF\_MtBE, cinq à partir de l'extrait BNC\_BuOH et trois à partir de l'extrait BNC\_MtBE. Parmi ces molécules, quatre avait déjà été purifiées et identifiées au laboratoire. Les autres, soit six composés sucrés (m/z 641, 183, 807, 783, 639-1 et 639-3), quatre amers (m/z 169-pos, 169-neg, 539 et 639-2) et un astringent (m/z 209), ont été plus particulièrement étudiés par la suite. Leur caractérisation sensorielle dans deux nouvelles matrices ainsi que leur caractérisation structurale feront l'objet du prochain chapitre.

# CHAPITRE IV. IDENTIFICATION DE COMPOSÉS SAPIDES DU BOIS DE CHÊNE

# Introduction

L'objectif de ce chapitre est d'élucider la structure des composés purifiés précédemment, à l'aide de la HRMS et de la RMN, et d'étudier leurs propriétés sensorielles dans deux matrices, de l'eau et un vin blanc non boisé.

# I. Etude des propriétés sensorielles des composés purifiés

Les quantités obtenues pour les composés d'intérêt ont permis d'étudier leurs propriétés sensorielles dans de l'eau et dans un vin blanc non boisé (Bordeaux 2013) par un panel restreint. Pour chaque matrice, ils ont été dégustés à une concentration fixe de 5 mg/L, selon les conditions décrites dans la **partie expérimentale générale III. A**. Les cinq dégustateurs ont comparé les composés entre eux et avec les témoins. La perception gustative a alors été décrite, puis l'intensité a été notée pour les différentes saveurs perçues. Le vin blanc, utilisé comme témoin, a été décrit avec une forte acidité. Le QTT I a été utilisé comme molécule de référence pour la sucrosité (Marchal, Waffo-Téguo, *et al.* 2011) ; il a été noté à une intensité de 4/5 dans de l'eau et dans le vin blanc, dont il diminue en outre l'acidité. Les résultats de la dégustation sont reportés dans le **Tableau 56**.

**Tableau 56 :** Propriétés gustatives des composés d'intérêt dans de l'eau et dans un vin blanc

 non boisé.

		Eau			Vin blan Borde	c non boisé aux 2013	
	Sucré	Amer	Astringent	Sucré	Amer	Astringent	Acide
Témoin	/	/	/	0/5	0/5	0/5	5/5
QTT I	4/5	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5	2/5
169-pos	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5	1/5	3/5
183	2/5	0/5	0/5	3/5	1/5	0/5	2/5
209	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	3/5	4/5
641	4/5	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5	3/5
639-1	3/5	0/5	0/5	3/5	1/5	0/5	3/5
639-2	0/5	2/5	0/5	0/5	3/5	0/5	3/5
639-3	1/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	5/5
807	2/5	0/5	0/5	3/5	1/5	0/5	2/5
783	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	4/5
169-neg	0/5	3/5	0/5	0/5	3/5	0/5	3/5
539	0/5	2/5	0/5	1/5	3/5	0/5	3/5

/ : Aucune note n'a été attribuée.

#### Deuxième partie : Recherche de nouveaux marqueurs sapides dans le bois de chêne

La dégustation a permis d'établir que six molécules purifiées ont un goût sucré dans les deux matrices. Elles ont été notées avec des intensités variables mais plus faibles que le QTT I, à l'exception du composé m/z 641 qui est apparu aussi sucré que la référence. Dans le vin blanc, cette molécule procure également une forte augmentation de la sensation de sucrosité ainsi qu'une diminution de l'acidité.

Les composés m/z 183, 639-1 et 807 possèdent aussi un goût sucré. Dans l'eau, ils ont été notés respectivement avec une intensité de 2, 3 et 2 sur 5. En outre, ils ont chacun modifié l'équilibre gustatif du vin blanc en augmentant intensément la sucrosité, faiblement l'amertume et en diminuant l'acidité.

Après ajout du composé m/z 783 dans de l'eau, celui-ci a été perçu avec un faible goût sucré. Dans un vin blanc, sa saveur a également été ressentie mais plus faiblement. Le composé m/z 639-3 a été décrit comme peu sucré dans de l'eau. En revanche, il semble participer à l'équilibre gustatif du vin blanc en augmentant son amertume sans modifier son acidité.

Par ailleurs, trois molécules (m/z 639-2, 169-neg et 539) ont développé un goût amer dans de l'eau. Leur ajout a également un effet sur la qualité gustative du vin en augmentant intensément l'amertume et en diminuant l'acidité.

Deux molécules (m/z 169-pos et 209) ont également été décrites comme astringentes tant dans de l'eau que dans le vin blanc.

Les molécules d'intérêt ont pu être caractérisées sensoriellement. Néanmoins, seule la détermination de leur seuil de détection dans diverses matrices pourra évaluer leur influence organoleptique sur le goût des vins et des eaux-de-vie élevés sous bois.

# II. Caractérisation structurale des composés purifiés

La détermination de la formule brute de composés inconnus peut se faire grâce à la LC-HRMS en raison des caractéristiques techniques de l'analyseur Orbitrap. Elle s'articule en plusieurs étapes (Kind et Fiehn 2007). Tout d'abord, l'application QualBrowser du logiciel Xcalibur permet d'assigner les espèces chimiques majoritaires du spectre de masse, telles que les ions quasi-moléculaires, adduits, dimères et les fragments, présentes dans ces composés. Cette affectation est basée sur les écarts de m/z observés entre les ions. Cela permet de générer des formules brutes potentielles pour chaque ion quasi-moléculaire, en appliquant des contraintes relatives à la composition des molécules comme, par exemple, le nombre maximum des différents atomes. Le logiciel présente, pour chacune des formules candidates, l'écart entre la masse mesurée et la masse théorique. En raison de la précision de mesure de masse de l'analyseur Orbitrap, la formule n'est plausible que lorsque cet écart est inférieur à 3 ppm. Enfin, le logiciel permet d'estimer le nombre d'atomes de carbones de la molécule, par la mesure du rapport entre les ions M et M+1 du massif isotopique. Cette estimation réduit le nombre de formules brutes candidates et permet de déterminer celle correspondant au composé considéré.

L'utilisation de cette méthode a permis de déterminer les formules brutes pour les ions déprotonés m/z 641, 639-1, 639-2, 639-3, 807, 783, 169-neg et 539 ainsi que pour les ions protonés m/z 169-pos, 183 et 209. L'analyseur Orbitrap est équipé d'une cellule de collision HCD permettant la fragmentation des ions totaux. Cette analyse est susceptible de fournir des renseignements sur la nature, la position et l'enchaînement des groupes fonctionnels d'une molécule (Marchal, Génin, *et al.* 2015). Ainsi les molécules ont été analysées avec différentes énergies de collision. Les principaux fragments ont été obtenus à 40 eV en mode d'ionisation négatif et à 30 eV en mode positif. Les **Tableau 57** et **Tableau 58** récapitulent les données de spectrométrie de masse à haute résolution enregistrées pour les composés purifiés. Le pouvoir rotatoire spécifique de chaque molécule a également été mesuré à partir d'1 mg d'extrait pur, avec l'appareil et les conditions décrites en partie expérimentale générale.

	Ion moléculaire		Ions fra	Pouvoir rotatoire spécifique	
<i>m/z</i> nominale	$[M-H]^-$	Formule <sup>b</sup>	$[M-H]^-$	Formule	$[\alpha]^{25}$
6/1	641 2218	$C_{22}H_{27}O_{12}$	417,1578	$C_{22}H_{25}O_{8}^{-}$	-74.2
0+1	071,2210	033113/013	223,0606	$C_{11}H_{11}O_5^-$	-77,2
			487,1826	$C_{22}H_{31}O_{12}$	
639-1	639,1935	$C_{29}H_{35}O_{16}$	335,1678	$C_{15}H_{27}O_8^-$	-2,3
			169,0125	$C_7H_5O_5^-$	
			487,1826	$C_{22}H_{31}O_{12}$	
639-2	639,1935	$C_{29}H_{35}O_{16}$	335,1678	$C_{15}H_{27}O_8^-$	-7,1
			169,0125	$C_7H_5O_5^-$	
			487,1826	$C_{22}H_{31}O_{12}$	
639-3	639,1935	C29H35O16	335,1678	$C_{15}H_{27}O_{8}$	n.d
			169,0125	$C_7H_5O_5^-$	
160 mag	160 01/2		125,0243	$C_6H_5O_3^-$	0.2
109-neg	109,0142	C7H5O5	97,0290	$C_5H_5O_2^-$	-9,2
			505,0607	$C_{22}H_{17}O_{14}$	
807	807,0702	$C_{36}H_{23}O_{22}$	300,9991	$C_{14}H_5O_8^-$	-71,9
			169,0134	$C_7H_5O_5^-$	

**Tableau 57 :** Données HRMS en ionisation négative et pouvoir rotatoire spécifique des composés purifiés à partir de l'extrait de bois de chêne.

		0241127 0 14	313,0567	$C_{13}H_{13}O_{9}$	
539	1171411	<b>V 241127V J</b> 14			TH./
520	530 1/11	C. H. O. F	509,1304	$C_{23}H_{25}O_{13}$	17
765	785,009	C34H23O22	300,9991	$C_{14}H_5O_8^-$	+0.0,1
783	783.060		481,0603	$C_{20}H_{17}O_{14}$	+ 95 1

<sup>a</sup> : Fragmentation HCD réalisée à 40 eV.

<sup>b</sup> : Formule brute postulée à partir de la mesure de masse précise, du ratio isotopique et de l'interprétation de la composition des fragments.

n.d : non déterminé.

**Tableau 58 :** Données HRMS en ionisation positive et pouvoir rotatoire spécifique des composés purifiés à partir de l'extrait de bois de chêne.

Ion moléculaire			Ions fra	Pouvoir rotatoire spécifique	
m/z nominale	$[M+H]^+$	Formule <sup>b</sup>	$[M+H]^+$	Formule	[α] <sup>25</sup>
169-pos	169,0494	$C_8H_9O_4^+$	154,0269 125,0447	$C_7H_6O_4^+ C_7H_9O_2^+$	0
183	183,0656	$C_9H_{11}O_4^+$	168,0344 153,0109	$\begin{array}{c} C_8H_8O_4{}^+\\ C_7H_5O_4{}^+\end{array}$	-2,4
209	209,0813	$C_{11}H_{13}O_4^+$	194,0501 179,0266	$\begin{array}{c} C_{10}H_{10}O_4{}^+ \\ C_9H_7O_4{}^+ \end{array}$	13,7

<sup>a</sup> : Fragmentation HCD réalisée à 30 eV.

<sup>b</sup> : Formule brute postulée à partir de la mesure de masse précise, du ratio isotopique et de l'interprétation de la composition des fragments.

L'analyse structurale a ensuite été réalisée par l'étude des spectres RMN. Pour cela, 1 mg de chaque composé a été utilisé. Les techniques de RMN et de polarimétrie étant non destructives, les échantillons ont ensuite été récupérés puis lyophilisés. 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 supervisée par le Pr. Waffo-Téguo.

### A. Composés de la fraction BCF\_MTBE

# 1. Identification des composés *m/z* 169-pos, 183 et 209

Le composé m/z 169-pos présente un ion protoné  $[M+H]^+$  de m/z 169,0494, ce qui correspond à une formule brute de C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (avec une précision de 1,3 ppm par rapport à la valeur théorique). La présence des ions fragments de m/z 154,0269 et 125,0447 correspondent respectivement à une perte d'un méthyle et d'un groupe carboxyle.

Le composé m/z 183 présente un ion quasi-moléculaire  $[M+H]^+$  de m/z 183,0656 ce qui correspond à une formule brute de C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (avec une précision de 1,9 ppm). La présence des ions fragments de m/z 168,0344 et 153,0109 correspondent à des pertes de groupes méthyles.

Le composé m/z 209 présente un ion quasi-moléculaire  $[M+H]^+$  de m/z 209,0813 ce qui correspond à une formule brute de C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> (avec une précision de 2,3 ppm). La présence des ions fragments de m/z 194,0501 et 179,0266 correspondent à des pertes de groupes méthyles.

Les formules brutes correspondant à ces composés ont déjà été décrites dans de nombreuses espèces et également dans le genre *Quercus* (Brígida Fernández de Simón *et al.* 1996 ; Martínez-Gil *et al.* 2019 ; M. Sanz *et al.* 2012). Afin de valider leur identification, seuls les spectres mono-dimensionnels du proton ont été réalisés, à 300 K dans de l'acétone-*d*<sub>6</sub>. La comparaison des données RMN expérimentales (**Tableau 59**) avec celles de la littérature (H. Kim *et al.* 2003) a permis de confirmer la présence des différents groupements décrits précédemment pour chaque composé.

<i>m/z</i> 169-pos		<i>m/z</i> 183		<i>m/z</i> 209	
Numéro l'atome	$\begin{array}{c} de  \delta^{-1}H  (en  ppm) \\ multiplicité \\ (J en Hz) \end{array}$	Numéro l'atome	$de \begin{array}{c} \delta^{1}H (en ppm) \\ multiplicité \\ (J en Hz) \end{array}$	Numéro l'atome	$\begin{array}{c} \delta  {}^{1}\text{H}  (\text{en ppm}) \\ \text{multiplicité} \\ (J \text{ en Hz}) \end{array}$
2	7,51 d (1,6)	2/6	7,2 s	2/6	7,1 s
5	6,9 d (8,3)	7	9,8 s	7	7,56 d (15,8)
6	7,58 dd (8,3 ; 1,6)	3-OMe	3,9 s	8	6,69 dd (15,8 ; 7,8)
3-OMe	3,8 s	5-OMe	3,9 s	9	9,63 d (7,8)
				3-OMe	3,9 s
				5-OMe	3,9 s

**Tableau 59 :** Données RMN <sup>1</sup>H des composés m/z 169-pos, 183 et 209.

Ainsi, les molécules ont été identifiées comme étant l'acide vanillique (m/z 169-pos), le syringaldéhyde (m/z 183) et le sinapaldéhyde (m/z 209) (**Figure 47**).



**Figure 47 :** Structure chimique de l'acide vanillique (m/z 169-pos), du syringaldéhyde (m/z 183) et du sinapaldéhyde (m/z 209).

L'acide vanillique a déjà été identifié dans les vins et les eaux-de-vie (Canas 2017 ; J. -L Puech *et al.* 1984 ; Rocchetti *et al.* 2018 ; Symonds 1978). Il a déjà été décrit dans la littérature pour son astringence (Gonzalo-Diago, Dizy, et Fernández-Zurbano 2014). Son seuil de détection dans de l'eau a été établi à 53 mg/L par Hufnagel & Hofmann (Hufnagel et Hofmann 2008) pour le caractère astringent également. Lors de la dégustation, présentée dans le paragraphe I de ce chapitre, ce composé a été décrit avec un goût très peu intense, ce qui est cohérent avec la valeur de son seuil de détection (Hufnagel et Hofmann 2008). Pour cette raison, son étude ne sera pas poursuivie dans la suite de ce travail.

Le syringaldéhyde a lui aussi été identifié dans les vins et les spiritueux (Barnaba *et al.* 2015 ; Canas 2017 ; de Simón *et al.* 1990 ; Sirén, Sirén, et Sirén 2015). Si son goût n'a jamais été relaté dans la bibliographie, ce composé a été décrit comme développant une odeur « douce, gourmande », avec un seuil de détection olfactive estimé à 22  $\mu$ g/L (Sterckx *et al.* 2011). La dégustation réalisée avec les cinq experts a permis de juger ce composé sucré avec une intensité de 3/5. Afin de valider son influence dans les vins et les eaux-de-vie, son seuil de détection gustative sera réalisé dans ces deux matrices. En outre, la dégustation se fera avec des pincenez pour que le panel ne soit pas influencé par son odeur caractéristique.

Le sinapaldéhyde a également été identifié dans les spiritueux (Canas, Casanova, et Pedro Belchior 2008 ; Canas *et al.* 2003). Son goût n'a jamais été identifié dans la littérature. Pour la suite de ce travail, ce composé n'a pas fait l'objet d'un seuil de détection gustative, car la dégustation présentée précédemment n'avait pas révélé d'activité gustative significative en dépit de sa présence dans une fraction sucrée.

#### 2. Identification du composé *m/z* 641

Le composé m/z 641, d'ion quasi moléculaire [M-H]<sup>-</sup> de m/z 641,2218, a pour formule brute C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>O<sub>13</sub> (avec une précision de 0,4 ppm par rapport à la valeur théorique). Son spectre HRMS en ionisation négative avec fragmentation HCD présente deux fragments majoritaires de m/z 417,1578 et 223,0606, correspondant respectivement à des pertes de neutre de 223,8422 (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>) et de 418,1612 (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>), comme représenté à la **Figure 48**. Ces données suggèrent que ces deux fragments correspondent aux deux groupements principaux de la molécule d'intérêt.





A notre connaissance, aucun composé avec cette formule brute n'a été décrit dans le bois ni dans le genre *Quercus*. Les spectres mono-dimensionnels (<sup>1</sup>H) et bi-dimensionnels (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC) ont été réalisés selon les conditions décrites dans la **partie expérimentale générale II. B. 2. b.** Aucune correspondance n'a été trouvée entre les données RMN expérimentales et celles de la littérature pour cette molécule m/z 641 (**ANNEXE 6**). Toutefois, l'ion fragment de formule C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup> pourrait correspondre au syringarésinol, un lignane présent dans diverses boissons, telles que le vin et le sirop d'érable (Liu *et al.* 2017 ; Nurmi *et al.* 2003 ; Sanz *et al.* 2012), ainsi que dans diverses essences de bois, et notamment le chêne (Seikel, Hostettler, et Niemann 1971). Pour valider cette hypothèse, une comparaison entre les données RMN et celles de la littérature a d'abord été initiée. Puis, la structure complète du composé m/z 641 a été réalisée. Le raisonnement conduisant à ce résultat est détaillé ci-dessous.

# Identification du fragment C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>

Les données HRMS ont établi une formule brute  $C_{22}H_{26}O_8$  qui pourrait correspondre au syringarésinol. L'analyse du spectre RMN du proton a permis de repérer plusieurs signaux caractéristiques (**ANNEXE 6**).

Douze protons, résonnant à 3,73 et 3,84 ppm, apparaissent sous forme de singulets ; ils correspondent aux protons de groupes méthoxy présents sur deux noyaux aromatiques.

Quatre protons, résonnant à 6,68 et 6,66 ppm, apparaissent sous forme de singulets ; ils correspondent à des protons en position méta sur deux noyaux aromatiques.

Les autres protons sont présents sur les deux tétrahydrofuranes : deux « broad bands » intégrant pour un proton chacun et résonnant à 3,11 et 3,13 ppm ; deux multiplets intégrant pour deux protons chacun et résonnant à 3,89 et 4,27 ppm ; deux doublets intégrant pour un proton chacun, résonnant à 4,78 et 4,74 ppm avec des constantes de couplage de 3,9 et 4,1 Hz respectivement. Ces différents signaux sont cohérents avec l'hypothèse initiale, il semblerait que ce fragment soit bien le syringarésinol (Casabuono et Pomillo 1994).

La stéréo-isomérie de ce fragment a notamment été étudiée. Celle-ci présente 4 centres stéréogènes. En effet, si la RMN ne permet pas de caractériser la configuration absolue d'une molécule, il est en revanche possible de déterminer la configuration relative des cycles, grâce aux constantes de couplage des signaux <sup>1</sup>H et à l'expérience ROESY. Les données RMN ainsi que la littérature montrent que cette partie de la molécule comporte des liaisons condensées de type résinol ( $\beta$ - $\beta$ ) (Davin *et al.* 2008). Ainsi, il est connu que pour les tétrahydrofuranes, la stéréo-isomérie entre H-8 et H-8' correspond toujours à une orientation *cis* (Rahman *et al.* 1990). Les données RMN <sup>1</sup>H pour les protons benzyliques H-7 et H-7' ne sont pas identiques et apparaissent comme doublets respectivement à 4,78 (J = 3,9 Hz) et 4,74 ppm (J = 4,1 Hz). En outre, le proton H-7, résonnant à 4,78 ppm, est corrélé en ROESY avec le proton H-9, résonnant à 3,89 ppm, et avec les protons H-2 et H-6, résonnant à 6,68 ppm. De la même façon, le proton H-7', résonnant à 4,74 ppm, est corrélé en ROESY avec le proton H-9, résonnant à 3,89 ppm, et avec les protons H-2 et H-6', résonnant à 6,66 ppm. Cette observation indique que les protons H-7 et H-8, ainsi que H-7' et H-8' sont en position *trans* diéquatoriale. Ces données sont cohérentes avec celles de la littérature (Casabuono et Pomillo 1994).

# Identification du fragment C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>

Après l'identification du syringarésinol, quatre signaux n'ont toujours pas été attribués (ANNEXE 6).

Six protons, résonnant à 3,85 ppm, apparaissent sous forme de singulets et sont portés par deux carbones à 56,2 ppm. Le spectre HMBC montre que ce signal <sup>1</sup>H corrèle avec un carbone situé dans la zone des aromatiques à 147,03 ppm. Les déplacements chimiques de ces deux derniers signaux suggèrent la présence de deux groupements méthoxy sur un cycle aromatique.

Un singulet, intégrant pour deux protons à 7,35 ppm et portés par deux <sup>13</sup>C de  $\delta$  105,8 ppm, est caractéristique de deux C-H équivalents et inclus dans un cycle aromatique. Le spectre HMBC montre que ce signal <sup>1</sup>H corrèle notamment avec des carbones situés dans la zone des aromatiques à 120,8, 147,0 ppm. Le déplacement chimique de ce dernier signal suggère la présence des deux groupements méthoxy décrits précédemment. En outre, le proton à  $\delta$  7,35 ppm corrèle en HMBC avec un <sup>13</sup>C à 195,3 ppm associé généralement à la présence d'une cétone. La molécule de formule brute C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>O<sub>13</sub> comporte 15 insaturations, dont 10 font parties du syringarésinol (1<sup>er</sup> groupement de la molécule). Ainsi, la deuxième partie du composé *m/z* 641 comporte 5 insaturations. Sur la base des signaux identifiés, un cycle aromatique (4 insaturations) et une cétone (1 insaturation) pourraient faire partie de ce fragment. Pour le cycle aromatique, il manquerait un signal aux alentours de  $\delta_C$  135 ppm, corrélé avec les protons résonnant à 7,35 ppm, pour valider cette hypothèse. Or celui-ci n'est pas observable sur le spectre, ce qui pourrait suggérer un problème de solvant ou un manque de sensibilité. L'opération pourra être renouvelée avec du chloroforme deutéré.

Deux protons, résonnant à 3,95 ppm, apparaissent sous la forme d'un multiplet et sont portés par un carbone à 61,9 ppm. En général, le déplacement chimique caractéristique d'un CH<sub>2</sub> se trouve se trouve aux alentours de 1-2 ppm. Ainsi, les deux protons correspondent vraisemblablement à un groupement méthylène rattaché à un alcool ou un oxyde, dont ces déplacements chimiques sont caractéristiques. En outre, le spectre HMBC montre que ce signal <sup>1</sup>H corrèle avec un carbone à 85,2 ppm, caractéristique d'un carbone portant un hydroxyle.

Un proton, résonnant à 5,29 ppm, avec une constante de couplage de 5,6 Hz, apparait sous la forme d'un triplet. Il est porté par le <sup>13</sup>C à  $\delta$  85,2 ppm, caractéristique d'un carbone portant un hydroxyle. Le spectre COSY montre que ce proton est corrélé qu'avec les protons

résonnant à 3,95 ppm. La ROESY a permis de voir que ce proton corrèle également avec les deux protons résonnant à 7,35 ppm présents sur le cycle aromatique.

En comparant ces données avec celles de la littérature, ce fragment correspond vraisemblablement au 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propan-1-one (Lin et al. 1994). Les données RMN devraient permettre de préciser la position du fragment C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> sur le syringarésinol. En effet, le triplet présent à 5,29 ppm intègre pour un proton au lieu de deux dans la molécule associée à ce fragment. En outre, le déplacement chimique pour ces 2 protons est normalement aux alentours de 3-3,5 ppm. Ainsi, il est possible que le proton résonnant à 5,29 ppm ait été déblindé par la présence de la première partie de la molécule. Ce déblindage est notamment caractéristique des dérivés du syringarésinol (Kamaya, Nakatsubo, et Higuchi 1983) ; les fragments se fixent préférentiellement sur l'alcool du C-4 (Davin et al. 2008 ; L. Li et Seeram 2011; S.-F. Li et al. 2010). C'est notamment le cas du (1S,2R)-2-[2,6-dimethoxy-4-[(1*S*,3*aR*,4*S*,6*aR*)-tetrahydro-4-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1*H*,3*H*-furo[3,4-*c*]furan-1yl]phenoxy]-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol, du buddlenol E. du (erythro,erythro)-4",4"'-dihydroxy-3,3',3",5,5'-hexamethoxy-7,9';7',9-diepoxy-4,8";4',8"'bisoxy-8,8'-dineolignan-7",7",9",9"-tetraol, ou encore de l'éther guaiacylglycerol-βsyringarésinol (Kamaya, Nakatsubo, et Higuchi 1983; Y. Liu et al. 2017; Zhu et al. 2012).

Les valeurs des  $\delta^{13}$ C ont été attribuées à l'aide du spectre HSQC et HMBC et sont reportés dans le **Tableau 60** et à l'**ANNEXE 6**.

	Numéro de l'atome	δ <sup>1</sup> H (en ppm) multiplicité (J en Hz)	$\delta^{13}$ C (en ppm)
	1	/	134,8
	2/6	6,68 s	102,2
	3/5	/	152,1
	4	/	137,5
	7	4,78 d (3,9)	85,2
	8	3,11 brd	53,7
	9	3,89 m	70,8
Syringerseinel	10/11	3,73 s	54,6
Synngaresmor	1'	/	134,2
	2'/6'	6,66 s	102,4
	3'/5'	/	147,4
	4'	/	131,5
	7'	4,74 d (4,1)	85,6
	8'	3,13 brd	53,7
	9'	4,27 m	71,0
	10'/11'	3,84 s	54,7
	1"	/	140,8
	2"/6"	7,35 s	105,8
	3"/5"	/	147,0
Frogmont C. U.O.	4"	/	n.d
$\Gamma_{11} \Pi_{12} O_{5}$	7"	/	195,5
	8"	5,29 t (5,6)	85,2
	9"	3,95 m	61,9
	10"/11"	3,85 s	56,2

**Tableau 60 :** Données RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé m/z 641.

n.d : non déterminé.

L'interprétation de ces données a permis de déterminer la configuration relative du composé m/z 641, qui n'avait jamais été décrite auparavant ; il s'agit de l'HDPP-syringarésinol (**Figure 49**). Par ailleurs, le pouvoir rotatoire spécifique de ce composé a été mesuré à partir d'1 mg d'extrait pur. Celui-ci a été établi à  $[\alpha]^{25} = -74,2$  (c = 0,1, MeOH), il est ainsi présent essentiellement sous forme lévogyre.

A notre connaissance, cette molécule n'a jamais été identifié dans le bois de chêne ni dans d'autres espèces. Il a été évoqué dans une publication comme un possible produit de dégradation de la lignine par *Fusarium solani* M-13-1 (Kamaya, Nakatsubo, et Higuchi 1983) mais n'avait jamais fait l'objet d'une élucidation complète. La configuration absolue de l'HDPP-syringarésinol pourrait être déterminée par dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD). Il s'agit d'une technique chiroptique spectroscopique qui repose sur l'aptitude d'une molécule chirale à absorber différemment une lumière infrarouge polarisée circulairement gauche ou droite (Nafie, Keiderling, et Stephens 1976). Elle doit son efficacité à son association à des calculs de chimie quantique, permettant de simuler les spectres théoriques des différents énantiomères afin de les comparer aux données expérimentales. En revanche cette technique nécessite des quantités de produit importantes. Bien que fournissant des informations précieuses pour la caractérisation structurale complète d'une molécule (Buffeteau *et al.* 2007 ; Cretin *et al.* 2015), elle n'a pas pu être mise en œuvre ici.



Figure 49 : Structure chimique de l'HDPP-syringarésinol (*m/z* 641).

Par ailleurs, la dégustation a révélé que ce composé était sucré avec une forte intensité. Dans la poursuite de ce travail, sa présence dans les vins et les eaux-de-vie sera étudiée. Des analyses sensorielles complémentaires pourraient permettre de déterminer son seuil de détection gustative dans ces deux matrices. Cela nécessite une purification de ce composé en plus grande quantité, qui n'a pu être réalisée dans le cadre de ce travail.

### B. Composés de la fraction BNC\_MtBE

## 1. Identification des isomères *m/z* 639

Les isomères m/z 639 présentent des spectres de masse identiques, avec un ion quasimoléculaire [M-H]<sup>-</sup> de m/z 639,1935, ce qui correspond à une formule brute de C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>16</sub> (avec une précision de 0,1 ppm par rapport à la valeur théorique). L'ion négatif m/z 487,1826, de formule brute C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>O<sub>12</sub><sup>-</sup>, correspond à une espèce formée par la perte d'un groupement neutre C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> caractéristique d'un groupement galloyle. De même, l'ion négatif m/z 335,1678, de formule brute C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup> correspond à une perte de C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>O<sub>8</sub> vis-à-vis de l'ion m/z 639,1935. Ces résultats suggèrent la présence de deux groupements galloyles dans la structure de la molécule. Par ailleurs, le spectre de fragmentation a montré l'existence des espèces m/z331,0587 (C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>10</sub><sup>-</sup>) et 313,0573 (C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>9</sub><sup>-</sup>), caractéristiques d'un groupement hexosegallate. Les isomères m/z 639 contiendraient donc 2 groupements galloyle et 1 groupement hexosyle, ce dernier étant fixé à au moins un des deux gallates. La présence des ions m/z 487 et m/z 335 suggère que le sucre n'est pas en position terminale. Ces groupements fonctionnels seraient fixés sur une molécule de formule brute C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>. Le spectre HRMS correspondant aux isomères m/z 639 est représenté à **Figure 50**.

L'ion fragment majoritaire, le m/z 487, pourrait correspondre au dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3*S*,4*S*)-4- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-3-méthyloctonoïque (**P-WL**), un précurseur de la whisky-lactone, qui a été identifié pour la première fois dans le bois de *Platycarya strobilacea* (Tanaka et Kouno 1996). Les données RMN expérimentales et celles de la littérature ont confirmé cette hypothèse (E. Masson *et al.* 2000). Les composés m/z 639-1 et 639-2 présentent les mêmes déplacements chimiques du proton pour les signaux correspondant au fragment m/z487. Ainsi, la molécule m/z 639 pourrait se composer de ce précurseur avec un galloyle supplémentaire. A notre connaissance, aucun dérivé galloylé de cette molécule n'est connu dans le bois de chêne. Néanmoins, deux composés de même formule brute ont été identifiés par Maeda *et al.* dans le genre *Platycarya* (Maeda *et al.* 2011).



Figure 50 : Spectre HRMS correspondant aux composés m/z 639-1, 639-2 et 639-3.

#### a. Identification des composés *m/z* 639-1 et 639-2

Afin de vérifier si les composés purifiés correspondent à ceux de la publication, les données RMN mono- et bi-dimensionnels ont été analysées. Pour la molécule m/z 639-1, deux protons résonnent à 7,10 et 7,13 ppm sous forme de singulets. Les mêmes singulets sont observés pour la molécule m/z 639-2 à 7,10 et 7,08 ppm. Ils correspondent aux protons des deux groupements galloyles. A l'inverse de l'article de Maeda *et al.*, aucune information provenant des spectres COSY et HMBC ne permet d'affirmer que les galloyles sont liés l'un à l'autre. En outre, dans cette publication, trois déplacements chimiques, appartenant à la zone des aromatiques, sont observés (deux doublets à 7,48 et 7,37 ppm et un singulet à 7,26 ppm) contre deux ici.

Les spectres COSY et ROESY ont été analysés afin de connaître la position du deuxième galloyle dans ces molécules (**ANNEXE 7**).

## Identification du deuxième groupement galloyle

Pour les deux molécules, un signal diffère sur l'hexose par rapport au P-WL. En effet, un proton résonne sous la forme d'un triplet à 5,1 ppm pour le m/z 639-1 et à 5,04 ppm pour le m/z 639-2. A l'inverse pour le P-WL, les signaux des protons présents sur l'hexose apparaissent sur le spectre entre 3,20 et 4,40 ppm sous forme de multiplets ou de doublet de doublets. Ainsi, il est possible que le proton résonnant autour de 5 ppm ait été déblindé par la présence du gallate. Cette hypothèse a été vérifiée avec l'analyse du spectre HMBC. En effet, le proton à 5 ppm voit un carbone résonnant à 167 ppm, caractéristique d'un ester.

La différence entre les m/z 639-1 et 639-2 vient de la position du deuxième gallate sur l'hexose. La COSY a permis de déterminer que le gallate est fixé sur le carbone C-3' de l'hexose pour le composé m/z 639-1 et sur le carbone C-4' pour le m/z 639-2. Ainsi ces deux composés sont des isomères, différant par la position d'un gallate sur le sucre. Les valeurs des  $\delta^{13}$ C ont été attribuées à l'aide du spectre HSQC et HMBC et sont reportées dans le **Tableau 61** et à l'**ANNEXE 7**.

		<i>m/z</i> 639-1		<i>m/z</i> 639-2	
	Numéro de	$\delta^{1}$ H (en ppm)	$\delta^{13}$ C (en	$\delta^{1}$ H (en ppm)	$\delta^{13}$ C (en
	l'atome	multiplicité (J en Hz)	ppm)	multiplicité (J en Hz)	ppm)
Hexose	1'	4,51 d (7,8)	102,6	4,51 d (8)	102,8
	2'	3,45 dd (9,4 ; 8,1)	72,7	3,30 m	74,3
	3'	5,1 t (9,2)	77,6	3,73 t (9,6)	74,4
	4'	3,69 m	69,6	<b>5,04 t (10,0)</b>	71,3
	5'	3,71 m	73,6	3,86 m	71,4
	6'	4,45 dd (11,8 ; 6,4 Hz)	62 1	1.26 m	62,8
		4,50 dd (11,6 ; 2,2 Hz)	03,1	4,20 111	

**Tableau 61 :** Données RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du groupement hexose des m/z 639-1 et 639-2.

Dans la publication de Maeda *et al.*, aucun déplacement chimique n'a été attribué aux protons présents sur le glucose aux positions H-3' et H-4'. En outre, les auteurs ne mentionnent pas l'interprétation de leurs spectres HMBC et COSY pour déterminer où le deuxième groupement galloyle pourrait se fixer sur le P-WL. La comparaison avec leurs données est donc d'une pertinence limitée.

A notre connaissance, ces composés n'ont jamais été décrits dans la littérature. Il s'agit de leur première élucidation structurale et de leur première identification dans le bois de chêne. Les structures chimiques de ces deux composés sont représentées à la **Figure 51**. Par ailleurs, les pouvoirs rotatoires spécifiques de ces composés ont été mesurés à partir d'1 mg d'extrait pur. Ils ont été établis à  $[\alpha]^{25} = -2,3$  (c = 0,1, MeOH) pour le m/z 639-1 et à  $[\alpha]^{25} = -7,1$  (c = 0,1, MeOH) pour le m/z 639-2. Ces composés semblent être présents avec un léger excès de la forme

lévogyre. Cependant, en considérant l'erreur de précision de la mesure et les valeurs obtenues, ces composés pourraient vraisemblablement être sous forme d'un mélange racémique.



Figure 51 : Structure chimique des composés m/z 639-1 et 639-2.

En outre, en fonction de la position du gallate sur l'hexose, des goûts différents ont été obtenus pour ces deux composés. En effet, le m/z 639-1 (gallate en C-3') a été jugé sucré tandis que le m/z 639-2 (gallate en C-4') a été jugé amer. Leur présence dans les vins et les eaux-de-vie sera étudiée dans la poursuite de ce travail.

#### b. Hypothèses d'identification du *m/z* 639-3

Les spectres RMN expérimentales obtenus pour le composé m/z 639-3 n'étaient pas interprétables sans ambiguïté. Le problème vient probablement de la trop faible quantité disponible de produit pur.

En revanche, puisque le spectre de fragmentation associé à cette molécule est le même que celui des composés m/z 639-1 et 639-2, une hypothèse de structure peut être émise. Comme pour les deux autres isomères, le m/z 639-3 est composé de l'ion fragment m/z 487, correspondant au P-WL, avec un gallate supplémentaire. En comparaison avec les configurations obtenues pour les isomères m/z 639-1 et 639-2, il est envisageable que la troisième structure corresponde à la fixation du gallate sur la dernière position disponible de l'hexose soit le carbone C-2'. Si tel était le cas, il devrait y avoir sur le spectre proton un signal aux alentours de 5 ppm, sous forme d'un triplet. Celui-ci est bien visible avec une constante de couplage de 5 Hz au lieu de 9 et 10 Hz constatés pour les m/z 639-1 et 639-2. Pour valider cette hypothèse, il faudrait que ce proton corrèle avec celui du carbone C-3' sur le spectre COSY (vers 3,6 ppm). Or, cette information n'est pas visible sur le spectre. Il faudrait également que

le proton à 5 ppm corrèle en HMBC avec les carbones C-1' (vers 101 ppm) et C-3' (vers 75 ppm). Or, aucun signal n'est détectable sur le spectre. Ainsi, compte tenu de ces éléments manquants, il est impossible de déterminer la structure de façon certaine pour le composé m/z 639-3.

Afin de confirmer ou d'infirmer les hypothèses émises, une nouvelle purification devra être entreprise afin d'obtenir des quantités suffisantes en vue de son élucidation structurale.

## 2. Hydrolyse enzymatique des composés *m/z* 639-1 et 639-2

Dans leur publication, Maeda *et al.* ont considéré que les composés de m/z 639 qu'ils ont isolés étaient des précurseurs de la whisky-lactone, molécule volatile dont les propriétés olfactives ont été décrites dans la bibliographie générale de cette thèse. Afin d'étudier si les composés m/z 639-1 et 639-2 purifiés précédemment étaient de potentiels précurseurs de la whisky-lactone, leur hydrolyse enzymatique a été réalisée selon la méthodologie développée par Slaghenaufi *et al.* (Slaghenaufi *et al.* 2013). Les quantités du composé m/z 639-3 n'étaient pas suffisantes pour entreprendre cette réaction.

La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS) a été utilisée afin d'identifier et de doser la whisky-lactone (WL), composé volatil, potentiellement formée par l'hydrolyse enzymatique.

## a. Matériels et méthodes

## 1) Hydrolyse enzymatique des isomères m/z 639

Afin d'effectuer cette réaction chimique, la Rapidase® AR 2000 (DSM Food Specialties, Delft, Pays-Bas) a été utilisée. Il s'agit d'une préparation enzymatique pectolytique à activités secondaires glycosidases et dérivée d'*Aspergillus niger*.

Une quantité (0,2 mg) de chaque composé a été pesée précisément dans des piluliers distincts. Par la suite, chaque poudre a été dissoute dans 2 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium (pH 5,0 ; 10 mM) puis complétée avec 200  $\mu$ L d'une solution AR 2000 (70 mg/mL). Le mélange a été maintenu sous agitation pendant 24 h dans une étuve à 37 °C. Cette méthode a déjà été décrite dans la littérature et a été utilisée pour l'étude des précurseurs glycosidiques d'arôme (Sarry et Gunata 2004 ; Slaghenaufi *et al.* 2013).

# 2) Analyse en Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)

# Préparation des échantillons

La préparation des deux échantillons, en vue de l'analyse en GC-MS, a été réalisée de la façon suivante : 1 mL de la solution préparée précédemment a été prélevé à la fin des 24 h puis complété avec 1 mL de la solution tampon d'acétate de sodium, 10  $\mu$ L d'étalon interne (octan-3-ol à 11,75 mg/L) et 2 mL de dichlorométhane. L'extraction liquide-liquide est accélérée par agitation sous vortex pendant 1 min puis le mélange a été centrifugé pendant 5 min à 5000 rpm. Après séparation des deux phases, la phase aqueuse est jetée puis la phase organique est séchée avec du sulfate de sodium anhydre et concentrée sous flux d'azote jusqu'à atteindre un volume de 200  $\mu$ L environ.

### Préparation des solutions de calibration

Une solution mère de whisky-lactone (*cis* et *trans*) a été préparée à 540 mg/L dans le mélange réalisé pour la préparation des échantillons. Une gamme d'étalonnage a été ensuite réalisée par dilutions successives de cette solution mère afin d'atteindre les concentrations suivantes : 108, 54, 27, 13,5, 6,75, 3,38, 1,69, 0,84 et 0,42 mg/L. La quantification a été réalisée avec l'ajout d'un étalon interne à 11,75 mg/L (octan-3-ol). Une courbe de calibration quadratique, passant par l'origine, a été obtenue avec un bon coefficient de corrélation ( $\mathbb{R}^2 > 0,999$ ).

## Conditions chromatographiques

Les échantillons ainsi que la gamme d'étalonnage ont été injectés en GC-MS, selon les conditions décrites dans le **Tableau 62**. L'étalon interne ajouté est bien séparé des autres constituants, ce qui est nécessaire pour une bonne analyse.

Appareil	Agilent Technologies Intuvo 9000 GC System
Injecteur	240 °C
Mode	Splitless
Gaz vecteur	Hélium
Débit	1 mL/min
Colonne	DB-HeavyWax
Dimensions	30 m x 250 μm x 0,25 μm
Programme de température	45 °C pendant 1 min
	10 °C/min jusqu'à 230 °C maintenu pendant 15 min
Run	34,5 min
Détecteur	Spectrométrie de masse fonctionnant en impact électronique
	Energie d'ionisation : 70 eV
	Température : 230 °C
	Détection en mode SIM

Tableau 62 : Conditions chromatographiques utilisées pour les échantillons en GC-MS.

L'analyse a été réalisée en mode d'ions sélectionnés (SIM). La méthode consiste en la sélection d'un ion de quantification majoritaire et de deux ions de confirmation par molécule étudiée. Pour la WL, les ions ciblés étaient les m/z 99, 114 et 156.

### b. Résultats et discussion

L'hydrolyse enzymatique est une réaction chimique, catalysée par des enzymes du type hydrolase, au cours de laquelle intervient obligatoirement une molécule d'eau et qui aboutit à la scission d'un composé. Le produit AR 2000 possèdent plusieurs activités enzymatiques et notamment du type  $\beta$ -glucosidase (Sarry et Gunata 2004). Cette dernière joue un rôle clé dans la libération des composés aromatiques pour les précurseurs glycosidiques présents notamment dans les jus de fruits, les moûts ou encore les vins (Fan *et al.* 2011 ; Sestelo, Poza, et Villa 2004). En pratique, le produit utilisé transforme les précurseurs non aromatiques en composés aromatiques libres.

Les échantillons correspondant à l'hydrolyse enzymatique des composés m/z 639-1 et 639-2 ont été injectés en GC-MS. L'analyse a révélé la présence du *trans*- et du *cis-β*-méthyly-octalactone aux temps de rétention respectivement de 14,34 et 15,07 min (**Figure 52**). L'attribution des pics chromatographiques a été réalisée en comparant les données avec celles de la littérature (Pérez-Olivero *et al.* 2014). Ainsi, les résultats obtenus valident les hypothèses précédemment émises. Les composés purifiés m/z 639-1 et 639-2 sont bien des précurseurs de la whisky-lactone (WL).



**Figure 52 :** Chromatogrammes GC-MS correspondant au standard de la WL (à gauche) et à l'hydrolyse enzymatique du *m/z* 639-1 (au milieu) et du *m/z* 639-2 (à droite) ; *trans*-WL ( $t_R = 14,34 \text{ min}$ ) et *cis*-WL ( $t_R = 15,07 \text{ min}$ ).

La WL a alors été quantifiée dans ces deux échantillons afin d'établir le rendement de cette réaction chimique. Les teneurs pour le mélange *cis* et *trans* de la WL sont de 0,76 et 0,69 mg/L respectivement pour le m/z 639-1 et 639-2, ce qui correspond à des rendements de réaction de 3,16 et 2,88 %.

Lors d'une précédente étude, où la quantification du P-WL a été réalisée dans le bois de chêne, les auteurs ont démontré que cette molécule était le principal précurseur de la whisky lactone (E. Masson, Baumes, et Puech 2001). La libération de celle-ci se fait au cours de la maturation du bois, sous l'action de microorganismes (Wilkinson *et al.* 2004). Le même phénomène pourrait alors se produire pour les composés m/z 639-1 et 639-2. Par ailleurs, une concentration plus élevée a été observée pour la *cis*-WL que pour la *trans*-WL (**Figure 52**). Le ratio entre les deux composés a été calculé à partir des aires et correspond à 96,5 % pour la *cis*-WL et 3,5 % pour la *trans*-WL. La même tendance a été observée pour les deux échantillons. A la vue de ce résultat préliminaire, il est possible que, pour cette enzyme, les composés m/z 639-1 et 639-2 libèrent davantage de *cis*-WL que de *trans*-WL. D'autres études pourront être menées pour valider ces hypothèses.

#### C. Composés de la fraction BNC\_BuOH

#### 1. Identification du composé *m/z* 169-neg

Le composé m/z 169-neg présente un ion quasi-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> de m/z 169,0142, ce qui correspond à une formule brute de C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (avec une précision de 0,7 ppm par rapport à la valeur théorique). En comparant les données obtenues en LC-HRMS et ceux de la littérature, il est établi que ce composé est l'acide gallique (**Figure 53**). Le seul signal observé sur son spectre RMN <sup>1</sup>H (acetone- $d_6$ ) à 7,2 ppm, raisonnant pour deux protons, confirme son identification.



**Figure 53 :** Structure chimique de l'acide gallique (m/z 169-neg)

Ce composé très largement répandus dans le règne végétal, soit sous forme libre soit sous forme de dérivés estérifiés de catéchine ou de tannins hydrolysables. Ces molécules ont un intérêt particulier puisqu'elles possèdent des activités biologiques et pharmaceutiques diverses, telles que des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires ou encore des effets neuroprotecteurs (Korani *et al.* 2014 ; Kroes *et al.* 1992 ; Z. Lu *et al.* 2006). Il a déjà été identifié dans le bois de chêne, les vins et les spiritueux (Chamkha *et al.* 2003 ; Puech et Moutonnet 1992 ; Quinn et Singleton 1985 ; Seikel, Hostettler, et Niemann 1971 ; Viriot *et al.* 1993). Son goût a également été discuté dans la littérature. Il a été écrit comme astringent par Hufnagel et Hofmann (Hufnagel et Hofmann 2008) et ils ont établi son seuil de détection gustative dans de l'eau à 50 mg/L. D'autres auteurs ont jugé ce composé plus amer qu'astringent dans une solution modèle de vin (Robichaud et Noble 1990). Son goût amer a été reporté dans une autre publication de 2013 et l'auteur a calculé un nouveau seuil gustatif de détection à 34,02 mg/L dans de l'eau (Purwayanti 2013).

Au laboratoire, la dégustation réalisée avec les cinq experts a permis de juger ce composé amer avec une intensité de 3/5, confirmant les données de la littérature. Dans la suite de ce travail, la détermination du seuil gustatif de détection de ce composé dans les vins et les eaux-de-vie sera présentée, en vue d'évaluer son influence dans ces deux matrices.

#### 2. Identification du composé m/z 807

Le composé m/z 807 d'ion quasi-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> m/z 807,0702 possède une formule brute de C<sub>36</sub>H<sub>24</sub>O<sub>22</sub> (avec une précision de 1,9 ppm par rapport à la valeur théorique). Cette molécule contient 25 insaturations, ce qui suggère la présence de plusieurs cycles aromatiques. Après une fragmentation avec une énergie de collision de 40 eV, un ion de m/z 169,0134 (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup>) a été observé, ce qui correspond à l'acide gallique. L'ion m/z 300,9991 (C<sub>14</sub>H<sub>5</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup>) a également été constaté. Celui-ci pourrait correspondre à la présence d'un acide ellagique dans la molécule. Par ailleurs, le spectre de fragmentation a montré l'existence d'un ion m/z 505,0607 (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>O<sub>14</sub><sup>-</sup>), correspondant à la perte d'un groupement neutre C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub> par rapport à l'ion m/z807, ce qui pourrait coïncider avec un groupement hexahydroxydiphénoyle (HHDP). En comparant les fragments obtenus avec les données de la littérature, la molécule m/z 807 pourrait être un ellagitannin *C*-glycosidique (Jourdes *et al.* 2011).

L'interprétation des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (**ANNEXE 8**) et la comparaison avec la bibliographie a permis de confirmer cette hypothèse. Le spectre HMBC indique bien la présence de l'unité 4,6-hexahydroxydiphénoyle (HHDP) des ellagitannins *C*-glycosidiques. En outre, la corrélation HMBC d'un singulet aromatique à 6,96 ppm a révélé la présence d'un groupe 3,4,5-trihydroxybenzoyle (cycle B). Le composé m/z 807 a été identifié comme étant la Quercusnine A (**Figure 54**) par comparaison avec les déplacements chimiques publiés par Omar *et al.* pour cette molécule (Omar *et al.* 2014).



Figure 54 : Structure chimique de la Quercusnine A (m/z 807).

Par ailleurs, le pouvoir rotatoire spécifique du composé purifié a été mesuré à partir d'1 mg d'extrait, avec l'appareil et les conditions décrites en partie expérimentale générale. Celui-

ci a été établi à  $[\alpha]^{25} = -71,9$  (c = 0,1, MeOH), ce composé est ainsi essentiellement présent sous forme lévogyre. Dans la littérature, le pouvoir rotatoire spécifique de cette molécule a également été mesuré par Omar *et al.* et a été établi à  $[\alpha]^{20} = -75,8$  (c = 0,1, MeOH) (Omar *et al.* 2014). Les valeurs sont quasiment similaires, ce qui permet de confirmer une nouvelle fois qu'il s'agit de la même molécule et que la configuration absolue est identique à celle publiée.

Elle a été décrite pour la première fois en 2014 par Omar *et al.* et a été purifié à partir de l'aubier de *Quercus crispula* (Omar *et al.* 2014). A notre connaissance, ce composé n'a pas fait l'objet d'autres études pour le moment. Ainsi, il s'agit de sa première identification dans le bois de chêne sessile. Son goût sucré est également décrit pour la première fois. Dans la poursuite de ce travail, sa présence dans les vins et les eaux-de-vie sera étudiée. Sa purification en plus grande quantité serait nécessaire afin de préciser son seuil de détection gustative dans ces deux matrices. Elle n'a pu être réalisée dans le cadre de ce travail.

#### 3. Identification du composé *m/z* 783

Le composé m/z 783 présente un ion quasi-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> de m/z 783,0690, ce qui correspond à une formule brute de C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>O<sub>22</sub> (avec une précision de 1,6 ppm par rapport à la valeur théorique). Ce composé possède 23 insaturations. L'ion fragment m/z 481,0603 a été observé. Il représente une perte d'un groupement neutre C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub> par rapport à l'ion m/z 783, caractéristique du groupement hexahydroxydiphénoyle (HHDP). Les mêmes pertes de neutres que pour le composé m/z 807 ont été observées. Ainsi, il est fort probable que le composé m/z 783 soit également un ellagitannin (García-Villalba *et al.* 2017).

L'analyse de la fragmentation HCD de cette molécule et l'interprétation des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (**ANNEXE 9**) confirment cette hypothèse et établissent le m/z 783 comme étant la pédunculagine (**Figure 55**), par comparaison avec les données publiées par Tsujita *et al.* (Tsujita *et al.* 2017). En LC-HRMS, ce composé présente deux pics chromatographiques à deux temps de rétention différents. Cette observation a déjà été mentionnée dans la bibliographie et est caractéristique de cette molécule (García-Villalba *et al.* 2017 ; Rauha *et al.* 2001). En effet, les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du groupement glucose de la pédunculagine sont présents en même temps (Tsujita *et al.* 2017).



Figure 55 : Structure chimique de la Pédunculagine (m/z 783).

Par ailleurs, le pouvoir rotatoire spécifique du composé m/z 783 a été mesuré à partir de 0,5 mg d'extrait pur. Celui-ci a été établi à  $[\alpha]^{25} = +85,1$  (c = 0,5, MeOH), ce composé est ainsi essentiellement présent sous forme dextrogyre. Gao *et al.*, l'avait mesuré à  $[\alpha]^{26} = +78,8$  (c = 0,5, H<sub>2</sub>O + acétone) (Gao *et al.* 2010). Les résultats obtenus sont semblables à ceux de la littérature, ce qui permet de valider la structure de la pédunculagine et notamment sa configuration absolue.

La pédunculagine a été mise en évidence pour la première fois en 1965 par Schmidt *et al.* (Schmidt, Wuertele, et Harreus 1965). Ce composé a été identifié dans plusieurs espèces naturelles et plus précisément dans le bois de chêne pédonculé *Quercus robur* (Ito *et al.* 2002 ; Salminen *et al.* 2004 ; Scalbert, Monties, et Favre 1988) mais également dans le *Quercus crispula* (Omar *et al.* 2013) ou encore dans la vigne brésilienne *Myrciaria cauliflora* (Pereira *et al.* 2017). Il a également été découvert dans plusieurs boissons à base de grenade, jus et vin (Borges et Crozier 2012 ; Mena *et al.* 2014 ; Ordoudi *et al.* 2014). Sa dégustation, réalisée ici pour la première fois, a révélé un goût sucré. Dans la poursuite de ce travail, sa présence dans les vins et les eaux-de-vie sera étudiée.

#### 4. Identification du composé *m/z* 539

Le composé m/z 539 d'ion quasi-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> de m/z 539,1411 possède une formule brute de C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub> (avec une précision de 2,2 ppm par rapport à la valeur théorique). Son spectre HRMS en ionisation négative avec fragmentation HCD présente un fragment majoritaire de m/z 509,1304. Ce dernier correspond à une perte de neutre de 30,0107, caractéristique d'un groupement méthoxy (CH<sub>2</sub>O). De même, l'ion négatif m/z 479,1197, de
formule brute  $C_{22}H_{23}O_{12}$  correspond à une perte de CH<sub>2</sub>O vis-à-vis de l'ion *m/z* 509,1304, suggérant la présence d'un deuxième groupement méthoxy dans la molécule. Par ailleurs, l'ion *m/z* 313,0567, correspondant à une perte de neutre de 226,0844 ( $C_{11}H_{14}O_5$ ) par rapport à l'ion quasi-moléculaire, est caractéristique d'un groupement hexose-gallate. La présence de l'ion *m/z* 169,0125, caractéristique de l'acide gallique, tend à confirmer la précédente observation. Le spectre HRMS du composé *m/z* 539 est présenté à la **Figure 56**.



Figure 56 : Spectre HRMS correspondant au composé m/z 539.

A notre connaissance, aucun composé possédant cette formule brute n'a été décrit dans le genre *Quercus*. Les spectres mono-dimensionnels (<sup>1</sup>H) et bi-dimensionnels (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC) ont été réalisés dans les conditions décrites dans la **partie expérimentale générale II. B. 2. b.** Les données ont été traitées puis comparées avec celles de la littérature. Les spectres RMN expérimentaux obtenus pour le composé m/z 539 n'étaient pas suffisamment lisibles pour être interprétables sans ambiguïté, en particulier pour les expériences 2D. Le problème vient probablement de la faible quantité disponible de produit pur ou que le solvant utilisé n'était pas adéquat pour avoir une bonne interprétation des spectres. Néanmoins, plusieurs signaux ont pu être enregistrés. A priori, aucune correspondance n'a été trouvée entre les données RMN <sup>1</sup>H expérimentales et celles de la littérature pour des composés de même formule brute (**ANNEXE 10**). En dépit d'une absence vraisemblable de certains signaux, le raisonnement visant à interpréter la structure du composé m/z 539 est développé cidessous. Tout d'abord, l'utilisation de la LC-HRMS a permis de nous renseigner sur la composition de la molécule ; elle contient 11 insaturations et comporte probablement deux groupements méthoxy ainsi qu'un gallate et un hexose, liés l'un à l'autre. Les déplacements chimiques associés à ce dernier groupement ont été recherchés sur le spectre proton.

#### Identification du groupement hexose-gallate

Un singulet intégrant pour 2 protons à  $\delta$  7,1 ppm et portés par deux <sup>13</sup>C de  $\delta$  108,7 ppm en HSQC, est caractéristique de deux C-H équivalents et inclus dans un cycle aromatique. Le spectre HMBC montre des corrélations avec des carbones à 120,1, 138,4 et 145,5 ppm, observables dans la zone des aromatiques. Les déplacements chimiques de ces deux derniers signaux suggèrent la présence de phénols. En outre, le proton à  $\delta$  7,1 ppm corrèle avec un carbone à 166,7 ppm, associé généralement à la présence d'un groupement carboxyle estérifié. Ces signaux sont caractéristiques d'un groupe galloyle. Ainsi, ces résultats sont cohérents avec les hypothèses émises suite à la fragmentation en spectrométrie de masse.

Un proton, sous forme de doublet à  $\delta$  4,66 ppm (J = 7,8 Hz), est porté par un carbone à 98,3 ppm. Ce signal est caractéristique d'un proton anomérique. Le spectre COSY montre que 6 protons sont situés dans le même système de spin que cet anomère, à  $\delta$  4,62 et  $\delta$  4,42 ppm,  $\delta$  $3,55, \delta 3,66, \delta 3,77$  et  $\delta 3,20$  ppm ; le spectre HSQC permet de voir que ces protons sont portés respectivement par des carbones à  $\delta$  62,9, 70,6, 73,5, 75,9 et 79,1 ppm. Ces signaux montrent que le composé m/z 539 contient un groupement hexose. La <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY permet ensuite d'assigner chaque proton, de proche en proche : le proton anomérique (H-1') corrèle avec le proton H-2' résonnant sous forme de triplet à 3,20 ppm (t, 8,7 Hz). Il est couplé au proton H-3' résonnant à 3,66 ppm sous forme de multiplet. Ce dernier est corrélé avec le H-4' qui résonne à 3,55 ppm sous forme d'un triplet (t, 9,6 Hz). Puis, celui-ci est couplé avec le H-5' résonnant à 3,77 ppm sous forme de multiplet. Les protons H-6' du méthylène apparaissent sous forme de doublet de doublets à 4,42 ppm (dd, 12,0 ; 5,5 Hz) et à 4,62 ppm (dd, 12,3 ; 2,5 Hz). Les constantes de couplage associées aux protons H-2' et H-4' sont élevées et caractérisent une configuration trans diaxiale. La multiplicité des signaux H-3' et H-5' ne peut être déterminée car ils apparaissent sous la forme de multiplets. En revanche, le spectre ROESY ne montre aucune corrélation de ces protons avec respectivement H-2' ou H-4', et H-4' ; ils sont donc vraisemblablement en position axiale. Le groupement hexose est donc un glucopyranose.

Par ailleurs, l'anomère H-1' possède une constante de couplage élevée (7,8 Hz), ce qui caractérise une configuration  $\beta$ . La configuration absolue (D ou L) de l'hexose ne peut être déterminée sur la base des spectres RMN.

L'analyse du spectre HMBC permet de connaître la position du gallate sur l'hexose. En effet, une corrélation entre le carbone C-7 du gallate (166,7 ppm) et les H-6' (4,42 et 4,62 ppm) du méthylène a été observée, ce qui suggère la structure présentée à la **Figure 57** pour ce groupement.

Les valeurs des déplacements chimiques obtenus pour ce groupement sont reportées dans le **Tableau 63** et à l'**ANNEXE 10**.

	Numéro de l'atome	$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité (J en Hz)	$\delta^{13}$ C (en ppm)
	1	/	120,1
	2	7,1 s	108,7
	3	/	145,5
Gallate	4	/	138,4
	5	/	145,5
	6	7,1 s	108,7
	7	/	166,7
	1'	4,66 d (7,8)	98,3
	2'	3,20 t (8,7)	79,1
	3'	3,66 m	73,5
Hexose	4'	3,55 t (9,6)	70,6
	5'	3,77 m	75,9
	6'	4,62 dd (12,3 ; 2,5) 4,42 dd (12 ; 5,5)	62,9

**Tableau 63 :** Données RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du groupement hexose-gallate du composé m/z 539.



Figure 57 : Structure du groupement hexose-gallate présent dans la molécule m/z 539.

### Identification du groupement correspondant à la perte de neutre $C_{11}H_{14}O_5$

L'autre partie de la molécule correspond à un groupement de formule brute  $C_{11}H_{14}O_5$ . Il possède donc cinq insaturations. Le spectre RMN présente des signaux dus à des impuretés, ce qui complique l'élucidation structurale de la molécule. Néanmoins, après l'identification du groupement hexose-gallate, il reste au moins sept signaux du spectre proton qui n'ont pas été attribués.

Un proton, résonnant à 3,81 ppm, apparait sous la forme d'un multiplet. Il est fixé à un carbone résonnant à 81,2 ppm ; celui-ci doit probablement porter un hydroxyle. La COSY a montré que ce proton était corrélé avec un proton à 4,48 ppm et deux autres à 3,39 et 3,47 ppm.

Un proton, résonnant à 3,39 ppm, apparait sous la forme d'un multiplet qui est couplé avec un proton, résonnant à 3,47 ppm, et qui apparait également sous la forme d'un multiplet ; il s'agit probablement d'un méthylène. Le spectre HMBC montre qu'ils sont portés par un carbone à 60,7 ppm. La COSY montre qu'ils sont corrélés avec le proton à 3,81 ppm.

Un proton, résonnant à 6,71 ppm, et un autre proton, résonnant à 6,51 ppm, apparaissent chacun sous la forme d'un singulet. Le spectre HSQC montre qu'ils sont portés respectivement par un carbone à 106,3 ppm et à 104,9 ppm. Ils sont situés tous les deux dans la zone des aromatiques. Ainsi, le groupement est possiblement composé d'un cycle aromatique où les protons n'ont pas le même environnement chimique. Le spectre HMBC montre que ces protons sont corrélés avec deux carbones de  $\delta$  147,8 ppm. En outre, le proton à 6,71 ppm est corrélé avec un carbone de  $\delta$  127,9 ppm et le proton à 6,51 ppm à un carbone de  $\delta$  124,5 ppm. Ces déplacements chimiques correspondent à la zone des aromatiques. En outre, le spectre ROESY a permis de montrer des corrélations entre le proton à  $\delta$  6,71 ppm et ceux à 4,48 ppm et à 3,85 ppm. En revanche, aucune corrélation en COSY et en ROESY n'a pu être observée pour le proton à 6,51 ppm.

Un proton, résonnant à 4,48 ppm, apparait sous la forme d'un doublet de doublets, avec une constante de couplage de 9,8 et 5,6 Hz. Il est porté par un carbone à 78,3 ppm. La COSY a montré que le proton à  $\delta_H$  4,48 ppm est couplé avec celui à 3,81 ppm. Par ailleurs, la HMBC a donné des informations sur les possibles corrélations entre les carbones. Cinq signaux ont été observés à 4,48 ppm. Ainsi, ce proton corrèle avec un carbone résonnant à 81,2 ppm et qui porte le proton à 3,81 ppm, caractéristique d'un carbone portant un hydroxyle. Cette observation valide le résultat de la COSY. Il corrèle également avec un carbone, résonnant à 60,7 ppm, qui porte les deux protons à 3,39 et 3,47 ppm ; un carbone résonnant à 104,9 ppm et qui porte le proton à 6,71 ppm ; un carbone résonnant à 127,9 ppm et qui correspond à l'un des carbones corrélés avec le proton à 6,71 ppm. Enfin ce proton à 4,48 ppm corrèle avec un carbone, résonnant à 79,1 ppm, et qui porte le proton H-2' de l'hexose résonnant sous forme de triplet à 3,20 ppm (t, 8,7 Hz). Ce signal est plus faible en intensité sur le spectre HMBC que les 4 précédents mais il est visible. Le spectre ROESY permet également de voir des corrélations entre le proton à 4,48 ppm et le proton à 3,20 ppm correspondant au H-2' de l'hexose (**Figure 58**). Il est ainsi possible que le deuxième groupement de la molécule m/z 539 soit fixé sur l'alcool du C-2'.



**Figure 58 :** Détail du spectre ROESY. Les corrélations présentées permettent de déterminer la position du deuxième fragment (<sup>1</sup>H à 4,48 ppm) sur l'hexose (H-2').

Six protons, résonnant à 3,85 ppm, apparaissent sous forme de singulets et sont portés par au moins un carbone à 55,4 ppm. Le spectre HMBC montre que ce signal <sup>1</sup>H corrèle avec un carbone situé dans la zone des aromatiques à 147,8 ppm. Pour ce dernier déplacement chimique, une seule tâche est visible sur le spectre HMBC et est caractéristique d'un carbone d'un cycle aromatique portant un groupement méthoxy. Or, il resterait encore 3 protons à assigner. Lors de la fragmentation en LC-HRMS, deux méthoxy semblaient être présents dans la molécule m/z 539. Si tel est le cas, il devrait y avoir deux tâches aux alentours de  $\delta_C$  147 ppm en HMBC. Il est donc possible que celles-ci soient superposées, soit à cause d'un problème de solvant soit à cause d'un manque de sensibilité. Les déplacements chimiques pourraient alors suggérer la présence de deux groupements méthoxy sur un cycle aromatique. Le spectre

ROESY montre une corrélation entre le signal à 3,85 ppm et celui à 6,71 ppm, appartenant au proton du cycle aromatique.

En résumé, avec ces éléments, le nombre d'insaturations de ce fragment doit être de 5 puisque celui de l'hexose-gallate en comptabilise déjà 6. Les protons, résonnant à 6,71 et 6,51 ppm, appartiennent à un cycle aromatique (nombre d'insaturations : 4). Il est donc possible que ce fragment contienne un deuxième cycle. En outre, ce fragment semble se fixer sur l'oxygène du C-2' de l'hexose. Puis, un enchaînement de 5 carbones est visible.

Sur ces bases, une hypothèse de structure pourrait être proposée pour ce fragment (**Figure 59** et **Tableau 64**). Pour confirmer celle-ci, il faudrait tout d'abord vérifier la position des méthoxy, comme expliqué précédemment. En outre, il faudrait également la présence d'une tache de corrélation en ROESY entre le proton à 6,51 ppm et les protons du groupement méthoxy. Par ailleurs, sur le spectre HMBC, des taches de corrélations supplémentaires apparaissent pour les protons à 6,51 et 6,71 ppm à  $\delta_C$  134, 137 et 44 ppm, liés certainement à un manque de sensibilité. Afin de valider cette hypothèse de structure, une nouvelle purification du composé m/z 539 devra être entreprise. Un autre solvant que le methanol- $d_4$  pourra également permettre une meilleure résolution des signaux.



**Figure 59 :** Structure hypothétique du groupement  $C_{11}H_{14}O_5$  du composé *m/z* 539.

	Numéro de l'atome	$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité (J en Hz)	$\delta^{13}$ C (en ppm)
	1"	4,48 dd (9,8 ; 5,6)	78,3
	2"	/	127,9
	3"	6,71 s	104,9
	4"	/	147,8
	5"	/	147,8
CULLO	6"	6,51 s	106,3
C11H14O5	7"	/	124,5
	8"	3,39 m 3,47 m	60,7
	9"	3,81 m	81,2
	10"	3,85 s	55,4
	11"	3,85 s	55,4

**Tableau 64 :** Valeurs hypothétiques attribuées aux protons et aux carbones du groupement  $C_{11}H_{14}O_5$  du composé *m/z* 539.

Une hypothèse de structure du composé m/z 539 est présentée ci-dessous. Celle-ci a été réalisée à partir des possibles corrélations COSY et HMBC observées (**ANNEXE 10**) et décrites précédemment (**Figure 60**).



Figure 60 : Hypothèse de structure pour le composé m/z 539.

Par ailleurs, le pouvoir rotatoire spécifique du composé m/z 539 a été mesuré à partir de 0,5 mg d'extrait pur. Celui-ci a été établi à  $[\alpha]^{25} = +4,3$  (c = 0,5, MeOH), ce qui pourrait suggérer un léger excès de la forme dextrogyre. Cependant, avec l'erreur de précision de la mesure et les valeurs obtenues, ce composé serait optiquement inactif.

A notre connaissance, une telle structure n'a jamais été identifiée dans la littérature. Il pourrait s'agir de sa première identification dans le bois de chêne. Son goût n'a *a priori* pas encore été décrit. Sa présence dans les vins et les eaux-de-vie sera étudiée dans la poursuite de l'étude.

#### Conclusion Chapitre IV

L'objectif de ce chapitre était de caractériser, au niveau sensoriel puis structural, les composés purifiés à partir des différents extraits de bois de chêne. Parmi les onze molécules isolées, six ont été perçues avec un goût sucré après leur ajout dans un vin blanc, trois avec un goût amer et deux avec une sensation d'astringence. Le syringaldéhyde, le sinapaldéhyde, l'acide vanillique, l'acide gallique, la pédunculagine et la quercusnine A avait déjà été identifiés dans le genre *Quercus*. En revanche, le goût sucré de trois de ces molécules (syringaldéhyde, pédunculagine et quercusnine A) n'avait jamais été décrit. La configuration relative des composés m/z 641, 639-1 et 639-2, correspondant respectivement à l'HDPP-syringarésinol et à deux précurseurs de la whisky-lactone, a été décrite ici pour la première fois. Il s'agit également de leur première identification dans le bois de chêne. Le goût sucré du m/z 641 et 639-1 et l'amertume du m/z 639-2 ont également été établis pour la première fois.

Des hypothèses de structure ont été proposées pour les composés m/z 639-3 et 539. D'autres études permettront de vérifier les conjectures formulées. Si elles étaient avérées, il s'agirait à notre connaissance de leur première identification dans le bois. Il en va de même pour leur goût qui n'a *a priori* pas encore été décrit.

#### CHAPITRE V. EXPLORATION DE NOUVELLES APPROCHES POUR LA RECHERCHE DE COMPOSÉS SAPIDES DES VINS ET DES EAUX-DE-VIE

#### Introduction

La stratégie de purification guidée par le goût a permis de sélectionner les fractions les plus actives, qui étaient alors conservées pour la suite de la purification. Le succès de cette approche inductive repose sur le choix de l'extrait brut, la fiabilité du test gustatif mais également sur l'accès à différentes techniques analytiques. Néanmoins, afin d'améliorer la recherche de composés sapides, de nouvelles méthodologies pourraient être utilisées. L'objectif de ce chapitre est de proposer des techniques complémentaires, à titre exploratoire.

Dans un premier temps, pour tenter de pallier les phénomènes de masquage intervenant lors de la dégustation, un criblage des fractions par mesure de l'activation des récepteurs gustatifs a été mis en place. Dans un deuxième temps, l'application d'une analyse différentielle non-ciblée par LC-HRMS à des extraits de bois de chêne a été proposée.

#### I. Criblage des fractions par mesure de l'activation de récepteurs gustatifs

Le développement d'une méthode de criblage des fractions par mesure de l'activation de récepteurs gustatifs apparait complémentaire à la gustatométrie utilisée au Chapitre III de cette partie. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Docteur Loïc Briand (DR INRA, CSGA Dijon), spécialisée dans les mécanismes moléculaires associés à la perception des composés sapides.

#### A. Principe

Cette équipe utilise des cellules qui expriment les récepteurs aux goûts sucré (Tas1R2/Tas1R3), umami (TasR1) et amer (Tas2R) (Behrens *et al.* 2018 ; Belloir *et al.* 2017 ; Maîtrepierre *et al.* 2012). L'activation de ces récepteurs peut être mesurée par imagerie calcique (Koizumi *et al.* 2011 ; Poirier *et al.* 2012). En effet, le calcium est impliqué dans plusieurs processus physiologiques mais également dans la signalisation intracellulaire.

Dans le cadre de cette collaboration, une stratégie visant à la recherche de composés amers a été adoptée. L'Homme perçoit l'amertume grâce à 25 récepteurs, dont les plasmides ont été fournis par l'équipe du Professeur Wolfgang Meyerhof (Université de Postdam) au laboratoire du Docteur Loïc Briand. L'approche originale mise en place consiste à coupler la démarche de séparation inductive, guidée classiquement par la gustatométrie, à la mesure de l'activation des récepteurs à l'amertume. Ainsi, à l'issue de chaque étape de fractionnement, les extraits obtenus ont été mis au contact des cellules exprimant les récepteurs Tas2R (**Figure 61**).



**Figure 61 :** Stratégies de détection pour la sélection des fractions, par gustatométrie et par mesure de l'activation des récepteurs à l'amertume.

L'inconvénient majeur de cette méthode est sa mise en œuvre puisqu'elle nécessite des quantités plus importantes, après le fractionnement. En revanche, elle apparait plus fiable et s'affranchit des disparités de sensibilité, importantes pour l'amertume (Campbell *et al.* 2014 ; Kim *et al.* 2003 ; Roudnitzky *et al.* 2016). Ce type de détection éviterait des phénomènes de masquage susceptibles d'atténuer la perception de certains composés amers par gustatométrie. A la fin du protocole, la nature chimique des composés présents dans les fractions pourra être identifiée (Soares *et al.* 2013). Enfin, cette approche permettra une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques associés à la perception de l'amertume.

#### **B.** Application à des extraits de bois de chêne

L'approche développée a été appliquée aux extraits de bois de chêne sessile du Chapitre III de cette deuxième partie. Le travail présenté ici correspond à des résultats préliminaires.

#### 1. Matériels et méthodes

#### a. Fractionnement guidé par la dégustation

#### 1) Extraction solide-liquide

De nouvelles macérations ont été réalisées sur des extraits de bois de chêne sessile, pour les trois modalités de chauffe (BNC, BCN et BCF) et selon la méthode décrite au **Chapitre III. II. B.** de cette partie. En revanche, au lieu de concentrer les filtrats obtenus, ceux-ci ont été évaporés à sec puis lyophilisés. Des poudres homogènes ont été pesées, puis 100 mg de chaque modalité ont été envoyés au laboratoire de Dijon.

#### 2) Extraction liquide-liquide et CPC

Les fractions MtBE, AcOEt, BuOH et phase Aqueuse du BNC ont également été sélectionnées pour cette étude. Le protocole pour les extractions liquide-liquide a été décrit au **Chapitre III. II. C.** de cette partie. Ainsi, 100 mg de chaque extrait ont été envoyés au laboratoire de Dijon.

Les six extraits correspondant au fractionnement par CPC du BNC\_BuOH, décrit au **Chapitre III. V. A** de cette partie, ont également été étudiés. Puisque le fractionnement demande des quantités importantes, seulement 10 mg de ces fractions ont été envoyés.

#### b. Mesure de l'activité fonctionnelle des récepteurs à l'amertume

Les mesures de l'activation des récepteurs à l'amertume au contact des extraits de bois de chêne ont été réalisées par Christine Belloir au sein de l'équipe du Dr Loïc Briand (CSGA, Dijon).

Afin de pouvoir mesurer l'activation de ces récepteurs, deux étapes préliminaires ont été nécessaires. Un ensemencement, d'une durée de 24 h, sur des lignées de cellules HEK293 transfectées avec la protéine Gα16-gus44 (gustducine) a d'abord été effectué. Puis la transfection, soit l'introduction d'un plasmide hTas2R dans une cellule hôte, a été réalisée et favorisée par un réactif de transfection commun, le lipofectamine 2000<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific). Par la suite, les cellules ont été chargées avec une sonde fluorescente, Fluo-4-AM, sensible au calcium. Cette sonde de synthèse sert à mesurer la libération calcique intracellulaire dépendante de l'activation des protéines hétérotrimériques de type G (Chambers *et al.* 2003 ; Gee *et al.* 2000). Un lavage des cellules a ensuite été réalisé afin d'éliminer les sondes encore présentes dans le milieu extracellulaire.

Les extraits de bois de chêne ont été ajoutés au contact des cellules à des concentrations croissantes : de 0,1 à 10 mg/mL pour l'extrait brut du chêne sessile, de 0,0003 à 1 mg/mL pour les extraits BNC, BCN et BCF, de 0,0033 à 3,3 mg/mL pour les extraits MtBE, AcOEt, BuOH et phase aqueuse du BNC, et de 0,001 à 1 mg/mL pour le premier fractionnement par CPC de l'extrait BNC\_BuOH. La lecture des plaques a ensuite été réalisée avec un lecteur de type Flexstation® (Molecular Devices, Etats-Unis). Toutes les mesures ont été réalisées en duplicat.

Quand la sonde est excitée avec une source lumineuse, à 488 nm, centrée sur son pic d'absorption, alors l'émission de photons par le fluorophore dépend principalement de la présence de calcium dans le milieu. Par conséquent, la réponse à l'activation, générant un flux de calcium, peut être suivie par fluorescence ( $\Delta F/F0$ ).

Afin d'analyser la capacité des fractions à activer les récepteurs de l'amertume, une relation dose-réponse a été mise en place, ce qui a permis le calcul de la concentration efficace médiane ( $EC_{50}$ ). Il s'agit de la concentration en un composé induisant une réponse correspondant à 50 % de la réponse maximale. Elle traduit ainsi la puissance, gustative en l'occurrence, d'une substance. Plus la valeur obtenue est faible, plus la puissance de la substance est grande.

#### 2. Résultats et discussion

#### a. Test de l'activation des Tas2Rs par un extrait de chêne sessile

Le premier test a tout d'abord été réalisé sur un macérat brut de bois de chêne. L'origine botanique sélectionnée pour cette étude est le *Quercus petraea* (chêne sessile), pour rester dans des conditions similaires au fractionnement.

Des solutions de macérat de concentrations croissantes ont été ajoutées aux cellules exprimant les 25 récepteurs de l'amertume. L'activation consécutive à cette stimulation a été mesurée. Les résultats sont représentés à la **Figure 62**. Les réponses ont été comparées avec un puits témoin, c'est-à-dire un puits sans ajout d'extrait.



**Figure 62 :** Représentation de l'activation des 25 récepteurs à l'amertume en fonction des concentrations croissantes en extrait brut de bois de chêne sessile.

Pour la moitié des récepteurs à l'amertume, un signal d'activation a été mesuré, mais certains sont trop faibles pour être significatifs. Cette activation par l'extrait brut du bois de chêne sessile est en accord avec les résultats de la gustatométrie. La réponse la plus forte en amplitude est celle du Tas2R7, suivie du Tas2R4, Tas2R16, Tas2R38 et du Tas2R43. Pour le récepteur Tas2R7, la fluorescence augmente avec la concentration puis diminue à partir de 3 mg/mL. En effet, à trop forte concentration, l'environnement pourrait devenir toxique pour les cellules, ce qui entraînerait une baisse de la réponse des récepteurs.

L'extrait de bois de chêne n'active presque pas les récepteurs Tas2R10, Tas2R14 et Tas2R46. Ces récepteurs ont pourtant été décrits comme ayant un spectre large, c'est-à-dire qu'ils sont capables de détecter plusieurs composés amers (Born *et al.* 2013 ; Behrens *et al.* 2004 ; Brockhoff *et al.* 2007). Au contraire, les récepteurs Tas2R7 et Tas2R4 ont un spectre plus spécialisé, c'est-à-dire qu'ils sont capables de ne détecter que quelques composés amers, comme la caféine pour le Tas2R7 ou l'amarogentine pour le Tas2R4 (Meyerhof *et al.* 2010). Ainsi, ces récepteurs n'activent pas les mêmes familles de molécules chimiques.

La poursuite de l'étude a été focalisée uniquement sur le récepteur pour lequel l'amplitude était la plus intense, soit le Tas2R7. Il sera toutefois intéressant de réaliser le même protocole sur le Tas2R4. Celui-ci a été décrit dans la littérature pour son activation par des molécules de la famille des flavonoïdes, comme l'épicatéchine ou l'épicatéchine gallate (Soares *et al.* 2013 ; 2018), mais également des acides aminés (Kohl *et al.* 2013). Il pourrait donc être activé par des composés différents de ceux interagissant avec le Tas2R7.

#### b. Test de l'activation du Tas2R7 par les extraits BNC, BCN et BCF

Le même protocole a été réalisé à partir des extraits BNC, BCN et BCF du chêne sessile. Des solutions de concentrations croissantes en ces extraits ont été ajoutées aux cellules, puis l'activation du récepteur Tas2R7 a été mesurée. Les résultats sont présentés à la **Figure 63**.





Le « vecteur vide » présent sur le graphique correspond à des cellules sans récepteurs. Ces témoins permettent de vérifier que les trois extraits n'induisent pas de fluorescence à 488 nm lorsqu'ils sont mis au contact des cellules.

Pour les trois extraits, le récepteurs Tas2R7 a été activé. Néanmoins, une meilleure réponse en amplitude a été observée pour le BNC avec une  $EC_{50}$  égale à 3,04 ± 0,65 µg/mL. A l'inverse, la réponse du BCF est deux fois moins puissante que celle du BNC, avec une  $EC_{50}$  égale à 7,36 ± 1,52 µg/mL. Ces résultats sont en accord avec ceux de la dégustation

précédemment réalisée. En outre, ils valident les observations empiriques des tonneliers et démontrent que le bois « non chauffé » apporte davantage d'amertume que le bois « chauffe forte ». Cette diminution de la perception amère en lien avec la chauffe pouvait s'expliquer par la dégradation de composés amers du bois et/ou la formation de composés sucrés. L'utilisation de cette technique, insensible aux interactions perceptives comme les effets de masquage, permet de démontrer qu'il se produit, à tout le moins, une disparition partielle de composés amers présents dans le bois non-chauffé. Afin de préciser leur nature, le fractionnement suivi par test cellulaire a ensuite impliqué des extractions liquide-liquide.

# c. Test de l'activation du Tas2R7 par les extraits MtBE, AcOEt, BuOH et phase aqueuse du BNC

Le protocole décrit précédemment a été réalisé sur les extraits MtBE, AcOEt, BuOH et phase aqueuse du BNC. Des solutions de concentrations croissantes en ces extraits ont été ajoutées aux cellules puis l'activation du récepteur Tas2R7 a été mesurée. Les résultats sont présentés à la **Figure 64**.



**Figure 64 :** Réponse du récepteur Tas2R7 aux extraits MtBE, AcOEt, BuOH et phase aqueuse du BNC. n.d = non déterminé.

Le « vecteur vide » présent sur le graphique correspond à des cellules sans récepteurs. Le signal de fluorescence associé à l'extrait MtBE du BNC apparait nul, indistinct du témoin négatif. L'extrait AcOEt active légèrement le récepteur Tas2R7, suivi par l'extrait BuOH du BNC, avec une EC<sub>50</sub> égale à 44,8  $\pm$  2,9 µg/mL. La meilleure réponse enregistrée est pour la phase aqueuse  $EC_{50}$  égale à 10,4 ± 0,6 µg/mL, soit quatre fois supérieur à l'extrait BuOH. La variation en fluorescence observée suggère que la composition en molécules amères est différente d'un extrait à l'autre. En outre, l' $EC_{50}$  de la phase aqueuse est proche de la valeur initiale du BNC (3 µg/mL). Ainsi, il est possible que les composés amers activés pour le BNC se retrouvent en grande partie dans sa phase aqueuse.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de la dégustation. En effet, le manque de signal du Tas2R7 par l'extrait MtBE corrobore les résultats de la dégustation où celui-ci avait été décrit comme sucré. La fraction AcOEt avait également été jugée sucrée. Il est possible que par des effets de masquage, les dégustateurs n'aient pas pu distinguer la légère amertume de cet extrait. Les phases BuOH et aqueuse avaient été décrites amères mais de façon différentes. La phase aqueuse était notamment perçue plus astringente qu'amère. La comparaison des données entre gustatométrie et mesure de l'activation est résumée dans le **Tableau 65**.

**Tableau 65 :** Comparaison entre les données obtenues par la dégustation et celles de l'activation

 du Tas2R7 pour les extraits pré-purifiés du BNC.

Extraits pré-purifiés BNC	Goût	Récepteur Tas2R7
Phase MtBE	Sucré : 2/5	n.d.
Phase AcOEt	Sucré : 1/5	$187\pm363~\mu\text{g/mL}$
Phase BuOH	Sucré : 2/5 Amer : 3/5	<b>44,8</b> $\pm$ 2,9 µg/mL
Phase Aqueuse	<b>Amer : 2/5</b> Astringent : 4/5	$\textbf{10,4} \pm 0,6 \; \mu\text{g/mL}$

n.d. : non déterminé.

Pour la poursuite de ce travail, il aurait été intéressant de continuer cette approche sur l'extrait phase aqueuse du BNC. Malheureusement, le fractionnement guidé par gustatométrie n'a pas encore été réalisé sur cette fraction. Par ailleurs, la plupart des composés présents dans celle-ci sont des polyphénols, tels que les ellagitannins. Une récente étude de Soares *et al.*, a montré que les principaux tannins hydrolysables activent le récepteur à l'amertume Tas2R7 (Soares *et al.* 2018). Ainsi, il est possible que l'amertume perçue pour la phase aqueuse provienne de ces composés. D'autres études devront être menées pour valider cette hypothèse.

Le fractionnement de l'extrait BNC\_BuOH a ensuite été réalisé par CPC.

# d. Test de l'activation du Tas2R7 par les fractions obtenues après CPC de l'extrait BNC\_BuOH

Le protocole décrit précédemment a été appliqué aux six fractions (F1 à F6) de l'extrait BNC\_BuOH. Des solutions de concentrations croissantes en ces extraits ont été ajoutées aux cellules puis l'activation du récepteur Tas2R7 a été mesurée. Les résultats sont présentés à la **Figure 65**.



**Figure 65 :** Réponse du récepteur Tas2R7 aux fractions F1 à F6 de l'extrait BNC\_BuOH. n.d = non déterminé.

La première fraction F1 du BNC\_BuOH n'émet pas de signal, ce qui suggère qu'elle n'est pas active vis-à-vis du récepteur Tas2R7. La fraction F2 présente le plus faible EC<sub>50</sub> des autres fractions. La BNC\_BuOH\_F6 est celle qui a la meilleure réponse en amplitude avec un EC<sub>50</sub> égale à  $28 \pm 7 \mu g/mL$ , suivie de la fraction F4 puis F5 et F3. La variation en fluorescence observée entre les fractions F4, F5 et F6 suggère que la composition en molécules amères diffère de l'une à l'autre ou qu'il s'agit des mêmes molécules mais à des concentrations différentes.

La comparaison de ces résultats avec ceux de la dégustation révèle des différences. La fraction BNC\_BuOH avait été jugée amère mais également sucrée. Après sa séparation en CPC, une partition de ces saveurs avait été observée entre les différentes fractions qui en résultaient, mais avec une dominante de la sensation sucrée. La mesure de l'activation de ces fractions suggère le contraire, puisqu'elles activent toutes, à l'exception de F1, le récepteur Tas2R7. Il est possible que des phénomènes de masquage soient plus marqués pour ces fractions. La

dégustation avait toutefois permis de distinguer une fraction amère, la BNC\_BuOH\_F5, ce qui est en accord avec la réponse positive du récepteur à son contact.

Les données obtenues par gustatométrie et par mesure de l'activation sont comparées dans le **Tableau 66**.

**Tableau 66 :** Comparaison entre les données obtenues par la dégustation et celles de l'activation

 du Tas2R7 pour les extraits BNC\_BuOH.

Fraction	Goût	Récepteur Tas2R7
BNC_BuOH_F1	/	n.d.
BNC_BuOH_F2	Sucré : 1/5 Amer : 2/5	$89\pm14~\mu g/mL$
BNC_BuOH_F3	Sucré : 3/5	$28\pm26~\mu\text{g/mL}$
BNC_BuOH_F4	Sucré : 2/5	$38\pm9~\mu g/mL$
BNC_BuOH_F5	Amertume : 3/5	$35\pm7~\mu g/mL$
BNC_BuOH_F6	Sucré : 3/5	$28\pm7~\mu\text{g/mL}$

/ : aucun goût n'a été perçu ; n.d. : non déterminé.

Pour la poursuite du protocole, il serait intéressant de cribler les fractions F1 à F4, obtenues après CPC de l'extrait BNC\_BuOH\_F6, en mesurant l'activation du récepteur Tas2R7 à leur contact. En effet, la dégustation avait révélé parmi elles trois fractions amères, dont deux avec une forte intensité (voir **chapitre III V. B de la partie II**).

L'activation des récepteurs Tas2R pourrait également être mesurée pour les molécules amères purifiées au cours du fractionnement guidé par la gustatométrie, telles que l'acide gallique ou le composé m/z 539. Cette manipulation permettrait de renforcer les résultats obtenus lors de la dégustation, et de préciser le récepteur impliqué.

La stratégie de détection mise en place pour la sélection des fractions, c'est-à-dire par gustatométrie et par mesure de l'activation des récepteurs à l'amertume, s'est révélée pertinente. En effet, ce deuxième contrôle par les récepteurs est complémentaire à la dégustation puisqu'elle permet notamment de diminuer des phénomènes de masquage. Les résultats obtenus sur les extraits de bois de chêne ont permis de valider les observations émises lors de la dégustation. Par ailleurs, l'activation des récepteurs a pu être mesurée au contact d'un extrait brut. Les résultats ont révélé que 5 récepteurs sur les 25 ont eu une forte réponse en amplitude ; il s'agit des Tas2R4, Tas2R7, Tas2R16, Tas2R38 et Tas2R43. L'étude a ensuite été limitée au

récepteur Tas2R7. De fortes fluorescences ont été constatées dans certaines fractions, ce qui a permis de montrer que leur composition en molécules amères devait varier. En outre, ce protocole pourra être mis en place sur les autres récepteurs, décrits précédemment. Il serait également intéressant de voir si de mêmes molécules activent un ou plusieurs récepteurs à l'amertume. Enfin, ce protocole, bien que fastidieux à mettre en œuvre, pourra être réalisé sur les autres fractionnements des BNC, BCN et BCF. Son développement ouvre de nouvelles perspectives quant à la recherche inductive de composés sapides inconnus dans des matrices complexes.

#### II. Approche par analyse différentielle non-ciblée

#### A. État de l'art

Depuis plusieurs années, les analyses non-ciblées ont fait l'objet de nombreux développements pour l'étude de substances naturelles (Hoffmann et al. 2014 ; Olsen et al. 2016 ; Stewart et al. 2018 ; Rutz et al. 2019). Plus précisément, la métabolomique apparait comme un domaine en pleine émergence et en développement pour la chimie des produits naturels. Celle-ci consiste en l'identification et la quantification non ciblée des métabolites présents dans un échantillon d'origine biologique. La HPLC-MS<sup>n</sup> et la RMN, principales techniques utilisées pour la recherche de molécules non-volatiles naturelles, ont été employées pour ces approches métabolomiques (Wolfender et al. 2019 ; Hubert, Nuzillard et Renault 2017). La technologie HRMS, utilisée dans ce travail, apparaît comme un outil de choix, par sa sensibilité, sa résolution et sa grande gamme dynamique. Si le recours à l'analyse globale peut limiter les conclusions à un cadre descriptif (Roullier-Gall et al. 2014), son utilisation couplée avec des outils permettant un criblage apparait prometteur pour la découverte de nouvelles substances actives (Cabral et al. 2016; Nothias et al. 2018). En outre, le développement de stratégies de déréplication, soit l'identification dans un mélange complexe de composés déjà décrits dans la littérature, couplées à l'utilisation de réseaux moléculaires (molecular networks) semble particulièrement puissant (Allard, Genta-Jouve et Wolfender 2017 ; Wang et al. 2016).

Ces approches génèrent une grande quantité de données relatives à tous les composés détectés dans un échantillon, ce qui nécessite l'utilisation d'outils de bioinformatique (Pluskal *et al.* 2010 ; Blaženović *et al.* 2018). L'objectif est de mettre en évidence les informations d'intérêt contenues dans les données collectées. En outre, la déréplication associée à la consultation des bases de données de fragmentation des substances naturelles pourrait fournir *in silico* des informations structurales sur les composés présents et faciliter leur identification (Allard *et al.* 2016).

En œnologie, l'approche par analyse différentielle non-ciblée a été appliquée aux raisins (Roullier-Gall *et al.* 2014), aux bois de chêne (Gougeon *et al.* 2009), aux vins (Rocchetti *et al.* 2018 ; Roullier-Gall *et al.* 2015 ; Arbulu *et al.* 2015 ; Gougeon *et al.* 2019) et aux spiritueux (Roullier-Gall *et al.* 2018).

#### B. Application de l'analyse différentielle non-ciblée à des extraits de bois de chêne

Pour la recherche de nouveaux composés du bois modifiés par la chauffe, une approche par analyse différentielle non-ciblée a été appliquée à différents extraits de bois de chêne. L'analyse globale des échantillons a été réalisée par HRMS. Le travail présenté ici correspond à des résultats préliminaires.

#### 1. Matériels et méthodes

#### a. Nature et origine des macérats de bois de chêne analysés

Les échantillons de bois de chêne proviennent de la tonnellerie Seguin-Moreau. Deux facteurs ont été étudiés : l'influence de l'espèce de chêne et l'effet de la chauffe.

Pour le premier paramètre, deux espèces de chêne français ont été comparées. Pour cela, 9 échantillons de chêne sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl., 1784) et 9 échantillons de chêne pédonculé (*Quercus robur* L., 1753) ont été sélectionnés. Ces échantillons ont été analysés au préalable par LC-HRMS, selon la méthode développée par Marchal *et al.* (Marchal, Prida et Dubourdieu 2016), afin de déterminer l'espèce de chêne sur la base de leur composition triterpénique.

Pour étudier le second paramètre, les 18 échantillons précédents ont subi les trois modalités de chauffe décrites au début de cette partie (le BNC, BCN et BCF), ce qui a donné 54 échantillons de bois.

Par la suite, ces 54 échantillons ont été broyés sous forme de poudre puis mis à macérer dans une solution modèle de vin (H<sub>2</sub>O/EtOH : 88/12, 5 g/L d'acide tartrique, pH 3,5) à 50 g/L pendant 48 h. Ils ont ensuite été dilués et filtrés à 0,45  $\mu$ m avant d'être injectés.

## b. Analyse par LC-MS/MS (Q-Exactive<sup>TM</sup> Plus Orbitrap)

Les analyses ont été réalisées par le Docteur Eric Frérot, de la société Firmenich, à l'aide d'un Q-Exactive<sup>TM</sup> Plus Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) couplée à une chaîne LC (Waters), dont est équipé son laboratoire. Ce spectromètre de masse à haute résolution est particulièrement adapté aux expériences MS/MS. A l'inverse de l'Exactive, où tous les ions formés dans la source sont collectés dans la « C-trap » puis injectés dans l'analyseur Orbitrap, le Q-Exactive va pouvoir sélectionner, à l'aide d'un quadripôle haute performance, des ions avec des m/z spécifiques puis les fragmenter avant la détection par l'analyseur Orbitrap (**Figure 66**).



**Figure 66 :** Spectromètres de masse à analyseur Orbitrap. Différences entre l'Exactive et le Q-Exactive (d'après Michalski *et al.* 2011).

Tous les échantillons ont été injectés en mode positif et négatif. Les conditions chromatographiques et les paramètres spectroscopiques utilisés sont détaillés dans les tableaux suivants : **Tableau 67** et **Tableau 68**.

**Tableau 67 :** Conditions chromatographiques pour l'analyse en LC-MS/MS des extraits de bois de chêne.

Appareil : Q-Exactive Plus (Thermo Fischer Scientific) Colonne : BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 μm (Waters, Guyancourt, France)						
Phase mobile : Débit à 400 µL/min Solvant A : H <sub>2</sub> O + 0,1 % HCOOH Solvant B : ACN + 0,1 % HCOOH						
Gradient :						
Temps (min): 0 0,5 10,5 14 16						
% de B : 5 5 100 0 0						
Injection : 2 µL						

**Tableau 68 :** Conditions spectrométriques pour l'analyse en LC-MS/MS des extraits de boisde chêne.

	Mode négatif		Mode positif		
Paramètre	Full MS	dd-MS²/dd-SIM	Full MS	dd-MS²/dd-SIM	
Débit du « sheath gas » <sup>a</sup>	2	48	48		
Débit du gaz auxiliaire <sup>a</sup>		11	11,25		
Débit du « spare gas »		2	2,25		
Tension du spray	- 3,	3 kV	3,5 kV		
Température du capillaire	300 °C		300 °C		
Température de la source	frature de la source 300 °		400 °C		
Résolution <sup>b</sup>	35000	17500	35000	17500	
AGC <sup>c</sup>	$10^6$ ions	$10^5$ ions	10 <sup>6</sup> ions	$10^5$ ions	
Gamme de masses	100 - 1500  Th $200 - 2000  Th$		100 – 1500 Th	200 - 2000  Th	
HCD <sup>d</sup>	-	28,33 eV	-	28,33 eV	
Type de données	Centroïde		Centroïde		

<sup>a</sup> Les débits du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires

<sup>b</sup> Résolution  $m/\Delta m$ , fwhm à m/z 200 Th

<sup>c</sup> Contrôle automatique de gain

<sup>d</sup> Dissociation induite par collision de haute énergie

Le Q-Exactive peut isoler successivement différents ions précurseurs et les fragmenter dans la cellule HCD, chacun à une énergie de collision normalisée individuelle adaptée à ses propriétés. Comme chaque population d'ions précurseurs n'est fragmentée qu'une fois lors de l'injection dans la cellule HCD, tous les ions fragments sont successivement stockés dans la cellule HCD, puis soumis à une analyse conjointe dans l'analyseur Orbitrap. Un scan a été réalisé en « Full Scan » puis les données de la MS<sup>2</sup> ont été acquises ici en utilisant le mode « MS<sup>2</sup> data dependent ». Le but est de choisir les 4 ions précurseurs les plus abondants de l'analyse (100-1500 Th) en vue de la fragmentation en HCD (28,33 eV).

#### c. Traitement des données avec MZmine

MZmine est un logiciel libre dédié au traitement des données LC-MS, créé en 2005 (Katajamaa, Miettinen et Orešič 2006). La version MZmine 2 (2.38), plus complète (Pluskal et al. 2010), a été utilisée pour traiter les données transmises par le Dr Eric Frérot après analyse des échantillons avec le Q-Exactive. Le protocole mis en place comprend cinq étapes majeures. La première consiste en la détection des pics chromatographiques à l'aide d'un algorithme qui va repérer les ions et placer le sommet de chaque pic. Dans la même étape, une suppression du bruit de fond a été réalisée. Par la suite, l'alignement inter-échantillons a été effectué, ce qui permet la création des chromatogrammes. La troisième étape consiste en la déconvolution des chromatogrammes et se traduit par une correction des temps de rétention pour chaque ion. Pour éliminer les complications dues à la présence d'isotopes dans un spectre de masse, les chromatogrammes ont été désisotopés à l'aide d'un algorithme. La quatrième étape réside en l'alignement des pics chromatographiques de tous les échantillons, ce qui permet de détecter ceux qui ont pu être supprimés en raison d'un bruit de fond trop important. Enfin, pour la cinquième étape, un « gap-filling » c'est-à-dire un remplissage des zéros de la matrice (des signaux manquants après l'alignement), a été effectué. La Figure 67 résume le protocole suivi pour le traitement des données métabolomiques des extraits de bois de chêne.



**Figure 67 :** Résumé du protocole pour le traitement des données métabolomiques (d'après Katajamaa et Orešič 2005).

Ce protocole a été appliqué aux données obtenues en mode négatif puis à celles en mode positif. Les conditions utilisées pour chaque paramètre sont détaillées dans le **Tableau 69**.

**Tableau 69 :** Conditions utilisées pour le traitement des données métabolomiques des extraitsde bois de chêne. Les paramètres sont écrits en anglais, comme sur le logiciel MZmine 2.

Traitement des données	Paramètres	
Détection des nies charmate anombienses	"Noise level MS <sup>1</sup> "( <i>m</i> / <i>z</i> 100-1500)	1.10 <sup>3</sup>
Detection des pics chromatographiques	"Noise level MS <sup>2</sup> "( <i>m</i> / <i>z</i> 200-2000)	$1.10^{1}$
	"Min time span"	0,01 min
Création des chromatogrammes	"Min height"	$3.10^{3}$
	" $m/z$ tolerance"	10 ppm
	"Min peak height"	$2.10^{3}$
	"Peak duration range"	0,01 - 1,00 min
Déconvolution des chromatogrammes	"Baseline level"	$1.10^{3}$
Algorithme : Baseline cut-oli	" $m/z$ range for MS <sup>2</sup> scan pairing"	0,02 Da
	"Retention time range for MS <sup>2</sup> scan pairing"	0,1 min
	<i>"m/z</i> tolerance"	10 ppm
Suppression des isotopes	"Retention time tolerance"	0,1 min
Algorithme : "Isotopic peaks grouper"	"Maximum charge"	3
	"Representative isotope"	Most intense
	" $m/z$ tolerance"	10 ppm
Alignement des pics chromatographiques	"Weight for $m/z$ "	75
Algorithme : "Join aligner"	"Retention time tolerance"	0,1 min
	"Weight for retention time"	25
	"Intensity tolerance"	10 %
Gap-filling	" $m/z$ tolerance"	20 ppm
	"Retention time tolerance"	0,2 min

A la suite de ces traitements, 41 026 ions ont été observés pour le mode d'ionisation négatif et 37 471 pour le mode d'ionisation positif. En appliquant un dernier filtre qui permet de conserver seulement les pics chromatographiques possédant un scan MS<sup>2</sup>, plus que 312 ions ont été conservés pour le mode négatif et 236 pour le mode positif. La poursuite de l'étude est réalisée sur ces derniers ions. Il est important de préciser que la réduction de données, indispensable pour le traitement statistique, est également susceptible d'engendrer une perte de données, ce qui constitue une limite majeure à ce type d'approche.

#### d. Traitements statistiques

Les traitements statistiques ont été réalisés sous R, logiciel libre destiné aux statistiques, en collaboration avec le Docteur Warren Albertin (UR Œnologie).

Les résultats ont été interprétés par une analyse de la variance à 2 facteurs (ANOVA) suivie d'un test *post hoc* de Tukey, selon la méthode décrite dans la partie expérimentale

générale. Les hypothèses d'homogénéité des variances (test de Levene) et de normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk) ont été validées pour toutes les séries (modalité chauffe, espèce et interaction chauffe-espèce) et dans les deux modes d'ionisation. Puis, le test *post hoc* de Tukey, montre la formation de différents groupes en fonction des modalités : a et b pour les espèces de chêne, a, b et c pour les types de chauffe et a,b,c,d, e et f pour les interactions entre la chauffe et l'espèce. Compte-tenu du grand nombre de tests réalisés (plusieurs centaines), la correction de Benjamini-Hochberg pour les tests multiples a été appliquée aux probabilités calculées (*p*-values) pour chaque type d'analyse. Après correction, le seuil de significativité retenu est  $\alpha = 5$  %.

Des analyses en composante principale (ACP) ont été réalisées. Les valeurs ont été exprimées en logarithme pour homogénéiser les données.

#### 2. Résultats et discussion des différents traitements de données

#### a. Analyse des données métabolomiques des extraits de bois de chêne

Le premier objectif de cette approche non-ciblée était de pouvoir observer de possibles différences entre les modalités par une analyse globale. Les données ont d'abord été traitées selon les stratégies de métabolomiques mises en place pour la recherche de molécules naturelles (Wolfender *et al.* 2019 ; Hubert, Nuzillard et Renault 2017).

Après une utilisation de MZmine, les données ont été analysées statistiquement par une ANOVA à deux facteurs (facteur « espèce », facteur « chauffe » et effet d'interaction « espèce x chauffe ») pour les deux modes d'ionisation. Des ACP ont été réalisées à partir des 312 ions du mode négatif et des 236 ions du mode positif, obtenus après le traitement sur MZmine 2. La **Figure 68** reporte les différentes représentations obtenues après le traitement statistique pour toutes les modalités. Les deux premiers axes factoriels (Dim 1 et Dim 2) expliquent 47,1 % de la variation totale pour le mode négatif et 51,3 % pour le mode positif. L'axe 1 permet la séparation des extraits de bois de chêne en fonction de la chauffe et l'axe 2 permet la séparation des échantillons en fonction de l'espèce de chêne. A partir de ces données, l'effet chauffe semble être plus marqué que l'effet espèce. En outre, cette différence est observée davantage en ionisation positive qu'en ionisation négative. *A priori*, il ne devrait pas y avoir de distinction majeure entre les deux modes d'ionisation. Cette légère différence pourrait venir des filtres choisis pour le traitement des données sur MZmine. Il est également possible que certains marqueurs moléculaires discriminants de l'espèce soient mieux ionisés en mode positif.



**Figure 68 :** Représentation des données métabolomiques pour l'effet espèce (1), l'effet chauffe (2) et les interactions chauffe-espèce (3), en mode d'ionisation négatif (à gauche) et positif (à droite). ACP réalisées sur 312 et 326 ions des modes négatif et positif respectivement.

En raison de l'effet prédominant de la chauffe mis en évidence précédemment, son incidence sur les composés présents dans les extraits de bois de chêne a été plus particulièrement étudiée. Les résultats ont montré des différences significatives de la composition en fonction du niveau de chauffe (*p-value* < 0,05) pour 163 ions (soit 69,1 %) et 183 ions (soit 58,7 %), respectivement en mode positif et en mode négatif. Les lettres a, b et c correspondent aux différents groupes de significativité. A la suite du traitement statistique, plusieurs profils ont été observés en fonction de la chauffe et en fonction des composés, de type « abc », « cba », « aab », « baa » et « bab » (**Figure 69**).



**Figure 69 :** Représentation des différents profils observés pour les composés influencés significativement par la chauffe (mode négatif en haut et mode positif en bas) et exprimés en pourcentage. « a », « b » et « c » représentent des groupes de significativité. BCF : bois chauffe forte ; BCN : bois chauffe normale ; BNC : bois non chauffé.

#### Deuxième partie : Recherche de nouveaux marqueurs sapides dans le bois de chêne

Quatre profils majoritaires ont été observés pour le mode positif et cinq pour le mode négatif. Celui le plus présent pour les deux modes d'ionisation est de type « cba » et correspond à une dégradation des composés au cours de la chauffe du bois. Il est suivi par le profil « baa » qui correspond à une dégradation des composés seulement par la chauffe la plus forte. Les profils de type « abc » et « aab » correspondent à des composés qui sont formés pendant la chauffe. Enfin, le profil de type « bab » correspond à des molécules qui sont formées pendant la chauffe normale mais dégradées par la chauffe forte. Les profils moins fréquents ont été rassemblés sous la catégorie « autres ». Au vu des résultats, il semblerait que davantage de composés soient dégradés par la chauffe plutôt que formés, pour ceux qui ont été conservés après le traitement par MZmine.

L'identification des pics chromatographiques obtenus après le traitement de données par MZmine n'a pas été réalisée pour le moment. D'autres études devront s'attacher à cette partie afin de valider les hypothèses émises. Par ailleurs, cette étape devrait permettre d'identifier des molécules connues du bois de chêne par déréplication et de caractériser les composés majoritaires de ces échantillons. Ces résultats pourront être comparés avec une étude récente, portant sur une analyse différentielle non-ciblée appliquée à des extraits de bois d'érable et de chêne (He *et al.* 2019).

En revanche, les données correspondant aux molécules purifiées au Chapitre III de cette partie, ont été extraites du jeu de données enregistré. Ainsi, l'approche métabolomique nonciblée des extraits de bois de chêne initialement mise en place permet également de renseigner l'évolution en fonction de la chauffe de composés donnés, par une quantification relative.

# b. Application aux molécules d'intérêt purifiées à partir des extraits de bois de chêne

Les données obtenues pour les 54 échantillons après l'ANOVA ont été représentées de manière à mettre en évidence les moyennes et les écarts types associés à chaque composé, sous forme de « graphes des moyennes » ou « mean plot ». La **Figure 70** représente les « mean plot » des composés purifiés dans le Chapitre III de cette partie pour les deux espèces de chêne.



**Figure 70 :** Evolution des composés d'intérêt (m/z 641, 639, 807, 783, 169-neg et 539 – de gauche à droite et de haut en bas) en fonction des 3 modalités de chauffe (BCF à gauche, BCN au milieu et BNC à droite) pour le chêne sessile (courbe en vert) et le chêne pédonculé (courbe en bleu). Les groupes de significativité « a », « b » et « c » (test de Tukey) sont mentionnés audessus des graphiques.

#### Deuxième partie : Recherche de nouveaux marqueurs sapides dans le bois de chêne

Le composé m/z 641, de type « bac », semble se former pendant la chauffe et se dégrader légèrement avec la chauffe forte. Ce résultat est en accord avec les conditions de sa purification puisqu'il a été obtenu à partir de bois « chauffe forte » du chêne sessile. La même tendance a été observée pour les deux espèces de chêne, ce qui permet également d'identifier ce composé dans le chêne pédonculé.

La quercusnine A (m/z 807), de type « cba », semble se dégrader avec la chauffe tant pour le chêne sessile que pour le chêne pédonculé. A titre de comparaison, les concentrations des principaux ellagitannins, comme la vescalagine et la castalagine, diminuent également au cours de la chauffe du bois (Glabasnia et Hofmann 2007 ; Sanz *et al.* 2010). Ce composé n'a jamais été identifié dans ces deux espèces. Il a été purifié à partir d'extraits de bois de chêne « non chauffé ». Ainsi, les résultats obtenus sont cohérents avec son protocole de purification.

Les isomères m/z 639, la pédunculagine (m/z 783) et le composé m/z 539, sont tous de type « baa », ce qui correspond à une dégradation apportée par la chauffe forte. La même tendance semble être observée pour les deux espèces de chêne pour les composés m/z 783 et 539. En revanche, pour les isomères m/z 639, une différence significative entre les chênes sessile et pédonculé a été constatée. Cette observation peut être reliée aux teneurs significativement plus élevées de whisky-lactone dans le bois de chêne sessile (Prida et Puech 2006). Les protocoles de purification mis en place pour ces trois composés à partir du chêne sessile et dans du bois « non chauffé » concordent avec les résultats obtenus.

Pour l'acide gallique (m/z 169-neg), aucun effet significatif de l'espèce de chêne, de la chauffe ou des interactions entre les deux n'a été remarqué.

L'approche non-ciblée a permis de renseigner sur l'évolution des composés d'intérêt en fonction de la chauffe. Cependant, ces résultats devront être vérifiés par la quantification absolue des composés dans différents échantillons d'extraits de bois de chêne.

L'analyse différentielle non-ciblée des extraits de bois de chêne a permis de mettre en évidence que l'effet chauffe est plus marqué que l'effet espèce pour 64 % des composés. En outre, plusieurs profils d'évolution des teneurs en composés en fonction de la chauffe ont été observés. Cette première expérience d'une approche non-ciblée s'est révélée prometteuse puisqu'elle pourrait permettre de mettre en lumière des molécules significativement affectées par un ou plusieurs paramètres, en vue de leur purification. Par exemple, des composés formés

#### Deuxième partie : Recherche de nouveaux marqueurs sapides dans le bois de chêne

par la chauffe pourront être repérés grâce au traitement statistique, purifiés après la mise en place d'un protocole de fractionnement, puis dégustés afin de les caractériser sensoriellement. Ce type de technique, qui n'avait pas encore été utilisée au laboratoire avant cette thèse, pourrait être mise en œuvre de façon complémentaire à l'approche inductive classiquement utilisée, afin de repérer des molécules affectées par des facteurs œnologiques définis. Néanmoins, il ne semble pas envisageable ni souhaitable que de telles approches métabolomiques remplacent la démarche guidée par le goût, qui offre davantage de garanties sur la pertinence sensorielle des composés isolés.

#### Conclusion Chapitre V

L'objectif de ce chapitre était de proposer de nouvelles méthodologies pour la découverte de molécules sapides. Le fractionnement parallèle des extraits de bois de chêne issus de différentes modalités de chauffe, expliqué au **Chapitre III** de cette partie, s'est révélé pertinent et efficace pour la purification de nouveaux composés. Néanmoins, avec ce type de démarche, des phénomènes de masquage peuvent se produire lors de la dégustation. Par conséquent, des fractions peuvent être ignorées alors qu'elles contiennent des composés amers ou sucrés. Pour remédier à cet écueil, une approche originale a été mise en place avec le laboratoire du Docteur Loïc Briand. Elle consiste en la mesure de l'activation des récepteurs à l'amertume pour guider le protocole de fractionnement. Cette méthode pourrait en outre permettre de fournir des indications sur la nature chimique des composés présents dans les fractions puis de détecter la présence de nouvelles molécules amères.

Par ailleurs, afin de progresser dans la connaissance des composés sapides, le recours à d'autres approches peut être intéressant. C'est notamment le cas de l'analyse différentielle nonciblée. Dans un premier temps, son utilisation a été limitée à un cadre purement descriptif. Néanmoins, elle a permis de montrer que la purification de nouvelles substances actives pouvait être orientée par une étude par LC-HRMS suivie d'un traitement statistique.

Les résultats obtenus dans ce chapitre sont préliminaires mais ont tout de même permis d'expérimenter de nouvelles approches afin d'en évaluer la pertinence et l'efficacité.

Dans la continuité de ce travail, une analyse non-ciblée par spectrométrie de masse a été réalisée sur plusieurs eaux-de-vie de Cognac. Cette étude visant à caractériser et purifier de nouvelles molécules sapides fait l'objet de la prochaine partie de cette thèse.

# TROISIÈME PARTIE

# RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS SAPIDES DANS LES EAUX-DE-VIE BOISÉES DE COGNAC

#### **TROISIÈME PARTIE :**

# RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS SAPIDES DANS LES EAUX-DE-VIE BOISÉES DE COGNAC

### CHAPITRE VI. SÉLECTION DE COMPOSÉS D'INTÉRÊT DANS DES EAUX-DE-VIE DE COGNAC PAR ANALYSE DIFFERENTIELLE NON-CIBLÉE

#### Introduction

La Partie II a été consacrée à l'étude de nouveaux composés sapides dans des extraits de bois de chêne. En effet, l'élaboration de nombreux grands vins et spiritueux comporte généralement une étape de maturation en fûts, au cours de laquelle sont libérés des extractibles du bois. Ce phénomène est particulièrement important pour les eaux-de-vie, dont la composante non-volatile est exclusivement conférée par l'élevage. Toutefois, après la libération dans les eaux-de-vie de composés du bois de chêne, certains d'entre eux peuvent évoluer, en se dégradant ou en réagissant avec des constituants de l'eau-de-vie ou d'autres molécules du bois. Une étude récente a ainsi montré, dans le cadre d'une analyse holistique, qu'il existait une plus grande diversité de composés dans les eaux-de-vie élevées sous bois que dans le bois lui-même (Roullier-Gall *et al.* 2018). Ce résultat conforte l'hypothèse de la co-existence, dans les eaux-de-vie maturées en fûts, de composés nativement présents dans le bois et de molécules néoformées au cours du vieillissement. Afin de rechercher de tels composés, des travaux ont également été réalisés directement sur des eaux-de-vie maturées. En particulier, une analyse non-ciblée par HRMS a été réalisée sur des eaux-de-vie boisées de Cognac de différents âges. Son utilisation croisée avec des outils analytiques vise à isoler de nouveaux composés sapides.

#### I. Analyse non-ciblée par HRMS d'eaux-de-vie de Cognac de différents âges

#### A. Matériels et méthodes

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

Les eaux-de-vie de Cognac ont été fournies par la maison Rémy-Martin. Dix millésimes, de 1970 à 2015, ont été sélectionnés pour cette étude. Les échantillons proviennent de la même distillerie et sont élevés selon des conditions similaires. Pour chaque millésime, un échantillon a été prélevé dans cinq barriques différentes, afin de limiter des écarts liés à l'hétérogénéité du bois de chêne d'une barrique à une autre. Ces eaux-de-vie sont toujours en cours d'élevage. Elles ne résultent donc pas d'un assemblage et ne sont pas commercialisées pour le moment.

## 2. Analyse par LC-MS/MS (Q-Exactive<sup>TM</sup> Plus Orbitrap)

Les analyses ont été réalisées par le Docteur Eric Frérot, de la société Firmenich, à l'aide d'un Q-Exactive<sup>TM</sup> Plus Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) couplée à une chaîne LC (Waters), dont est équipé son laboratoire.

Les conditions utilisées pour l'analyse des données sont les mêmes que celles décrites à la **Partie II. Chapitre V. II. B. 1. b**). Tous les échantillons ont été injectés en mode d'ionisation positif et négatif.

### 3. Traitement des données avec MZmine

Le traitement des données sur MZmine a été réalisé de la même façon que pour l'analyse métabolomique des extraits de bois de chêne, expliquée à la **Partie II. Chapitre V. II. B. 1. c**). Les conditions utilisées pour chaque paramètre sont détaillées dans le **Tableau 70**. Les deux modes d'ionisation ont été traités à part.

**Tableau 70 :** Conditions utilisées pour le traitement des données métabolomiques des eaux-de 

 vie de Cognac. Les paramètres sont écrits en anglais, comme sur le logiciel MZmine 2.

Traitement des données	Paramètres	
Détection des nies charmets monhiques	"Noise level MS <sup>1</sup> " ( <i>m</i> / <i>z</i> 100-1500)	$1.10^{3}$
Detection des pics chromatographiques	"Noise level MS <sup>2</sup> " ( <i>m</i> / <i>z</i> 200-2000)	$1.10^{1}$
	"Min time span"	0,01 min
Création des chromatogrammes	"Min height"	$3.10^{3}$
	" $m/z$ tolerance"	20 ppm
	"Min peak height"	$2.10^{3}$
	"Peak duration range"	0,01 - 1,00 min
Déconvolution des chromatogrammes	"Baseline level"	$1.10^{3}$
Algorithme : "Baseline cut-off"	" $m/z$ range for MS <sup>2</sup> scan pairing"	0,02 Da
	"Retention time range for MS <sup>2</sup> scan pairing"	0,1 min
	" <i>m/z</i> tolerance"	20 ppm
Suppression des isotopes	"Retention time tolerance"	0,1 min
Algorithme : "Isotopic peaks grouper"	"Maximum charge"	3
	"Representative isotope"	Most intense
	" $m/z$ tolerance"	10 ppm
Alignement des pics chromatographiques	"Weight for $m/z$ "	75
Algorithme : "Join aligner"	"Retention time tolerance"	0,1 min
-	"Weight for retention time"	25
	"Intensity tolerance"	10 %
Gap-filling	" $m/z$ tolerance"	25 ppm
	"Retention time tolerance"	0,2 min

A la suite de ces traitements, 42 120 ions ont été observés pour le mode d'ionisation négatif et 47 243 pour le mode d'ionisation positif. En appliquant un dernier filtre qui permet de ne conserver que les pics chromatographiques possédant un scan MS<sup>2</sup>, seulement 331 ions ont été conservés pour le mode négatif et 1 293 pour le mode positif. La poursuite de l'étude est réalisée sur ces ions.

#### 4. Traitements statistiques

Les traitements statistiques ont été réalisés sous R, logiciel libre destiné aux statistiques, en collaboration avec le Docteur Warren Albertin (UR Œnologie).

Les résultats ont été interprétés par une analyse de la variance à 1 facteur (facteur « millésime », ANOVA), selon la méthode décrite dans la partie expérimentale générale. Les valeurs ont préalablement été transformées en logarithme afin d'améliorer l'homogénéité des variances, condition d'application de l'ANOVA. La normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk) a été validée pour les deux modes d'ionisation. Des analyses en composante principale (ACP) ont également été réalisées, pour chaque triplicat. Des cartes auto-organisatrices (ou « self organizing maps ») ont également été effectuées pour la classification des données (Kohonen 1982). Des corrélations de Pearson ont ensuite été réalisées ( $\alpha < 0,05$ , coefficient de corrélation r > 0,8) et ont permis la création de groupes de composés présentant une évolution similaire en fonction des millésimes. Le coefficient de Pearson est un indice reflétant une relation linéaire entre deux variables continues. Une corrélation positive indique que les deux variables varient ensemble dans le même sens. Celui-ci est calculé selon la formule suivante :

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \bar{X}) (Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \bar{X})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{n} (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

#### B. Résultats et discussion des traitements statistiques

L'objectif de cette analyse non-ciblée était de pouvoir observer de possibles différences de composition entre les jeunes et les vieux millésimes d'eau-de-vie par une analyse globale. Les données ont d'abord été traitées avec le logiciel MZmine 2.

Une étude métabolomique implique parfois une analyse différentielle des empreintes, avec une expression semi-quantitative des résultats (Boudah, Roux et Junot 2012). Ici, une analyse en composante principale (ACP) des données a été effectuée à partir des aires des 331 ions négatifs mis en évidence par l'ANOVA. La même analyse a été faite à partir des aires des
1 293 ions positifs. La **Figure 71** reporte les représentations obtenues après le traitement statistique pour les deux modes d'ionisation. Les deux axes factoriels du mode négatif expliquent 79,7 % du jeu de données. L'effet millésime est nettement marqué et représente 71,5 % de la variation totale du jeu de données. La même tendance est observée pour le mode positif mais les deux dimensions n'expriment que 53,1 % de la variance totale. Il semblerait qu'il y ait plus de variabilité dans le jeu de données du mode positif mais que ce dernier explique moins l'effet millésime.

L'ANOVA a montré que l'effet millésime était significatif (*p-value* < 0,05) pour 321 composés sur 331 (soit 97 %) pour le mode négatif et 1 036 composés sur 1 293 (soit 80 %) pour le mode positif.



**Figure 71 :** Représentation des données métabolomiques pour les eaux-de-vie de Cognac en mode d'ionisation négatif (en haut) et positif (en bas).

Les « self organizing map » ainsi que les corrélations de Pearson ont permis de répartir les composés sous différents groupes. Les composés présents dans un groupe ont la même tendance d'évolution en fonction des millésimes. Sur les 321 composés détectés en mode négatif et significativement influencés par le millésime, 298 ont été attribués à un groupe parmi les 4 créés. Pour le mode positif, 854 composés sur les 1 036 significatifs ont été assignés à un groupe parmi les 5 créés. Tous les groupes sont présentés à la **Figure 72**.



**Figure 72 :** Représentation des différents groupes de composés en fonction de leurs évolutions dans les eaux-de-vie de Cognac pour le mode d'ionisation négatif (à gauche) et positif (à droite).

Pour le mode négatif, les groupes 1, 3 et 4, représentant 92 % des composés significatifs, correspondent à des composés plus abondants dans les millésimes anciens. Le groupe 2 comporte 24 composés dont les teneurs sont maximales dans les millésimes 1995 à 1993 puis à nouveau plus basses pour les millésimes 1973 à 1970.

Pour le mode positif, les groupes 2, 3 et 5 représentent 76 % des composés dont les concentrations sont significativement influencées par le millésime. Ces groupes correspondent également à des composés plus abondants dans les millésimes anciens. Le groupe 1 comporte 10 composés présents en plus grande concentration dans les eaux-de-vie jeunes puis de façon moins abondante au cours de l'élevage. Le groupe 4 est composé de 60 molécules dont les teneurs diminuent quand l'âge de l'eau-de-vie augmente.

D'après les évolutions présentées à la **Figure 72**, il semblerait qu'il y ait davantage de composés dans les millésimes anciens. Cette observation rejoint les teneurs en extrait sec obtenues pour les dix millésimes d'eaux-de-vie de Cognac, plus élevées dans les vieux millésimes que dans les jeunes (**Tableau 71**). Pour expliquer ces résultats, il est possible que davantage de composés soient détectés car ils sont plus abondants dans les vieux millésimes ou que des composés soient néoformés au cours du vieillissement, ce qui rejoindrait l'hypothèse formulée en introduction de cette partie. Dans une moindre mesure, on ne peut totalement exclure le fait que la composition du bois ait évolué au cours de ces dernières années, en lien avec des changements climatiques par exemple.

**Tableau 71 :** Concentration en extrait sec (g/L) dans dix millésimes d'eaux-de-vie de Cognac.

Extrait sec	2015	2010	2008	2005	2000	1995	1993	1990	1973	1970
Moyenne	0,36	1,06	1,56	1,58	2,45	2,95	2,89	2,96	4,30	5,57
(g/L) +	±	±	±	±	±	±	±	±	±	<b>±</b>
Ic	0,21	0,16	0,11	0,11	0,66	0,15	0,27	0,32	0,12	0,13

Ic : Intervalle de confiance.

La formation des groupes statistiques a permis de révéler la présence d'une grande diversité de composés dans ces eaux-de-vie de Cognac, toujours en cours d'élevage. Pour certains d'entre eux, les concentrations sont supérieures dans les eaux-de-vie âgées, alors que pour d'autres, l'inverse est constaté. Deux hypothèses peuvent alors être émises pour interpréter ces observations : les composés proviennent d'une extraction, du bois vers l'eau-de-vie, continue au cours du vieillissement, ou les composés sont néoformés par des réactions chimiques dans l'eau-de-vie.

# II. Utilisation de l'analyse non-ciblée pour sélectionner des molécules d'intérêt en vue de leur purification

La dernière étape de l'analyse métabolomique consiste en l'identification des composés associés aux signaux détectés. Cette étape est la plus hasardeuse ; notamment, puisque pour un métabolite donné, l'ionisation ESI produit souvent plus d'un ion. Ils peuvent correspondre à des fragments produits dans la source, des pseudo-dimères, des adduits et leurs isotopes ayant échappé aux filtres du traitement. En outre, l'identification nécessite, en règle générale, l'utilisation conjointe de plusieurs techniques analytiques, telles que la spectrométrie de masse, la RMN, l'UV ou l'IR. Lors d'une approche LC-MS, l'identification formelle repose sur la

### Troisième partie : Recherche de nouveaux marqueurs sapides dans les eaux-de-vie

similarité du temps de rétention chromatographique, de la masse exacte et des spectres MS<sup>n</sup>, entre le composé à identifier et un standard ou un composé présent dans les bibliothèques spectrales. Si l'ensemble de ces critères n'est pas validé, la caractérisation du composé n'est pas complète et l'identification sera putative.

L'identification de tous les métabolites présents dans ces eaux-de-vie de Cognac n'a pas été entreprise pour le moment car cette étape demande un temps considérable et assez peu de composés non-volatils sont connus à ce jour. En revanche, la table de pics chromatographiques, obtenus à la suite du traitement MZmine, ainsi que les données des traitements statistiques ont été utilisées afin de cibler de nouvelles substances qui pourraient être formées au cours du vieillissement des eaux-de-vie, en vue de leur purification.

Dans un premier temps, la création d'un tableau a permis de classer les molécules en fonction de leur intensité dans les eaux-de-vie, de 1970 et 2015. Par la suite, un criblage LC-HRMS de ces molécules dans les eaux-de-vie et dans les extraits de bois de chêne a été effectué. La sélection des composés d'intérêt, en vue de leur purification a reposé sur trois critères : une forte influence de la durée d'élevage, une forte abondance du composé ciblé et un fort écart d'intensité entre le composé dans l'eau-de-vie et dans le bois. Malgré le nombre conséquent de pics chromatographiques présents dans les deux modes d'ionisation, deux composés répondant aux critères précédemment émis ont été ciblés pour la suite de l'étude.

Les composés de m/z 331, en ionisation positive, et de m/z 703, en ionisation négative, étaient en effet présents en forte intensité dans l'eau-de-vie. Le composé m/z 331 a été classé parmi les composés ayant le plus grand écart d'intensité entre les eaux-de-vie de 1970 et 2015, avec une augmentation de 3 142 % ; il fait partie des 475 composés présents dans le Groupe 2 pour le mode positif. La concentration en composé m/z 703 augmente jusqu'en 1993 puis diminue jusqu'en 1970, tout en restant abondant dans l'eau-de-vie ; il fait partie des 24 composés présents dans le Groupe 2 pour le mode négatif. Les évolutions des deux composés sont représentées à la **Figure 73**.



**Figure 73 :** Evolution des composés m/z 331 (en haut) et m/z 703 (en bas) dans des eaux-devie allant de 2015 à 1970. Les barres d'erreur représentent l'écart type des différents réplicats.

Par ailleurs, le composé m/z 331 est présent de façon native dans le bois ; sa teneur dans l'eau-de-vie âgée pourrait donc s'expliquer par une extraction tout au long de la maturation en fûts. Le composé m/z 703 est observé uniquement dans l'eau-de-vie, ce qui pourrait s'expliquer par une possible réaction chimique au sein de la matrice lors du vieillissement.

# CHAPITRE VII. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSÉS CIBLÉS PROVENANT D'EAUX-DE-VIE DE COGNAC

### Introduction

L'étude précédente a permis de mettre en évidence deux composés. L'objectif de ce chapitre est de les isoler puis de les caractériser sensoriellement et structuralement. Leur purification a été réalisée dans le cadre du Master 2 de Delphine Bahammou.

Le composé m/z 703 n'est présent que dans les eaux-de-vie, il sera donc purifié à partir de cette matrice. En revanche, le composé m/z 331 est également présent dans le bois de chêne. Pour des raisons de disponibilité du matériel, son protocole de purification sera réalisé à partir d'extraits de bois de chêne.

## I. Développement d'un protocole de purification des composés ciblés

### A. Suivi de fractionnement

La LC-HRMS a été utilisée pour le criblage de l'extrait de bois de chêne ainsi que l'eaude-vie de Cognac. Les échantillons ont été injectés en mode positif pour le composé m/z 331 et en mode négatif pour le composé m/z 703. Les conditions chromatographiques et les paramètres spectroscopiques utilisés sont détaillés dans les tableaux suivants (**Tableau 72** et **Tableau 73**).

**Tableau 72 :** Conditions chromatographiques utilisées au cours du fractionnement des extraits

 de bois de chêne et d'eau-de-vie.

Appareil : U-HPLC Accela (Thermo Fischer Scientific)										
Colonne : Hypersil Gold C18 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules 1,9 $\mu$ m										
Phase mobile : Débit à 600 µL/min										
Solvant A : H2O ultrapure + 0,1 % HCOOH Solvant B : ACN LC-MS Optima + 0,1 % HCOOH										
Temps (min): $0 1.0 5.0 5.3 6.0$								7,0		
Gradient 1	% de B :	20	20	50	98	98	20	20		
	Temps (min) :	0	1,0	5,0	5,3	6,0	6,15	7,0		
Gradient 2 % de B : 10 10 50 98 98 10 10										
Injection : $5 \ \mu L$	Injection : 5 µL									

Paramètre	Mode négatif	Mode positif
Débit du « sheath gas » <sup>a</sup>	70	70
Débit du gaz auxiliaire <sup>a</sup>	15	15
Débit du « sweep gas »	0	0
Tension du spray	- 3,5 kV	3,5 kV
Température du capillaire	350 °C	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	320 °C
Résolution <sup>b</sup>	25 000	25 000
AGC <sup>c</sup>	$10^6$ ions	$10^6$ ions
Gamme de masses	100 - 1500  Th	100 - 1500  Th

**Tableau 73 :** Conditions spectrométriques utilisées au cours du fractionnement des extraits de bois de chêne et d'eau-de-vie.

<sup>a</sup> Les débits du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires

<sup>b</sup> Résolution  $m/\Delta m$ , fwhm à m/z 200 Th

<sup>c</sup> Contrôle automatique de gain

La préparation des échantillons, en vue de l'analyse en LC-HRMS, a été réalisée de la façon suivante : une aliquote (0,5 mg) de chaque fraction a été reprise dans 1 mL de méthanol, 100  $\mu$ L ont été prélevés puis complétés avec 900  $\mu$ L d'eau Milli-Q. Ils ont été ensuite filtrés à 0,45  $\mu$ m avant injection.

# **B.** Purification du composé m/z 331 à partir d'extraits de bois de chêne

### 1. Criblage d'extraits de bois de chêne

Le criblage a été réalisé à partir d'échantillons de différentes espèces de chêne : le sessile, le pédonculé et le chêne blanc d'Amérique. Deux types de chauffe ont également été étudiés. L'analyse par LC-HRMS a révélé que le composé m/z 331 était présent en grande quantité dans le bois de chêne d'Amérique « non chauffé » (BNC\_Am).

Pour extraire au mieux le composé m/z 331, des solvants ont été testés en vue d'un premier fractionnement par extraction liquide-liquide. Les résultats ont montré que ce composé semblait avoir davantage d'affinité avec la phase MtBE. Une macération de ce bois ainsi que

des extractions liquide-liquide au MtBE avaient été réalisées précédemment au **Chapitre III. IV. C. de la Partie II** pour la purification des isomères m/z 639. Les fractions obtenues après le premier fractionnement par CPC de l'extrait BNC\_Am\_MtBE ont été criblées, en vue de la purification du composé m/z 331 (**Tableau 74**).



**Figure 74 :** TIC (en haut) et XIC (en bas) en ionisation positive correspondant à l'ion m/z 331 de l'extrait de bois de chêne BNC Am MtBE F-II.

La fraction II était riche en composé ciblé ; elle a donc été conservée pour la suite du fractionnement (**Figure 74**). Le criblage de ces fractions a ainsi permis de limiter la consommation de solvants, de matériel végétal et de gagner du temps.

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Molécule d'intérêt
F-I	20-30	224,4	/
F-II	31-44	333,8	<i>m/z</i> 331
F-III	45-61	146,7	<i>m/z</i> 639-1
F-IV	62-67	49,5	<i>m/z</i> 639-1 ; 639-2
F-V	68-89	180	<i>m/z</i> 639-2
F-VI	90-107	88,3	<i>m/z</i> 639-3
F-VII	108-150	276,7	/
F-VIII	151-196	71,5	/
F-IX	197-211	31,5	/
F-X	212-230	134,8	/

**Tableau 74 :** Criblage des extraits obtenus après le fractionnement par CPC de l'extraitBNC\_Am\_MtBE, en vue de la purification du composé m/z 331. Gradient LC-MS : 1.

## 2. Fractionnements par CPC

L'extrait BNC\_Am\_MtBE\_F-II possédait un profil chromatographique complexe et contenait de nombreux composés. Par conséquent, une deuxième expérience de CPC a été réalisée. Différents systèmes de solvants de la gamme Arizona ont été testés afin de choisir celui permettant un fractionnement optimal (**Tableau 75**).

**Tableau 75 :** Systèmes de solvants testés pour le fractionnement par CPC de l'extraitBNC\_Am\_MtBE\_F-II.

Systèmes	Н	H'	Н"	J	Κ
Hept	1	1	1	2	1
AcOEt	3	-	3	5	2
MtBE	-	3,64	-	-	-
MeOH	1	1	-	2	1
ACN	-	-	1,3	-	-
H <sub>2</sub> O	3	3	3	5	2

Les K<sub>D</sub> ont été calculés l'extrait BNC\_Am\_MtBE\_F-II (Tableau 76).

					K <sub>D</sub>		
	Elution	Composés (m/z)	Н	Н'	Н"	J	K
BNC_Am_MtBE_F-II	Début	193	0,46	0,72	0,19	1,81	0,74
	Milieu	331	0,64	1,17	0,23	11,40	1,90
	Milieu	291	0,73	1,24	0,18	15,05	2,10
	Fin	333	0,16	0,20	1,24	3,22	0,53

**Tableau 76 :** K<sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extraitBNC\_Am\_MtBE\_F-II.

Après le calcul des  $K_D$ , le système K a été choisi pour le fractionnement de l'extrait BNC\_Am\_MtBE\_F-II. L'expérience a été réalisée avec le rotor de 100 mL en mode ascendant, selon la méthode d'analyse décrite dans le **Tableau 77**.

Méthode de fractionnement 7 : Rotor 100 mL ; Mode ascendant									
	Début (min)	Fin (min)	Débit (mL/min)	Rotor (rpm)	% A	% B			
	0	15	10	0	100	0			
ין ויוי <del>ד</del> ו	15	30	10	500	100	0			
Equilibration	30	35	5	2300	100	0			
	35	60	5	2300	0	100			
Elution	0	70	5	2300	0	100			
Extrusion	70	100	10	2300	100	0			

**Tableau 77 :** Méthode de fractionnement de la fraction II de l'extrait BNC\_Am\_MtBE.

La vitesse du rotor a été fixée à 2300 rpm. Les phases A et B correspondaient, respectivement, à la phase inférieure et la phase supérieure du système K. La pression et le volume à l'équilibre étaient de 63 bars et de 52 mL respectivement. Après analyse en LC-HRMS, l'extrait a pu être décomposé en sept fractions distinctes (**Tableau 78**).

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Molécule d'intérêt
F-II_1	15-31	29,8	/
F-II_2	32-38	44,0	/
F-II_3	39-52	47,5	/
F-II_4	53-66	29,4	/
F-II_5	67-81	54,3	<i>m/z</i> 331
F-II_6	82-89	30,0	/
F-II_7	90-115	9,4	/

**Tableau78**: Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extraitBNC\_Am\_MtBE\_F-II.

#### 3. Purification du composé *m/z* 331 par HPLC-Prep

La fraction F-II\_5 de l'extrait BNC\_Am\_MtBE a été injectée en HPLC-Prep pour la purification du composé m/z 331. La colonne Sunfire a été utilisée pour le fractionnement. La phase A était constituée d'H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique et la phase B d'ACN + 0,1 % d'acide formique. Les conditions chromatographiques ont été optimisées pour une meilleure séparation des composés, selon les méthodes décrites dans le **Tableau 79**.

**Tableau 79 :** Gradient utilisé pour la purification par HPLC-Prep du composé *m/z* 331 dans la fraction BNC\_Am\_MtBE\_F-II\_5.

BNC_Am_MtBE_F-II_5	Gradiant 14	Temps (min)	0	7,4	37	39	44,2	45,3	52
Colonne Sunfire		% B	20	20	25	98	98	20	20

Les purifications réalisées par HPLC-Prep ont permis d'obtenir 3,1 mg du composé ciblé m/z 331. La **Figure 75** résume le protocole de fractionnement mis en place pour sa purification à partir de l'extrait BNC\_Am\_MtBE. Son élucidation structurale est désormais possible. Sa caractérisation sensorielle dans de l'eau et dans un vin sera également conduite afin d'évaluer son intérêt potentiel dans ces deux matrices. Par ailleurs, sa quantification absolue dans les eaux-de-vie, les vins et le bois pourra être menée en fonction des résultats de la dégustation.



**Figure 75 :** Fractionnement de l'extrait BNC\_Am\_MtBE en vue de la purification du composé m/z 331.

# C. Purification du composé *m/z* 703 à partir d'une eau-de-vie boisée de Cognac (EDV)

Le composé m/z 703 était présent seulement dans les eaux-de-vie boisées de Cognac. Sa quantification relative a montré qu'il était présent en plus grande proportion dans les eaux-de-vie élevées sous bois pendant 20 ans. Sa purification a alors été réalisée à partir d'un assemblage de trois EDV élevées en fûts pendant respectivement 19, 20 et 21 ans. Elles ont été fournies par la maison Rémy-Martin.

### 1. Préparation des échantillons

Les EDV étaient titrées autour de 64 % v/v d'alcool. Elles ont été évaporées à sec afin d'éliminer l'éthanol, susceptible de perturber les étapes de fractionnement ultérieures. Après évaporation et lyophilisation de 4 bouteilles de 750 mL d'EDV, un extrait sec d'une quantité de 7,35 g a été obtenu.



Figure 76 : TIC (en haut) et XIC (en bas) en ionisation négative correspondant à l'ion m/z 703 dans l'extrait sec de l'eau-de-vie de Cognac.

L'extrait sec a d'abord subi des extractions liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante. Le protocole décrit dans la **Partie II** au **Chapitre III. II. 2. a**. a été appliqué à cette matrice. Après évaporation à sec, les extraits MtBE, AcOEt, BuOH et phase aqueuse ont été lyophilisés pour donner des poudres homogènes. Les masses récupérées après ces extractions sont reportées au **Tableau 80**.

**Tableau 80 :** Quantités obtenues après les extractions liquide-liquide successives de l'extrait sec de Cognac.

Extraits pré-purifiés	EDV_Extrait-sec (g)
Phase MtBE	1,78
Phase AcOEt	1,33
Phase BuOH	1,19
Phase Aqueuse	2,95

Après analyse en LC-HRMS de ces quatre extraits, le composé m/z 703 a été observé dans les phases AcOEt, BuOH et la phase aqueuse. Cependant, il est essentiellement présent dans la phase BuOH. Cet extrait (EDV\_BuOH) a été conservé pour la suite du fractionnement.

### 2. Fractionnement de l'extrait EDV\_BuOH par CPC

L'extrait EDV\_BuOH possédait un profil chromatographique complexe. L'utilisation de la CPC était nécessaire afin de le fractionner et d'obtenir une fraction enrichie en composé m/z 703. Pour injecter la totalité de la fraction en minimisant la consommation de solvants, deux expériences de CPC ont été effectuées à l'aide du rotor de 100 mL, plutôt qu'une seule à l'aide du rotor de 1 L.

Dans un premier temps, différents systèmes ont été testés afin de choisir celui permettant un fractionnement optimal (**Tableau 81**).

Systèmes	P5	P6	P7	P11	P12	P13	P14	P18	P19
MtBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcOEt	4	3	2	5	4	3	2	3	2
ACN	-	-	-	-	-	-	-	1	1
iPrOH	1	1	1	-	-	-	-	-	-
MeOH	-	-	-	1	1	1	1	-	-
$H_2O$	4	3	2	5	4	3	2	3	2

Tableau 81 : Systèmes testés de type « pont » pour le fractionnement de l'extrait EDV\_BuOH.

Les systèmes qui solubilisaient correctement l'extrait ont été conservés. Les phases inférieures et supérieures de chaque système ont été injectées en LC-HRMS, puis les  $K_D$  ont été calculés (**Tableau 82**).

**Tableau 82 :** K<sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait EDV\_BuOH.

			K	D
	Elution	Composés (m/z)	P6	P7
	Début	703	5,74	2,26
EDV_BuOH	Milieu	635	0,64	0,55
	Fin	695	1,28	0,79

Dans le système P6, les principaux composés de l'extrait présentaient un  $K_D$  élevé, peu compatible avec la mise en œuvre pratique de l'expérience de CPC. Dans le système P7, les  $K_D$  obtenus sont plus proches de 1 ; ces conditions ont été retenues pour le fractionnement. Pour vérifier la pertinence de ce choix, une première injection de 500 mg de l'extrait a été réalisée avec le rotor de 100 mL, en mode ascendant, selon la méthode décrite dans le **Tableau 83**.

Méthode de fractionnement 8 : Rotor 100 mL ; Mode ascendant							
	Début	Fin	Débit	Rotor	96 A	% B	
	(min)	(min)	(mL/min)	(rpm)	70 A	70 D	
Equilibration	0	15	10	0	100	0	
	15	30	10	500	100	0	
	30	35	5	2300	100	0	
	35	60	5	2300	0	100	
Elution	0	90	5	2300	0	100	
Extrusion	90	120	10	2300	100	0	

 Tableau 83 : Méthode de fractionnement de l'extrait EDV\_BuOH.

La vitesse du rotor a été fixée à 2300 rpm. La pression et le volume à l'équilibre étaient de 51 bars et de 46 mL respectivement. Le profil chromatographique UV présentait plusieurs pics. Après analyse en LC-HRMS, l'extrait EDV\_BuOH a pu être décomposé en trois fractions distinctes. Une deuxième expérience a été réalisée sur le reste de cette fraction (600 mg) avec la même méthode d'analyse. La pression et le volume à l'équilibre étaient de 46 bars et de 50 mL respectivement. Le profil UV de la deuxième injection et les profils LC-HRMS des tubes collectés sont similaires à ceux de la première. Ainsi, les mêmes fractions ont été constituées pour les deux CPC. Les quantités obtenues sont reportées dans le **Tableau 84**.

Tableau 84 : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait EDV\_BuOH.

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Molécule d'intérêt
EDV_BuOH_F1	37-52	421	<i>m/z</i> 703
EDV_BuOH_F2	53-59	395,5	/
EDV_BuOH_F3	60-125	580,8	/

La fraction F1 de l'extrait EDV\_BuOH était la plus enrichie en composé m/z 703. En revanche, le profil chromatographique étant toujours complexe, un autre fractionnement par CPC a été nécessaire. Les systèmes P11 à P19 ont alors été testés. Les K<sub>D</sub> ont été calculés pour

les systèmes qui solubilisaient le mieux l'échantillon, soit pour P14, P18 et P19. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 85**.

**Tableau 85 :** K<sub>D</sub> calculés pour les différents systèmes de solvants testés pour l'extrait EDV\_BuOH\_F1.

				KD	
	Elution	Composés (m/z)	P14	P18	P19
	Début	675	8,50	20,59	39,3
EDV_BuOH_F1	Milieu	703	1,61	3,78	3,03
	Fin	993	0,80	3,19	3,22

Parmi les trois systèmes, le P14 est celui qui présentait des  $K_D$  proche de 1. En outre, les valeurs entre les composés au début, milieu et fin d'élution sont différentes et éloignées, ce qui pourrait laisser envisager un bon fractionnement par CPC. L'expérience a été réalisée avec le rotor de 100 mL, en mode ascendant, selon la méthode décrite ci-dessous (**Tableau 86**).

Méthode de fractionnement 9 : Rotor 100 mL ; Mode ascendant							
	Début	Fin	Débit	Rotor	%Δ	% B	
	(min)	(min)	(mL/min)	(rpm)	/0 /1	70 <b>D</b>	
Equilibration	0	15	10	0	100	0	
	15	30	10	500	100	0	
	30	35	5	2300	100	0	
	35	60	5	2300	0	100	
Elution	0	70	5	2300	0	100	
Extrusion	70	110	10	2300	100	0	

 Tableau 86 : Méthode de fractionnement de l'extrait EDV\_BuOH\_F1.

La pression et le volume à l'équilibre étaient de 40 bars et de 52 mL respectivement. Après la CPC, les tubes ont été injectés en LC-HRMS et cinq fractions ont pu être regroupées selon leur profil chromatographique. Les quantités obtenues sont reportées dans le **Tableau 87**.

Fraction	Tubes	Masses (mg)	Molécule d'intérêt
EDV_BuOH_F1_1	32-37	284	<i>m/z</i> 703
EDV_BuOH_F1_2	28-31 + 38-52	67,6	/
EDV_BuOH_F1_3	53-100	3,3	/
EDV_BuOH_F1_4	101-115	1,2	/
EDV_BuOH_F1_5	116-125	19,8	/

Tableau 87 : Masses obtenues après le fractionnement par CPC de l'extrait EDV\_BuOH\_F1.

Le profil chromatographique en LC-HRMS de la fraction 1 de l'extrait EDV\_BuOH\_F1 était simplifié (**Figure 77**). Celle-ci a donc été conservée pour la suite du protocole de purification.



**Figure 77 :** TIC (en haut) et XIC (en bas) en ionisation négative correspondant à l'ion m/z 703 dans l'extrait EDV\_BuOH\_F1\_1.

# 3. Purification du composé *m/z* 703 par HPLC-Prep

La fraction a été injectée en HPLC-Prep équipée d'une colonne Sunfire. La phase mobile était constituée d'un mélange H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique (phase A) et ACN + 0,1 % d'acide formique (phase B). Le débit était fixé à 20 mL/min. Les gradients ont été optimisés afin de séparer au mieux les composés proches de la molécule m/z 703. Les conditions chromatographiques utilisées pour ces fractionnements sont reportées dans le **Tableau 88**.

**Tableau 88 :** Gradient utilisé pour la purification par HPLC-Prep du composé m/z 703 dans la fraction EDV\_BuOH\_F1\_1.

EDV_BuOH_F1_1 Colonne Sunfire	Gradiant 15	Temps (min)	0	7,4	37	39	44,2	45,3	52
	Gradient 15	% B	10	10	35	98	98	10	10

Les profils LC-HRMS et UV présentaient peu de pics chromatographiques. En revanche, en ELSD le profil était plus complexe et le composé ciblé m/z 703 n'apparaissait pas comme le plus abondant. Néanmoins, sur les 284 mg injectés, 1,5 mg de la molécule m/z 703 ont pu être récupérés. Ces éléments suggèrent la présence dans la fraction initiale de composés abondants répondant peu en spectrométrie de masse et en UV. La **Figure 78** résume le protocole de fractionnement mis en place pour la purification du composé m/z 703 à partir de l'extrait EDV\_BuOH.



**Figure 78 :** Fractionnement de l'extrait EDV\_BuOH en vue de la purification du composé m/z 703.

### II. Caractérisation structurale et sensorielle des composés purifiés

### A. Etude de la molécule m/z 331

### 1. Etude des propriétés sensorielles du composé m/z 331

Les quantités obtenues pour le composé m/z 331 ont permis sa caractérisation sensorielle dans de l'eau et dans un vin blanc non boisé (Bordeaux 2013) par un panel restreint. Pour chaque matrice, il a été dégusté à une concentration fixe de 5 mg/L, selon les conditions décrites dans la **partie expérimentale générale III. A**. Le vin blanc a été utilisé comme témoin et le QTT I comme molécule de référence pour la sucrosité, comme décrit à la **Partie II Chapitre IV. I**. Les résultats de la dégustation sont reportés dans le **Tableau 89**.

**Tableau 89 :** Propriétés gustatives du composé m/z 331 dans de l'eau et dans un vin blanc non boisé.

	E	au	Vin Bo	blanc non ordeaux 20	boisé )13	
	Sucré	Amer	Sucré Amer A			
Témoin	/	/	0/5	0/5	5/5	
QTT I	4/5	0/5	4/5	0/5	2/5	
331	3/5	0/5	2/5	0/5	3/5	

La dégustation a permis d'établir le goût sucré de la molécule m/z 331 dans les deux matrices. Elle est notée avec une intensité plus faible que la molécule de référence. Dans le vin blanc, le composé m/z 331 procure une augmentation de la sucrosité ainsi qu'une diminution de l'acidité.

Seule la détermination de son seuil de détection dans diverses matrices pourra permettre d'évaluer son influence organoleptique sur le goût des eaux-de-vie et des vins élevés sous bois.

### 2. Caractérisation structurale

La formule brute de cette molécule a été déterminée selon la méthodologie décrite à la **Partie II Chapitre IV. II**.

Le spectre HRMS de la molécule présente un ion positif majoritaire m/z 331,1531, de formule brute C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>. Celui-ci correspond à un fragment vis-à-vis de l'ion quasi moléculaire  $[M+H]^+$ , observé à une intensité très faible quels que soient les paramètres d'ionisation. L'ion protoné de rapport m/z 361,1491 correspond à une formule brute de C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub> (avec une

précision de 1,280 ppm). Cette molécule est vraisemblablement fragmentée dans la source d'ionisation. Ainsi, l'espèce majoritairement détectée correspond à une perte de neutre de 29,9961 par rapport à l'ion m/z 361, caractéristique d'un groupement méthoxy (CH<sub>2</sub>O). En outre, l'ion positif m/z 313,1426, de formule brute C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, pourrait correspondre à une déshydratation vis-à-vis de l'ion m/z 331. Le spectre HRMS présentait également un ion correspondant à un adduit sodium [M+Na]<sup>+</sup> de rapport m/z 383,1463 (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>), comme présenté à la **Figure 79**.



Figure 79 : Spectre HRMS de la molécule m/z 331 (sans fragmentation).

Par la suite, les spectres mono-dimensionnels (<sup>1</sup>H) et bi-dimensionnels (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC) ont été réalisés selon les conditions décrites dans la partie expérimentale générale **II. B. 2. b.** 

En comparant, les données obtenues en LC-HRMS, l'interprétation des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (**ANNEXE 11**) et les données de la littérature, le composé m/z 331 a pu être identifié. Il s'agit de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle (**Figure 80**). Le raisonnement conduisant à la détermination de la structure à partir des données RMN n'est pas détaillé puisque celle-ci a déjà été décrite dans la littérature (Hanawa, Shiro et Hayashi 1997 ; Pieters *et al.* 1993). Il convenait toutefois de préciser sa configuration relative. Il a été démontré dans la littérature que la constante de couplage entre H-7 et H-8 (égale à 6,5 Hz ici) ne pouvait pas être un élément pour distinguer les diastéréoisomères *cis/trans* d'un squelette de ce type (García-Muñoz *et al.* 2006). Par ailleurs, le proton H-7, résonnant à 5,5 ppm sous la forme d'un doublet, est corrélé en ROESY avec le proton H-9, résonnant à 3,75 ppm sous la forme d'un multiplet. Cette

observation indique que les protons H-7 et H-8 sont en position *trans*, comme détaillé dans la littérature (García-Muñoz *et al.* 2006).



Figure 80 : Structure chimique de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle (m/z 331).

Par ailleurs, le pouvoir rotatoire spécifique de cette molécule a été mesuré à partir d'1 mg de composé pur, avec l'appareil et les conditions décrites en partie expérimentale générale. Celui-ci a été établi à  $[\alpha]^{25} = -2,6$  (c = 0,1, MeOH). Cette valeur, très proche de zéro, pourrait suggérer un mélange racémique ou un très léger excès de forme lévogyre. Dans la littérature, le pouvoir rotatoire spécifique de cette molécule a également été mesuré par Hanawa *et al.* et a été établi à  $[\alpha]^{23} = -6,1$  (c = 0,99, MeOH) (Hanawa, Shiro et Hayashi 1997). Les valeurs sont quasiment similaires, ce qui permet de confirmer une nouvelle fois qu'il s'agit de la même molécule.

Ce composé est un néolignane, mis en évidence pour la première fois par Weinges *et al.* en 1970 à partir du Chardon-Marie (*Silybum marianum*) (Weinges *et al.* 1970). Il a également été identifié dans plusieurs espèces naturelles, telles que le duramen du bouleau de Maximowicz (*Betula maximowicziana*) (Hanawa, Shiro et Hayashi 1997) et du pin (*Pinus massoniana*) (Suga *et al.* 1993), le bois du *Viburnum awabuki* (Fukuyama *et al.* 1996) et les feuilles du *Peltophorum pterocarpum* (Y.-C. Li *et al.* 2019), mais jamais dans le genre *Quercus*. Il a également été découvert dans le sirop et le sucre d'érable (Li et Seeram 2010 ; Liu *et al.* 2017). En revanche, aucune publication ne mentionne sa présence dans les eaux-de-vie.

Ainsi, il s'agit de sa première identification dans le bois de chêne américain et dans les eaux-de-vie de Cognac. Son goût sucré est également décrit pour la première fois. Dans la poursuite de ce travail, sa présence dans le chêne sessile et pédonculé ainsi que dans d'autres spiritueux et dans les vins sera étudiée. Sa purification en plus grande quantité serait nécessaire afin de préciser son seuil de détection gustative. Elle n'a pu être réalisée dans le cadre de ce travail.

### B. Etude de la molécule *m/z* 703

Les données RMN de ce composé ne sont pas disponibles à ce jour puisqu'il a été purifié à la fin de cette thèse. Toutefois, l'utilisation conjointe de la LC-HRMS et du logiciel Sirius a permis de fournir des informations importantes en vue de son élucidation structurale.

### 1. Détermination de la formule brute par LC-HRMS

La détermination de la formule brute par LC-HRMS a été effectuée de la même façon que pour les autres composés purifiés, selon la méthode décrite dans la **Partie II Chapitre IV. II**. Le détail du spectre de masse du composé m/z 703, présenté à la **Figure 81**, permet de montrer que cette espèce est monochargée (z = 1).





Le rapport isotopique expérimental (M+1)/M est d'environ 35 %. La formule correspondant à l'ion quasi-moléculaire m/z 703,1143, en mode d'ionisation négative, estimée par le logiciel Xcalibur est :  $C_{31}H_{27}O_{19}^{-}$  avec une précision de 0,6 ppm par rapport à la valeur théorique. La formule brute de cette molécule a été déterminée comme étant  $C_{31}H_{28}O_{19}$ ; elle contient ainsi 18 insaturations.

A notre connaissance, aucun composé possédant cette formule brute n'a été décrit dans la littérature.

## 2. Fragmentation par HCD

La fragmentation du composé m/z 703, par application d'une énergie HCD de 35 eV, conduit à la formation de nombreux ions visibles sur le spectre de masse (**Figure 82**).

L'ion m/z 657,0731, de formule brute C<sub>29</sub>H<sub>21</sub>O<sub>18</sub>, correspond à une espèce formée par la perte d'un groupement neutre C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O vis-à-vis de l'ion m/z 703,1143. Ce groupement peut correspondre soit à la perte d'un éthoxy soit à une perte d'un méthyl et d'un groupe méthoxy. De même, l'ion négatif m/z 639,0626, de formule brute C<sub>29</sub>H<sub>19</sub>O<sub>17</sub> correspond à une déshydratation vis-à-vis de l'ion m/z 657,0731. Par ailleurs, le spectre de fragmentation a montré la présence d'un ion négatif de m/z 523,0513 et pourrait correspondre à une espèce formée par la perte d'un groupement C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, caractéristique d'un hexose, vis-à-vis de l'ion m/z 703,1143.

En outre, un ion de m/z 169,0134 (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup>) a été observé, ce qui correspond à l'acide gallique. L'ion m/z 300,9991 (C<sub>14</sub>H<sub>5</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup>) a également été constaté. Celui-ci pourrait correspondre à la présence d'un acide ellagique dans la molécule. En outre, les ions m/z249,0404 (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>) et m/z 275,0195 (C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>O<sub>7</sub><sup>-</sup>) ont été observés ; ils pourraient correspondre respectivement au 2,2',3,3',4,4'-Biphénylhexol et au 3,4,8,9,10-Pentahydroxy-6Hbenzo[c]chromén-6-one. Ces trois derniers ions, m/z 300, 275 et 249, sont généralement des fragments caractéristiques des principaux ellagitannins, comme la vescalagine et la castalagine (Bowers *et al.* 2018).

Par conséquent, en comparant les fragments obtenus avec les données de la littérature, la molécule *m/z* 703 pourrait être un ellagitannin *C*-glycosidique (Jourdes *et al.* 2011 ; Regueiro *et al.* 2014 ; Engström, Pälijärvi et Salminen 2015).



Figure 82 : Spectre HRMS du composé *m/z* 703 (HCD 35 eV).

### 3. Utilisation du logiciel Sirius

Pour compléter les informations de la fragmentation HCD, le logiciel Sirius a été utilisé. C'est un logiciel libre, complémentaire de MZmine, destiné à l'analyse des métabolites à partir de données obtenues par la spectrométrie de masse en tandem (Dührkop *et al.* 2015 ; Böcker *et al.* 2009 ; Dührkop, Scheubert et Böcker 2013). Le logiciel détermine les formules brutes les plus probables associées à l'ion précurseur puis annote également des formules pour chaque fragment, grâce aux données MS/MS. Les pics qui ne reçoivent aucune annotation sont supposés être du bruit de fond. En outre, un arbre de fragmentation est prédit, ce qui permet de connaître les différentes réactions conduisant à la formation des ions fragments. Puis, l'utilisation de CSI:FingerID, une application permettant de rechercher des structures moléculaires dans les bases de données existantes, permet de proposer des structures associées à chaque formule brute.

Ce logiciel a donc été utilisé pour obtenir de nouvelles informations sur la molécule m/z703. En partant du constat que l'espèce était monochargée, la formule brute proposée par ce logiciel était la même que celle obtenue sur Xcalibur. Par la suite, un arbre de fragmentation (**Figure 83**) a été généré pour l'espèce de formule brute C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>O<sub>19</sub>.



**Figure 83 :** Arbre de fragmentation généré par le logiciel Sirius pour la molécule m/z 703. L'intensité relative des fragments est exprimée en pourcentage.

L'arbre de fragmentation, généré à partir des données MS/MS (énergie de collision 28,33 eV) en mode négatif, propose 8 fragments dont 3 majoritaires (représentés en bleu à la **Figure 83**). L'ion m/z 275,0196, correspondant à une perte de neutre de C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub> vis-à-vis de l'ion moléculaire m/z 703,1153, a également été observé ; il s'agit vraisemblablement du 3,4,8,9,10-pentahydroxy-6H-benzo[c]chromén-6-one de formule brute C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (**Figure 84**). L'ion m/z 275 est associé à la fragmentation majoritaire, c'est-à-dire celle qui conduit au radical le plus stable.



Figure 84 : Structure du 3,4,8,9,10-pentahydroxy-6H-benzo[c]chromén-6-one (*m/z* 275).

Les deux autres fragments majoritaires de m/z 274 et 273, correspondent respectivement à la perte d'un et de deux protons vis-à-vis de l'ion m/z 275.

Par ailleurs, le logiciel n'a trouvé aucune structure moléculaire associée à cette formule brute. Ainsi, le composé m/z 703 semble être une nouvelle substance naturelle.

L'utilisation de la LC-HRMS ainsi que l'analyse des spectres  $MS^2$  a permis d'obtenir la formule brute du composé m/z 703, mais également de suggérer la présence de certains groupements appartenant à la famille des ellagitannins. Bien que ces techniques ne permettent pas la détermination de formule brute semi-développée des molécules, elles fournissent des informations importantes afin de faciliter l'interprétation des futures données RMN. Par la suite, l'étude se portera en priorité sur la caractérisation structurale de ce composé puis dans un second temps sur son étude sensorielle.

### Conclusion Partie III

Cette partie visait à caractériser et purifier de nouvelles substances sapides à l'aide d'une approche métabolomique non-ciblée sur plusieurs eaux-de-vie boisées de Cognac. Dans un premier temps, son utilisation a été limitée à un cadre purement descriptif. Après une étude par LC-HRMS suivie d'un traitement statistique, une grande diversité de composés a été observée dans ces eaux-de-vie. Deux catégories de molécules se sont distinguées, celles extraites du bois de chêne dans l'eau-de-vie et celles formées par des réactions chimiques dans l'eau-de-vie. Dans un second temps, un protocole de fractionnement a été mis en place afin de purifier un composé présent dans chacune de ces catégories. Ainsi, le composé m/z 331 a été purifié à partir d'extraits de bois de chêne et le composé m/z 703 à partir d'une eau-de-vie élevée depuis 20 ans.

Le composé m/z 331 a été identifié comme l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle grâce aux données LC-HRMS et RMN. Son élucidation sensorielle a permis de révéler son goût sucré. Dans la suite de cette thèse, sa présence dans des extraits de bois de chêne, des spiritueux et des vins a été étudiée.

Le composé m/z 703 n'a pas été caractérisé structuralement ni sensoriellement à ce jour. En revanche, au vu des données LC-HRMS, ce composé est vraisemblablement une nouvelle substance naturelle, possiblement un ellagitannin. Les données RMN permettront de valider cette hypothèse.

L'utilisation de l'approche non-ciblée s'est révélée prometteuse puisqu'elle a permis de mettre en lumière des molécules significativement affectées par l'élevage en barriques. Ce travail pourra être continué en le couplant à l'approche inductive classiquement utilisée.

# **QUATRIEME PARTIE**

# CARACTÉRISATION SENSORIELLE DU SYRINGALDÉHYDE ET DE L'ACIDE GALLIQUE. QUANTIFICATION DES COMPOSÉS PURIFIÉS DANS LES VINS ET LES EAUX-DE-VIE ; ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES PARAMÈTRES DE TONNELLERIE

# QUATRIÈME PARTIE :

# CARACTÉRISATION SENSORIELLE DU SYRINGALDÉHYDE ET DE L'ACIDE GALLIQUE. QUANTIFICATION DES COMPOSÉS PURIFIÉS DANS LES VINS ET LES EAUX-DE-VIE ; ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES PARAMÈTRES DE TONNELLERIE

# CHAPITRE VIII. CARACTÉRISATION SENSORIELLE DU SYRINGALDÉHYDE ET DE L'ACIDE GALLIQUE DANS LES VINS ET LES EAUX-DE-VIE

### Introduction

L'utilisation du protocole de fractionnement guidé par la gustatométrie, décrit à la Partie II, a permis d'isoler des composés sapides. Leurs propriétés sensorielles ont d'ailleurs été étudiées dans le deuxième chapitre de la Partie II. Au-delà de la description de la saveur des molécules, la détermination de leur seuil de détection gustative est nécessaire afin de préciser leur influence réelle sur le goût des vins et des eaux-de-vie. Néanmoins, une telle caractérisation sensorielle nécessite des quantités de produits importantes, ce qui peut constituer une limite majeure. C'est notamment le cas de la plupart des composés de ce travail puisqu'ils ne sont pas commercialisés, à l'exception du syringaldéhyde et de l'acide gallique. Ainsi, ce chapitre vise à déterminer le seuil de détection gustative de ces deux composés dans un vin blanc non boisé et dans une eau-de-vie dite « blanche », c'est-à-dire non boisée également.

# I. Détermination des seuils de détection gustative du syringaldéhyde et de l'acide gallique dans deux matrices

Les conditions de la dégustation ont été décrites dans la partie expérimentale générale **III. B.** Pour le syringaldéhyde, les dégustations ont été réalisées avec des pince-nez pour que le panel ne soit pas influencé par son odeur caractéristique.

### A. Dans un vin blanc non boisé

Le seuil de détection du syringaldéhyde et de l'acide gallique ont été déterminés dans un vin blanc sec (Pays d'Oc ; 12 % vol. ; pH 3,43 ; AT = 3,62 g/L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ce vin, élaboré sans contact avec le bois de chêne, a été au préalable injecté en LC-HRMS afin de valider l'absence des deux composés.

Pour chaque concentration, trois verres ont été 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 (test à choix forcé de 1 parmi 3). Le panel était constitué de 21 personnes, appartenant au personnel des laboratoires de l'ISVV, entraînées à la dégustation des vins et sensibilisées à la perception des différentes saveurs. Pour l'acide gallique, cinq concentrations ont été présentées aux dégustateurs, dans un ordre croissant et suivant une progression géométrique de raison 2 : 5, 10, 20, 40, 80 et 160 mg/L. Cinq concentrations (2, 4, 8, 16, 32 et 64 mg/L) ont également été présentées pour le syringaldéhyde, suivant toujours un ordre croissant et une progression géométrique de raison 2.

### B. Dans une eau-de-vie blanche

Le panel qui a été entraîné à la dégustation des eaux-de-vie (partie expérimentale générale **III. B. 3.**) a été choisi pour déterminer le seuil gustatif de détection du syringaldéhyde et de l'acide gallique dans cette matrice. Les seuils ont été déterminés dans une eau-de-vie blanche réduite à 40 % d'alcool. Comme pour le vin blanc, l'eau-de-vie a été injectée en LC-HRMS afin de valider l'absence des deux composés.

Afin d'éviter d'éventuels phénomènes de saturation ou de rémanence dus à la matrice, deux sessions différentes ont été organisées. Pour chacune d'elle, des tests triangulaires ont été présentés aux dégustateurs, selon la méthodologie décrite dans la partie expérimentale générale.

Pour l'acide gallique, trois concentrations croissantes ont été présentées au panel lors de la première session : 20, 40 et 80 mg/L. Les concentrations présentées à chaque dégustateur lors de la seconde session dépendaient de leurs résultats lors de la première session. En effet, si le panéliste donnait des réponses correctes, il dégustait à nouveau la concentration la plus basse pour laquelle il avait donné une bonne réponse, afin de confirmer son jugement, ainsi que 2 concentrations inférieures (5 et 10 mg/L). En revanche, si le panéliste ne trouvait aucune bonne réponse, trois nouvelles concentrations lui étaient présentées : deux plus hautes (120 et 240 mg/L) et une plus basse (60 mg/L), afin de mettre en évidence ou non des phénomènes de saturation liés à la matrice lors de la première session. La même méthodologie a été appliquée pour le syringaldéhyde, mais avec d'autres concentrations (8, 16 et 32 mg/L). Puis, pour la deuxième session, des concentrations plus basses (2, 4 et 8 mg/L) et plus hautes (32, 64 et 128 mg/L) ont été présentées en fonction des réponses données lors de la première session.

### II. Résultats et discussion

Les concentrations utilisées pour la détermination du seuil de détection de l'acide gallique et du syringaldéhyde ont été choisies à partir des données de la littérature. En effet, ces

deux composés sont présents à des concentrations de l'ordre du mg/L dans les vins (Chamkha *et al.* 2003 ; Barnaba *et al.* 2015 ; Sirén, Sirén et Sirén 2015), voire de la dizaine de mg/L dans les eaux-de-vie (Canas 2017 ; Viriot *et al.* 1993).

Le panel a discerné le goût sucré du syringaldéhyde, malgré le port du pince-nez, et l'amertume de l'acide gallique. Les seuils de détection ont été déterminés pour les deux composés dans les deux matrices de l'étude. Le **Tableau 90** les récapitule. Les traitements statistiques conduisant aux résultats ont été expliqués dans la partie expérimentale générale **III. B. 2.** 

**Tableau 90 :** Seuils de détection gustative du syringaldéhyde et de l'acide gallique dans un vin

 blanc non boisé et une eau-de-vie jeune.

Molécules	Seuil de détection gustative	Seuil de détection gustative		
	dans un vin blanc non boisé	dans une eau-de-vie blanche		
Syringaldéhyde	19,2 mg/L	9,3 mg/L		
Acide gallique	33,4 mg/L	29,6 mg/L		

Dans le vin, les seuils de détection gustative du syringaldéhyde et de l'acide gallique ont été évalués respectivement à 19,2 et 33,4 mg/L, avec des variabilités interindividuelles très importantes. En effet, les seuils de détection individuels pour cette matrice s'étalaient de 1,4 à 90,5 mg/L pour le syringaldéhyde et de 3,5 à 226,3 mg/L pour l'acide gallique. Dans l'eau-de-vie, la même tendance a été observée. Ces seuils vont de 1,4 à 90,5 mg/L pour le syringaldéhyde et de 3,5 à 169,7 mg/L pour l'acide gallique. Ces différences de détection ont déjà été observées pour d'autres composés tels que le lyonirésinol (Marchal, Cretin *et al.* 2015 ; Winstel et Marchal 2019). Le seuil de détection de l'acide gallique ne semble pas être significativement influencé par la nature de la matrice. En outre, ces résultats rejoignent ceux de Purwayanti où le seuil de détection avait été déterminé dans l'eau à 34,02 mg/L (Purwayanti 2013). A l'inverse, le syringaldéhyde a un seuil de détection plus haut dans les vins (19,2 mg/L) que dans les eaux-de-vie (9,3 mg/L), malgré une plus forte concentration en alcool dans cette dernière. Ces résultats permettent de confirmer de précédentes observations décrites dans la partie I de cette thèse, c'est-à-dire que l'on ne peut systématiquement présumer de la contribution sensorielle d'un composé dans une matrice à partir de ses propriétés dans une autre matrice.

# CHAPITRE IX. QUANTIFICATION DES COMPOSÉS PURIFIÉS DANS LES VINS ET LES EAUX-DE-VIE ; ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES PARAMÈTRES DE TONNELLERIE.

### Introduction

L'effet d'une molécule sur le goût du vin dépend d'une part de son activité gustative, mais également de son abondance. Les seuils de détection gustative ayant été déterminés pour l'acide gallique et le syringaldéhyde, il convient alors de les comparer aux concentrations retrouvées dans les vins et les eaux-de-vie pour évaluer leur incidence sensorielle.

L'étude sensorielle des composés purifiés au cours des parties II et III a également été réalisée. Afin de connaître leur possible influence sur les vins et les eaux-de-vie, il est nécessaire de disposer de données quantitatives dans ces deux matrices.

Ce dernier chapitre traite d'un développement de deux méthodes de dosage par LC-HRMS des composés sapides purifiés précédemment, dans les vins ainsi que dans les eaux-devie. L'influence des différents paramètres de tonnellerie sur la composition en ces composés sera également étudiée.

### I. Développement de deux méthodes de dosage par LC-HRMS des composés purifiés

La mesure des teneurs en composés purifiés dans les vins et les eaux-de-vie nécessite le développement d'une méthode de dosage robuste et fiable. Ainsi, la LC-HRMS, dont les caractéristiques ont été décrites dans la partie expérimentale générale, a été choisie pour leur quantification.

### A. Composés quantifiés

Les différents protocoles de fractionnement mis en place, décrits dans les parties II et III, ont permis d'obtenir suffisamment de quantités de produits pour la quantification absolue de dix composés. Parmi eux, six ionisent davantage en mode négatif et quatre en mode positif. Ainsi, deux méthodes de quantification ont été mises en œuvre.

Les six composés quantifiés en mode négatif sont : l'acide gallique, la pédunculagine, la quercusnine A, les précurseurs de la whisky-lactone (notés **P-WL-1** pour le m/z 639-1 et **P-WL-2** pour *le m/z* 639-2) et le composé m/z 539.

Pour le mode positif, les composés quantifiés sont : le syringaldéhyde, le sinapaldéhyde, le HDPP-syringarésinol et l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle (noté Alc-diHDDC).

### B. Préparation des échantillons et des solutions de calibration

### 1. Préparation des échantillons

Pour la quantification, les vins et les macérats de bois ont été dilués par cinq avec de l'eau ultra-pure puis filtrés à 0,45  $\mu$ m avant d'être injectés en LC-HRMS. Le taux d'alcool volumique des échantillons d'eaux-de-vie, initialement compris 38 et 71 % v/v, a été réduit à 8 % par addition d'eau. Le facteur de dilution ainsi appliqué a été pris en compte dans le calcul de la concentration finale.

### 2. Préparation des solutions de calibration

Deux solutions mères, soit une pour chaque méthode, ont été préparées dans de l'éthanol. Les composés purs y étaient placés à une concentration initiale de 1 g/L. Pour chaque solution mère, une gamme d'étalonnage a été réalisée par dilutions successives de celle-ci dans de l'eau ultrapure afin d'atteindre les concentrations suivantes : 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 500  $\mu$ g/L, 200  $\mu$ g/L, 100  $\mu$ g/L, 50  $\mu$ g/L, 20  $\mu$ /L, 10  $\mu$ g/L, 20  $\mu$ /L, 10  $\mu$ g/L, 2  $\mu$ g/L et 1  $\mu$ g/L.

### C. Conditions chromatographiques et spectrométriques

Pour les deux modes d'ionisation, les conditions chromatographiques ont été optimisées afin d'améliorer la séparation des composés. Le **Tableau 91** récapitule ces données.

Les paramètres spectrométriques ont également été adaptés à la détection des composés. L'optimisation des valeurs de gaz, des tensions ainsi que des températures appliquées pour l'ionisation et le transfert des ions a été réalisée pour chaque mode d'ionisation par injection directe des standards. Les valeurs choisies résultent d'un consensus des paramètres permettant une ionisation optimale des différents composés (**Tableau 92**). **Tableau 91 :** Conditions chromatographiques utilisées pour la quantification des dix molécules

 purifiées.

Appareil : U-HPLC Accela	(Thermo Fischer Scientific)
--------------------------	-----------------------------

Colonne : Hypersil Gold C18 ; 100 x 2,1 mm ; Taille des particules 1,9 µm

Phase mobile : Débit à 600 µL/min

Solvant A : H<sub>2</sub>O ultrapure + 0,1 % HCOOH

Solvant B : ACN LC-MS Optima + 0,1 % HCOOH

Gradient Quantification 1 (négatif)	Temps (min) : % de B :	0 10	1,6 40	6,3 50	7,0 98	6,0 98	8,0 10	9,3 20
Gradient Quantification 2 (positif)	Temps (min) : % de B :	0 5	1,6 5	6,3 50	7,0 98	6,0 98	8,0 5	9,3 5

Injection :  $5 \mu L$ 

**Tableau 92 :** Conditions d'ionisation et paramètres spectrométriques utilisés pour laquantification des dix molécules purifiées.

Paramètre	Mode négatif	Mode positif
Débit du « sheath gas » <sup>a</sup>	60	60
Débit du gaz auxiliaire <sup>a</sup>	15	15
Débit du « sweep gas »	0	0
Tension du spray	- 3,5 kV	4,0 kV
Température du capillaire	330 °C	300 °C
Tension du capillaire	- 92,5 V	57,5 V
Tension du tube lens	- 170 V	140 V
Tension du skimmer	- 40 V	18 V
Température de la source	360 °C	300 °C
Résolution <sup>b</sup>	10 000	10 000
AGC <sup>c</sup>	3.10 <sup>6</sup> ions	3.10 <sup>6</sup> ions
Gamme de masses	100 - 1000  Th	100 - 1000  Th

<sup>a</sup> Les débits du « sheath gas » et du gaz auxiliaire (azote) sont exprimés en unités arbitraires

<sup>b</sup> Résolution  $m/\Delta m$ , fwhm à m/z 200 Th

<sup>c</sup> Contrôle automatique de gain

# **D.** Traitement des résultats

L'analyse a été réalisée en mode de balayage total. La détection de l'acide gallique, de la pédunculagine, de la quercusnine A, des **P-WL-1** et **P-WL-2** et du composé m/z 539 a été effectuée à partir de la masse exacte de leur ion déprotoné [M-H]<sup>-</sup> et de leur temps de rétention (**Tableau 93**). Cette méthode a également été appliquée pour le syringaldéhyde, le sinapaldéhyde et le HDPP-syringarésinol, mais à partir de leur ion protoné [M+H]<sup>+</sup> (**Tableau 94**). En revanche, pour l'Alc-diHDDC, le signal correspondant à l'ion protoné (C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>) était très faible, quels que soient les paramètres d'ionisation. Par conséquent, sa quantification a été effectuée à partir de son ion le plus intense, l'ion fragment de m/z 331,1531 (C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>).

Les pics chromatographiques ont été intégrés automatiquement grâce à l'application Quanbrowser du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

**Tableau 93 :** Caractéristiques des ions utilisés pour la quantification en mode négatif des molécules purifiées.

Molécules (Mode négatif)	Ion quasi-moléculaire [M-H] <sup>-</sup>	Masse exacte théorique	Temps de rétention (min)
Acide gallique	$C_7H_5O_5$	169,0132	0,63
Pédunculagine	$C_{34}H_{23}O_{22}$	783,0683	0,80 1,16
m/z 539	$C_{24}H_{27}O_{14}$	539,1389	3,24
Quercusnine A	$C_{36}H_{23}O_{22}$	807,0683	3,72
P-WL-1	$C_{29}H_{35}O_{16}$	639,1922	6,21
P-WL-2	$C_{29}H_{35}O_{16}$	639,1922	6,30
Molécules (Mode positif)	Ion quasi-moléculaire [M+H] <sup>+</sup>	Masse exacte théorique	Temps de rétention (min)
-----------------------------	---	---------------------------	-----------------------------
Syringaldéhyde	$C_9H_{11}O_4^+$	183,0648	4,65
Sinapaldéhyde	$C_{11}H_{13}O_4^+$	209,0806	5,23
HDPP-Syringarésinol	$C_{33}H_{39}O_{13}^+$	643,2374	6,30
Molécules (Mode positif)	Ion fragment	Masse exacte théorique	Temps de rétention (min)
Alc-diHDDC	$C_{19}H_{23}O_5^+$	331,1531	5,57

**Tableau 94 :** Caractéristiques des ions utilisés pour la quantification en mode positif des molécules purifiées.

## E. Validation de deux méthodes de quantification

Les méthodes de quantification doivent être validées sur la base de leur sensibilité, leur linéarité, leur répétabilité, leur justesse et leur spécificité. Les données sont présentées dans les **Tableau 95** et **Tableau 96**.

## 1. Sensibilité

De la même manière qu'à la partie I, la sensibilité de la méthode LC-HRMS a été déterminée suivant l'approche décrite par De Paepe *et al.* (De Paepe *et al.* 2013). La limite de détection de chaque molécule a été définie comme la concentration la plus basse de cette molécule pour laquelle un signal fiable et répétable a été observé. En outre, le signal doit être différent d'un blanc réalisé dans les mêmes conditions.

Cette limite de détection a été établie ici à 1  $\mu$ g/L pour les P-WL-1 et -2 ; à 2  $\mu$ g/L pour le sinapaldéhyde, l'alc-diHDDC, l'HDPP-syringarésinol et le composé *m/z* 539 ; à 5  $\mu$ g/L pour le syringaldéhyde et les deux ellagitannins ; et à 20  $\mu$ g/L pour l'acide gallique.

Des tests préalables de justesse ont permis de montrer qu'il n'y avait pas d'effet matrice significatif. De ce fait, les gammes de calibration ont été réalisées dans de l'eau ultra pure. La limite de quantification est définie comme la concentration la plus basse de la molécule pouvant être déterminée quantitativement par la méthode avec une variabilité mesurée, soit avec une précision inférieure à 10 % et une justesse supérieure à 90 %. La sensibilité obtenue est

suffisante au regard des concentrations observées dans les vins, les eaux-de-vie et dans le bois de chêne.

#### 2. Linéarité

Sur la base des études précédentes, la gamme de travail a été choisie en prenant en compte la limite de quantification déterminée précédemment, jusqu'à 10 mg/L. Une courbe de calibration quadratique, avec une pondération en 1/x, a été obtenue, avec des coefficients de corrélation corrects pour chaque molécule (R<sup>2</sup> entre 0,9960 et 0,9995). Le rapport de recouvrement entre la concentration mesurée et celle attendue était supérieur à 90 % pour tous les points de la gamme. Ces résultats établissent la linéarité de la méthode.

### 3. Spécificité

La spécificité de l'Orbitrap a été évaluée par la précision de mesure des masses et la répétabilité des temps de rétention. Les paramètres ont été vérifiés pour chaque injection des solutions de calibration ainsi que pour tous les échantillons. De faibles variations du temps de rétention ont été observées (< 0,07 min) et des écarts entre masse théorique et masse expérimentale inférieurs à 3 ppm ont été enregistrés pour les différentes concentrations, ce qui garantit la spécificité de la méthode.

Des valeurs de répétabilité d'un jour sur l'autre insuffisantes ont été obtenues. Pour pallier cet écueil, des nouvelles gammes de calibration sont injectées lors de chaque série d'analyse.

## 4. Répétabilité et justesse

Pour déterminer la répétabilité intra-journalière (% Coefficient de Variation), cinq réplicats de trois points de la gamme de calibration (10  $\mu$ g/L, 200  $\mu$ g/L et 10 mg/L) ont été injectés successivement. Des valeurs inférieures à 9,9 % ont été obtenues pour les trois concentrations, garantissant la répétabilité de la méthode.

La justesse a été déterminée en calculant le ratio de recouvrement pour deux échantillons (un vin blanc non boisé et une eau-de-vie blanche) dans lesquels des ajouts dosés de 100  $\mu$ g/L, 1 mg/L et 10 mg/L des composés ont été réalisés. Ces ratios de recouvrement variaient de 85 % à 114 %. Ces légères variations pourraient s'expliquer par la matrice très complexe des spiritueux et des vins. Toutefois, les résultats sont restés conformes aux spécifications communes (Guidance for Industry 2018) et ont permis d'établir la justesse de la méthode. Tous ces résultats permettent de valider les deux méthodes de quantification par LC-HRMS des dix composés purs.

Tableau 95 : Paramètres de validation de la méthode de quantification 1 (mode négatif). La justesse a été mesurée dans un vin blanc non boisé e
une eau-de-vie blanche.

Molécules	Sens	sibilité	Linéar	ité	Spé	Spécificité		Répétabilité et justesse								
Ionisation	LOD	100	100	Gamma da		Variation to	Exactitudo do la	F	Répétabil	ité		Justesse Vin blanc	2	1	Justesse Eau-de-vie	2
négative	(μg/ L)	LOQ (μg/L)	linéarité	R <sup>2</sup>	(min)	in) masse (ppm)	10 μg/L	200 μg/L	10 mg/L	100 μg/L	1 mg/L	10 mg/L	100 μg/L	l mg/L	10 mg/L	
Acide gallique	20	50	50 μg/L - 10 mg/L	0,9971	0,05	0,95	/	7,9 %	8,3 %	97 %	90 %	102 %	108 %	106 %	100 %	
Pédunculagine	5	10	10 μg/L - 10 mg/L	0,9990	0,04	1,62	9,9 %	8,5 %	6,9 %	92 %	92 %	103 %	111 %	106 %	101 %	
<i>m/z</i> 539	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9990	0,06	2,27	5,6 %	7,1 %	5,9 %	85 %	91 %	100 %	86 %	104 %	105 %	
Quercusnine A	5	10	10 μg/L - 10 mg/L	0,9995	0,07	1,94	7,3 %	3,4 %	9,6 %	88 %	99 %	103 %	99 %	101 %	102 %	
P-WL-1	1	2	2 μg/L - 10 mg/L	0,9970	0,03	2,58	5,5 %	7,4 %	6,2 %	85 %	98 %	103 %	113 %	98 %	102 %	
P-WL-1	1	2	2 μg/L - 10 mg/L	0,9991	0,04	1,16	9,4 %	5,9 %	8,2 %	100 %	102 %	107 %	114 %	104 %	104 %	

**Tableau 96 :** Paramètres de validation de la méthode de quantification 2 (mode positif). La justesse a été mesurée dans un vin blanc non boisé et une eau-de-vie blanche.

Molécules	Sensi	bilité	Linéa	rité	Spéc	Répétabilité et justesse									
Ionisation	LOD	100	Gamme de		Variation $t_{R}$ (min) $Exactitude de la masse (ppm)$	Exactitude	Répétabilité			Justesse Vin blanc			Justesse Eau-de-vie		
positive	(µg/L)	LOQ (μg/L)	linéarité	R <sup>2</sup>		10 μg/L	200 μg/L	10 mg/L	100 μg/L	l mg/L	10 mg/L	100 μg/L	l mg/L	10 mg/L	
Syringaldéhyde	5	10	10 μg/L - 10 mg/L	0,9963	0,04	2,34	7,8 %	2,5 %	6,5 %	87 %	89 %	94 %	85 %	92 %	97 %
Sinapaldéhyde	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9996	0,03	2,65	6,1 %	9,2 %	9,5 %	88 %	87 %	90 %	91 %	94 %	93 %
Alc-diHDDC	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9960	0,04	0,31	9,3 %	5,2 %	5,3 %	85 %	95 %	94 %	87 %	91 %	94 %
HDPP-Syringarésinol	2	5	5 μg/L - 10 mg/L	0,9995	0,03	0,39	8,4 %	1,4 %	8,6 %	94 %	103 %	97 %	92 %	93 %	96 %

## II. Application de la méthode à l'analyse des vins

Les méthodes développées et validées précédemment ont été appliquées pour le dosage des composés purifiés dans plusieurs vins. Parmi les dix composés, seulement quatre ont été identifiés et quantifiés dans ces échantillons ; il s'agit de l'acide gallique, le syringaldéhyde, l'Alc-diHDDC et l'HDPP-syringarésinol. Tous les résultats de la quantification sont reportés à l'**ANNEXE 12**.

## A. Origine des vins analysés

## 1. Vins commerciaux

Les quatre composés ont été dosés dans 90 vins commerciaux, 43 vins rouges (24 de diverses appellations de Bordeaux, 6 de Bourgogne, 2 du Languedoc-Roussillon, 2 de la Vallée du Rhône, 1 du Beaujolais, 7 d'Espagne et 1 d'Allemagne) et 47 vins blancs (13 provenant de divers vignobles de Bourgogne, 11 d'Alsace, 9 de Bordeaux, 6 du Val de Loire, 4 du Languedoc-Roussillon et 4 de la Vallée du Rhône). Les millésimes s'étendaient de 1995 à 2017. La grande majorité de ces vins a été élevée en barriques, mais les informations sur les durées d'élevage et les pourcentages de barriques neuves n'étaient pas disponibles.

## 2. Vins issus du même cru sur plusieurs millésimes

Cette deuxième série était constituée de dix-sept millésimes, de 1982 à 2016, provenant d'un même cru classé de l'appellation Pauillac. Ces vins rouges ont tous été élevés avec un pourcentage de barriques neuves supérieures à 78 %, à l'exception de l'année 1992 (72 %) et 1994 (66 %), avec des barriques appartenant à trois tonneliers différents.

## B. Résultats et discussion

La concentration de l'acide gallique a été exprimée en mg/L et les trois autres molécules en  $\mu$ g/L.

## 1. Vins commerciaux

Les résultats du dosage sont présentés à la **Figure 85**. La concentration moyenne de chaque molécule dans les vins blancs et les vins rouges a été exprimée.



**Figure 85 :** Concentrations moyennes en acide gallique, syringaldéhyde, Alc-diHDDC et HDPP-syringarésinol dans 43 vins rouges et 47 vins blancs commerciaux. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Les teneurs moyennes mesurées en acide gallique dans les vins rouges (43 mg/L) sont 14 fois plus élevées que dans les vins blancs (3 mg/L). Cette différence pourrait s'expliquer par un vieillissement en fûts plus long pour les vins rouges que pour les vins blancs. En effet, dans la région bordelaise, les vins rouges subissent un élevage en barriques entre 12 à 18 mois contre 6 à 9 mois pour les vins blancs. En Bourgogne, les vins rouges peuvent être élevés en barriques jusqu'à 24 mois et les vins blancs jusqu'à 16 mois.

Ces valeurs ont déjà été décrites dans la littérature et ont fait l'objet de plusieurs travaux (Chamkha *et al.* 2003 ; Padilha *et al.* 2017 ; Barnaba *et al.* 2015 ; Belmiro, Pereira et Paim 2017). Le **Tableau 97** reporte les concentrations mesurées en acide gallique pour les 43 vins rouges. Ainsi, à partir du 1<sup>er</sup> quartile, les vins analysés possèdent une concentration supérieure au seuil gustatif de détection (33,4 mg/L), mesurée au **Chapitre VIII** de cette partie. Ce résultat suggère une possible contribution sensorielle de l'acide gallique à l'amertume de ces vins.

Acide	Moyenne $\pm$ Ic	Minimum	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
gallique	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Vins rouges	43,1 ± 5,2	9,79	32,6	44,9	53	86,4

Tableau 97 : Concentrations en acide gallique dans les 43 vins rouges commerciaux (mg/L).

Ic : intervalle de confiance.

A l'inverse de l'acide gallique, les teneurs moyennes mesurées en syringaldéhyde sont six fois plus élevées dans les vins blancs (349  $\mu$ g/L) que dans les vins rouges (54  $\mu$ g/L). Cette observation pourrait s'expliquer par la durée d'élevage plus longue des vins rouges, mais surtout par leur composition phénolique particulière. En effet, il a été déjà observé qu'après une accumulation pendant environ 9 mois, les teneurs en syringaldéhyde d'un vin rouge diminuaient avec le vieillissement (Ortega-Heras, González-Sanjosé et González-Huerta 2007). Ces résultats suggèrent l'existence de deux phases d'évolution du syringaldéhyde dans le vin. Dans un premier temps, la libération par le bois serait prédominante : les teneurs augmentent. Puis, cette extraction deviendrait insuffisante pour compenser la dégradation du syringaldéhyde : les concentrations baissent. Il a en effet été démontré que des réactions de condensation pouvaient se produire entre des flavanols et des aldéhydes libérés par le bois de chêne des barriques (Es-Safi, Cheynier et Moutounet 2000) ou d'autre nature. Des réactions du même type ont également été observées avec des anthocyanes (Fulcrand, dos Santos et al. 1996 ; Fulcrand, Doco et al. 1996 ; Saucier et al. 1997). Les faibles à inexistantes quantités de ces composés dans les vins blancs pourraient expliquer la préservation du syringaldéhyde dans ce type de matrice.

Ces ordres de grandeur ont déjà été décrits dans la littérature (Sirén, Sirén et Sirén 2015 ; Barnaba *et al.* 2015). Par ailleurs, les concentrations retrouvées pour le syringaldéhyde dans les différents vins sont toutes nettement inférieures à son seuil de détection gustative dans cette matrice (19,2 mg/L). Il semble peu probable que ce composé contribue à la saveur sucrée des vins élevés sous bois de chêne.

Les teneurs moyennes mesurées en Alc-diHDDC sont deux fois plus élevées dans les vins rouges (370  $\mu$ g/L) que dans les vins blancs (172  $\mu$ g/L). En fonction des vins analysés, de fortes variations en ce composé ont été observées (**Tableau 98**). Par ailleurs, sa présence et ses teneurs dans ces deux matrices sont décrites ici pour la première fois.

Alc-	Moyenne ± Ic	Minimum	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
diHDDC	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	$(\mu g/L)$
Vins rouges	$370 \pm 37$	159,7	261,5	361,8	456,9	665,3
Vins blancs	$172\pm26$	38,4	99,6	156,8	205,6	425,4

**Tableau 98 :** Concentrations en Alc-diHDDC dans les vins rouges et vins blancs commerciaux (µg/L).

Ic : intervalle de confiance.

Les teneurs mesurées pour l'HDPP-syringarésinol sont moins élevées que pour les trois autres composés. En effet, les concentrations moyennes en ce composé dans les vins blancs ont été déterminées à 19,1  $\mu$ g/L et à 37,6  $\mu$ g/L dans les vins rouges, soit quasiment deux fois plus. De fortes variations en ce composé ont été observées entre les vins analysés. Le **Tableau 99** reporte les concentrations mesurées.

**Tableau 99 :** Concentrations en HDPP-syringarésinol dans les vins rouges et vins blancs commerciaux ( $\mu$ g/L).

HDPP-	Moyenne $\pm$ Ic	Minimum	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
syringarésinol	(µg/L)	$(\mu g/L)$	$(\mu g/L)$	(µg/L)	(µg/L)	$(\mu g/L)$
Vins rouges	$19,1 \pm 7,1$	0	0	0	33,7	90,3
Vins blancs	$37,6 \pm 4,2$	0	29,2	35,0	45,3	67,1

Ic : intervalle de confiance.

## 2. Vins issus du même cru sur plusieurs millésimes

Ces molécules ont également été dosées dans des vins rouges issus du même cru sur 17 millésimes. Les résultats sont présentés à la **Figure 86** et à l'**ANNEXE 12**.

#### Quatrième partie : Caractérisation sensorielle et quantification



**Figure 86 :** Concentrations en acide gallique, syringaldéhyde, Alc-diHDDC et HDPPsyringarésinol dans 17 millésimes issus du même cru. Les barres d'erreurs indiquent la précision de la méthode. Sd : seuil de détection gustative.

Douze des dix-sept vins analysés possèdent une concentration en acide gallique supérieure au seuil de détection gustative, représentée en rouge sur le graphique. La concentration maximale mesurée en ce composé est de 58,2 mg/L pour le millésime 1986. Les teneurs dans les autres vins sont proches de la valeur du seuil, soit 33,4 mg/L. Ce résultat suggère une possible contribution sensorielle de l'acide gallique à l'amertume de ces vins, et ce de façon durable. Par ailleurs, aucun effet notable du vieillissement sur la concentration en cet acide n'a été observé, à l'exception des millésimes 1996 et 1992 où le pourcentage en barriques neuves était inférieur par rapport aux autres années. Par ailleurs, il est envisageable qu'une variabilité importante puisse exister d'une barrique à une autre, comme il a été démontré pour d'autres composés dans de précédentes études (Cretin, Dubourdieu et Marchal 2016).

Le syringaldéhyde a pu seulement être détecté dans les millésimes allant de 2016 à 2008 et ceux de 2004 et 2000. La concentration maximale enregistrée est de 935  $\mu$ g/L pour le millésime 2016 et la plus basse de 292  $\mu$ g/L pour le millésime 2000. Les valeurs observées sont plus élevées que celles mesurées pour les vins commerciaux. Il est possible que les vins de cette verticale aient été élevés dans un pourcentage de barriques neuves supérieur à celui des vins commerciaux. Par ailleurs, le syringaldéhyde ne semble pas être stable dans le temps, suggérant sa dégradation partielle ou totale au cours de la conservation en bouteille, ce qui rejoint les hypothèses émises précédemment. En outre, ces résultats sont cohérents avec les teneurs plus élevées trouvées dans les vins blancs commerciaux que dans les vins rouges.

Les teneurs mesurées en Alc-diHDDC dans cette verticale coïncident avec les valeurs obtenues pour les vins commerciaux. La concentration maximale est de 435 µg/L pour le millésime 2006. Les valeurs les plus faibles correspondent à nouveau aux millésimes 1996 et 1992 où le pourcentage de barriques neuves était inférieur. Ce composé semble être stable dans le vin à cette échelle de temps. Les variations observées entre les différents échantillons semblent donc plutôt être liées aux pratiques œnologiques qu'au temps de vieillissement en bouteille.

Les teneurs mesurées en HDPP-syringarésinol dans cette verticale sont en accord avec les valeurs obtenues pour les vins commerciaux. La concentration maximale est de 79,7  $\mu$ g/L pour le millésime 2008. Par ailleurs, des concentrations plus faibles sont observées pour les millésimes les plus anciens. Toutefois, la variabilité pouvant exister d'une barrique à une autre au sein d'un même millésime n'est pas connue ; si celle-ci est trop grande, l'écart des concentrations entre les millésimes n'est pas forcément lié à des phénomènes de dégradation du composé avec le temps.

La détermination des seuils de détection gustative de l'Alc-diHDDC et de l'HDPPsyringarésinol dans les vins permettrait, après comparaison avec les teneurs mesurées, de déterminer leur contribution sensorielle et leur pertinence comme marqueur lors de la fabrication des barriques.

## **III.** Application de la méthode à l'analyse des spiritueux

Les méthodes développées et validées précédemment ont été appliquées pour le dosage des dix composés purifiés dans plusieurs spiritueux par LC-HRMS. Tous les résultats de la quantification sont reportés à l'ANNEXE 12.

#### A. Nature et origine des eaux-de-vie analysées

Deux séries de spiritueux ont été utilisées pour cette étude. Les composés ont d'abord été quantifiés dans 28 eaux-de-vie commerciales, comprenant 12 cognacs, 4 eaux-de-vie de vin (ou « brandy »), 3 rhums, 5 whiskies et 4 bourbons. Toutes ces eaux-de-vie ont été élevées en fûts de chêne, avec des durées d'élevage non précisées, mais variables (**ANNEXE 2**).

La deuxième série de spiritueux a été fournie par la maison Rémy-Martin et comprenait dix millésimes, de 1970 à 2015, toujours en cours d'élevage dans des barriques à gros grains de 350 litres. Il s'agit des mêmes échantillons que ceux présentés au **Chapitre I – III. C. 1. a.** de la **Partie I**.

## B. Résultats et discussion

## 1. Eaux-de-vie commerciales

Les résultats du dosage sont présentés à la **Figure 87** pour le syringaldéhyde, le sinapaldéhyde, l'acide gallique, le composé m/z 539, l'HDPP-syringarésinol et l'Alc-diHDDC. La concentration moyenne de chaque molécule a été exprimée, en mg/L, pour chaque catégorie de spiritueux.

Les concentrations moyennes mesurées pour le syringaldéhyde varient entre 7,1 mg/L pour les brandies et 33,3 mg/L pour les bourbons. Cette différence entre ces deux catégories de spiritueux a déjà été décrite dans la littérature (Goldberg et al. 1999). A première vue, les écarts de concentrations pourraient venir de l'origine botanique du bois utilisé. En effet, les brandies sont généralement vieillis dans des fûts de chêne français, sessile ou pédonculé, alors que les bourbons sont vieillis dans des fûts de chêne américain. Cependant, Prida et al. ont dosé ce composé dans différents extraits de bois de chêne français et américain et n'ont pas remarqué des différences de teneurs entre ces deux types de bois, ce qui tend à infirmer cette hypothèse (Prida et Puech 2006). Il est donc possible que les écarts observés proviennent des durées d'élevage différant d'un échantillon à un autre. Par ailleurs, les résultats présentent une variabilité importante en fonction de chaque catégorie de spiritueux. Le Tableau 100 reporte les concentrations mesurées pour toutes les eaux-de-vie confondues. Les valeurs observées sont du même ordre de grandeur que celles décrites dans la littérature (Canas 2017 ; Barnaba et al. 2015 ; Puech 1988). Sur les 28 eaux-de-vie commerciales, seulement 5 ont une concentration en ce composé inférieure au seuil de détection gustative (9,3 mg/L), mesurée dans cette matrice. Ainsi, ces résultats démontrent une contribution sensorielle du syringaldéhyde à la sensation sucrée de ces eaux-de-vie.

Syringaldéhyde	Moyenne ± Ic	Minimum	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Spiritueux	17,6 ± 3,9	3,3	10,3	14,2	23,0	43,0

Tableau 100 : Concentrations en syringaldéhyde dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).

Ic : intervalle de confiance.

### Quatrième partie : Caractérisation sensorielle et quantification



**Figure 87 :** Concentrations moyennes (mg/L) en syringaldéhyde, sinapaldéhyde, acide gallique, composé m/z 539, HDPP-syringarésinol et Alc-diHDDC dans 24 eaux-de-vie commerciales (de gauche à droite et de haut en bas). Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Les teneurs moyennes mesurées pour le sinapaldéhyde vont de 0,13 mg/L pour les *brandies* à 3,9 mg/L pour les rhums. Ces valeurs sont en accord avec les données observées dans la littérature (Canas 2017 ; Cernîşev 2017). Cette molécule avait été perçue comme astringente lors de la dégustation. A notre connaissance, son seuil de détection gustative n'a pas été décrit dans les eaux-de-vie. Il pourra être déterminé dans de futures études afin d'établir son influence sensorielle vis-à-vis de cette matrice.

Les concentrations moyennes mesurées pour l'acide gallique varient de 6,8 mg/L pour les bourbons à 45,1 mg/L pour les cognacs. Les écarts de teneurs entre ces deux catégories de spiritueux ont déjà été décrits dans la littérature (Goldberg *et al.* 1999). Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études, où des teneurs plus élevées en acide gallique ont été enregistrées dans le chêne français par rapport au chêne américain (Cadahía *et al.* 2001 ; Martínez-Gil *et al.* 2019). Par ailleurs, les résultats soulignent une variabilité importante au sein d'une même catégorie de spiritueux. Le **Tableau 101** reporte les concentrations mesurées pour toutes les eaux-de-vie confondues. Les valeurs observées sont du même ordre de grandeur que celles décrites dans la littérature (Zacaroni *et al.* 2011 ; Silva *et al.* 2009). Sur les 28 eaux-de-vie commerciales, seules les 12 eaux-de-vie de Cognac ont une concentration en acide gallique supérieure à son seuil de détection gustative (29,6 mg/L), mesurée dans cette matrice. Ainsi, ce résultat démontre une contribution sensorielle de l'acide gallique à l'amertume de ces cognacs.

Tableau 101 : Concentrations en acide gallique dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).

Acide gallique	Moyenne $\pm$ Ic	Minimum	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Spiritueux	$26,4 \pm 7,8$	0,9	10,6	20,6	36,2	85,8

Ic : intervalle de confiance.

Les teneurs moyennes mesurées en Alc-diHDDC s'étalent de 0,8 mg/L pour les *brandies* à 3,41 mg/L pour les bourbons. En fonction des spiritueux analysés, de fortes variations des teneurs en ce composé ont été observées (**Tableau 102**).

Alc-	Moyenne $\pm$ Ic	Minimum	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
diHDDC	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Spiritueux	$1,\!68 \pm 0,\!4$	0,4	0,7	1,2	2,6	4,0

 Tableau 102 : Concentrations en Alc-diHDDC dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).

Ic : intervalle de confiance.

Les teneurs mesurées pour l'HDPP-syringarésinol s'étalent de 0,2 mg/L pour les *brandies* à 0,7 mg/L pour les bourbons. De fortes variations des teneurs en ce composé ont été observées entre les spiritueux analysés, jusqu'à une concentration maximale de 1,2 mg/L pour un bourbon. Le **Tableau 103** reporte les concentrations mesurées. Par ailleurs, ce composé n'avait jamais été dosé ni même décrit dans cette matrice.

HDPP-	Moyenne ± Ic	Minimum	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
syringarésinol	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Spiritueux	$0,\!4 \pm 0,\!1$	0,07	0,2	0,4	0,6	1,2

 Tableau 103 : Concentrations en HDPP-syringarésinol dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).

Ic : intervalle de confiance.

Les concentrations moyennes mesurées pour le composé m/z 539 sont plus élevées dans les cognacs (1,10 mg/L) que dans les autres spiritueux, 0,01 mg/L pour les bourbons par exemple. Le **Tableau 104** reporte les différentes concentrations en ce composé dans les 24 eaux-de-vie commerciales. De fortes variations des teneurs en ce composé ont ainsi été observées. En revanche, puisque sa structure n'a pas été clairement élucidée, aucune comparaison n'a pu être faite avec la littérature.

**Tableau 104 :** Concentrations en composé m/z 539 dans les eaux-de-vie commerciales (mg/L).

m/z 539	Moyenne $\pm$ Ic	Minimum	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>ème</sup> quartile	Maximum
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Spiritueux	$0,6 \pm 0,2$	0	0,03	0,5	0,9	2,3

Ic : intervalle de confiance.

Les résultats du dosage sont présentés à la **Figure 88** pour les deux précurseurs de la whisky-lactone (P-WL-1 et P-WL-2). Leurs concentrations, exprimées en  $\mu g/L$ , sont représentées pour chaque eau-de-vie. Elles s'élèvent de 0  $\mu g/L$  à 64,6  $\mu g/L$ . Ces composés ont donc été identifiés dans certains spiritueux à la différence des vins commerciaux. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus à partir du bois de chêne. En effet, ces composés sont davantage extraits dans une solution plus riche en alcool. Les écarts de concentrations observés entre les eaux-de-vie pourraient venir de l'origine botanique du bois utilisé pour le vieillissement en barriques. En effet, le bois de chêne français est davantage utilisé pour l'élaboration des cognacs et des « brandies » tandis que le bois de chêne américain est privilégié pour l'élevage des bourbons. Le rhum (R-3), où la concentration en P-WL-1 et P-WL-2 atteint respectivement 64,5  $\mu g/L$  et 42,7  $\mu g/L$ , a également été élevé dans des fûts de chêne blanc d'Amérique qui avaient précédemment accueilli du whisky américain. Cette observation peut être reliée aux teneurs significativement plus élevées de la *trans*-whisky-lactone dans le bois de chêne américain (Prida et Puech 2006). Étonnamment, les teneurs obtenues en ces composés dans les bourbons

sont plus faibles que la plupart des cognacs analysés. Ces écarts pourraient alors venir des temps d'élevage différant d'une eau-de-vie à une autre. Cette hypothèse ne peut être vérifiée puisque ces informations n'ont pas été communiquées.



**Figure 88 :** Concentrations ( $\mu$ g/L) en P-WL-1 et P-WL-2 dans les 24 eaux-de-vie commerciales. Les barres d'erreurs indiquent la précision de la méthode.

Les deux ellagitannins, la pédunculagine et la quercusnine A, ont été identifiés seulement dans les eaux-de-vie de Cognac. Les résultats de leur dosage sont présentés à la **Figure 89**.



**Figure 89 :** Concentrations moyennes ( $\mu$ g/L) en pédunculagine (à gauche) et en quercusnine A (à droite) dans les 12 eaux-de-vie de Cognac commerciales. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Les teneurs moyennes mesurées sont de 33,7  $\mu$ g/L et de 70,5  $\mu$ g/L pour la pédunculagine et la quercusnine A respectivement. Par ailleurs, leur présence et leur teneur n'avaient jamais été décrites auparavant. A titre de comparaison, les principaux ellagitannins ont été identifiés dans le cognac (Glabasnia et Hofmann 2007). A notre connaissance, la vescalagine et la castalagine ont seulement été mesurées en équivalent d'acide gallique (Canas 2017). Par ailleurs, la plupart des articles mentionnent seulement la concentration moyenne des ellagitannins totaux (jusqu'à 127 mg/L) dans les spiritueux (Puech *et al.* 1990 ; Viriot *et al.* 1993).

De façon générale, les teneurs de ces dix composés sont nettement plus élevées dans les eaux-de-vie que dans les vins commerciaux analysés précédemment. Ainsi, ils sont davantage extraits lorsque le pourcentage en alcool augmente, ce qui est cohérent avec les conditions du protocole de purification.

#### 2. Eaux-de-vie millésimes

Les résultats du dosage sont présentés à la Figure 90.

Neuf des dix millésimes analysés possèdent une concentration en syringaldéhyde supérieure à son seuil de détection gustative (9,3 mg/L), représentée en rouge sur le graphique. La concentration moyenne la plus élevée est de 35,03 mg/L pour le millésime 1995. A partir du millésime 2008, les valeurs sont sensiblement les mêmes, suggérant que le composé reste stable au cours du vieillissement en barriques. Ce résultat démontre une contribution sensorielle du syringaldéhyde à la sucrosité de ces eaux-de-vie boisées de Cognac, de façon durable. Les variations de concentration peuvent provenir des écarts liés à l'hétérogénéité du bois de chêne d'une barrique à une autre.

Huit des dix spiritueux analysés possèdent une concentration en acide gallique supérieure à son seuil de détection gustative (29,6 mg/L), représentée en rouge sur le graphique. Plus l'eau-de-vie est âgée, plus la concentration en acide gallique est élevée. Par exemple, une concentration maximale de 99,8 mg/L a été enregistrée pour le millésime 1970 et une concentration de 7,6 mg/L pour le millésime 2015. Ce résultat démontre sa contribution sensorielle à l'amertume de ces eaux-de-vie de Cognac et ce au cours du temps.

De 2015 à 2005, les résultats montrent que plus l'eau-de-vie est vieillie, plus les teneurs en sinapaldéhyde sont élevées. A l'inverse, pour les plus vieux millésimes, des concentrations plus faibles en ce composé ont été mesurées. Cette observation pourrait suggérer une première phase d'extraction du sinapaldéhyde, puis sa dégradation après un long vieillissement en fûts.



**Figure 90 :** Concentrations moyennes (n = 5 de 2015 à 1990 ; n = 4 pour 1973 et 1970) en syringaldéhyde (mg/L), acide gallique (mg/L), sinapaldéhyde (mg/L), Alc-diHDDC (mg/L), composé m/z 539 (mg/L), HDPP-syringarésinol (mg/L), quercusnine A (µg/L), pédunculagine (µg/L), P-WL-1 (µg/L) et P-WL-2 (µg/L) dans dix millésimes d'eaux-de-vie de Cognac de la même distillerie (de gauche à droite et de haut en bas). Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %. Sd : Seuil de détection.

Les teneurs mesurées pour l'Alc-diHDDC sont plus élevées dans les vieux millésimes, jusqu'à atteindre une concentration moyenne de 3,3 mg/L pour le millésime 1970. Ainsi, un élevage long semble favoriser l'extraction de ce composé. Ces résultats concordent avec sa quantification relative obtenue lors de l'approche métabolomique non ciblée décrite à la **partie III**, pour laquelle la même tendance avait été observée.

Pour l'HDPP-syringarésinol, les résultats montrent que plus l'eau-de-vie est vieillie, plus les teneurs en sont élevées. En revanche, à partir de 1995, des concentrations légèrement plus faibles en ce composé ont été mesurées. Cette observation pourrait suggérer une légère dégradation du HDPP-syringarésinol après un long vieillissement en fûts. D'autre part, le vieillissement en fûts usagés implique un potentiel d'extractibilité des composés inférieur à celui des barriques neuves, ce qui pourrait influencer la teneur en HDPP-syringarésinol dans ces eaux-de-vie millésimes.

Par ailleurs, la détermination du seuil gustatif de détection de l'Alc-diHDDC et de l'HDPP-syringarésinol dans cette matrice permettra de préciser leur contribution potentielle au goût sucré des eaux-de-vie.

La cinétique d'extraction du composé m/z 539 semble être rapide puisque ses teneurs augmentent jusqu'en 2008 (2,5 mg/L) puis restent stables jusqu'en 1970 (3,1 mg/L). En fonction des millésimes, de grandes variabilités ont été enregistrées. Ces écarts peuvent être liés à l'hétérogénéité du bois de chêne d'une barrique à une autre. D'autres études devront être menées pour déterminer son seuil gustatif de détection et ainsi connaître sa possible contribution au goût amer des eaux-de-vie.

L'évolution des teneurs observées pour la quercusnine A, de l'ordre de la centaine de  $\mu$ g/L, suit une courbe de Gauss. En effet, des concentrations plus élevées ont été enregistrées jusqu'en 2005 (127  $\mu$ g/L) puis, pour les vieux millésimes, des valeurs plus faibles ont été observées (33,8  $\mu$ g/L pour le millésime 1970). A titre de comparaison, la concentration des principaux ellagitannins dans des eaux-de-vie de Cognac au cours du vieillissement a été décrite dans la littérature (Viriot *et al.* 1993) ; ils se comportent de la même façon que la quercusnine A.

La cinétique d'extraction de la pédunculagine semble être très lente puisqu'elle a été principalement identifiée dans les vieux millésimes, jusqu'à atteindre une concentration maximale de 67,3 µg/L pour le millésime 1970. En fonction des millésimes, de grandes variations ont été enregistrées. Ces écarts peuvent être liés à l'hétérogénéité du bois de chêne

d'une barrique à une autre. Ces résultats pourraient également être dus à des modifications des pratiques de vieillissement de la distillerie ou à des changements dans l'approvisionnement en barriques.

Les précurseurs de la whisky-lactone ont également été identifiés dans ces eaux-de-vie boisées de Cognac. Les concentrations observées sont de l'ordre du  $\mu$ g/L. Les valeurs sont cohérentes avec celles du dosage dans les eaux-de-vie commerciales. En revanche, le vieillissement en barriques, même sur une longue période, ne semble pas affecter leur extraction. Ces composés semblent rester stables au cours du temps, à de faibles concentrations.

## IV. Étude de l'influence des paramètres de tonnellerie

Les dix molécules, présentées dans cette partie, ont toutes été purifiées à partir d'extraits de bois de chêne. Par conséquent, les méthodes de quantification développées précédemment ont été appliquées à cette matrice avant de mesurer l'incidence éventuelle de paramètres liés à la nature et au traitement du bois de chêne sur les teneurs en composés purifiés. Deux paramètres ont été étudiés : l'influence de l'espèce de chêne et l'influence de la température de chauffe sur la composition en ces composés. Tous les résultats de la quantification sont reportés à l'ANNEXE 12.

## A. Origine et préparation des échantillons

Les échantillons de bois de chêne proviennent de la tonnellerie Seguin-Moreau. Leur nature a déjà été décrite lors de l'approche non ciblée au **Chapitre V. II. B. 1. a.** de la partie II. Les 54 échantillons ont été broyés sous forme de poudre puis mis à macérer dans une solution modèle de vin (H<sub>2</sub>O/EtOH : 88/12, 5 g/L d'acide tartrique, pH 3,5) à 50 g/L pendant 48 h. Ils ont ensuite été dilués par cinq et filtrés à 0,45  $\mu$ m avant d'être injectés. Les concentrations ont été exprimées en  $\mu$ g/g de bois sec.

#### **B.** Résultats et discussion

#### 1. Influence de l'espèce de chêne

Pour chaque espèce de chêne, sessile et pédonculé, 27 échantillons ont été préparés puis utilisés pour la quantification des dix composés purifiés. Les résultats du dosage sont présentés à la **Figure 91** pour toutes les molécules, à l'exception des P-WL-1 et P-WL-2 (**Figure 92**). Pour chaque molécule, la concentration moyenne a été considérée, ainsi que l'intervalle de confiance, déterminé à partir de cette dernière.



**Figure 91 :** Concentrations moyennes ( $\mu$ g/g de bois sec, n = 27) en syringaldéhyde, acide gallique, quercusnine A, pédunculagine, composé m/z 539, Alc-diHDDC, HDPP-syringarésinol et sinapaldéhyde pour les échantillons de bois de chêne des espèces sessile et pédonculé (de gauche à droite et de haut en bas). NS : Non Significatif. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %.

Un traitement statistique de Kruskal-Wallis, décrit dans la **partie I**, a été réalisé sur les données obtenues après la quantification des composés purs. L'objectif était de déterminer si une différence significative pouvait être observée entre les deux espèces de chêne. Cependant, les résultats ont montré qu'aucune molécule n'était influencée par l'espèce (*p*-value > 0,05).

Les teneurs en syringaldéhyde varient de 132 à 230  $\mu$ g/g de bois sec pour le chêne sessile et de 168 à 295 pour le chêne pédonculé, ce qui rejoint des résultats de la littérature (Brígida Fernández de Simón *et al.* 2010 ; Brígida Fernández de Simón, Sanz, *et al.* 2014). Pour l'acide gallique, les teneurs moyennes mesurées sont respectivement de 347 et de 338  $\mu$ g/g de bois sec pour le chêne sessile et le chêne pédonculé. Ces valeurs coïncident également avec celles publiées dans la littérature (Garcia *et al.* 2012 ; Brígida Fernández de Simón *et al.* 2006). Par ailleurs, d'une barrique à une autre, de faibles écarts de teneurs en ces composés ont été observés, ce qui semble suggérer une certaine homogénéité de composition du bois de chêne pour ces deux composés. Ainsi, les variations des teneurs en ces composés observées précédemment dans les 10 millésimes d'eaux-de-vie de Cognac pourraient être davantage dues à des modifications des pratiques de vieillissement de la distillerie ou à des changements dans l'approvisionnement en barriques.

Des concentrations plus élevées ont été mesurées pour le sinapaldéhyde, jusqu'à 1167 µg/g de bois sec, et sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature (Garcia *et al.* 2012).

Les concentrations mesurées pour les deux ellagitannins sont quasiment similaires. En effet, elles varient de 31 à 197  $\mu$ g/g de bois sec pour la pédunculagine et de 42 à 204  $\mu$ g/g de bois sec pour la quercusnine A. A titre de comparaison, les concentrations des principaux ellagitannins, la vescalagine et la castalagine, sont respectivement aux alentours de 1,5 et 3,5 mg/g de bois sec (Glabasnia et Hofmann 2006). Ainsi, la pédunculagine et la quercusnine A sont présents en quantités bien inférieures. A notre connaissance, la quercusnine A n'avait jamais été identifiée dans le chêne sessile ni dans le chêne pédonculé. La pédunculagine avait déjà été identifiée dans le genre *Quercus* (Scalbert, Monties et Favre 1988), mais n'avait jamais été quantifiée dans celui-ci. Malgré des teneurs moyennes plus élevées dans le chêne pédonculé (130,2  $\mu$ g/g de bois sec pour la pédunculagine et 134,9  $\mu$ g/g pour la quercusnine A) que dans le chêne sessile (64,2  $\mu$ g/g pour la pédunculagine et 86,6  $\mu$ g/g pour la quercusnine A), les différences ne sont pas significatives, en raison de la forte disparité inter-individuelle au sein de chaque espèce. Ces résultats rejoignent en ce sens ceux-déjà observés précédemment pour d'autres ellagitannins (Prida *et al.* 2006). En outre, ces résultats sont également cohérents avec

les variations de teneurs en ces composés observées précédemment dans les 10 millésimes d'eaux-de-vie de Cognac.

Les teneurs moyennes mesurées pour l'Alc-diHDDC ( $34 \mu g/g$  de bois sec pour le chêne sessile et  $30 \mu g/g$  de bois sec pour le chêne pédonculé) et l'HDPP-Syringarésinol ( $17 \mu g/g$  de bois sec pour les deux espèces) n'avaient jamais été établies dans le bois de chêne et ne peuvent donc être comparées à des travaux antérieurs. Le composé m/z 539 a également été dosé dans le bois de chêne. Les concentrations moyennes obtenues sont de 82 et 70  $\mu g/g$  de bois sec respectivement pour les chênes sessile et pédonculé. Puisque sa structure n'a pas été clairement élucidée, aucune comparaison n'a pu être faite avec la littérature.

Les précurseurs de la whisky-lactone (P-WL-1 et P-WL-2) ont également été dosés dans ces échantillons (Figure 92). Les résultats ont montré que ces composés ont été extraits seulement à partir du chêne sessile avec une macération à 12 % d'alcool. Or, lors du criblage des extraits de bois de chêne en vue de leur purification, au chapitre III de la partie II, leur présence dans le bois de chêne pédonculé avait été montrée. Pour vérifier ces observations, une nouvelle macération des échantillons a été réalisée, mais avec une solution à 50 % d'alcool. Après analyse en LC-HRMS, les résultats ont prouvé que ces composés étaient davantage extraits dans une solution plus riche en éthanol. Ainsi, les deux précurseurs ont pu être quantifiés à une concentration moyenne de 25,6 µg/g de bois sec pour le P-WL-1 et de 20,6  $\mu g/g$  pour le P-WL-2 dans le chêne sessile et à des concentrations de 2,9  $\mu g/g$  et de 4,0  $\mu g/g$ dans le chêne pédonculé. La Figure 92 présente les concentrations obtenues pour chaque macération et pour chaque molécule en fonction des deux espèces de chêne. Avec une macération de 50 %, une forte disparité d'un échantillon à un autre a été observée pour les deux espèces de chêne. Ainsi, ils ne sont pas significativement différents l'un de l'autre malgré des écarts importants des teneurs moyennes. D'autres macérations de ces extraits de bois devront être réalisées pour valider ces résultats. En revanche, à une macération de 12 %, les écarts de teneurs entre le chêne pédonculé et le chêne sessile sont significatifs au risque de 0,1 %. Cette observation peut être reliée aux teneurs significativement plus élevées de la whisky-lactone dans le bois de chêne sessile (Prida et Puech 2006).

Par rapport aux autres composés, les P-WL-1 et P-WL-2 sont présents dans le bois de chêne en quantités plus faibles, avec des concentrations moyennes respectivement de 2,6 et de 5,7  $\mu$ g/g de bois sec. Leur teneur n'avait jamais été décrite auparavant.



**Figure 92 :** Concentrations moyennes ( $\mu$ g/g de bois sec, n = 27) en P-WL-1 et P-WL-2 pour les échantillons de bois de chêne des espèces sessile et pédonculé, avec une macération réalisée à 12 % d'alcool (à gauche) et à 50 % d'alcool (à droite). Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %. NS : Non Significatif ; Significatif au risque de 0,1 % (\*\*\*).

## 2. Influence de la température de chauffe

Pour chaque modalité de chauffe (BNC, BCN et BCF), 9 réplicats ont été préparés, et ce pour chaque espèce de chêne. Ainsi, 27 échantillons d'extraits de bois de chêne sessile et 27 échantillons d'extraits de bois de chêne pédonculé ont été utilisés pour la quantification des dix composés purifiés. Les résultats du dosage sont présentés à la **Figure 93** pour toutes les molécules, à l'exception des P-WL-1 et P-WL-2 (**Figure 94**). Pour chaque composé et chaque modalité, la concentration moyenne a été utilisée, ainsi que l'intervalle de confiance, déterminé à partir de cette dernière.

Après le dosage de ces échantillons, un test de Kruskal-Wallis avec la procédure de Dunn, décrit dans la **partie I**, a été effectué. Les résultats ont montré une influence significative de la température de chauffe pour toutes les molécules (*p-value* < 0,05). Le test de Dunn a permis de classer les modalités en plusieurs groupes pour chaque molécule. Pour chaque composé, l'effet de la chauffe suit la même tendance que ce soit pour le chêne sessile ou pour le chêne pédonculé. La **Figure 93** présente seulement les résultats obtenus pour le chêne sessile.

Les analyses ont montré que les teneurs en syringaldéhyde augmentent significativement au cours de la chauffe, au seuil de 0,1 %. En effet, la modalité non chauffée (BNC), groupe « a », est différenciée des deux autres chauffes groupe « b » (BCN) et groupe « c » (BCF). Ces résultats confirment de précédentes études (Garcia *et al.* 2012 ; Sanz *et al.* 2010 ; Chatonnet, Boidron et Pons 1989).



Figure 93 : Concentrations moyennes ( $\mu g/g$  de bois sec, n = 9) en syringaldéhyde, sinapaldéhyde, HDPP-syringarésinol, acide gallique, Alc-diHDDC, composé m/z 539, quercusnine A et pédunculagine pour les extraits de bois de chêne sessile avec trois types de chauffes (de gauche à droite et de haut en bas). « a », « b » et « c » représentent des groupes statistiques. Les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %. L'effet de la chauffe est significatif au risque de 0,1 % (\*\*\*).

Les teneurs en sinapaldéhyde augmentaient également au cours de la chauffe, au seuil de 0,1 %. En revanche, aucun écart significatif n'a été enregistré entre la modalité chauffe normale (BCN) et la modalité chauffe forte (BCF). Ces observations ont déjà été décrites dans la littérature (Sanz *et al.* 2010).

A l'inverse, les teneurs en acide gallique diminuaient significativement entre la chauffe « normale » et la chauffe « forte », au seuil de 0,1 %. En outre, aucune différence significative n'a été observée entre le bois « non chauffé » et chauffe « normale ». Ces observations ont également été décrites dans la littérature (Sanz *et al.* 2010).

Pour les deux ellagitannins, la même tendance a été observée. En effet, leurs concentrations diminuent avec la chauffe. La modalité non chauffée (BNC), groupe « a », est différenciée des deux autres chauffes groupe « b », au seuil de 1 % avec le BCN et de 0,1 % avec le BCF. Les résultats obtenus confirment ceux observés dans l'approche métabolomique non ciblée au **Chapitre V** de la **Partie II**. A titre de comparaison, les concentrations des principaux ellagitannins, comme la vescalagine et la castalagine, diminuent également au cours de la chauffe du bois (Glabasnia et Hofmann 2007 ; Sanz *et al.* 2010).

Les teneurs en Alc-diHDDC diminuent significativement entre le BCN et le BCF, au seuil de 0,1 %. En outre, aucune différence significative n'a été observée entre le BNC et le BCN.

Les teneurs en HDPP-syringarésinol augmentent significativement entre le BNC et le BCN, au seuil de 0,1 %. En outre, une chauffe poussée n'augmente pas sa concentration. Les résultats obtenus varient légèrement par rapport à la quantification relative de l'approche métabolomique non ciblée présentée au **Chapitre V** de la **Partie II**. En effet, trois groupes avaient été distingués au lieu de deux ici.

Pour le composé m/z 539, les teneurs diminuent significativement entre le BCN (89,4 ± 31,8 µg/g de bois sec) et le BCF (19,2 ± 7,2 µg/g de bois sec), au seuil de 1 % ; les écarts de concentrations moyennes entre le BNC (137,9 ± 54,1 µg/g de bois sec) et le BCN (89,4 ± 31,8 µg/g de bois sec) semblent traduire un effet de la chauffe. Or, le test de Kruskal-Wallis, n'a pas distingué significativement ces deux chauffes, avec une *p*-value égale à 0,41. Cela pourrait provenir d'un artéfact, lié à de très grands écarts individuels d'une barrique à une autre pour chaque modalité de chauffe. Les intervalles de confiance, présentés sur la figure, sont très importants et suggèrent une forte disparité inter-individuelle au sein de l'espèce. Le dosage de ce composé pourra être réalisé avec un plus grand nombre d'extraits de bois de chêne afin de

valider les tendances obtenues. Les résultats obtenus sont tout de même en accord avec ceux obtenus au **Chapitre 5 de la Partie II.** En revanche, puisque sa structure n'a pas été clairement élucidée, aucune comparaison n'a pu être faite avec la littérature.

Les P-WL-1 et P-WL-2 ont également été dosés dans cette série d'échantillons (**Figure 94**). Ils ont été observés seulement dans le chêne sessile pour la macération à 12 % d'alcool, comme expliqué à la partie précédente, et dans les deux espèces pour la macération à 50 % d'alcool. Pour cette dernière, seulement un échantillon de chaque modalité de chauffe a été réalisé pour chaque espèce puis quantifié. Le test de Kruskal-Wallis n'a donc pas été appliqué à ces échantillons ; des groupes de significativité n'ont pu être attribués. En revanche, cette macération à 50 % d'alc. permet d'observer les évolutions de ces composés en fonction de la chauffe. Les mêmes tendances ont été notées pour les deux composés. Pour les deux espèces de chêne, une chauffe poussée semble diminuer significativement les teneurs en P-WL-1 et en P-WL-2, au seuil de 1 %. En revanche, pour la macération à 12 % d'alcool, aucune différence n'est perçue entre le BNC et BCN, avec des *p-value* égales à 0,07 pour le P-WL-1 et à 0,18 pour le P-WL-2. Pour la macération à 50 % d'alcool, les trois chauffes semblent influencer les teneurs en ces composés. Par ailleurs, cette quantification absolue coïncide avec la quantification relative réalisée au **Chapitre V de la Partie II**.

A titre de comparaison, les teneurs en précurseurs de la whisky lactone, déjà identifiés dans la littérature (Masson *et al.* 2000 ; Tanaka et Kouno 1996 ; Wilkinson *et al.* 2004), semblent évoluer de la même façon que les P-WL-1 et P-WL-2 en fonction de la chauffe. En effet, Wilkinson *et al.* les ont quantifié dans des extraits de bois à différentes températures et ont remarqué une dégradation thermique de ces composés à partir d'une chauffe réalisée à 200 °C pendant 30 minutes (Wilkinson, Prida et Hayasaka 2013). La chauffe BCF correspond à ce dernier paramètre, mais avec un temps de chauffe plus long. A l'inverse, les concentrations en *cis*- et *trans*-whiskylactone augmentent notablement avec la chauffe du bois (Chatonnet, Boidron et Pons 1989 ; Doussot *et al.* 2002). Il a été démontré que la whiskylactone pouvait être produite par ses précurseurs lors de la chauffe des douelles, pendant laquelle la température et la durée de chauffe jouent un rôle primordial (Wilkinson, Prida et Hayasaka 2013). Ainsi, il est tout à fait envisageable que les P-WL-1 et P-WL-2 se comportent de la même façon ; ces précurseurs pourraient libérer de la whiskylactone lors de leur dégradation pendant la chauffe des douelles.



**Figure 94 :** Concentrations moyennes ( $\mu$ g/g de bois sec) en P-WL-1 et P-WL-2 pour les échantillons de bois de chêne sessile (macération à 12 % d'alcool, en haut) et pour les échantillons de bois de chêne sessile et pédonculé (macération à 50 % d'alcool, en bas). « a » et « b » représentent des groupes. Pour la macération à 12 % d'alc., les barres d'erreurs indiquent un intervalle de confiance de 95 %. Pour la macération à 50 % d'alc., les barres d'erreurs d'erreurs indiquent la précision de la méthode. L'effet de la chauffe est significatif au risque de 0,1 % (\*\*\*).

Suite à l'étude de deux paramètres de tonnellerie, des différences significatives ont été constatées en fonction des molécules. Le contrôle de la chauffe notamment semble être un élément pertinent pour moduler l'apport de certains composés et modifier l'équilibre gustatif des vins et des eaux-de-vie.

### Conclusion Partie IV

Dans un premier temps, les seuils de détection gustative du syringaldéhyde, pour son goût sucré, et de l'acide gallique, pour son amertume, ont été déterminés dans un vin blanc non boisé (respectivement 19,2 mg/L et 33,4 mg/L) et une eau-de-vie blanche (respectivement 9,3 mg/L et 29,6 mg/L). Les résultats ont montré que le seuil du syringaldéhyde était influencé par la matrice, contrairement à celui de l'acide gallique.

Dans un second temps, deux méthodes de quantification par LC-HRMS ont été développées et validées. Tout d'abord, la contribution gustative du syringaldéhyde et de l'acide gallique dans les vins et les eaux-de-vie a été étudiée. Il a été montré que l'acide gallique confère de l'amertume à la plupart des vins rouges et des eaux-de-vie analysés. Le syringaldéhyde, quant à lui, contribue au goût sucré des eaux-de-vie, et ce de façon durable. Puis, des dosages ont été réalisés, pour huit molécules purifiées lors des parties II et III : le sinapaldéhyde, la pédunculagine, la quercusnine A, les précurseurs de la whisky lactone (P-WL-1 et P-WL-2), l'HDPP-syringarésinol, l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle (Alc-diHDDC) et le composé m/z 539, dans des vins, des eaux-de-vie et des extraits de bois de chêne.

Parmi les composés de cette partie, quatre ont été identifiés et quantifiés dans des vins blancs et rouges, dont deux pour la première fois (HDPP-syringarésinol et Alc-diHDDC). Les dix composés purs ont été identifiés et quantifiés dans divers spiritueux, dont sept pour la première fois (pédunculagine, quercusnine A, P-WL-1, P-WL-2, HDPP-syringarésinol, Alc-diHDDC et le composé m/z 539).

Dans la poursuite de ce travail, les seuils de détection gustative, de l'HDPPsyringarésinol et de l'Alc-diHDDC dans les vins et les eaux-de-vie et du composé m/z 539 dans les eaux-de-vie, devront été déterminés afin d'établir leur réelle contribution sensorielle dans ces matrices.

Par ailleurs, le contrôle de la chauffe a semblé être un élément pertinent pour moduler l'apport de certains composés et donc de modifier l'équilibre gustatif des vins et des eaux-devie. En outre, l'effet de la température sur l'HDPP-syringarésinol, Alc-diHDDC, la pédunculagine, la quercusnine A et les deux précurseurs de la whisky lactone n'avait pas encore été étudié.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

La recherche en œnologie vise notamment à caractériser les déterminants moléculaires à l'origine de la construction de l'image sensorielle des vins et des eaux-de-vie dans la tête du dégustateur. L'élevage sous bois est une étape clé de leur élaboration, modifiant leur expression aromatique et influençant leur saveur. La composition des vins et spiritueux élevés en barriques est en effet modulée par l'extraction de composés du bois et différentes réactions physicochimiques en partie liées à la dissolution d'oxygène. Si les principaux composés volatils libérés par le bois de chêne ont été identifiés, les déterminants moléculaires des saveurs amères et sucrées demeurent, dans une large mesure, inconnus. Leur identification constitue un préalable à la maîtrise des paramètres du vieillissement affectant le goût des vins et des eaux-de-vie élevés en fûts de chêne.

Le premier axe de ce travail a consisté à apporter de nouvelles connaissances sur des familles de molécules déjà identifiées dans le bois de chêne : les lignanes et les coumarines. Dans un premier temps, le seuil de détection gustative du (±)-lyonirésinol a été évalué dans une eau-de-vie blanche et établi à 2,6 mg/L. Après le développement et la validation d'une méthode par LC-HRMS, une influence significative de ce composé sur l'amertume des spiritueux a été démontrée. L'étude des paramètres œnologiques a permis d'établir que l'essence ainsi que le type de grain du bois pouvaient avoir un effet important sur les teneurs en lyonirésinol. Dans un second temps, l'utilisation d'un criblage par LC-HRMS d'un extrait de bois de chêne a permis de mettre en évidence six coumarines. Leur étude sensorielle a établi l'amertume de cinq de ces composés. Les seuils gustatifs de détection de la scopolétine, l'esculétine et la 4méthylombelliférone, notées comme les plus intenses, ont été déterminés, dans un vin blanc et une eau-de-vie blanche, de l'ordre de la centaine de µg/L. La confrontation des données sensorielles et quantitatives a permis de montrer que ces trois coumarines ne contribuaient pas, individuellement, à l'amertume des vins et des eaux-de-vie. En revanche, des analyses sensorielles complémentaires ont mis en évidence le rôle des six coumarines en mélange dans l'amertume des deux matrices de l'étude, via des effets de synergie. Le dosage a permis de mettre en évidence un effet significatif de l'origine botanique et/ou de l'intensité de la chauffe du bois sur les concentrations de certaines coumarines. Le contrôle de ces paramètres vise à moduler l'apport des coumarines et à maîtriser davantage la contribution amère de l'élevage en fûts.

Ce travail sur l'amertume des lignanes et des coumarines s'inscrit dans le prolongement des recherches effectuées au laboratoire depuis quelques années sur l'effet gustatif du bois de chêne. Toutefois, ces composés à eux seuls ne peuvent expliquer l'importance gustative de l'élevage en barriques. Un grand nombre de molécules sapides non volatiles libérées par le bois de chêne restent vraisemblablement à identifier. Le second axe de ce travail visait à en isoler certaines. La sensation de sucrosité conférée au vin par la chauffe des douelles lors de la fabrication des barriques a tout d'abord été étudiée, ce qui a permis de confirmer et d'interpréter des observations empiriques. Afin de donner un éclairage moléculaire à ces phénomènes sensoriels, une approche inductive a été adoptée. Un protocole de fractionnement et de purification d'extraits de bois de chêne guidé par la gustatométrie a été développé. Plusieurs fractions possédant un goût amer et/ou sucré ont été mises en évidence et onze molécules sapides ont été purifiées, ce qui démontre l'intérêt de la démarche utilisée. Leur identification a été réalisée par HRMS et RMN. Les structures de l'HDPP-syringarésinol et de deux précurseurs de la whisky-lactone (P-WL-1 et P-WL-2) n'avaient jamais été décrites. Six composés avaient déjà été identifiés dans le genre Quercus. A l'exception de l'acide gallique, le goût des composés purifiés n'avait jamais été mentionné dans la littérature. Par ailleurs, la structure de deux molécules amères, les m/z 639-3 et m/z 539, n'a pu être élucidée de façon formelle, faute de données RMN suffisamment robustes. Des hypothèses de structure ont seulement pu être émises. D'autres études devront être menées pour vérifier les conjectures formulées.

En parallèles de la sélection des fractions par gustatométrie, désormais classique au laboratoire, des approches méthodologiques complémentaires ont également été développées. Une stratégie de détection de ces fractions par mesure de l'activation des récepteurs à l'amertume a notamment été proposée pour tenter de pallier les phénomènes de masquage intervenant lors de la dégustation. Cette approche originale a été mise en œuvre en collaboration avec l'équipe du Dr Loïc Briand, au CSGA de Dijon. Cinq récepteurs (les Tas2R4, Tas2R7, Tas2R16, Tas2R38 et Tas2R43) sur les vingt-cinq ont eu une réponse en amplitude au contact d'un extrait de bois. L'étude a ensuite été limitée au récepteur Tas2R7. Il a été démontré que celui-ci était activé, de façon plus ou moins intense, par certaines fractions de bois. Ce nouveau développement ouvre des perspectives quant à la recherche de composés amers dans des matrices complexes. Parallèlement, une approche par analyse différentielle non-ciblée d'extraits de bois de chêne a été discutée, en vue de la recherche de nouveaux composés dont la teneur est significativement influencée par un paramètre, comme la chauffe du bois dans le

cas présent. Cette analyse globale a notamment permis de montrer que l'effet chauffe était plus marqué que l'effet espèce pour plus de la moitié des composés sélectionnés après le traitement par MZmine. Elle a également permis de pointer certains composés fortement affectés par la chauffe du bois, ce qui permettrait d'orienter leur purification.

Le troisième axe de ce travail visait à appliquer cette nouvelle approche métabolomique non ciblée à plusieurs eaux-de-vie boisées de Cognac, en vue de la caractérisation et la purification de nouvelles molécules potentiellement sapides. Un plus grand nombre de composés a été observé par rapport aux extraits de bois de chêne, ce qui a confirmé la présence de molécules néoformées dans les spiritueux. Après ces observations, un protocole de fractionnement a permis d'isoler deux molécules. Ainsi, l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle (Alc-diHDDC) a été identifié et purifié à partir d'extraits de bois de chêne ; sa présence dans cette matrice ainsi que dans l'eau-de-vie n'avait jamais été décrite, de même que son goût sucré. Puis, le composé m/z 703 a été purifié à partir d'une eau-de-vie élevée depuis 20 ans. Il s'agirait possiblement d'un ellagitannin, absent des extraits de bois de chêne et formé pendant l'élevage en barriques. Les données RMN devront valider cette hypothèse.

La dernière partie de cette thèse visait à quantifier dix molécules, purifiées au cours de ce travail, dans des extraits de bois de chêne, des vins et des spiritueux. Les seuils gustatifs de détection de l'acide gallique et du syringaldéhyde dans les vins et les eaux-de-vie ont été établis, ce qui a permis de discuter de leur incidence sensorielle. L'acide gallique contribue à l'amertume de la plupart des vins rouges et des spiritueux analysés. En outre, le syringaldéhyde participe de façon durable au goût sucré des eaux-de-vie. La pédunculagine, la quercusnine A, le composé m/z 539, les P-WL-1 et P-WL-2 n'avaient jamais été mentionnés dans des spiritueux. De la même façon, l'HDPP-syringarésinol et l'Alc-diHDDC n'avaient jamais été identifiés, à la fois dans les spiritueux mais aussi dans les vins. Aucun effet significatif de l'origine botanique n'a été observé pour ces composés à l'inverse de la température de chauffe. En outre, en fonction des molécules, des teneurs variables ont été obtenues entre différents échantillons de la même espèce. L'origine de ces écarts devra faire l'objet d'études ultérieures afin de mieux maîtriser la contribution de ces composés à l'élevage sous bois. Pour la suite de l'étude, une nouvelle dégustation des composés purs, en prenant en compte leur teneur dans les vins et les eaux-de-vie, devra être réalisée pour confirmer leur goût. Puis la détermination de leur seuil de détection gustative, nécessitant de grandes quantités de composé pur, permettra d'établir leur réelle contribution sensorielle.

Ce travail de thèse visait à poursuivre la caractérisation des composés sapides libérés par le bois de chêne, tant dans les vins que dans les eaux-de-vie de Cognac. Les modifications gustatives induites par la chauffe du bois ont été plus particulièrement étudiées. Au-delà d'approfondir les connaissances sur les propriétés sensorielles de composés déjà connus, cette thèse a conduit à l'identification de nouveaux marqueurs sapides, à partir d'extraits de bois de chêne et d'eaux-de-vie boisées de Cognac. Cependant il sera nécessaire de poursuivre ces travaux, car la compréhension moléculaire des équilibres gustatifs des vins et des eaux-de-vie n'est encore que partielle. En premier lieu, il conviendra de caractériser structuralement et sensoriellement les composés m/z 639-3, 539 et 703.

Cette thèse ouvre diverses perspectives d'applications pratiques, et notamment l'étude de l'influence des paramètres de tonnellerie sur la teneur en composés sapides. Ces travaux possèdent une visée pratique et, à terme, devront permettre de transmettre des préconisations aux viticulteurs et aux tonneliers.

D'un point de vue plus académique, les résultats préliminaires obtenus avec le criblage des fractions par mesure de l'activation de récepteurs gustatifs et les approches différentielles non ciblées, ouvrent de nombreuses perspectives de recherche. Ces développements pourront être utilisés de façon complémentaire à l'approche inductive, classiquement employée au laboratoire, afin de repérer des molécules affectées par des facteurs œnologiques définis. Par exemple, des composés, formés par la chauffe ou formés au cours de l'élevage en barriques dans les vins et les eaux-de-vie, pourront être repérés grâce au traitement statistique, purifiés après la mise en place d'un protocole de fractionnement, puis dégustés afin de les caractériser sensoriellement.

Une autre approche, plus déductive, pourrait également être employée. Celle-ci fait appel à la modélisation moléculaire et consiste à calculer l'orientation préférée d'une molécule vers un second édifice, afin de former un complexe stable. En effet, des chercheurs ont mis au point des modèles de prédiction *in silico* pour la recherche de nouveaux composés sucrés. Il serait également intéressant de préciser les modes de fixation des composés sapides du vin et des eaux-de-vie sur les récepteurs gustatifs. Ainsi, ce modèle pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre les composés et ces récepteurs, mais également de mieux comprendre les phénomènes de synergie et de masquage contribuant à l'équilibre gustatif des vins et des eaux-de-vie.

284

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

# A

- ABE K., 2008, « Studies on Taste: Molecular Biology and Food Science », *Bioscience*, *Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 72, nº 7, p. 1647-1656.
- ADLER E., HOON M. A., MUELLER K. L., CHANDRASHEKAR J., RYBA N. J.P et ZUKER C. S., 2000, « A Novel Family of Mammalian Taste Receptors », *Cell*, vol. 100, n° 6, p. 693-702.
- ALLARD P.-M., GENTA-JOUVE G. et WOLFENDER J.-L., 2017, « Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification », *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 36, p. 40-49.
- ALLARD P.-M., PÉRESSE T., BISSON J., GINDRO K., MARCOURT L., PHAM V. C., ROUSSI F., LITAUDON M. et WOLFENDER J.-L., 2016, « Integration of Molecular Networking and *In-Silico* MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication », *Analytical Chemistry*, vol. 88, nº 6, p. 3317-3323.
- ALONSO-SALCES R. M., BARRANCO A., ABAD B., BERRUETA L. A., GALLO B. et VICENTE F., 2004, « Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Cultivars and Their Technological Properties », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, n° 10, p. 2938-2952.
- ARBULU M., SAMPEDRO M. C., GÓMEZ-CABALLERO A., GOICOLEA M. A. et BARRIO R. J., 2015, « Untargeted metabolomic analysis using liquid chromatography quadrupole time-offlight mass spectrometry for non-volatile profiling of wines », *Analytica Chimica Acta*, vol. 858, p. 32-41.
- ARRAMON G., SAUCIER C., COLOMBANI D. et GLORIES Y., 2002, « Identification of triterpene saponins in Quercus robur L. and Q. petraea Liebl. heartwood by LC-ESI/MS and NMR », *Phytochemical Analysis*, vol. 13, n° 6, p. 305-310.
- 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, Bordeaux 2.
- ARVISENET G., GUICHARD E. et BALLESTER J., 2016, « Taste-aroma interaction in model wines: Effect of training and expertise », *Food Quality and Preference*, vol. 52, p. 211-221.
- ATTA-UR-R., SHABBIR M., ZIAUDDIN SULTANI S., JABBAR A. et IQBAL CHOUDHARY M., 1997, « Cinnamates and coumarins from the leaves of Murraya paniculata », *Phytochemistry*, vol. 44, n° 4, p. 683-685.
- AYRES D. C. et LOIKE J. D., 1990, *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*, Cambridge University Press, 428 p.

# B

- BABA K., TAKEUCHI K., HAMASAKI F. et KOZAWA M., 1986, « Chemical Studies on the Constituents of the Thymelaeaceous Plants. I. : Structures of Two New Flavans from Daphne odora THUNB. », *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 34, nº 2, p. 595-602.
- BAEK N.-I., CHUNG M.-S., SHAMON L., KARDONO L.B. S., TSAURI S., PADMAWINATA K., PEZZUTO J. M., SOEJARTO D. D.et KINGHORN A. D., 1993, « Selligueain A, a Novel Highly Sweet Proanthocyanidin from the Rhizomes of Selliguea feei », *Journal of Natural Products*, vol. 56, nº 9, p. 1532-1538.

- BAJEC M. R. et PICKERING G. J., 2008, « Astringency: Mechanisms and Perception », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 48, nº 9, p. 858-875.
- BALDWIN S., BLACK R. A., ANDREASEN A. A. et ADAMS S. L., 1967, « Aromatic congener formation in maturation of alcoholic distillates », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 15, n° 3, p. 381-385.
- BARNABA C., DELLACASSA E., NICOLINI G., NARDIN T., MALACARNE M. et LARCHER R., 2015, « Identification and quantification of 56 targeted phenols in wines, spirits, and vinegars by online solid-phase extraction – ultrahigh-performance liquid chromatography – quadrupole-orbitrap mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, vol. 1423, p. 124-135.
- BARTOSHUK L. M., 2000, « Comparing Sensory Experiences Across Individuals: Recent Psychophysical Advances Illuminate Genetic Variation in Taste Perception », *Chemical Senses*, vol. 25, n° 4, p. 447-460.
- BARTOSHUK L. M., DUFFY V. B. et MILLER I. J., 1994, « PTC/PROP tasting: Anatomy, psychophysics, and sex effects », *Physiology & Behavior*, vol. 56, nº 6, p. 1165-1171.
- BARUA A. D., PAL Sk et DUTTA Sp, 1972, « Triterpenoids. The constitution of barrinic acid–a new triterpene acid from Barringtonia acutangula Gaertn ».
- BASSOLI A., BORGONOVO G., DREW M. G. B. et MERLINI L., 2000, « Enantiodifferentiation in taste perception of isovanillic derivatives », *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 11, n° 15, p. 3177-3186.
- BEHRENS M., BRIAND L., DE MARCH C. A, MATSUNAMI H., YAMASHITA A., MEYERHOF W. et WEYAND S., 2018, « Structure–Function Relationships of Olfactory and Taste Receptors », *Chemical Senses*, vol. 43, nº 2, p. 81-87.
- BEHRENS M., BROCKHOFF A., KUHN C., BUFE B., WINNIG M. et MEYERHOF W., 2004, « The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 319, n° 2, p. 479-485.
- BEHRENS M., MEYERHOF W., HELLFRITSCH C. et HOFMANN T., 2011, « Sweet and Umami Taste: Natural Products, Their Chemosensory Targets, and Beyond », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, n° 10, p. 2220-2242.
- BEIER R. C. et OERTLI E. H., 1983, « Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery », *Phytochemistry*, vol. 22, nº 11, p. 2595-2597.
- BELL L., OLOYEDE O. O., LIGNOU S., WAGSTAFF C.et METHVEN L., 2018, « Taste and Flavor Perceptions of Glucosinolates, Isothiocyanates, and Related Compounds », *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 62, nº 18, p. 1700990.
- BELLOIR C., SAVISTCHENKO J., NEIERS F., TAYLOR A. J., MCGRANE S. et BRIAND L., 2017, « Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in Escherichia coli », *PLOS ONE*, vol. 12, nº 10, p. 1-19.
- BELMIRO T. M. C., PEREIRA C. F. et PAIM A. P. S., 2017, « Red wines from South America: Content of phenolic compounds and chemometric distinction by origin », *Microchemical Journal*, vol. 133, p. 114-120.
- BENJAMINI Y. et HOCHBERG Y., 1995, « Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing », *Journal of the Royal Statistical Society*. *Series B (Methodological)*, vol. 57, n° 1, p. 289-300.
- BESNARD P., PASSILLY-DEGRACE P. et KHAN N. A., 2016, « Taste of Fat: A Sixth Taste Modality? », *Physiological Reviews*, vol. 96, nº 1, p. 151-176.
- BHANDARI S., JO J. et LEE J., 2015, « Comparison of Glucosinolate Profiles in Different Tissues of Nine Brassica Crops », *Molecules*, 31, vol. 20, nº 9, p. 15827-15841.

- BI H., XI M., ZHANG R., WANG C., QIAO L. et XIE J., 2018, « Electrostatic Spray Ionization-Mass Spectrometry for Direct and Fast Wine Characterization », *ACS Omega*, vol. 3, n° 12, p. 17881-17887.
- BISSON J., 2012, Développements méthodologiques en chromatographie de partage: application aux stilbénoïdes, thèse, Bordeaux 2.
- DE-LA-FUENTE-BLANCO A., SÁENZ-NAVAJAS M.-P. et FERREIRA V., 2016, « On the effects of higher alcohols on red wine aroma », *Food Chemistry*, vol. 210, p. 107-114.
- BLAŽENOVIĆ I., KIND T., JI J. et FIEHN O., 2018, « Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics », *Metabolites*, vol. 8, n° 2.
- BÖCKER S., LETZEL M. C., LIPTÁK Z. et PERVUKHIN A., 2009, « SIRIUS: decomposing isotope patterns for metabolite identification<sup>†</sup> », *Bioinformatics*, vol. 25, nº 2, p. 218-224.
- BORGES G. et CROZIER A., 2012, « HPLC–PDA–MS fingerprinting to assess the authenticity of pomegranate beverages », *Food Chemistry*, vol. 135, nº 3, p. 1863-1867.
- BORN S., LEVIT A., NIV M. Y., MEYERHOF W. et BEHRENS M., 2013, « The Human Bitter Taste Receptor TAS2R10 Is Tailored to Accommodate Numerous Diverse Ligands », *Journal* of Neuroscience, vol. 33, nº 1, p. 201-213.
- BOUDAH S., ROUX A.et JUNOT C., 2012, « Analyse métabolomique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution : état des lieux et perspectives », *Spectra Analyse*, nº 284, p. 52-68.
- BOURGAUD F., HEHN A., LARBAT R., DOERPER S., GONTIER E., KELLNER S. et MATERN U., 2006, « Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes », *Phytochemistry Reviews*, vol. 5, n° 2-3, p. 293-308.
- BOWERS J. J., GUNAWARDENA H. P., CORNU A., NARVEKAR A. S., RICHIEU A., DEFFIEUX D., QUIDEAU S. et THARAYIL N., 2018, « Rapid Screening of Ellagitannins in Natural Sources via Targeted Reporter Ion Triggered Tandem Mass Spectrometry », *Scientific Reports*, 10, vol. 8, nº 1, p. 10399.
- BRESLIN P. a. S., GILMORE M. M., BEAUCHAMP G. K. et GREEN B. G., 1993, « Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation », *Chemical Senses*, vol. 18, n° 4, p. 405-417.
- BRILLAT-SAVARIN J. A., 1825, La physiologie du goût.
- BROCKHOFF A., BEHRENS M., MASSAROTTI A., APPENDINO G. et MEYERHOF W., 2007, «Broad Tuning of the Human Bitter Taste Receptor hTAS2R46 to Various Sesquiterpene Lactones, Clerodane and Labdane Diterpenoids, Strychnine, and Denatonium », *Journal* of Agricultural and Food Chemistry, vol. 55, nº 15, p. 6236-6243.
- BUFFETEAU T., CAVAGNAT D., BOUCHET A. et BROTIN T., 2007, « Vibrational Absorption and Circular Dichroism Studies of (–)-Camphanic Acid », *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 111, nº 6, p. 1045-1051.
- BUGLASS A. J., 2015, « Chemical Composition of Beverages and Drinks » dans Peter Chi Keung Cheung et Bhavbhuti M. Mehta (eds.), *Handbook of Food Chemistry*, Berlin, Heidelberg, p. 225-300.
- BURDOCK G. A. et FENAROLI G., 2005, *Fenaroli's handbook of flavor ingredients: George A. Burdock*, 5eme ed., Boca Raton, CRC Press.

## C

CABRAL R. S., ALLARD P.-M., MARCOURT L., YOUNG M. C. M., QUEIROZ E. F. et WOLFENDER J.-L., 2016, « Targeted Isolation of Indolopyridoquinazoline Alkaloids from Conchocarpus fontanesianus Based on Molecular Networks », *Journal of Natural Products*, 23, vol. 79, nº 9, p. 2270-2278.

- CADAHÍA E., MUÑOZ L., FERNÁNDEZ DE SIMÓN B. et GARCÍA-VALLEJO M. C., 2001, « Changes in Low Molecular Weight Phenolic Compounds in Spanish, French, and American Oak Woods during Natural Seasoning and Toasting », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, nº 4, p. 1790-1798.
- CAMPBELL M. C., RANCIARO A., ZINSHTEYN D., RAWLINGS-GOSS R., HIRBO J. THOMPSON S., WOLDEMESKEL D., FROMENT A., RUCKER J.B., OMAR Sabah A., BODO J.-M., NYAMBO T., BELAY G., DRAYNA D., BRESLIN P. A. S. et TISHKOFF S. A., 2014, « Origin and Differential Selection of Allelic Variation at TAS2R16 Associated with Salicin Bitter Taste Sensitivity in Africa », *Molecular Biology and Evolution*, vol. 31, nº 2, p. 288-302.
- CANAS S., 2017, « Phenolic Composition and Related Properties of Aged Wine Spirits: Influence of Barrel Characteristics. A Review », *Beverages*, vol. 3, nº 4, p. 55.
- CANAS S., BELCHIOR A. P., CALDEIRA I., SPRANGER M. I. et BRUNO-DE-SOUSA R., 2000, « Évolution de la couleur des eaux-de-vie de Lourinhã au cours des trois premières années de vieillissement. », *Ciência e Técnica Vitivinícola*, vol. 15, nº 1, p. 1-14.
- CANAS S., BELCHIOR A. P., SPRANGER M. I. et BRUNO-DE-SOUSA R., 2003, «High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation », *Journal of Separation Science*, 2003, vol. 26, n<sup>o</sup> 6-7, p. 496-502.
- CANAS S., CALDEIRA I., ANJOS O. et BELCHIOR A. P., 2019, « Phenolic profile and colour acquired by the wine spirit in the beginning of ageing: Alternative technology using micro-oxygenation vs traditional technology », *LWT*, vol. 111, p. 260-269.
- CANAS S., CALDEIRA I., MATEUS A. M., BELCHIOR A. P., CLÍMACO M. C. et BRUNO-DE-SOUSA R., 2006, « Effect of natural seasoning on the chemical composition of chestnut wood used for barrel making », vol. 21, n° 1, *Ciência Téc. Vitiv.*, p. 1-16.
- CANAS S., CASANOVA V. et BELCHIOR A. P., 2008, « Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies », *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 21, n° 8, p. 626-633.
- CANAS S., LEANDRO M. C., SPRANGER M. I. et BELCHIOR A. P., 2000, « Influence of Botanical Species and Geographical Origin on the Content of Low Molecular Weight Phenolic Compounds of Woods Used in Portuguese Cooperage », *Holzforschung*, vol. 54, n° 3.
- CANAS S., BELCHIOR A. P., ISABEL SPRANGER M. et BRUNO-DE-SOUSA R., 2011, « HPLC method for the quantification of phenolic acids, phenolic aldehydes, coumarins and furanic derivatives in different kinds of toasted wood used for the ageing of brandies », *Analytical Methods*, vol. 3, n° 1, p. 186-191.
- CANTAGREL R., MAZEROLLES G., VIDAL J.P. et GALY B., 1992, Élaboration et Connaissance des Spiritueux: Recherche de la qualité, tradition & innovation, Lavoisier—Tec & Doc., Paris, France, 567–572 p.
- CARTEA M. E. et VELASCO P., 2008, « Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health », *Phytochemistry Reviews*, vol. 7, nº 2, p. 213-229.
- CASABUONO A. C. et POMILLO A. B., 1994, « Lignans and a stilbene from Festuca argentina », *Phytochemistry*, vol. 35, n° 2, p. 479-483.
- CERNÎŞEV S., 2017, « Analysis of lignin-derived phenolic compounds and their transformations in aged wine distillates », *Food Control*, vol. 73, p. 281-290.
- CHAMBERS C., SMITH F., WILLIAMS C., MARCOS S., LIU Z. H., HAYTER P., CIARAMELLA G., KEIGHLEY W., GRIBBON P. et SEWING A., 2003, « Measuring intracellular calcium fluxes in high throughput mode », *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, vol. 6, nº 4, p. 355-362.
- CHAMKHA M., CATHALA B., CHEYNIER V. et DOUILLARD R., 2003, « Phenolic Composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot Noir Vintages », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, nº 10, p. 3179-3184.
- CHANDRASHEKAR J., HOON M. A., RYBA N. J. P. et ZUKER C. S., 2006, « The receptors and cells for mammalian taste », *Nature*, vol. 444, n° 7117, p. 288-294.
- CHANDRASHEKAR J., KUHN C., OKA Y., YARMOLINSKY D. A., HUMMLER E., RYBA N. J. P. et ZUKER C. S., 2010, « The cells and peripheral representation of sodium taste in mice », *Nature*, vol. 464, n° 7286, p. 297-301.
- CHANDRASHEKAR J., MUELLER K.L., HOON M. A., ADLER E., FENG L., GUO W., ZUKER C. S. et RYBA N. J.P., 2000, « T2Rs Function as Bitter Taste Receptors », *Cell*, vol. 100, n° 6, p. 703-711.
- CHASSAING S., LEFEUVRE D., JACQUET R., JOURDES Mi., DUCASSE L., GALLAND S., GRELARD A., SAUCIER C., TEISSEDRE P.-L., DANGLES O. et 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, vol. 2010, nº 1, p. 55-63.
- CHATONNET P., 1991, Incidences du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins: applications technologiques, thèse, Bordeaux 2.
- CHATONNET P., 1995, Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne, thèse, Bordeaux 2.
- CHATONNET P., BOIDRON J.-N., DUBOURDIEU D. et PONS M., 1994, « Evolution des composés polyphénoliques du bois de chêne au cours de son séchage. Premiers résultats », *OENO One*, vol. 28, nº 4, p. 359.
- CHATONNET P., BOIDRON J.-N. et PONS M., 1989, « Incidence du traitement thermique du bois de chêne sur sa composition chimique. 2e partie : évolution de certains composés en fonction de l'intensité de brûlage », *OENO One*, vol. 23, nº 4.
- CHATONNET P. et DUBOURDIEU D., 1988, « Comparative Study of the Characteristics of American White Oak (Quercus alba) and European Oak (Quercus petraea and Q. robur) for Production of Barrels Used in Barrel Aging of Wines | American Journal of Enology and Viticulture », *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 49, n° 1, p. 79-85.
- CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.-N. et PONS M., 1992, « The origin of ethylphenols in wines », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 60, n° 2, p. 165-178.
- CHATTOPADHYAY S., RAYCHAUDHURI U. et CHAKRABORTY R., 2014, « Artificial sweeteners a review », *Journal of Food Science and Technology*, vol. 51, nº 4, p. 611-621.
- CHÉRON J.-B., CASCIUC I., GOLEBIOWSKI J., ANTONCZAK S. et FIORUCCI S., 2017, « Sweetness prediction of natural compounds », *Food Chemistry*, vol. 221, p. 1421-1425.
- CHÉRON J.-B., GOLEBIOWSKI J., ANTONCZAK S. et FIORUCCI S., 2017, « The anatomy of mammalian sweet taste receptors: Modeling Sweet Taste Receptors », *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 85, n° 2, p. 332-341.
- CHIRA K.et 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 Chemistry*, vol. 140, nº 1–2, p. 168-177.
- CHIRA K., ZENG L., LE FLOCH A., PÉCHAMAT L., JOURDES M. et TEISSEDRE P.-L., 2015, « Compositional and sensory characterization of grape proanthocyanidins and oak wood ellagitannin », *Tetrahedron*, vol. 71, nº 20, p. 2999-3006.
- COLLARDET J. et BESSET J., 1992, Les bois commerciaux et leurs utilisations. Tome-2: Bois feuillus (régions tempérées et froides), Dourdan, Vial.
- COLLINGS V. B., 1974, « Human taste response as a function of locus of stimulation on the tongue and soft palate », *Perception & Psychophysics*, vol. 16, nº 1, p. 169-174.
- CRETIN B., 2016, *Recherches sur les déterminants moléculaires contribuant à l'équilibre gustatif des vins secs*, thèse, Université de Bordeaux.

- CRETIN B. N., DUBOURDIEU D. et MARCHAL A., 2016, « Development of a quantitation method to assay both lyoniresinol enantiomers in wines, spirits, and oak wood by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, nº 14, p. 3789-3799.
- CRETIN B. N., SALLEMBIEN Q., SINDT L., DAUGEY N., BUFFETEAU T., WAFFO-TEGUO P., DUBOURDIEU D. et MARCHAL A., 2015, « How stereochemistry influences the taste of wine: Isolation, characterization and sensory evaluation of lyoniresinol stereoisomers », *Analytica Chimica Acta*, vol. 888, p. 191-198.
- CRETIN B. N., WAFFO-TEGUO P., DUBOURDIEU D. et MARCHAL A., 2019, « Taste-guided isolation of sweet-tasting compounds from grape seeds, structural elucidation and identification in wines », *Food Chemistry*, vol. 272, p. 388-395.
- CZEPA A. et HOFMANN T., 2004, « Quantitative Studies and Sensory Analyses on the Influence of Cultivar, Spatial Tissue Distribution, and Industrial Processing on the Bitter Off-Taste of Carrots (Daucus carota L.) and Carrot Products », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, nº 14, p. 4508-4514.

### D

- DA PORTO C., CALLIGARIS S., CELOTTI E. et NICOLI M. C., 2000, « Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by the DPPH ' Test », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, nº 9, p. 4241-4245.
- DAGAN-WIENER A., DI PIZIO A., NISSIM I., BAHIA M. S., DUBOVSKI N., MARGULIS E. et NIV M. Y., 2019, « BitterDB: taste ligands and receptors database in 2019 », *Nucleic Acids Research*, vol. 47, n° D1, p. D1179-D1185.
- DAGULO L., DANYLUK M. D., SPANN T. M., VALIM M. F., GOODRICH-SCHNEIDER R., SIMS C. et ROUSEFF R., 2010, « Chemical Characterization of Orange Juice from Trees Infected with Citrus Greening (Huanglongbing) », *Journal of Food Science*, vol. 75, nº 2, p. C199-C207.
- DALTON P., DOOLITTLE N., NAGATA H. et BRESLIN P. a. S., 2000, « The merging of the senses: integration of subthreshold taste and smell », *Nature Neuroscience*, vol. 3, nº 5, p. 431.
- DAVIN L. B., JOURDES M., PATTEN A. M., KIM K.-W., VASSÃO D. G. et LEWIS N. G., 2008, « Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly: Comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis », *Natural Product Reports*, vol. 25, n<sup>o</sup> 6, p. 1015–1090.
- DE PAEPE D., SERVAES K., NOTEN B., DIELS L., DE LOOSE M., VAN DROOGENBROECK B. et VOORSPOELS S., 2013, « An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits », *Food Chemistry*, vol. 136, n° 2, p. 368-375.
- DE ROSSO M., CANCIAN D., PANIGHEL A., DALLA VEDOVA A. et FLAMINI R., 2009, « Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatile compounds and polyphenols », *Wood Science and Technology*, vol. 43, n<sup>o</sup> 5, p. 375-385.
- DE ROSSO M., PANIGHEL A., DALLA VEDOVA A., STELLA L. et FLAMINI R., 2009, « Changes in Chemical Composition of a Red Wine Aged in Acacia, Cherry, Chestnut, Mulberry, and Oak Wood Barrels », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n<sup>o</sup> 5, p. 1915-1920.
- DEA S., PLOTTO A., MANTHEY J. A., RAITHORE S., IREY M. et BALDWIN E., 2013, « Interactions and Thresholds of Limonin and Nomilin in Bitterness Perception in Orange Juice and Other Matrices: Limonin and Nomilin Thresholds in Orange Juice », *Journal of Sensory Studies*, vol. 28, nº 4, p. 311-323.

- DEGENHARDT A., ENGELHARDT U. H., WINTERHALTER P. et ITO Y., 2001, « Centrifugal Precipitation Chromatography a Novel Chromatographic System for Fractionation of Polymeric Pigments from Black Tea and Red Wine », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, nº 4, p. 1730-1736.
- DESPORTES C., CHARPENTIER M., DUTEURTRE B., MAUJEAN A. et DUCHIRON F., 2001, « Isolation, Identification, and Organoleptic Characterization of Low-Molecular-Weight Peptides from White Wine », *Am. J. Enol. Vitic.*, vol 52, n°4, p. 376-380.
- DI PIZIO A. et NIV M. Y., 2015, « Promiscuity and selectivity of bitter molecules and their receptors », *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 23, nº 14, p. 4082-4091.
- DOUSSOT F., DE JÉSO B., QUIDEAU S. et PARDON P., 2002, « Extractives Content in Cooperage Oak Wood during Natural Seasoning and Toasting ; Influence of Tree Species, Geographic Location, and Single-Tree Effects », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, nº 21, p. 5955-5961.
- DREWNOWSKI A. et GOMEZ-CARNEROS C., 2000, « Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review », *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 72, n° 6, p. 1424-1435.
- DUFFY V. B., DAVIDSON A. C., KIDD J. R., KIDD K. K., SPEED W. C., PAKSTIS A. J., REED D. R., SNYDER D. J. et BARTOSHUK L. M., 2004, « Bitter Receptor Gene (TAS2R38), 6-n-Propylthiouracil (PROP) Bitterness and Alcohol Intake »:, *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, vol. 28, nº 11, p. 1629-1637.
- DÜHRKOP K., SCHEUBERT K. et BÖCKER S., 2013, « Molecular Formula Identification with SIRIUS », *Metabolites*, vol. 3, nº 2, p. 506-516.
- DÜHRKOP K., SHEN H., MEUSEL M., ROUSU J. et BÖCKER S., 2015, « Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, nº 41, p. 12580-12585.

### E

- EHLERS D., PFISTER M., BORK W. -R. et TOFFEL-NADOLNY P., 1995, «HPLC analysis of tonka bean extracts », *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, vol. 201, n° 3, p. 278-282.
- ENGSTRÖM M. T., PÄLIJÄRVI M. et SALMINEN J.-P., 2015, «Rapid Fingerprint Analysis of Plant Extracts for Ellagitannins, Gallic Acid, and Quinic Acid Derivatives and Quercetin-, Kaempferol- and Myricetin-Based Flavonol Glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, nº 16, p. 4068-4079.
- ES-SAFI N.-E., CHEYNIER V. et MOUTOUNET M., 2000, « Study of the Reactions between (+)-Catechin and Furfural Derivatives in the Presence or Absence of Anthocyanins and Their Implication in Food Color Change », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, nº 12, p. 5946-5954.

### F

- FAN G., XU Y., ZHANG X., LEI S., YANG S. et PAN S., 2011, « Characteristics of immobilised  $\beta$ -glucosidase and its effect on bound volatile compounds in orange juice », *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 46, nº 11, p. 2312-2320.
- FAURION A., 2000, *Physiologie de la gustation*, Editions Scientifiques et Médicales, vol Otorhino-laryngologie.
- FAURION A., SAITO S. et LEOD P.M., 1980, « Sweet taste involves several distinct receptor mechanisms », *Chemical Senses*, vol. 5, nº 2, p. 107-121.

- FERNANDES A., SOUSA A., MATEUS N., CABRAL M. et DE FREITAS V., 2011, « Analysis of phenolic compounds in cork from Quercus suber L. by HPLC–DAD/ESI–MS », *Food Chemistry*, vol. 125, n° 4, p. 1398-1405.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., SANZ M., CADAHÍA E., MARTÍNEZ J., ESTERUELAS E. et MUÑOZ A.M., 2014, « Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood », *Food Chemistry*, vol. 143, p. 66-76.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., CADAHÍA E., ÁLAMO M. DEL et NEVARES I., 2010, « Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them », *Analytica Chimica Acta*, vol. 660, n° 1, p. 211-220.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., CADAHÍA E., CONDE E. et GARCÍA-VALLEJO M. C., 1996, « Low Molecular Weight Phenolic Compounds in Spanish Oak Woods », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, nº 6, p. 1507-1511.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., CADAHÍA E., CONDE E. et GARCÍA-VALLEJO M. C., 1999, « Evolution of Phenolic Compounds of Spanish Oak Wood during Natural Seasoning. First Results », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, nº 4, p. 1687-1694.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., MARTÍNEZ J., SANZ M., CADAHÍA E., ESTERUELAS E. et MUÑOZ A.M., 2014, « Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels », *Food Chemistry*, vol. 147, p. 346-356.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., SANZ M., CADAHÍA E., ESTERUELAS E. et MUÑOZ A. M., 2014, « Nontargeted GC-MS approach for volatile profile of toasting in cherry, chestnut, false acacia, and ash wood: Nontargeted GC-MS volatile profile of toasted woods », *Journal* of Mass Spectrometry, vol. 49, nº 5, p. 353-370.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., SANZ M., CADAHÍA E., POVEDA P. et BROTO M., 2006, « Chemical Characterization of Oak Heartwood from Spanish Forests of *Quercus pyrenaica* (Wild.). Ellagitannins, Low Molecular Weight Phenolic, and Volatile Compounds », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, nº 21, p. 8314-8321.
- FEUILLAT F., HUBER F. et KELLER R., 1992, « Mise au point sur la notion de « grain » utilisée pour le classement des merrains de chêne », *Rev. Fr. OEnologie*, vol. 139, p. 65-69.
- FEUILLAT F., KELLER R., SAUVAGEOT F. et PUECH J.-L., 1999, « Characterization of French oak cooperage (Quercus robur L., Quercus petraea Liebl.). Research of the study group on barrel-aging Burgundy wines », American journal of enology and viticulture, vol. 50, nº 4, p. 513–518.
- FEUILLAT F. et MOIO L., 1997, « Variation in the Concentration of Ellagitannins and cis- and trans-6-Methyl-T-Octalactone Extracted From Oak Wood (Quercus robur L., Quercus petraea Liebl.) Under Model Wine Cask Conditions », vol. 48, n° 4.
- FOUCAULT A. P. et CHEVOLOT L., 1998, « Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification », *Journal of Chromatography A*, vol. 808, nº 1, p. 3–22.
- FOUCAULT A. P., 1995, Centrifugal partition chromatography, New York, Marcel Dekker.
- FRANK O., BLUMBERG S., KUNERT C., ZEHENTBAUER G. et HOFMANN T., 2007, « Structure Determination and Sensory Analysis of Bitter-Tasting 4-Vinylcatechol Oligomers and Their Identification in Roasted Coffee by Means of LC-MS/MS », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, nº 5, p. 1945-1954.
- FRANK O. et HOFMANN T., 2002, « Reinvestigation of the Chemical Structure of Bitter-Tasting Quinizolate and Homoquinizolate and Studies on Their Maillard-Type Formation Pathways Using Suitable <sup>13</sup> C-Labeling Experiments », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, nº 21, p. 6027-6036.

- FRANK O., ZEHENTBAUER G. et HOFMANN T., 2005, « Bioresponse-guided decomposition of roast coffee beverage and identification of key bitter taste compounds », *European Food Research and Technology*, vol. 222, nº 5, p. 492.
- FROLOFF N., FAURION A. et MAC LEOD P., 1996, « Multiple Human Taste Receptor Sites: A Molecular Modeling Approach », *Chemical Senses*, vol. 21, nº 4, p. 425-445.
- FUKUYAMA H., NAKAHARA M., MINAMI H. et KODAMA M., 1996, « Two new benzofuran-type lignans from the wood of Viburnum awabuki », *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 44, n° 7, p. 1418-1420.
- FULCRAND H., DOCO T., ES-SAFI N.-E., CHEYNIER V. et MOUTOUNET M., 1996, « Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, vol. 752, n° 1-2, p. 85-91.
- FULCRAND H., DOS SANTOS P.-J. C., SARNI-MANCHADO P., CHEYNIER V. et FAVRE-BONVIN J., 1996, « Structure of new anthocyanin-derived wine pigments », *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, nº 7, p. 735-739.

G

- GAFFIELD W., LUNDIN R. E., GENTILI B. et HOROWITZ R.M., 1975, «C-2 Stereochemistry of naringin and its relation to taste and biosynthesis in maturing grapefruit », *Bioorganic chemistry*, vol. 4, n° 3, p. 259-269.
- GAMMACURTA M., TEMPERE S., MARCHAND S., MOINE V. et DE REVEL G., 2018, « Ethyl 2hydroxy-3-methylbutanoate enantiomers: quantitation and sensory evaluation in wine », *OENO One*, vol. 52, n° 1, p. 57-65.
- GAMMACURTA M., WAFFO-TEGUO P., WINSTEL D., CRETIN B. N., SINDT L., DUBOURDIEU D. et MARCHAL A., 2019, « Triterpenoids from Quercus petraea: Identification in Wines and Spirits and Sensory Assessment », *Journal of Natural Products*, vol 82, n°2, p. 265-275.
- GAO D.-F., XU M., YANG C.-R., XU M. et ZHANG Y.-J., 2010, « Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Camellia pachyandra* Hu. », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, nº 15, p. 8820-8824.
- GARCIA R., SOARES B., DIAS C. B., FREITAS A. M. C. et CABRITA M. J., 2012, « Phenolic and furanic compounds of Portuguese chestnut and French, American and Portuguese oak wood chips », *European Food Research and Technology*, vol. 235, n° 3, p. 457-467.
- GARCÍA-MUÑOZ S., ÁLVAREZ-CORRAL M., JIMÉNEZ-GONZÁLEZ L., LÓPEZ-SÁNCHEZ C., ROSALES A., MUÑOZ-DORADO M. et RODRÍGUEZ-GARCÍA I., 2006, « Synthesis of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol and derivatives through intramolecular C–H insertion », *Tetrahedron*, vol. 62, nº 52, p. 12182-12190.
- GARCÍA-VILLALBA R., ESPÍN J. C., TOMÁS-BARBERÁN F. A. et ROCHA-GUZMÁN N. E., 2017, « Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven Quercus leaf teas », *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 63, p. 38-46.
- GEE K.R., BROWN K.A., CHEN W-N.U., BISHOP-STEWART J., GRAY D. et JOHNSON I., 2000, « Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca2+-indicator dyes », *Cell Calcium*, vol. 27, n° 2, p. 97-106.
- GIBBS B. F., ALLI I. et MULLIGAN C., 1996, « Sweet and taste-modifying proteins: A review », *Nutrition Research*, vol. 16, nº 9, p. 1619-1630.
- GILBERTSON T. A., DAMAK S. et MARGOLSKEE R. F., 2000, « The molecular physiology of taste transduction », *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 10, nº 4, p. 519-527.
- GIMENEZ M. R., LOPEZ GARCIA DE LA SERRANA H., VILLALON MIR M., QUESADA GRANADOS J. et LOPEZ MARTINEZ M. C., 1996, « Influence of Wood Heat Treatment, Temperature

and Maceration Time on Vanillin, Syringaldehyde, and Gallic Acid Contents in Oak Wood and Wine Spirit Mixtures », *Am J Enol Vitic.*, vol. 47, nº 4, p. 441-446.

- GLABASNIA A.et 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 », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n° 9, p. 3380-3390.
- GLABASNIA A. et HOFMANN T., 2007, « Identification and Sensory Evaluation of Dehydro- and Deoxy-ellagitannins Formed upon Toasting of Oak Wood (*Quercus alba* L.)», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, nº 10, p. 4109-4118.
- GOLDBERG D. M., HOFFMAN B., YANG J. et SOLEAS G. J., 1999, « Phenolic Constituents, Furans, and Total Antioxidant Status of Distilled Spirits », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, nº 10, p. 3978-3985.
- GONZALO-DIAGO A., DIZY M. et FERNÁNDEZ-ZURBANO P., 2014, « Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines », *Food Chemistry*, vol. 154, p. 187-198.
- GOTO T. et KONDO T., 1991, « Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins Flower Color Variation », *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 30, nº 1, p. 17-33.
- GOUGEON L, DA COSTA G., GUYON F. et RICHARD T., 2019, « 1H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines », *Food Chemistry*, vol. 301, p. 125257.
- GOUGEON R. D., LUCIO M., DE BOEL A., FROMMBERGER M., HERTKORN N., PEYRON D., CHASSAGNE D., FEUILLAT F., CAYOT P., VOILLEY A., GEBEFÜGI I. et SCHMITT-KOPPLIN P., 2009, « Expressing Forest Origins in the Chemical Composition of Cooperage Oak Woods and Corresponding Wines by Using FTICR-MS », *Chemistry – A European Journal*, vol. 15, nº 3, p. 600-611.
- GUCHU E., DÍAZ-MAROTO M. C., DÍAZ-MAROTO I. J., VILA-LAMEIRO P. et PÉREZ-COELLO M. S., 2006, « Influence of the Species and Geographical Location on Volatile Composition of Spanish Oak Wood (Quercus petraea Liebl. and Quercus robur L.) », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n° 8, p. 3062-3066.
- GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2018, « Bioanalytical Method Validation », U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).
- GUTIÉRREZ F., ALBI M.A., PALMA R., RIOS J.J. et OLÍAS J.M., 1989, « Bitter Taste of Virgin Olive Oil: Correlation of Sensory Evaluation and Instrumental HPLC Analysis », *Journal of Food Science*, vol. 54, n° 1, p. 68-70.
- GUTIÉRREZ-ROSALES F., RÍOS J. J. et GÓMEZ-REY Ma. 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 », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, n° 20, p. 6021-6025.

# Η

- HANAWA F., SHIRO M. et HAYASHI Y., 1997, « Heartwood constituents of Betula Maximowicziana », *Phytochemistry*, vol. 45, nº 3, p. 589-595.
- HARBORNE J. B., 2013, *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*, s.l., Springer-Science.
- HARDMAN M. et MAKAROV A. A., 2003, « Interfacing the Orbitrap Mass Analyzer to an Electrospray Ion Source », *Analytical Chemistry*, vol. 75, nº 7, p. 1699-1705.
- HARRIS H. et KALMUS H., 1949, « The measurement of taste sensitivity to Phenylthiourea (PTC) », Annals of Eugenics, vol. 15, nº 1, p. 24-31.

- HASELEU G., INTELMANN D. et HOFMANN T., 2009, « Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from  $\beta$ -acids of hop (Humulus lupulus L.) upon wort boiling », *Food Chemistry*, vol. 116, n° 1, p. 71-81.
- HASLAM E., 1974, « Polyphenol–protein interactions (Short Communication) », *Biochemical Journal*, vol. 139, nº 1, p. 285-288.
- HE Z., SLEIGHTER R. L., HATCHER P. G., LIU S., WU F., ZOU H. et OLANYA O. M., 2019, « Molecular level comparison of water extractives of maple and oak with negative and positive ion ESI FT-ICR mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 54, n<sup>o</sup> 8, p. 655-666.
- HERVE DU PENHOAT C., MICHON V. M. F., PENG S., VIRIOT C., SCALBERT A. et GAGE D., 1991, « Structural elucidation of new dimeric ellagitannins from Quercus robur L. roburins A–E », J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, nº 7, p. 1653-1660.
- HOFFMANN T.s, KRUG D., HÜTTEL S. et MÜLLER R., 2014, « Improving Natural Products Identification through Targeted LC-MS/MS in an Untargeted Secondary Metabolomics Workflow », *Analytical Chemistry*, vol. 86, n° 21, p. 10780-10788.
- HORIE H., 2009, « Analysis of Lactucopicrins (Bitter Compounds) in Lettuce by High-Performance Liquid Chromatography », vol. 9, p. 189-195.
- HORIE H., ITO H., IPPOUSHI K., AZUMA K., SAKATA Y. et IGARASHI I., 2007, « Cucurbitacin C Bitter Principle in Cucumber Plants », p. 65-68.
- HU Q., NOLL R. J., LI H., MAKAROV A., HARDMAN M. et GRAHAM COOKS R., 2005, « The Orbitrap: a new mass spectrometer », *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 40, n<sup>o</sup> 4, p. 430-443.
- HUANG A. L., CHEN X., HOON M. A., CHANDRASHEKAR J., GUO W., TRÄNKNER D., RYBA N. J. P. et ZUKER C. S., 2006, « The cells and logic for mammalian sour taste detection », *Nature*, vol. 442, nº 7105, p. 934-938.
- HUBERT J., BORIE N., CHOLLET S., PERRET J., BARBET-MASSIN C., BERGER M., DAYDÉ J. et RENAULT J.-H., 2015, « Intensified Separation of Steviol Glycosides from a Crude Aqueous Extract of Stevia rebaudiana Leaves Using Centrifugal Partition Chromatography », *Planta Medica*, vol. 81, nº 17, p. 1614-1620.
- HUBERT J., NUZILLARD J.-M. et RENAULT J.-H., 2017, « Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? », *Phytochemistry Reviews*, vol. 16, n<sup>o</sup> 1, p. 55-95.
- HUFNAGEL J. C. et HOFMANN T., 2008, « Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, n° 4, p. 1376-1386.

# I

- ISO 3591:1977, 1977, « Analyse sensorielle Appareillage Verre à dégustation pour l'analyse sensorielle des vins » dans *Analyse sensorielle : Recueil, normes, agroalimentaire*, Geneva, AFNOR.
- ISO 4120:2007. 2007. « Sensory analysis Methodologie Test triangulaire ». Dans Analyse sensorielle : Recueil, normes, agroalimentaire. . Geneva : AFNOR. https://www.iso.org/standard/33495.html.
- ISO 8589:2010. 2010. « Analyse sensorielle Directives générales pour la conception de locaux destinés à l'analyse ». Dans *Analyse sensorielle : Recueil, normes, agroalimentaire.* . Geneva : AFNOR. https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-8589/analyse-sensorielle-directives-generales-pour-la-conception-de-locaux-destines-a-l-analyse/article/784220/fa165403.

- ISO 13299:2016. 2016. « Analyse sensorielle Méthodologie Directives générales pour l'établissement d'un profil sensoriel ». Dans *Analyse sensorielle : Recueil, normes, agroalimentaire*. . Geneva : AFNOR. https://www.iso.org/fr/standard/58042.html.
- ITO H., YAMAGUCHI K., KIM T.-H., KHENNOUF S., GHARZOULI K. et YOSHIDA T., 2002, « Dimeric and Trimeric Hydrolyzable Tannins from *Quercus coccifera* and *Quercus suber* », *Journal of Natural Products*, vol. 65, n° 3, p. 339-345.

# J

- JENKINS R. W., SUTTON A. D. et ROBICHAUD D. J., 2016, « Chapter 8 Pyrolysis of Biomass for Aviation Fuel » dans Christopher J. Chuck (ed.), *Biofuels for Aviation*, Academic Press, p. 191-215.
- JONES P.R., GAWEL R., FRANCIS I.L. et 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*, vol. 19, n° 6, p. 596-607.
- JOSEPH E. et MARCHE M., 1972, « Contribution à l'étude du vieillissement du cognac », *Connaissance Vigne Vin*, vol. 6, p. 373-330.
- JOURDES M., MICHEL J., SAUCIER C., QUIDEAU S. et 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 », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 401, n<sup>o</sup> 5, p. 1531-1539.

### K

- KAMAYA Y., NAKATSUBO F. et HIGUCHI T., 1983, « Degradation of Trimeric Lignin Model Compounds, Arylglycerol-β-syringaresinol Ethers, by *Fusarium solani* M-13-1 », *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 47, n° 2, p. 299-308.
- KANEKO S., KUMAZAWA K., MASUDA H., HENZE A. et HOFMANN T., 2006, « Molecular and Sensory Studies on the Umami Taste of Japanese Green Tea », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n° 7, p. 2688-2694.
- KATAJAMAA M., MIETTINEN J. et OREŠIČ M., 2006, « MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data », *Bioinformatics*, vol. 22, n° 5, p. 634-636.
- KATAJAMAA M. et OREŠIČ M., 2005, « Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data », *BMC Bioinformatics*, vol. 6, nº 1, p. 179.
- KELLER R., 1987, « Différentes variétés de chênes et leur répartition dans le monde », *OENO One*, vol. 21, n° 3, p. 191-229.
- KIM H., RALPH J., LU F., RALPH S. A., BOUDET A.-M., MACKAY J. J., SEDEROFF R. R., ITO T., KAWAI S. et OHASHI H., 2003, « NMR analysis of lignins in CAD-deficient plants. Part 1. Incorporation of hydroxycinnamaldehydes and hydroxybenzaldehydes into lignins », Organic & biomolecular chemistry, vol. 1, nº 2, p. 268–281.
- KIM U.-K., JORGENSON E., COON H., LEPPERT M., RISCH N. et DRAYNA D., 2003, « Positional Cloning of the Human Quantitative Trait Locus Underlying Taste Sensitivity to Phenylthiocarbamide », *Science*, vol. 299, n° 5610, p. 1221-1225.
- KIND T. et FIEHN O., 2007, « Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry », *BMC Bioinformatics*, vol. 8, p. 105.
- KINGDON K. H., 1923, « A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures », *Physical Review*, vol. 21, nº 4, p. 408-418.

- KINGHORN A., CHIN Y.-W., PAN L. et JIA Z., 2010, « Natural Products as Sweeteners and Sweetness Modifiers » dans Hung-Wen (Ben) Liu et Lew Mander (eds.), *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, vol.3, p. 269-315.
- KINGHORN A. D., 1987, « Biologically Active Compounds from Plants with Reputed Medicinal and Sweetening Properties », *Journal of Natural Products*, vol. 50, nº 6, p. 1009-1024.
- KOGA K., TAGUCHI A., KOSHIMIZU S., SUWA Y., YAMADA Y., SHIRASAKA N. et YOSHIZUMI H., 2007, « Reactive Oxygen Scavenging Activity of Matured Whiskey and Its Active Polyphenols », *Journal of Food Science*, vol. 72, n° 3, p. S212-S217.
- KOHL S., BEHRENS M., DUNKEL A., HOFMANN T. et MEYERHOF W., 2013, « Amino Acids and Peptides Activate at Least Five Members of the Human Bitter Taste Receptor Family », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, n° 1, p. 53-60.
- KOHONEN T., 1982, « Self-organized formation of topologically correct feature maps », *Biological Cybernetics*, vol. 43, nº 1, p. 59-69.
- KOIZUMI A., TSUCHIYA A., NAKAJIMA K, ITO K., TERADA T., SHIMIZU-IBUKA A., BRIAND L., ASAKURA T., MISAKA T. et ABE K., 2011, « Human sweet taste receptor mediates acidinduced sweetness of miraculin », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, nº 40, p. 16819-16824.
- KORANI M. S., FARBOOD Y., SARKAKI A., FATHI MOGHADDAM H.et TAGHI MANSOURI M., 2014, « Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats », *European Journal of Pharmacology*, vol. 733, p. 62-67.
- KROES B. H., BERG A. J. J. van den, UFFORD H. C. Quarles van, DIJK H. van et LABADIE R. P., 1992, « Anti-Inflammatory Activity of Gallic Acid », *Planta Medica*, vol. 58, nº 6, p. 499-504.
- KUHN C., BUFE B., WINNIG M., HOFMANN T., FRANK O., BEHRENS M., LEWTSCHENKO T., SLACK J. P., WARD C. D. et MEYERHOF W., 2004, « Bitter Taste Receptors for Saccharin and Acesulfame K », *Journal of Neuroscience*, vol. 24, nº 45, p. 10260-10265.
- KYRIAZIS G. A., SOUNDARAPANDIAN M. M. et TYRBERG B., 2012, « Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, n° 8, p. E524-E532.

### L

- LAAKSONEN O., SANDELL M. et KALLIO H., 2010, « Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (Vaccinium myrtillus) fractions », *European Food Research and Technology*, vol. 231, nº 2, p. 271-285.
- LAFFITTE A., NEIERS F. et BRIAND L., 2014, « Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues », *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 17, nº 4, p. 379-385.
- LAFON J., COUILLUD P. et GAYBELLILE F., 1973, Le Cognac, J.B. Baillière., Paris, France.
- LAUGERETTE F., 2005, « CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, nº 11, p. 3177-3184.
- LEDAUPHIN J., BASSET B., COHEN S., PAYOT T. et BARILLIER D., 2006, « Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and Cognac: Carbonyl and sulphur compounds », *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, nº 1, p. 28-40.
- LEDAUPHIN J., LE MILBEAU C., BARILLIER D. et HENNEQUIN D., 2010, « Differences in the Volatile Compositions of French Labeled Brandies (Armagnac, Calvados, Cognac, and

Mirabelle) Using GC-MS and PLS-DA », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, nº 13, p. 7782-7793.

- LEE K.-Y. M., PATERSON A., PIGGOTT J. R. et RICHARDSON G. D., 2001, « Origins of Flavour in Whiskies and a Revised Flavour Wheel: a Review », *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 107, n° 5, p. 287-313.
- LI D. et ZHANG J., 2014, « Diet Shapes the Evolution of the Vertebrate Bitter Taste Receptor Gene Repertoire », *Molecular Biology and Evolution*, vol. 31, n° 2, p. 303-309.
- LI L. et SEERAM N. P., 2010, « Maple Syrup Phytochemicals Include Lignans, Coumarins, a Stilbene, and Other Previously Unreported Antioxidant Phenolic Compounds », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, nº 22, p. 11673-11679.
- LI L. et SEERAM N. P., 2011, « Further Investigation into Maple Syrup Yields 3 New Lignans, a New Phenylpropanoid, and 26 Other Phytochemicals », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, n° 14, p. 7708-7716.
- LI M., LIU D., CONG X.-S., WU J.-H., WU C.-C. et XIA W., 2016, « Identification of Lignin-Derived *p*-Bis(2,6-dimethoxyphenol)yl Compounds in Bio-oil with Mass Spectrometry », *Energy & Fuels*, vol. 30, n° 12, p. 10950-10953.
- LI S.-F., DI Y.-T, WANG Y.-H, TAN C.-J., FANG X., ZHANG Y., ZHENG Y.-T., LI L., HE H.-P., LI S.-L. et HAO X.-J., 2010, « Anthraquinones and Lignans from Cassia occidentalis », *Helvetica Chimica Acta*, vol. 93, n° 9, p. 1795-1802.
- LI X., LI W., WANG H., CAO J., MAEHASHI K., HUANG L., BACHMANOV A. A., REED D. R., LEGRAND-DEFRETIN V., BEAUCHAMP G. K. et BRAND J. G., 2005, « Pseudogenization of a Sweet-Receptor Gene Accounts for Cats' Indifference toward Sugar », *PLoS Genetics*, vol. 1, nº 1, p. e3.
- LI Y.-C., KUO P.-C., YANG M.-L., CHEN T.-Y., HWANG T.-L., CHIANG C.-C., THANG T. D., TUAN N. N. et TZEN J. T.C., 2019, « Chemical Constituents of the Leaves of Peltophorum pterocarpum and Their Bioactivity », *Molecules*, vol. 24, n° 2.
- LIAO H., CAI Y. et HASLAM E., 1992, « Polyphenol interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wines », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 59, n° 3, p. 299-305.
- LIN R., SKALTSOUNIS A.-L., SEGUIN E., TILLEQUIN F.et KOCH M., 1994, « Phenolic Constituents of *Selaginella doederleinii* », *Planta Medica*, vol. 60, nº 02, p. 168-170.
- LINDEMANN B., 2001, « Receptors and transduction in taste », *Nature*, vol. 413, nº 6852, p. 219-225.
- LITCHEV V., 1989, « Influence of Oxidation Processes on the Development of the Taste and Flavor of Wine Distillates », *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 40, n° 1, p. 31-35.
- LIU R., SUN Q., SUN A. et CUI J., 2005, « Isolation and purification of coumarin compounds from Cortex fraxinus by high-speed counter-current chromatography », *Journal of Chromatography A*, vol. 1072, n° 2, p. 195-199.
- LIU Y., ROSE K. N., DASILVA N. A., JOHNSON S. L. et SEERAM Na. P., 2017, « Isolation, Identification, and Biological Evaluation of Phenolic Compounds from a Traditional North American Confectionery, Maple Sugar », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, nº 21, p. 4289-4295.
- LU Y. et BENNICK A., 1998, « Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins », *Archives of Oral Biology*, vol. 43, nº 9, p. 717-728.
- LU Z., NIE G., BELTON P. S., TANG H. et ZHAO B., 2006, « Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives », *Neurochemistry International*, vol. 48, nº 4, p. 263-274.
- LURTON L., FERRARI G. et SNAKKERS G., 2012, « Cognac: production and aromatic characteristics » dans *Alcoholic Beverages*, p. 242-266.

LYTRA G., TEMPERE S., LE FLOCH A., DE REVEL G. et BARBE J.-C., 2013, « Study of Sensory Interactions among Red Wine Fruity Esters in a Model Solution », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, n° 36, p. 8504-8513.

### Μ

- MACIUK A., 2005, Nouvelles méthodologie en chromatographie de partage centrifuge: application à l'isolement de substances naturelles.
- MACKEY A. et VALASSI K., 1956, « The discernement of primary tastes in the presence of different food textures », *Food Technology*, vol. 10, p. 238-240.
- MACNAMARA K., DABROWSKA D., BADEN M. et HELLE N., 2011, « Advances in the Chemistry of Distilled Spirits Matured in Oak Barrels », *LC-GC Europe*, vol. 24, nº 9, p. 448-466.
- MAEDA H., KAKOKI N., AYABE M., KOGA Y., ORIBE T., MATSUO Y., TANAKA T. et KOUNO I., 2011, « Ent-Eudesmane sesquiterpenoids, galloyl esters of the oak lactone precursor, and a 3-O-methylellagic acid glycoside from the wood of Platycarya strobilacea », *Phytochemistry*, vol. 72, n<sup>o</sup> 8, p. 796-803.
- MAI F. et GLOMB M. A., 2016, « Structural and Sensory Characterization of Novel Sesquiterpene Lactones from Iceberg Lettuce », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, nº 1, p. 295-301.
- MAITREPIERRE E., SIGOILLOT M. et BRIAND L., 2001, « Des saveurs aux récepteurs », *Biofutur*, 2001, n° 320, p. 24-27.
- MAÎTREPIERRE E., SIGOILLOT M., LE PESSOT L. et BRIAND L., 2012, « Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor », *Protein Expression and Purification*, vol. 83, nº 1, p. 75-83.
- MAKAROV A., 1999, « Mass spectrometer ».
- MAKAROV A., 2000, « Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis », *Analytical Chemistry*, vol. 72, nº 6, p. 1156-1162.
- MARCHAL A., 2010, Recherches sur les bases moléculaires de la saveur sucrée des vins secs : approches analytique et sensorielle, thèse, Université de Bordeaux.
- MARCHAL A., CRETIN B. N., SINDT L., WAFFO-TEGUO P. et DUBOURDIEU D., 2015, « Contribution of oak lignans to wine taste: chemical identification, sensory characterization and quantification », *Tetrahedron*, vol. 71, n° 20, p. 3148-3156.
- MARCHAL A., GÉNIN E., WAFFO-TÉGUO P., BIBÈS A., DA COSTA G., MÉRILLON J.-M. et DUBOURDIEU D., 2015, « Development of an analytical methodology using Fourier transform mass spectrometry to discover new structural analogs of wine natural sweeteners », *Analytica Chimica Acta*, vol. 853, p. 425-434.
- MARCHAL A., MARULLO P., MOINE V. et DUBOURDIEU D., 2011, « Influence of Yeast Macromolecules on Sweetness in Dry Wines: Role of the Saccharomyces cerevisiae Protein Hsp12 », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, n° 5, p. 2004-2010.
- MARCHAL A., PONS A., LAVIGNE V. et DUBOURDIEU D., 2013, « Contribution of oak wood ageing to the sweet perception of dry wines: Effect of oak ageing on wine sweetness », *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 19, nº 1, p. 11-19.
- MARCHAL A., PRIDA A. et DUBOURDIEU D., 2016, « New Approach for Differentiating Sessile and Pedunculate Oak: Development of a LC-HRMS Method To Quantitate Triterpenoids in Wood », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, n° 3, p. 618-626.
- MARCHAL A., WAFFO-TÉGUO P., GÉNIN E., MÉRILLON J.-M. et DUBOURDIEU D., 2011, « Identification of New Natural Sweet Compounds in Wine Using Centrifugal Partition

Chromatography–Gustatometry and Fourier Transform Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, vol. 83, nº 24, p. 9629-9637.

- MARCHE M. et JOSEPH E., 1975, « Étude théorique sur le cognac, sa composition et son vieillissement naturel en fûts de chêne. », *Revue française d'Œnologie*, vol. 57, p. 3-107.
- MARTIN N. et DE REVEL G., 1999, « Evaluation sensorielle : Bases scientifiques et applications oenologiques », *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, p. 81-93.
- MARTÍNEZ-GIL A., CADAHÍA E., FERNÁNDEZ DE SIMÓN B., GUTIÉRREZ-GAMBOA G., NEVARES I. et ÁLAMO-SANZA M., 2019, « Phenolic and volatile compounds in Quercus humboldtii Bonpl. wood: effect of toasting with respect to oaks traditionally used in cooperage », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 99, n° 1, p. 315-324.
- MASSON E., BAUMES R., LE GUERNEVÉ C. et PUECH J.-L., 2000, « Identification of a Precursor of β-Methyl-γ-octalactone in the Wood of Sessile Oak (Quercus petraea (Matt.) Liebl.) », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, n° 9, p. 4306-4309.
- MASSON E., BAUMES R. et PUECH J.-L., 2001, « Comparison of direct and indirect methods of measuring the precursors of b-methyl-g-octalactone and their application to the analysis of Sessile oak wood [Quercus petraea (Matt.) Liebl.] », *J. Chromatogr. A*, p. 183-191.
- MASSON G., MOUTOUNET M. et 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*, vol. 46, nº 2, p. 262-268.
- MATISSEK R., 1997, « Evaluation of xanthine derivatives in chocolate nutritional and chemical aspects », *Zeitschrift fur Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, vol. 205, n° 3, p. 175-184.
- MENA P., ASCACIO-VALDÉS J. A., GIRONÉS-VILAPLANA A., DEL RIO D., MORENO D. A. et GARCÍA-VIGUERA C., 2014, « Assessment of pomegranate wine lees as a valuable source for the recovery of (poly)phenolic compounds », *Food Chemistry*, vol. 145, p. 327-334.
- MEYERHOF W., BATRAM C., KUHN C., BROCKHOFF A., CHUDOBA E., BUFE B., APPENDINO G. et BEHRENS M., 2010, « The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors », *Chemical Senses*, vol. 35, n° 2, p. 157-170.
- MICHALSKI A., DAMOC E., HAUSCHILD J.-P., LANGE O., WIEGHAUS A., MAKAROV A., NAGARAJ N., COX J., MANN M. et HORNING S., 2011, « Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer », *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, vol. 10, n° 9.
- MICHEL J., ALBERTIN W., JOURDES M., LE FLOCH A., GIORDANENGO T., MOUREY N. et 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 Chemistry*, vol. 204, p. 381-390.
- MILDER I. E. J., ARTS I. C. W., PUTTE B., VENEMA D. P. et HOLLMAN P. C. H., 2005, « Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol », *British Journal of Nutrition*, vol. 93, nº 3, p. 393-402.
- MOGRA R. et DASHORA V., 2009, « Exploring the Use of Stevia rebaudiana as a Sweetener in Comparison with Other Sweeteners: Journal of Human Ecology: Vol 25, No 2 », *Journal of Human Ecology*, vol. 25, nº 2, p. 117-120.
- MOJARRO-GUERRA S. H., AMADÒ R., ARRIGONI E. et SOLMS J., 1991, « Isolation of Low-Molecular-Weight Taste Peptides from Vacherin Mont d'Or Cheese », *Journal of Food Science*, vol. 56, nº 4, p. 943-947.
- MONTMAYEUR J.-P. et MATSUNAMI H., 2002, « Receptors for bitter and sweet taste », *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 12, nº 4, p. 366-371.

- MOSEDALE J. R. et PUECH J.-L., 1998, « Wood maturation of distilled beverages », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 9, nº 3, p. 95-101.
- MOSEDALE J. R., PUECH J.-L. et FEUILLAT F., 1999, « The Influence on Wine Flavor of the Oak Species and Natural Variation of Heartwood Components », *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 50, nº 4, p. 503-512.

MOUTOUNET M., PUECH J.-L. et RABIER P., 1989, « Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood », *Sciences des Aliments*.

- MUELLER K. L., HOON M. A., ERLENBACH I., CHANDRASHEKAR J., ZUKER C. S. et RYBA N. J. P., 2005, « The receptors and coding logic for bitter taste », *Nature*, vol. 434, n° 7030, p. 225-229.
- MURAYAMA W., KOBAYASHI T., KOSUGE Y., YANO H., NUNOGAKI Y. et NUNOGAKI K., 1982, « A new centrifugal counter-current chromatograph and its application », *Journal of Chromatography A*, vol. 239, p. 643–649.

# Ν

- NABETA K., YONEKUBO J. et MIYAKE M., 1987, « Phenolic compounds from the heartwood of European oak (Quercus robur L.) and brandy », *Journal of the Japan Wood Research Society (Japan)*,
- NAFIE L. A., KEIDERLING T. A. et STEPHENS P. J., 1976, « Vibrational circular dichroism », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 98, nº 10, p. 2715-2723.
- NARUKAWA M., NOGA C., UENO Y., SATO T., MISAKA T. et WATANABE T., 2011, « Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39 », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 405, nº 4, p. 620-625.
- NELSON G., HOON M. A., CHANDRASHEKAR J., ZHANG Y., RYBA N. J.P. et ZUKER C. S., 2001, « Mammalian Sweet Taste Receptors », *Cell*, vol. 106, nº 3, p. 381-390.
- NISHIMURA T. et KATO H., 1988, « Taste of free amino acids and peptides », *Food Reviews International*, vol. 4, nº 2, p. 175-194.
- NIU Y., WANG P., XIAO Z., ZHU J., SUN X. et WANG R., 2019, « Evaluation of the perceptual interaction among ester aroma compounds in cherry wines by GC–MS, GC–O, odor threshold and sensory analysis: An insight at the molecular level », *Food Chemistry*, vol. 275, p. 143-153.
- NOBLE A.C., 1994, « Bitterness in wine », Physiology & Behavior, vol. 56, nº 6, p. 1251-1255.
- NOTHIAS L.-F., NOTHIAS-ESPOSITO M., DA SILVA R., WANG MI., PROTSYUK I., ZHANG Z., SARVEPALLI A., LEYSSEN P., TOUBOUL D., COSTA J., PAOLINI J., ALEXANDROV T., LITAUDON M. et DORRESTEIN P. C., 2018, « Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation », *Journal of Natural Products*, vol. 81, nº 4, p. 758-767.
- NURMI T., HEINONEN S., MAZUR W., DEYAMA T., NISHIBE S.et ADLERCREUTZ H., 2003, « Lignans in selected wines », *Food Chemistry*, vol. 83, nº 2, p. 303-309.

# 0

- OKA F., OKA H. et ITO Y., 1991, « Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography », *Journal of chromatography A*, vol. 538, n° 1, p. 99–108.
- OLSEN E. K., SØDERHOLM K. L., ISAKSSON J., ANDERSEN J. H. et HANSEN E., 2016, « Metabolomic Profiling Reveals the N-Acyl-Taurine Geodiataurine in Extracts from the

Marine Sponge Geodia macandrewii (Bowerbank) », *Journal of Natural Products*, vol. 79, nº 5, p. 1285-1291.

- OMAR M., MATSUO Y., MAEDA H., SAITO Y. et TANAKA T., 2013, « New ellagitannin and galloyl esters of phenolic glycosides from sapwood of Quercus mongolica var. crispula (Japanese oak) », *Phytochemistry Letters*, vol. 6, n° 3, p. 486-490.
- OMAR M., MATSUO Y., MAEDA H., SAITO Y. et TANAKA T., 2014, « New Metabolites of *C*-Glycosidic Ellagitannin from Japanese Oak Sapwood », *Organic Letters*, vol. 16, n° 5, p. 1378-1381.
- ONG J.-S., HWANG D. L.-D., ZHONG V. W., AN J., GHARAHKHANI P., BRESLIN P. A. S., WRIGHT M. J., LAWLOR D. A., WHITFIELD J., MACGREGOR S., MARTIN N. G. et CORNELIS M. C., 2018, « Understanding the role of bitter taste perception in coffee, tea and alcohol consumption through Mendelian randomization », *Scientific Reports*, vol. 8, n° 1.
- ORDOUDI S. A., MANTZOURIDOU F., DAFTSIOU E., MALO C., HATZIDIMITRIOU E., NENADIS N. et TSIMIDOU M. Z., 2014, « Pomegranate juice functional constituents after alcoholic and acetic acid fermentation », *Journal of Functional Foods*, vol. 8, p. 161-168.
- ORTEGA-HERAS M., GONZÁLEZ-SANJOSÉ M. L. et GONZÁLEZ-HUERTA C., 2007, « Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines », *Food Chemistry*, vol. 103, n° 4, p. 1434-1448.
- OTSUKA K. et ZENIBAYASHI Y., 1974, « On the Determination of Scopoletin in Aged Distilled Liquors », *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 38, nº 5, p. 1079-1080.
- OTTINGER H., SOLDO T.et HOFMANN T., 2003, « Discovery and Structure Determination of a Novel Maillard-Derived Sweetness Enhancer by Application of the Comparative Taste Dilution Analysis (cTDA) », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, n<sup>o</sup> 4, p. 1035-1041.

# P

- PADILHA C., CAMARÃO TELLES BIASOTO A., CORRÊA L. C., DOS SANTOS LIMA M. et PEREIRA Giuliano E., 2017, « Phenolic compounds profile and antioxidant activity of commercial tropical red wines (*Vitis vinifera* L.). », *Journal of Food Biochemistry*, vol. 41, nº 3.
- PASINI F., VERARDO V., CERRETANI L., CABONI M. F. et D'ANTUONO L. F., 2011, « Rocket salad (Diplotaxis and Eruca spp.) sensory analysis and relation with glucosinolate and phenolic content », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, n° 15, p. 2858-2864.
- PEREIRA L., BARBOSA J.S, RIBEIRO DA SILVA A., FERRI P. et SANTOS S., 2017, « Polyphenol and Ellagitannin Constituents of Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Chemical Variability at Different Stages of Fruit Development », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, n° 6, p. 1209-1219.
- PÉREZ-OLIVERO S. J., PÉREZ-PONT M. L., CONDE J. E. et PÉREZ-TRUJILLO J. P., 2014, « Determination of Lactones in Wines by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry », *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2014.
- PEYNAUD E., 1980, Le goût du vin, Dunod.
- PIETERS L., BRUYNE T., GROOT A., MEI G., DOMMISSE R., LEMIÈRE G. et VLIETINCK A., 1993, « NMR study of some dihydrobenzofuran lignans », *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 31, nº 7, p. 692-693.
- PIGGOTT J. R., CONNER J. M., CLYNE Ja. et PATERSON A., 1992, « The influence of non-volatile constituents on the extraction of ethyl esters from brandies », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 59, n° 4, p. 477-482.

- PIGGOTT J. R., CONNER J. M., PATERSON A. et CLYNE J., 1993, « Effects on Scotch whisky composition and flavour of maturation in oak casks with varying histories », *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 28, n° 3, p. 303-318.
- PIGGOTT J. R., 1983, *Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development*, E. Horwood Limited.
- PINEAU B., BARBE J.-C., VAN LEEUWEN C. et DUBOURDIEU D., 2007, « Which Impact for β-Damascenone on Red Wines Aroma? », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, nº 10, p. 4103-4108.
- PINEAU B., BARBE J.-C., VAN LEEUWEN C. et DUBOURDIEU D., 2009, « Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific "Red-" and "Black-berry" Aromas in Red Wines », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n° 9, p. 3702-3708.
- PLUSKAL T., CASTILLO S., VILLAR-BRIONES A. et OREŠIČ M., 2010, « MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data », *BMC Bioinformatics*, vol. 11, n<sup>o</sup> 1, p. 395.
- POIRIER N., ROUDNITZKY N., BROCKHOFF A., BELLOIR C., MAISON M., THOMAS-DANGUIN T., MEYERHOF W. et BRIAND L., 2012, « Efficient Production and Characterization of the Sweet-Tasting Brazzein Secreted by the Yeast Pichia pastoris », *Journal of Agricultural* and Food Chemistry, vol. 60, nº 39, p. 9807-9814.
- POISSON L. et SCHIEBERLE P., 2008, « Characterization of the Key Aroma Compounds in an American Bourbon Whisky by Quantitative Measurements, Aroma Recombination, and Omission Studies », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, nº 14, p. 5820-5826.
- PRIDA A., BOULET J.-C., DUCOUSSO A., NEPVEU G. et 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*, vol. 63, nº 4, p. 415-424.
- PRIDA A., DUCOUSSO A., PETIT R. J., NEPVEU G. et PUECH J.-L., 2007, « Variation in wood volatile compounds in a mixed oak stand: strong species and spatial differentiation in whisky-lactone content », *Annals of Forest Science*, vol. 64, n° 3, p. 313-320.
- PRIDA A. et PUECH J.-L., 2006, « Influence of Geographical Origin and Botanical Species on the Content of Extractives in American, French, and East European Oak Woods », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, nº 21, p. 8115-8126.
- PUECH J.-L., JOURET C. et GOFFINET B., 1985, « Evolution des composes phenoliques du bois de chene au cours du vieillissement de l'armagnac », *Sciences des Aliments*, p. 379-391.
- PUECH J.-L., LEAUTE R., CLOT G., NOMDEDEU L. et MONDIES H., 1984, « Evolution de divers constituants volatils et phenoliques des eaux-de-vie de cognac au cours de leur vieillissement », *Sciences des Aliments*, p. 66-80.
- PUECH J. L. et MOUTONNET M., 1992, « Phenolic compounds in an ethanol-water extract of oak wood and in a brandy », *LWT Food Science and Technology*, nº 25.
- PUECH J. L. et MOUTOUNET M., 1988, « Liquid chromatographic determination of scopoletin in hydroalcoholic extract of oak wood and in matured distilled alcoholic beverages », *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, vol. 71, n° 3, p. 512-514.
- PUECH J. L., RABIER P., BORIES-AZEAU J., SARNI F. et MOUTOUNET M., 1990, « Determination of ellagitannins in extracts of oak wood and in distilled beverages matured in oak barrels », *Journal Association of Official Analytical Chemists*, vol. 73, n° 4, p. 498-501.
- PUECH J.-L., 1981, « Extraction and evolution of lignin products in armagnac matured in oak », vol. 32, nº 2, p. 4.
- PUECH J.-L., 1984, « Characteristics of Oak Wood and Biochemical Aspects of Armagnac Aging », vol. 35, nº 2, p. 5.

- PUECH J.-L., 1987, « Extraction of Phenolic Compounds from Oak Wood in Model Solutions and Evolution of Aromatic Aldehydes in Wines Aged in Oak Barrels », *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 38, n° 3, p. 236-238.
- PUECH J.-L., 1988, « Phenolic compounds in oak wood extracts used in the ageing of brandies », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 42, n° 2, p. 165-172.
- PUECH J.-L., FEUILLAT F. et MOSEDALE J. R., 1999, « The Tannins of Oak Heartwood: Structure, Properties, and Their Influence on Wine Flavor », *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 50, n<sup>o</sup> 4, p. 469-478.
- PUENTES C., JOULIA X., VIDAL J.-P.et ESTEBAN-DECLOUX M., 2018, « Simulation of spirits distillation for a better understanding of volatile aroma compounds behavior: Application to Armagnac production », *Food and Bioproducts Processing*, vol. 112, p. 31-62.

PURWAYANTI S., 2013, « Taste Compounds from Crude Extract of Bekkai lan (Albertisia papuana Becc.) », *Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 1, nº 4.

# Q

- QUIDEAU S., JOURDES M., LEFEUVRE D., MONTAUDON D., SAUCIER C., GLORIES Y., PARDON P. et POURQUIER P., 2005, « The Chemistry of Wine Polyphenolic C-Glycosidic Ellagitannins Targeting Human Topoisomerase II », *Chemistry - A European Journal*, vol. 11, nº 22, p. 6503-6513.
- QUIDEAU S., JOURDES M., SAUCIER C., GLORIES Y., PARDON P. et BAUDRY C., 2003, « DNA Topoisomerase Inhibitor Acutissimin A and Other Flavano-Ellagitannins in Red Wine », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 42, nº 48, p. 6012-6014.
- QUINN M. K. et 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*, vol. 36, n° 2, p. 148-155.

### R

- RAHMAN M. M.A., DEWICK P. M., JACKSON D. E. et LUCAS J. A., 1990, « Lignans of Forsythia intermedia », *Phytochemistry*, vol. 29, nº 6, p. 1971-1980.
- RALIOU M., BOUCHER Y., WIENCIS A., BÉZIRARD V., PERNOLLET J.-C., TROTIER D., FAURION A. et MONTMAYEUR J.-P., 2009, « Tas1R1–Tas1R3 taste receptor variants in human fungiform papillae », *Neuroscience Letters*, vol. 451, n° 3, p. 217-221.
- RAUHA J.-P., WOLFENDER J-L., SALMINEN J.-P., PIHLAJA K., HOSTETTMANN K. et VUORELA H., 2001, « Characterization of the Polyphenolic Composition of Purple Loosestrife (Lythrum salicaria) », *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 56, n° 1-2, p. 13-20.
- REED D. R., TANAKA T. et MCDANIEL A. H., 2006, « Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception », *Physiology & Behavior*, vol. 88, nº 3, p. 215-226.
- REGALADO E. L., TOLLE S., PINO J. A., WINTERHALTER P., MENENDEZ R., MORALES A. R. et RODRÍGUEZ J. L., 2011, « Isolation and identification of phenolic compounds from rum aged in oak barrels by high-speed countercurrent chromatography/high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry and screening for antioxidant activity », *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, n° 41, p. 7358-7364.
- REGUEIRO J., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ C., VALLVERDÚ-QUERALT A., SIMAL-GÁNDARA J., LAMUELA-RAVENTÓS R. et IZQUIERDO-PULIDO M., 2014, « Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry », *Food Chemistry*, vol. 152, p. 340-348.

- RENAULT J.-H., NUZILLARD J.-M., INTES O. et MACIUK A., 2002, « Chapter 3 Solvent systems » dans *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol.38, p. 49-83.
- RENAULT J.-H., THÉPENIER P., ZÉCHES-HANROT M., LE MEN-OLIVIER L., DURAND A., FOUCAULT A. et MARGRAFF R., 1997, « Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography », *Journal of Chromatography A*, vol. 763, n° 1-2, p. 345-352.
- REPPEL L., 1954, « Natural coumarins. », *Die Pharmazie*, vol. 9, nº 4, p. 278-299.
- RIBEREAU-GAYON P., 1973, « Interprétation Chimique de la Couleur des Vins Rouges. », *Vitis*, vol. 12, p. 119-142.
- RIBEREAU-GAYON P., GLORIES Y., MAUJEAN A. et DUBOURDIEU D., 2017, Traité d'oenologie - Tome 2 - 7e éd. - Chimie du vin. Stabilisation et traitements, Dunod.
- RIBÉREAU-GAYON P., PONTALLIER P. et GLORIES Y., 1983, « Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 34, n° 5, p. 505-516.
- RIEKSTINA-DOLGE R., KRUMA Z. et KARKLINA D., 2012, « Sensory properties and chemical composition of cider depending on apple variety ».
- ROBICHAUD J. L. et NOBLE A. C., 1990, « Astringency and bitterness of selected phenolics in wine », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 53, n° 3, p. 343-353.
- ROCCHETTI G., GATTI M., BAVARESCO L. et LUCINI L., 2018, « Untargeted metabolomics to investigate the phenolic composition of Chardonnay wines from different origins », *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 71, p. 87-93.
- RODRIGUES L. M. A., DAS GRAÇAS CARDOSO M., SANTIAGO W. D., SOARES L. I., PASSAMANI F. R., ANDRADE SANTIAGO J., DE AZEVEDO LIRA N., NELSON D. L. et BATISTA L. R., 2016, « Phenolic extracts of cachaça aged in different woods and quantifying antioxidant activity and antifungal properties: Phenolic extracts of cachaça aged in different woods », *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 122, nº 4, p. 644-652.
- RODRÍGUEZ DODERO M. C., GUILLÉN SÁNCHEZ D. A., RODRÍGUEZ M. Schwarz et BARROSO C. García, 2010, « Phenolic Compounds and Furanic Derivatives in the Characterization and Quality Control of *Brandy de Jerez* », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, nº 2, p. 990-997.
- RODRÍGUEZ-SOLANA R., SALGADO JOSÉ M., DOMÍNGUEZ J. M. et CORTÉS-DIÉGUEZ S., 2014, « First Approach to the Analytical Characterization of Barrel-Aged Grape Marc Distillates Using Phenolic Compounds and Colour Parameters », *Food Technology and Biotechnology*, vol. 52, nº 4, p. 391-402.
- ROPER S. D. et CHAUDHARI N., 2017, « Taste buds: cells, signals and synapses », *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 18, nº 8, p. 485-497.
- ROSSELLI S., MAGGIO A. M., FARAONE N., SPADARO V., MORRIS-NATSCHKE S. L., BASTOW K. F., LEE K.-H. et BRUNO M., 2009, « The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of Ferulago campestris (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol », *Natural Product Communications*, vol. 4, nº 12, p. 1701-1706.
- ROUDNITZKY N., RISSO D., DRAYNA D., BEHRENS M., MEYERHOF W. et WOODING S. P., 2016, « Copy Number Variation in TAS2R Bitter Taste Receptor Genes: Structure, Origin, and Population Genetics », *Chemical Senses*, vol. 41, n° 8, p. 649-659.
- ROULLIER-GALL C., BOUTEGRABET L., GOUGEON R. D. et SCHMITT-KOPPLIN P., 2014, « A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects », *Food Chemistry*, vol. 152, p. 100-107.
- ROULLIER-GALL C., SIGNORET J., HEMMLER D., WITTING M. A., KANAWATI B., SCHÄFER B., GOUGEON R. D. et SCHMITT-KOPPLIN P., 2018, « Usage of FT-ICR-MS Metabolomics for Characterizing the Chemical Signatures of Barrel-Aged Whisky », *Frontiers in Chemistry*, vol. 6.

- ROULLIER-GALL C., WITTING M. A., TZIOTIS D., RUF A., GOUGEON R. D. et SCHMITT-KOPPLIN P., 2015, « Integrating analytical resolutions in non-targeted wine metabolomics », *Tetrahedron*, vol. 71, nº 20, p. 2983-2990.
- ROUSEFF R. L., MARTIN S. F. et YOUTSEY C. O., 1987, « Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 35, nº 6, p. 1027-1030.
- RUDMAN P., 1963, « The Causes of Natural Durability in Timber Part XI. Some Tests on the Fungi Toxicity of Wood Extractives and Related Compounds », *Holzforschung*, vol. 17, n° 2, p. 54-57.
- RUTZ A., DOUNOUE-KUBO M., OLLIVIER S., BISSON J., BAGHERI M., SAESONG T., EBRAHIMI S. M., INGKANINAN K., WOLFENDER J.-. et Allard P.-M., 2019, « Taxonomically informed scoring enhances confidence in natural products annotation », *bioRxiv*.

S

- SÁENZ-NAVAJAS M.-P., FERNÁNDEZ-ZURBANO P. et FERREIRA V., 2012, « Contribution of Nonvolatile Composition to Wine Flavor », *Food Reviews International*, vol. 28, nº 4, p. 389-411.
- SAKAMOTO K.et KONINGS W. N., 2003, « Beer spoilage bacteria and hop resistance », International Journal of Food Microbiology, vol. 89, nº 2-3, p. 105-124.
- SALAGOITY-AUGUSTE M.-H., TRICARD C. et SUDRAUD P., 1987, « Dosage simultané des aldéhydes aromatiques et des coumarines par chromatographie liquide haute performance: Application aux vins et eaux-de-vie vieillis en fût de chěne », *Journal of Chromatography A*, vol. 392, p. 379–387.
- SALGER M., STARK T. D. et HOFMANN T., 2019, « Taste Modulating Peptides from Overfermented Cocoa Beans », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, nº 15, p. 4311-4320.
- SALMINEN J.-P., ROSLIN T., KARONEN M., SINKKONEN J., PIHLAJA K.i et PULKKINEN P., 2004, « Seasonal Variation in the Content of Hydrolyzable Tannins, Flavonoid Glycosides, and Proanthocyanidins in Oak Leaves », *Journal of Chemical Ecology*, vol. 30, nº 9, p. 1693-1711.
- SANTIAGO Wilder D., CARDOSO Maria das G., A. SANTIAGO Juliana de, GOMES Marcos S., RODRIGUES Leonardo M. A., BRANDÃO Rafaela M., CARDOSO Rodolfo R., AVILA Gabriel B. D', SILVA Bruno L. da et CAETANO Alex R. S., 2014, « Comparison and Quantification of the Development of Phenolic Compounds during the Aging of Cachaça in Oak (Quercus sp) and Amburana (Amburana cearensis) Barrels », *American Journal of Plant Sciences*, vol. 05, nº 21, p. 3140-3150.
- SANZ G., THOMAS-DANGUIN T., HAMDANI El H., LE POUPON C., BRIAND L., PERNOLLET J.-C., GUICHARD E. et TROMELIN A., 2008, « Relationships Between Molecular Structure and Perceived Odor Quality of Ligands for a Human Olfactory Receptor », *Chemical Senses*, vol. 33, nº 7, p. 639-653.
- SANZ M., CADAHIA E., ESTERUELAS E., MUÑOZ Á., FERNANDEZ DE SIMON B., HERNANDEZ T. et ESTRELLA I., 2010, « Phenolic Compounds in Chestnut (Castanea sativa Mill.) Heartwood. Effect of Toasting at Cooperage », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, nº 17, p. 9631-9640.
- SANZ M., SIMÓN Brígida F., CADAHÍA E., ESTERUELAS E., MUÑOZ A., HERNÁNDEZ T., ESTRELLA I. et PINTO E., 2012, « LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (Fraxinus excelsior L. and F. americana L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage: LC-DAD/ESI-MS/MS of ash wood phenolic compounds », *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 47, nº 7, p. 905-918.

- SARNI F., MOUTOUNET M., PUECH J. L. et RABIER P., 1990, « Effect of heat treatment of oak wood on extractable compounds », *Holzforschung*.
- SARRY J. et GUNATA Z., 2004, « Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors », *Food Chemistry*, vol. 87, nº 4, p. 509-521.
- SAUCIER C., BOURGEOIS G., VITRY C., ROUX D. et GLORIES Y., 1997, « Characterization of (+)-Catechin–Acetaldehyde Polymers: A Model for Colloidal State of Wine Polyphenols », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, n° 4, p. 1045-1049.
- SAUCIER C., JOURDES M., GLORIES Y. et QUIDEAU S., 2006, « Extraction, Detection, and Quantification of Flavano-Ellagitannins and Ethylvescalagin in a Bordeaux Red Wine Aged in Oak Barrels », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n° 19, p. 7349-7354.
- SCALBERT A., MONTIES B. et FAVRE J.-M., 1988, « Polyphenols of Quercus robur: Adult tree and in vitro grown calli and shoots », *Phytochemistry*, vol. 27, nº 11, p. 3483-3488.
- SCHARBERT S. et HOFMANN T., 2005, « Molecular Definition of Black Tea Taste by Means of Quantitative Studies, Taste Reconstitution, and Omission Experiments », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, nº 13, p. 5377-5384.
- SCHIFFMAN S.S. et GATLIN C.A., 1993, « Sweeteners: State of knowledge review », *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 17, n° 3, p. 313-345.
- SCHIFFMAN S. S., BOOTH B. J., LOSEE M. L., PECORE S. D. et WARWICK Z. S., 1995, « Bitterness of sweeteners as a function of concentration », *Brain Research Bulletin*, vol. 36, n° 5, p. 505-513.
- SCHIFFMAN S. S., GATLIN L.A., FREY A. E., HEIMAN S. A., STAGNER W. C. et COOPER D. C., 1994, « Taste perception of bitter compounds in young and elderly persons: Relation to lipophilicity of bitter compounds », *Neurobiology of Aging*, vol. 15, n° 6, p. 743-750.
- SCHIFFMAN S. S. et SENNEWALD K., 1981, « Comparison of Taste Qualities and Thresholds of D- and L-Amino Acids I », *Physiology & Behavior*, vol. 27, nº 1, p. 51-59.
- SCHLIENGER J.-L. et MONNIER L., 2014, « Histoire du goût sucré : entre morale et plaisir », *Médecine des Maladies Métaboliques*, vol. 8, nº 3, p. 346-351.
- SCHMIDT O., WUERTELE L. et HARREUS A., 1965, « Natural tannins. XXXIII. Pedunculagin, a 2,3:4,6-bis[(-)-hexahydroxydiphenoyl]-D-glucose from the gallnut », *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, n<sup>o</sup> 690, p. 150-162.
- SCHWARZ M., RODRÍGUEZ M. C., GUILLÉN D. A. et BARROSO C. G., 2011, « Analytical characterisation of a Brandy de Jerez during its ageing », *European Food Research and Technology*, vol. 232, n° 5, p. 813-819.
- SCINSKA A., KOROS E., HABRAT B., KUKWA A., KOSTOWSKI W. et BIENKOWSKI P., 2000, « Bitter and sweet components of ethanol taste in humans », *Drug and Alcohol Dependence*, vol. 60, n<sup>o</sup> 2, p. 199-206.
- SCOTT K., 2005, « Taste Recognition: Food for Thought », Neuron, vol. 48, nº 3, p. 455-464.
- SEIKEL M. K., HOSTETTLER F. D. et NIEMANN G. J., 1971, « Phenolics of Quercus rubra wood », *Phytochemistry*, vol. 10, nº 9, p. 2249-2251.
- SERRA BONVEHÍ J. et VENTURA COLL F., 2000, « Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder », *European Food Research and Technology*, vol. 210, n° 3, p. 189-195.
- SESTELO A. B. F., POZA M. et VILLA T. G., 2004, « B-Glucosidase activity in a Lactobacillus plantarum wine strain », *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 20, p. 633-637.
- SHIN W., KIM S. J., SHIN J. M. et KIM S.-H., 1995, « Structure-Taste Correlations in Sweet Dihydrochalcone, Sweet Dihydroisocoumarin, and Bitter Flavone Compounds », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 38, nº 21, p. 4325-4331.

- SILVA A., NASCIMENTO E. S., CARDOSO D. R. et FRANCO D. W., 2009, « Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit », *Journal of Separation Science*, vol. 32, n° 21, p. 3681-3691.
- SIMMEN B. et HLADIK C. M., 1993, « Perception gustative et adaptation à l'environnement nutritionnel des Primates non-humains et des populations humaines », *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*, vol. 5, n° 3, p. 343-354.
- SIMÓN B. Fernández DE, PÉREZ-ILZARBE J., HERNÁNDEZ T., GÓMEZ-CORDOVÉS C. et ESTRELLA I., 1990, « HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds », *Chromatographia*, vol. 30, nº 1, p. 35-37.
- SINDT L., GAMMACURTA M., WAFFO-TEGUO P., DUBOURDIEU D. et MARCHAL A., 2016, « Taste-Guided Isolation of Bitter Lignans from *Quercus petraea* and Their Identification in Wine », *Journal of Natural Products*, vol. 79, n° 10, p. 2432-2438.
- SINGH N., PYDI S. P., UPADHYAYA J. et CHELIKANI P., 2011, « Structural Basis of Activation of Bitter Taste Receptor T2R1 and Comparison with Class A G-protein-coupled Receptors (GPCRs) », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, nº 41, p. 36032-36041.
- SINGLETON L., 1995, « Maturation of Wines and Spirits: Comparisons, Facts, and Hypotheses », vol. 46, nº 1, p. 18.
- SIRÉN H., SIRÉN K. et SIRÉN J., 2015, « Evaluation of organic and inorganic compounds levels of red wines processed from Pinot Noir grapes », *Analytical Chemistry Research*, vol. 3, p. 26-36.
- SLAGHENAUFI D., MARCHAND-MARION S., RICHARD T., WAFFO-TEGUO P., BISSON J., MONTI J.-P., MERILLON J.-M. et DE REVEL G , 2013, Centrifugal partition chromatography applied to the isolation of oak wood aroma precursors », *Food Chemistry*, vol. 141, n° 3, p. 2238-2245.
- SNAKKERS G., BOULESTEIX J.M., ESTRÉGUIL S., GASCHET J., LABLANQUIE O., FAURE A. et CANTAGREL R., 2003, « Effect of oak wood heating on cognac spirit matured in new barrel: a pilot study », *OENO One*, vol. 37, nº 4, p. 243.
- SOARES S., KOHL S., THALMANN S., MATEUS N., MEYERHOF W.g et DE FREITAS V., 2013, « Different Phenolic Compounds Activate Distinct Human Bitter Taste Receptors », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, nº 7, p. 1525-1533.
- SOARES S., SILVA M. S., GARCÍA-ESTEVEZ I., GROBMANN P., BRÁS N., BRANDÃO E., MATEUS N., DE FREITAS V., BEHRENS M. et MEYERHOF W., 2018, « Human Bitter Taste Receptors Are Activated by Different Classes of Polyphenols », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- SOMERS T. C., 1971, « The polymeric nature of wine pigments », *Phytochemistry*, vol. 10, nº 9, p. 2175-2186.
- SOUQUET J.-M., CHEYNIER V., BROSSAUD F. et MOUTOUNET M., 1996, « Polymeric proanthocyanidins from grape skins », *Phytochemistry*, vol. 43, n° 2, p. 509-512.
- SPRENG S. et HOFMANN T., 2018, « Activity-Guided Identification of *in Vitro* Antioxidants in Beer », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 66, nº 3, p. 720-731.
- STARK T., WOLLMANN N., WENKER K., LÖSCH S., GLABASNIA A.et HOFMANN T., 2010, « Matrix-Calibrated LC-MS/MS Quantitation and Sensory Evaluation of Oak Ellagitannins and Their Transformation Products in Red Wines », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, nº 10, p. 6360-6369.
- STERCKX F. L., MISSIAEN J., SAISON D. et DELVAUX F. R., 2011, « Contribution of monophenols to beer flavour based on flavour thresholds, interactions and recombination experiments », *Food Chemistry*, vol. 126, n° 4, p. 1679-1685.
- STEVENS J. C., 1997, « Detection of Very Complex Taste MixturesGenerous Integration Across Constituent Compounds », *Physiology & Behavior*, vol. 62, nº 5, p. 1137-1143.

- STEWART A. K., RAVINDRA R., VAN WAGONER R. M. et WRIGHT J. L. C., 2018, « Metabolomics-Guided Discovery of Microginin Peptides from Cultures of the Cyanobacterium Microcystis aeruginosa », *Journal of Natural Products*, vol. 81, nº 2, p. 349-355.
- SUGA T., OHTA S., MUNESADA K., IDE N., KUROKAWA M., SHIMIZU M. et OHTA E., 1993, « Endogenous pine wood nematicidal substances in pines, Pinus massoniana, P. strobus and P. palustris », *Phytochemistry*, vol. 33, n<sup>o</sup> 6, p. 1395-1401.
- SYMONDS P., 1978, « High-performance liquid chromatography in the determination of organic acids in wine », *Annales De La Nutrition Et De L'alimentation*, vol. 32, nº 5, p. 957-968.
- SYMONEAUX R., GUICHARD H., LE QUÉRÉ J.-M., BARON A. et CHOLLET S., 2015, « Could cider aroma modify cider mouthfeel properties? », *Food Quality and Preference*, vol. 45, p. 11-17.

- TAKAGI S. F., 1989, « Standardized olfactometries in Japan—a review over ten years », *Chemical Senses*, vol. 14, nº 1, p. 25-46.
- TANAKA T. et KOUNO I., 1996, « Whisky Lactone Precursors from the Wood of *Platycarya strobilacea* », *Journal of Natural Products*, vol. 59, nº 10, p. 997-999.
- TATUM J. H. et ROBERT B. F., 1977, « 6,7-Dimethoxycoumarin in the peels of Citrus », *Phytochemistry*, vol. 16, nº 7, p. 1091-1092.
- TEMPERE S., CUZANGE E., MALAK J., BOUGEANT J.C., DE REVEL G. et SICARD G., 2011, « The Training Level of Experts Influences their Detection Thresholds for Key Wine Compounds », *Chemosensory Perception*, vol. 4, nº 3, p. 99.
- THIBAUD F., SHINKARUK S. et DARRIET P., 2019, « Quantitation, Organoleptic Contribution, and Potential Origin of Diethyl Acetals Formed from Various Aldehydes in Cognac », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, n° 9, p. 2617-2625.
- TOMINAGA T., BLANCHARD L., DARRIET P. et DUBOURDIEU D., 2000, « A Powerful Aromatic Volatile Thiol, 2-Furanmethanethiol, Exhibiting Roast Coffee Aroma in Wines Made from Several Vitis v inifera Grape Varieties », Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 48, nº 5, p. 1799-1802.
- TORIBIO A., 2007, Développement de nouvelles approches méthodologiques en Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt, thèse, Reims.
- TORIBIO A., DELANNAY E., RICHARD B., PLÉ K., ZÈCHES-HANROT M., NUZILLARD J.-M. et RENAULT J.-H., 2007, « Preparative isolation of huperzines A and B from Huperzia serrata by displacement centrifugal partition chromatography », *Journal of Chromatography A*, vol. 1140, n° 1-2, p. 101-106.
- TORIBIO A., NUZILLARD J.-M. et RENAULT J.-H., 2007, « Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates », *Journal of Chromatography A*, vol. 1170, n<sup>o</sup> 1-2, p. 44-51.
- TRICARD C., SALAGOÏTY M.-H. et SUDRAUD P., 1987, « La scopolétine : un marqueur de la conservation en fûts de chêne », *OENO One*, vol. 21, nº 1, p. 33-41.
- TSUJITA T., MATSUO Y., SAITO Y. et TANAKA T., 2017, « Enzymatic oxidation of ellagitannin and a new ellagitannin metabolite from Camellia japonica leaves », *Tetrahedron*, vol. 73, n° 5, p. 500-507.
- TSUKAMOTO H., HISADA S. et NISHIBE S., 1985, « Coumarins from Bark of Fraxinus japonica and F. mandshurica var. japonica », *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 33, nº 9, p. 4069-4073.

Т

- VALENTA Z., GRAY A. H., ORR D. E., PAPADOPOULOS S. et PODEŠVA C., 1962, « The stereochemistry of quassin », *Tetrahedron*, vol. 18, nº 12, p. 1433-1441.
- VAN BEEK T. A., MAAS P., KING B. M., LECLERCQ E., VORAGEN A. G. J. et DE GROOT A., 1990, « Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, nº 4, p. 1035-1038.
- VENUGOPALA K. N., RASHMI V. et ODHAV B., 2013, « Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity », *BioMed Research International*, vol. 2013.
- VIRIOT C., SCALBERT A., LAPIERRE C. et MOUTOUNET M., 1993, « Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 41, n° 11, p. 1872–1879.
- 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, Bordeaux 2.
- VIVAS N. et GLORIES Y., 1996, « Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red Wines During Aging », *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 47, nº 1, p. 103-107.

### W

- WAGNER J., GRANVOGL M. et SCHIEBERLE P., 2016, « Characterization of the Key Aroma Compounds in Raw Licorice (Glycyrrhiza glabra L.) by Means of Molecular Sensory Science », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, nº 44, p. 8388-8396.
- WANG M., CARVER J. J., [...] et BANDEIRA N., 2016, « Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking », *Nature Biotechnology*, vol. 34, nº 8, p. 828-837.
- WANG Q. J., MIELBY L. A., JUNGE J. Y., BERTELSEN A. S., KIDMOSE U., SPENCE C. et BYRNE
  D. V., 2019, « The Role of Intrinsic and Extrinsic Sensory Factors in Sweetness Perception of Food and Beverages: A Review », *Foods*, vol. 8, nº 6, p. 211.
- WEINGES K., MUELLER R., KLOSS P. et JAGGY H., 1970, « Phenolic natural products. XIII. Isolation and determination of the constitution of an optically active dehydrodiconiferyl alcohol from the seeds of the milk thistle Silybum marianum », *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, vol. 736.
- WIEGHAUS A., MAKAROV A., FROEHLICH U., KELLMANN M., DENISOV E. et LANGE O., 2006,
   « The Thermo Scientific Exactive Benchtop LC/MS Orbitrap Mass Spectrometer »,
   *Application Note: 30162 Thermo Scientific.*
- WILDENRADT H. L. et SINGLETON V. L., 1974, « The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging », vol. 25, n° 2, p. 8.
- WILKINSON K. L., ELSEY G. M., PRAGER R. H., TANAKA T. et SEFTON M. A., 2004, « Precursors to oak lactone. Part 2: Synthesis, separation and cleavage of several β-dglucopyranosides of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid », *Tetrahedron*, vol. 60, n° 29, p. 6091-6100.
- WILKINSON K. L., PRIDA A. et HAYASAKA Y., 2013, « Role of Glycoconjugates of 3-Methyl-4-hydroxyoctanoic Acid in the Evolution of Oak Lactone in Wine during Oak Maturation », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, nº 18, p. 4411-4416.

- WINNIG M., BUFE B., KRATOCHWIL N. A., SLACK J. P. et MEYERHOF W., 2007, « The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor », *BMC Structural Biology*, vol. 7, n<sup>o</sup> 1, p. 66.
- WINSTEL D. et MARCHAL A., 2019, « Lignans in Spirits: Chemical Diversity, Quantification, and Sensory Impact of (±)-Lyoniresinol », *Molecules*, vol. 24, 117.
- WOLFENDER J.-L., NUZILLARD J.-M., VAN DER HOOFT J. J. J. , RENAULT J.-H. et BERTRAND S., 2019, « Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography–High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics », Analytical Chemistry, vol. 91, nº 1, p. 704-742.
- WU C., HUANG M., LIN Y., JU H. et CHING H., 2007, « Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins », *Food Chemistry*, vol. 104, nº 4, p. 1464-1471.

# Y

YANG H. H.-L. et LAWLESS H. T., 2005, « Descriptive analysis of divalent salts », *Journal of Sensory Studies*, vol. 20, nº 2, p. 97-113.

# Ζ

- ZACARONI L. M., DAS GRAÇAS CARDOSO M., SACZK A. A., DE MORAES A. R., DOS ANJOS J. P., DE RESENDE MACHADO A. M. et NELSON D. L., 2011, « Determination of Phenolic Compounds and Coumarins in Sugar Cane Spirit Aged in Different Species of Wood », *Analytical Letters*, vol. 44, nº 12, p. 2061-2073.
- ZEHNTER R. et GERLACH H., 1995, « Enantiodifferentiation in Taste Perception of the phyllodulcins », *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 6, nº 11, p. 2779-2786.
- ZHANG Y., HOON M. A., CHANDRASHEKAR J., MUELLER K. L., COOK B., WU D., ZUKER C. S. et RYBA N. J. P., 2003, « Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes: Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways », *Cell*, 2003, vol. 112, n° 3, p. 293-301.
- ZHAO G. Q., ZHANG Y., HOON M. A., CHANDRASHEKAR J., ERLENBACH I., RYBA N. J. P. et ZUKER C. S., 2003, « The Receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste », *Cell*, vol. 115, n° 3, p. 255-266.
- ZHAO T., HE J., WANG X., MA B., WANG X., ZHANG L., LI P., LIU N., LU J. et ZHANG X., 2014, « Rapid detection and characterization of major phenolic compounds in Radix Actinidia chinensis Planch by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 98, p. 311-320.
- ZHU J. X., REN J., QIN J. J., CHENG X. R., ZENG Q., ZHANG F., YAN S. K, JIN H. Z. et ZHANG W. D., 2012, « Phenylpropanoids and lignanoids from Euonymus acanthocarpus », *Archives of Pharmacal Research*, vol. 35, nº 10, p. 1739-1747.

#### VALORISATION SCIENTIFIQUE

#### Publications scientifiques dans des revues internationales

<u>Winstel, D.</u> and Marchal, A. Lignans in Spirits: Chemical Diversity, Quantification, and Sensory Impact of (±)-Lyoniresinol. *Molecules* **2019**, *24* (1), 117.

Gammacurta, M., Waffo-Teguo, P., <u>Winstel, D.</u>, Cretin, B. N., Sindt, L., Dubourdieu, D. and Marchal, A. Triterpenoids from *Quercus petraea*: Identification in Wines and Spirits and Sensory Assessment. *J. Nat. Prod.* **2019**, 82, 2, 265-275.

#### Publication technique dans une revue nationale

Marchal A., Cretin B., <u>Winstel D.</u>, Sindt L., Gammacurta M., Waffo-Téguo P. et Dubourdieu D. Acquisitions récentes sur l'amertume des vins rouges : contribution des composés libérés par le bois de chêne. *Revue Française d'Œnologie*, **2019**, N°292, 20-23

#### Communications orales dans des colloques scientifiques

<u>Winstel D.</u>, Waffo-Téguo P., Marchal A. Développement d'un protocole de purification d'extraits de bois de chêne en vue d'isoler des composés sapides. *Substances Odorantes et Sapides : du plaisir des sens aux effets toxicologiques*, **2018**, CSGA – INRA Dijon, France.

Winstel D., Cretin B., Gammacurta M., Waffo-Téguo P., Marchal A. Application de la CPC à l'étude de composés sapides du vin. *4<sup>ème</sup> Journée Scientifique sur les Substances Naturelles*, **2018**, Maison de la Chimie – Paris, France.

<u>Winstel D.</u>, Waffo-Téguo P., Cretin B., Gammacurta M., Dubourdieu, D., Marchal A. Understanding the taste of wine: isolation and identification of new taste-active compounds in oak wood. *30<sup>th</sup> international symposium on the chemistry of natural products*. **2018**, Athens, Greece.

<u>Winstel D.</u>, Waffo-Téguo P., Cretin B., Gammacurta M., Dubourdieu, D., Marchal A. How oak barrels can influence the taste of wine: current knowledge and recent acquisitions. *ASEV* 70<sup>th</sup> *National conference, oak symposium.* **2019**, Napa Valley Marriott Hotel, Napa, California, USA.

#### **Communications affichées**

<u>Winstel D.</u>, Waffo-Téguo P. et Marchal A. Développement d'un protocole de purification d'extraits de bois de chêne en vue d'isoler des composés sapides. *Journée de l'école doctorale SVS*, **2018**, Bordeaux, France.

<u>Winstel D.</u>, Waffo-Téguo P. and Marchal A. Development of a fractionation protocol for purification of oak wood extracts and isolation of taste-active compounds. *14<sup>th</sup> International Symposium on BioChromatography and Nanoseparations*, **2018**, Talence, France.

<u>Winstel D.</u> and Marchal A. Lignans in spirits: chemical diversity, quantification and sensory impact of (±)-lyoniresinol. *ŒNOIVAS 2019 - 11<sup>th</sup> International Symposium of Œnology - XI In Vino Analytica Scientia*, **2019**, Bordeaux, France.

# Encadrement de stagiaires

Marie André, Master 1 Matteo Zazzarini, Licence 3 Armance Richard, BTS Amandine Hueber, Master 2 François Clavero, Licence 3 Delphine Bahammou, Master 2 Eric Gautier, Master 1

#### ANNEXES

#### ANNEXE 1 – Exemple d'une fiche d'analyse sensorielle

Test triangulaire et profil sensoriel

### TEST TRIANGULAIRE

#### NOM / PRENOM

# Veuillez examiner (**évaluation gustative**) les trois échantillons proposés puis entourez le numéro de l'échantillon que vous percevez différent.

347	988	211
757	982	099
083	847	444
942	759	585
086	824	048
608	239	917

Descripteur gustatif : .....

Date :

#### PROFIL SENSORIEL

Nom/Prénom : Date :

Evaluez ces échantillons en bouche dans l'ordre indiqué sur la feuille, pour les descripteurs suivants :

#### Poste 1

### Sucrosité/douceur



907	0	10
522	0	10

#### Poste 2

#### Sucrosité/douceur

943	0	10
667	0	10

#### Amertume

943	0	10
667	0	10

Annexes

### Poste 3

### Sucrosité/douceur

590	0	10
494	0	10

### Amertume

590	0	10
494	0	10

### Poste 4

### Sucrosité/douceur

427	0	10
356	0	10

#### Amertume

427	0	10
356	0	10

Echantillon	Marque	Туре	Origine	<b>TAV (%)</b>
C-1	Marque A	Cognac	France	40
C-2	Marque A	Cognac	France	40
C-3	Marque A	Cognac	France	40
C-4	Marque A	Cognac	France	40
C-5	Marque B	Cognac	France	40
C-6	Marque B	Cognac	France	40
C-7	Marque C	Cognac	France	40
C-8	Marque C	Cognac	France	40
C-9	Marque C	Cognac	France	40
C-10	Marque D	Cognac	France	40
C-11	Marque D	Cognac	France	40
C-12	Marque E	Cognac	France	42
B-1	Marque F	Brandy	Afrique du Sud	38
B-2	Marque G	Brandy	France	40
B-3	Marque H	Brandy	Allemagne	38
B-4	Marque I	Brandy	France	40
W-1	Marque J	Whisky	Irelande	43
W-2	Marque K	Whisky	Ecosse	40
W-3	Marque L	Whisky	Ecosse	43
W-4	Marque L	Whisky	Ecosse	40
W-5	Marque M	Whisky	Irelande	40
R-1	Marque N	Rhum	Jamaïque	40
R-2	Marque O	Rhum	Guyane	40
R-3	Marque P	Rhum	La Barbade	50
Bo-1	Marque Q	Bourbon	Etats-Unis	50
Bo-2	Marque R	Bourbon	Etats-Unis	45
Bo-3	Marque S	Bourbon	Etats-Unis	43,2
Bo-4	Marque T	Bourbon	Etats-Unis	43

ANNEXE 2 – Caractéristiques des eaux-de-vie commerciales

# ANNEXE 3 – Données brutes de quantification du (±)-lyonirésinol dans les divers spiritueux analysés

Echantillon	Туре	Lyonirésinol (mg/L)
C-1	Cognac	1,69
C-2	Cognac	2,91
C-3	Cognac	0,41
C-4	Cognac	0,20
C-5	Cognac	8,43
C-6	Cognac	5,86
C-7	Cognac	11,77
C-8	Cognac	5,37
C-9	Cognac	3,65
C-10	Cognac	6,19
C-11	Cognac	4,10
C-12	Cognac	0,99
B-1	Brandy	2,61
B-2	Brandy	2,61
B-3	Brandy	0,32
B-4	Brandy	0,86
W-1	Whisky	1,82
W-2	Whisky	0,73
W-3	Whisky	4,60
W-4	Whisky	1,57
R-1	Rhum	0,83
R-2	Rhum	0,79
R-3	Rhum	10,13
Bo-1	Bourbon	0,23

✤ Eaux-de-vie commerciales

### ✤ Eaux-de-vie millésime

Millésime	Réplicat (N°)	Lyonirésinol (mg/L)	Millésime	Réplicat (N°)	Lyonirésinol (mg/L)
	1	0,76		1	5,02
	2	0,70		2	4,61
2015	3	0,82	1995	3	5,09
	4	1,13		4	4,89
	5	0,89		5	5,50
	1	2,04		1	4,41
	2	2,31		2	4,53
2010	3	2,19	1993	3	5,90
	4	2,49		4	4,33
	5	2,74		5	4,51
	1	3,62		1	4,16
	2	4,30		2	3,59
2008	3	2,77	1990	3	4,95
	4	2,58		4	3,81
	5	2,82		5	4,71
	1	3,16		1	2,60
	2	2,72	1072	2	3,07
2005	3	3,23	1973	3	3,02
	4	2,93		4	2,61
	5	3,04		1	3,05
	1	3,95	1070	2	2,65
	2	3,45	1970	3	2,75
2000	3	2,90		4	3,32
	4	3,40			
	5	3,04			

Lyonirésinol (mg/L)	Réplicat (N°)	6 mois d'élevage	12 mois d'élevage	23 mois d'élevage
	1	0,88	1,42	1,99
Chêne Français	2	1,12	1,34	1,63
	3	1,03	1,42	1,93
	1	1,02	0,95	1,27
Chêne Européen	2	0,80	0,91	1,23
	3	0,74	0,99	1,49
	1	1,10	1,25	1,70
Chêne du Caucase	2	0,75	1,49	1,79
	3	1,06	1,07	1,66
	1	1,33	1,60	2,49
Chêne Américain	2	1,49	1,92	2,39
	3	1,34	1,92	2,19
	1	0,12	0,09	0,17
Châtaignier	2	0,06	0,14	0,24
	3	0,09	0,16	0,22

Eaux-de-vie : influence de l'essence et origine géographique

✤ Eaux-de-vie : influence de la sélection gros grain/grain fin

Modalité	Réplicat (N°)	Lyonirésinol (mg/L)	Modalité	Réplicat (N°)	Lyonirésinol (mg/L)
	1	5,33		1	3,80
	2	5,16		2	3,02
	3	4,88		3	3,61
	4	4,99		4	3,16
Cros grain	5	5,06	5,06 5,88 Grain fin	5	2,90
Gros gram	6	5,88		6	3,40
	7	5,19		7	3,76
	8	5,01		8	3,54
	9	5,16		9	3,42
	10	5,35		10	2,89

# ANNEXE 4 – Données brutes de quantification des coumarines dans les vins, les spiritueux et les extraits de bois de chêne analysés

	Num	M:114aima	Dácion	Esculétine	Fraxétine	Scopolétine	Omb.	Coumarine
Inulli.		Millesine	Region	$(\mu g/L)$	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
	VR-1	2011	Bordeaux	255,02	62,06	8,95	43,62	196,16
	VR-2	2011	Bordeaux	111,41	77,03	0,00	11,64	153,26
	VR-3	2011	Bordeaux	42,34	60,84	0,00	30,59	329,98
	VR-4	2011	Bordeaux	105,06	61,92	27,53	5,93	88,64
	VR-5	2011	Bordeaux	42,81	75,62	64,31	5,62	168,20
	VR-6	2011	Bordeaux	63,01	63,18	23,40	7,49	101,46
	VR-7	2006	Bordeaux	65,15	48,43	307,25	< LOQ	221,53
	VR-8	2006	Bordeaux	75,45	45,31	11,41	< LOQ	77,05
	VR-9	2014	Allemagne	206,25	6,60	< LOQ	< LOQ	0,00
	VR-10	2015	Languedoc- Roussillon	268,86	25,29	< LOQ	94,57	278,48
	VR-11	2015	Beaujolais	79,18	23,93	0,00	0,00	29,02
	VR-12	2003	Bordeaux	69,37	<loq< td=""><td>&lt; LOQ</td><td>9,92</td><td>32,40</td></loq<>	< LOQ	9,92	32,40
XI	VR-13	2017	Languedoc- Roussillon	91,57	13,71	0,00	7,04	0,00
cial	VR-14	2012	Bordeaux	12,34	19,58	0,00	0,00	141,79
ner	VR-15	2005	Bordeaux	65,01	5,73	< LOQ	0,00	135,84
um	VR-16	2006	Bordeaux	48,51	< LOQ	0,00	8,81	201,54
S CO	VR-17	2015	Bordeaux	91,50	< LOQ	< LOQ	8,27	277,69
lge	VR-18	1999	Bordeaux	110,04	33,71	< LOQ	11,91	0,00
Roi	VR-19	2017	Espagne	26,53	6,96	7,48	9,06	397,81
ns ]	VR-20	2011	Bordeaux	21,98	22,53	< LOQ	0,00	294,12
Vi	VR-21	2017	Bordeaux	29,42	<loq< td=""><td>6,76</td><td>9,17</td><td>370,95</td></loq<>	6,76	9,17	370,95
	VR-22	2007	Bordeaux	145,93	21,87	7,22	< LOQ	90,36
	VR-23	2017	Espagne	25,72	6,61	< LOQ	12,96	230,74
	VR-24	2016	Espagne	50,54	11,15	6,37	< LOQ	289,90
	VR-25	2010	Espagne	79,96	<loq< td=""><td>&lt; LOQ</td><td>&lt; LOQ</td><td>298,10</td></loq<>	< LOQ	< LOQ	298,10
	VR-26	2010	Espagne	127,22	5,86	5,55	8,65	243,46
	VR-27	2014	Espagne	57,24	<loq< td=""><td>&lt; LOQ</td><td>0,00</td><td>198,52</td></loq<>	< LOQ	0,00	198,52
	VR-28	2016	Espagne	34,09	8,81	10,63	< LOQ	180,80
	VR-29	2014	Vallée du Rhône	93,62	5,75	6,77	19,59	121,52
	VR-30	2010	Vallée du Rhône	132,89	8,65	< LOQ	< LOQ	175,09
	VR-31	2005	Bordeaux	74,82	< LOQ	0,00	0,00	36,95
	VR-32	2010	Bordeaux	113,14	< LOQ	5,49	15,88	204,53
	VR-33	2014	Bourgogne	203,11	6,35	< LOQ	< LOQ	0,00

✤ Vins commerciaux

	VR-34	2014	Bourgogne	158,93	16,77	0,00	< LOQ	56,48
	VR-35	2014	Bourgogne	139,29	24,28	12,06	< LOQ	55,88
	VR-36	2014	Bourgogne	109,65	5,95	7,54	0,00	65,64
	VR-37	2014	Bourgogne	166,29	< LOQ	0,00	0,00	27,21
	VR-38	2013	Bourgogne	189,91	8,97	9,61	0,00	28,77
	VR-39	2000	Bordeaux	51,48	12,32	< LOQ	8,79	235,11
	VR-40	2008	Bordeaux	74,57	21,60	9,97	0,00	103,74
	VR-41	1995	Bordeaux	41,51	< LOQ	< LOQ	14,24	94,49
	VR-42	2005	Bordeaux	77,72	9,39	0,00	20,94	31,88
	VR-43	2003	Bordeaux	210,49	6,01	0,00	0,00	45,36
	VB-1	2016	Alsace	40,68	12,55	43,40	0,00	18,45
	VB-2	2017	Languedoc- Roussillon	34,42	6,72	9,39	0,00	0,00
	VB-3	2014	Languedoc- Roussillon	22,70	10,74	< LOQ	0,00	5,19
	VB-4	2017	Languedoc- Roussillon	38,54	8,88	26,00	0,00	0,00
	VB-5	2017	Bourgogne	21,88	10,43	23,37	0,00	0,00
	VB-6	2016	Bourgogne	59,95	13,35	28,86	0,00	7,33
	VB-7	2014	Bourgogne	26,52	15,00	7,58	0,00	0,00
	VB-8	2014	Bourgogne	38,98	28,16	18,73	0,00	0,00
	VB-9	2013	Bourgogne	44,97	36,55	13,40	0,00	10,73
M	VB-10	2016	Bourgogne	65,28	20,07	17,24	0,00	< LOQ
auy	VB-11	2014	Alsace	43,11	9,21	45,96	5,07	0,00
erci	VB-12	2014	Alsace	30,51	7,39	< LOQ	0,00	0,00
Ĩ	VB-13	2014	Alsace	48,17	14,69	49,25	0,00	0,00
con	VB-14	2014	Alsace	65,71	8,86	< LOQ	0,00	0,00
S	VB-15	2014	Alsace	27,26	9,64	51,79	0,00	0,00
s Blan	VB-16	2015	Vallée du Rhône	67,05	11,24	< LOQ	0,00	1,98
Vin	VB-17	2015	Bourgogne	94,39	30,95	0,00	0,00	0,00
	VB-18	2015	Bourgogne	32,25	15,19	< LOQ	0,00	0,00
	VB-19	2000	Bordeaux	< LOQ	< LOQ	21,38	0,00	0,00
	VB-20	2015	Bordeaux	39,04	7,01	< LOQ	0,00	0,00
	VB-21	2018	Val de Loire	47,70	5,22	< LOQ	0,00	0,87
	VB-22	2016	Bordeaux	17,20	7,97	9,65	0,00	0,00
	VB-23	2013	Bordeaux	66,18	10,59	14,81	0,00	0,00
	VB-24	2003	Bordeaux	58,44	< LOQ	9,79	0,00	0,00
	VB-25	2015	Val de Loire	10,31	7,92	13,15	0,00	0,00
	VB-26	2014	Bordeaux	50,68	< LOQ	34,94	6,72	0,00
	VB-27	2017	Languedoc- Roussillon	74,66	< LOQ	13,83	0,00	22,08

Annexes

VB-28	2016	Alsace	26,67	6,87	19,22	25,33	0,00
VB-29	2014	Alsace	38,82	< LOQ	56,30	5,66	0,00
VB-30	2015	Alsace	43,59	< LOQ	43,96	0,00	21,86
VB-31	2016	Bordeaux	10,38	< LOQ	< LOQ	0,00	0,00
VB-32	2015	Bordeaux	52,43	7,75	28,32	< LOQ	17,42
VB-33	2016	Bordeaux	56,81	< LOQ	13,54	0,00	22,79
VB-34	2013	Vallée du Rhône	15,97	6,77	0,00	0,00	10,01
VB-35	2010	Vallée du Rhône	34,15	5,47	14,44	0,00	29,22
VB-36	2008	Vallée du Rhône	11,15	< LOQ	5,64	0,00	14,27
VB-37	2016	Bourgogne	26,67	5,13	9,45	0,00	16,88
VB-38	2016	Bourgogne	22,51	21,57	0,00	0,00	0,00
VB-39	2013	Bourgogne	56,00	15,20	13,85	0,00	31,55
VB-40	2014	Bourgogne	16,18	11,83	10,15	0,00	8,67
VB-41	2015	Bourgogne	26,67	8,26	0,00	0,00	10,72
VB-42	2009	Val de Loire	47,81	< LOQ	31,22	0,00	27,31
VB-43	2017	Val de Loire	15,23	< LOQ	0,00	0,00	6,93
VB-44	2017	Val de Loire	21,63	< LOQ	< LOQ	0,00	28,80
VB-45	2009	Val de Loire	33,55	< LOQ	< LOQ	0,00	47,24
VB-46	2008	Alsace	92,18	< LOQ	< LOQ	0,00	55,55
VB-47	2017	Alsace	98,51	< LOQ	< LOQ	0,00	11,24

Num. : numérotation ; Omb. : ombelliférone ; LOQ : limite de quantification

### ✤ Eaux-de-vie commerciales

Echontillong	Туре	Esculétine	Fraxétine	Scopolétine	Omb.	Coumarine	4-Me
Echantinons		(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
C-1	Cognac	41,68	22,71	40,08	0,00	121,82	68,43
C-2	Cognac	118,72	63,73	96,12	0,00	117,21	90,07
C-3	Cognac	73,64	69,43	72,45	0,00	125,04	116,01
C-4	Cognac	91,18	45,13	70,11	0,00	77,11	41,11
C-5	Cognac	92,65	58,80	72,34	0,00	128,88	190,20
C-6	Cognac	95,81	28,81	66,83	0,00	71,20	7,18
C-7	Cognac	106,20	49,24	88,25	84,82	109,03	103,98
C-8	Cognac	53,58	36,90	45,15	0,00	66,96	79,79
C-9	Cognac	64,07	42,92	53,62	0,00	109,88	189,45
C-10	Cognac	97,26	16,11	75,85	0,00	99,03	198,73
C-11	Cognac	130,42	14,39	82,89	0,00	79,20	188,83
C-12	Cognac	212,36	8,71	177,63	0,00	86,23	28,66
B-1	Brandy	109,32	6,68	91,39	0,00	103,67	14,82
B-2	Brandy	43,28	18,72	40,49	0,00	32,49	271,98
B-3	Brandy	66,12	7,71	59,92	0,00	38,41	265,41
B-4	Brandy	43,45	9,24	48,79	0,00	21,11	154,21
W-1	Whisky	161,91	27,17	406,01	0,00	66,58	6,12
W-2	Whisky	59,13	15,93	170,43	0,00	30,16	11,23
W-3	Whisky	293,12	18,15	727,68	23,18	115,09	12,59
<b>W-4</b>	Whisky	87,57	< LOQ	522,64	0,00	222,25	51,09
W-5	Whisky	169,61	16,34	357,88	0,00	80,97	8,39
<b>R-1</b>	Rhum	151,44	10,60	502,40	0,00	107,80	15,94
R-2	Rhum	175,64	0,00	549,47	0,00	67,69	6,06
R-3	Rhum	391,28	214,93	1443,42	0,00	465,64	87,91
Bo-1	Bourbon	110,91	7,47	1303,42	0,00	172,42	43,96
Bo-2	Bourbon	203,94	17,63	995,63	0,00	248,92	70,09
Bo-3	Bourbon	188,52	28,92	890,92	0,00	414,77	77,40
Bo-4	Bourbon	237,65	20,12	1133,99	0,00	193,82	46,33

Omb. : ombélliférone ; 4-Me : 4-méthylombelliférone
#### ✤ Eaux-de-vie millésimes

Millésime	Réplicat (N°)	Esculétine (µg/L)	Fraxétine (µg/L)	Scopolétine (µg/L)	Omb. (µg/L)	Coumarine (µg/L)	4-Me (μg/L)
	1	9,37	12,95	14,42	0,00	30,21	67,40
	2	15,22	18,49	23,60	0,00	47,80	99,05
2015	3	38,33	28,35	39,50	0,00	28,28	41,83
	4	45,88	22,01	32,76	0,00	35,58	79,90
	5	9,14	11,75	20,63	0,00	33,80	57,86
	1	69,41	41,23	55,96	0,00	47,31	72,56
	2	77,11	58,36	71,91	0,00	50,00	89,31
2010	3	75,09	61,12	82,77	0,00	54,03	117,62
	4	85,93	62,40	91,62	0,00	129,25	328,65
	5	91,17	59,69	98,06	0,00	73,84	164,58
	1	94,61	74,79	72,68	0,00	144,41	355,02
	2	274,57	205,23	213,50	0,00	264,78	614,98
2008	3	134,47	74,33	106,00	0,00	116,19	239,58
	4	122,11	73,25	110,27	0,00	92,26	175,72
	5	76,64	98,38	138,26	0,00	97,44	150,30
	1	252,60	194,77	274,79	0,00	209,19	357,59
	2	104,31	67,01	106,53	0,00	87,59	147,25
2005	3	96,24	75,73	129,47	0,00	112,43	185,85
	4	133,40	109,78	170,47	0,00	108,65	172,38
	5	112,88	97,52	144,12	0,00	92,10	171,62
	1	149,01	97,81	153,32	0,00	113,45	125,94
	2	141,86	95,03	133,35	0,00	115,82	136,98
2000	3	116,57	86,25	133,84	0,00	103,50	125,86
	4	159,21	103,06	158,29	0,00	112,20	130,35
	5	172,40	96,28	148,06	0,00	114,69	114,96
	1	241,43	153,35	198,33	0,00	194,87	185,33
	2	239,35	135,46	201,44	0,00	200,81	95,56
1995	3	269,12	173,48	226,91	0,00	215,02	201,67
	4	249,95	157,51	210,25	0,00	210,96	216,71
	5	238,63	155,85	208,90	16,75	197,06	188,08
1002	1	275,77	162,06	285,84	0,00	172,16	130,76
1773	2	183,81	109,77	179,74	0,00	95,88	53,22

	3	266,14	245,38	316,04	0,00	224,47	234,20
	4	222,76	132,61	192,47	0,00	127,04	73,92
	5	224,80	155,76	257,67	27,58	143,62	86,88
	1	197,90	92,32	188,39	54,84	129,17	76,15
	2	184,73	90,31	163,11	45,36	103,38	43,03
1990	3	357,83	198,09	363,23	22,51	139,90	91,50
	4	273,19	114,16	213,40	16,96	110,51	45,71
	5	291,18	116,74	201,79	0,00	120,91	73,23
	1	254,62	82,05	177,56	0,00	116,65	24,99
1072	2	205,73	59,25	152,66	28,41	105,73	20,89
1975	3	258,77	79,37	182,05	0,00	139,61	33,00
	4	238,25	77,88	159,67	243,18	113,18	29,94
	1	329,12	66,45	256,37	0,00	181,77	35,51
1070	2	341,97	73,45	274,24	0,00	182,80	34,17
1970	3	322,46	70,15	262,99	0,00	192,09	37,09
	4	359,60	80,00	262,68	0,00	201,06	47,74

Omb. : ombélliférone ; 4-Me : 4-méthylombelliférone

<ul> <li>Extraits de bois de chên</li> </ul>
--

	Chauffe	Réplicat (N°)	Esculétine	Fraxétine	Scopolétine	Coumarine	4-Me
				(h	ug/g de bois se	ec)	
	BCF	1	0,14	0,35	1,44	3,55	9,27
	BCF	2	0,05	0,16	0,04	7,10	20,57
	BCF	3	0,17	0,83	1,00	2,99	11,30
	BCF	4	0,08	0,34	0,24	6,19	18,58
	BCF	5	0,20	0,91	1,03	3,11	10,02
٩	BCF	6	0,05	0,26	0,07	4,49	15,21
SSil	BCF	7	0,07	0,48	0,21	5,16	17,59
e se	BCF	8	0,15	0,78	0,98	3,76	13,01
nên	BCF	9	0,15	0,53	1,13	2,73	8,25
Cl	BCN	1	0,62	1,42	2,78	4,41	9,00
	BCN	2	0,05	0,17	0,02	4,85	7,68
	BCN	3	0,53	1,24	1,68	3,70	8,26
	BCN	4	0,30	0,93	0,25	4,83	10,63
	BCN	5	1,15	1,47	1,58	3,11	6,67
	BCN	6	0,08	0,26	0,03	4,44	7,66

	BCN	7	0,30	0,10	0,31	3,92	8,30
	BCN	8	0,60	0,97	1,82	3,18	6,26
	BCN	9	1,02	0,98	2,76	3,72	7,03
	BNC	1	1,05	0,86	5,40	0,18	0,10
	BNC	2	0,04	0,13	0,02	0,18	0,14
	BNC	3	0,96	0,77	3,63	0,14	0,13
	BNC	4	0,33	0,75	0,50	0,19	0,11
	BNC	5	2,97	2,26	3,75	0,15	0,19
	BNC	6	0,05	0,20	0,10	0,15	0,03
	BNC	7	0,14	0,58	0,44	0,16	0,07
	BNC	8	0,76	0,90	4,13	0,17	0,07
	BNC	9	1,47	1,07	4,35	0,16	0,10
	BCF	1	0,08	0,37	0,07	1,98	6,82
	BCF	2	0,05	0,13	0,08	5,15	16,18
	BCF	3	0,04	0,10	0,05	5,27	17,91
	BCF	4	0,04	0,26	0,12	3,89	14,19
	BCF	5	0,07	0,10	0,11	3,10	10,80
	BCF	6	0,04	0,25	0,09	3,13	8,27
	BCF	7	0,05	0,16	0,04	2,83	9,57
	BCF	8	0,05	0,15	0,07	4,71	16,75
	BCF	9	0,05	0,52	0,20	4,94	17,17
	BCN	1	0,24	0,55	0,11	4,51	10,91
<b>M</b> )	BCN	2	0,05	0,16	0,15	5,19	10,32
culé	BCN	3	0,06	0,10	0,03	5,00	11,15
ono	BCN	4	0,04	0,33	0,17	4,71	13,56
péd	BCN	5	0,22	0,23	0,10	5,02	13,02
ne ]	BCN	6	0,05	0,32	0,08	4,75	10,28
hê	BCN	7	0,05	0,14	0,05	3,96	8,84
U	BCN	8	0,06	0,31	0,13	4,69	11,08
	BCN	9	0,16	0,77	0,38	4,23	10,17
	BNC	1	0,27	0,41	0,23	0,13	0,07
	BNC	2	0,05	0,15	0,30	0,14	0,04
	BNC	3	0,05	0,12	0,02	0,14	0,11
	BNC	4	0,05	0,21	0,35	0,11	0,07
	BNC	5	0,19	0,27	0,32	0,19	0,12
	BNC	6	0,04	0,24	0,08	0,12	0,03
	BNC	7	0,08	0,14	0,08	0,14	0,11
	BNC	8	0,07	0,17	0,14	0,13	0,19
	BNC	9	0,04	0,43	0,56	0,16	0,04

4-Me : 4-méthylombelliférone

# ANNEXE 5 – Données RMN des composés *m/z* 517-1 (acide barrinique) et 517-2 (acide bartogénique)

m/z 517-1 (acide barrinique)



m/z 517-2 (acide bartogénique)



Numéro de l'atome	$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité ( <i>J</i> en Hz)	$\delta^{13}$ C (en ppm)
1	1,26 m 1,63 brd	41,6
2	4,15 td (12,1, 3,4)	65,8
3	3,96 d (2,5)	73,7
4	/	50,6
5	1,46 m	48,0
6	1,72 m 1,87 m	19,6
7	1,35 m 1,53 m	32,6
8	/	39,1
9	1,87 m	46,8
10	/	38,6
11	1,95 m 2,02 m	23,5
12	5,35 t (3,6)	124,0
13	/	143,4
14	/	41,9
15	1,03 m 1,77 m	28,4
16	1,64 m 2,30 m	27,3
17	/	45,1
18	3,07 m	43,9
19	3,27 m	81,1
20	/	34,7
21	1,05 m 1,78 m	27,9
22	1,65 m 1,78 m	32,6
23	/	176,0
24	1,33 s	23,6
25	0,88 s	13,3
26	0,79 s	16,2
27	1,35 s	29,1
28	/	179,6
29	0,98 s	28,2
30	0,95 s	23,7

• Déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du m/z 517-2 (CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H NMR 600 MHz)

Numéro de l'atome	δ <sup>1</sup> H (en ppm) multiplicité (J en Hz)	$\delta^{13}$ C (en ppm)	
1	0,92 m	46.8	
1	2,0 brd	- , -	
2	4,10 td (10,5, 4,8)	67,8	
3	2,90 d (9,8)	82,9	
4	/	49,3	
5	1,05 m	56,1	
C	1,51 m	20.1	
6	1,81 m	_ • ; _	
7	1,36 m	32.7	
/	1,52 m	- ,.	
8	/	38,8	
9	1,78 m	47,4	
10	/	38,3	
11	1,96 m	23.5	
11	2,02 m	23,5	
12	5,35 t (3,9)	123,2	
13	/	143,2	
14	/	41,3	
15	1,03 m	28.2	
	1,77 m	20,2	
16	1,63 m	27.3	
10	2,30 td (13,5, 3,5)	27,0	
17	/	45,3	
18	3,07 m	43,8	
19	3,27 d (3,5)	80,8	
20	/	34,5	
21	1,00 m	28.1	
	1,76 m	,	
22	1,62 m	32,7	
22	1,76 m	22.5	
23	1,45 s	23,5	
24	/	178,9	
25	0,96 s	13,7	
26	0,80 s	16,1	
27	1,32 s	23,5	
28	/	180,8	
29	0,98 s	27,5	
30	0,95 s	23,7	

• Déplacements chimiques <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du $m/z$ 517-2 (CD <sub>3</sub> OD, <sup>1</sup> H NMR 600 MHz)
--

0~11"

0

H ₹

Ľ∎Η

ЬН

11'

ڑ H

0

10'

Η

OH

11

-10"

#### ANNEXE 6 – Données RMN de l'HDPP-syringarésinol

Numéro de		$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité	$\delta^{13}C$	
_	1 atome	( <i>J</i> en HZ)	(en ppm)	
	1	/	134,8	ſ
	2/6	6,68 s	102,2	(
3/5		/	152,1	HO
	4	/	137,5	9
	7	4,78 d (3,9)	85,2	
	8	3,11 brd	53,7	
	9	3,89 m	70,83	
	10/11	3,73 s	54,6	
	1'	/	134,2	
	2'/6'	6,66 s	102,4	
3'/5'		/	147,4	
	4'	/	131,5	
	7'	4,74 d (J = 4,1)	85,6	
8'		3,13 brd	53,7	
	9'	4,27 m	70,96	
	10'/11'	3,84 s	54,7	
	1"	/	140,8	
	2"/6"	7,35 s	105,8	
	3"/5"	/	147,03	
	4"	/	138,1	
	7"	/	195,5	
	8"	5,29 t (5,6)	83,5	
	9"	3,95 m	61,9	
	10"/11"	3,85 s	56,2	

✤ Déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H NMR 600 MHz)

#### Spectre <sup>1</sup>H de l'HDPP-syringarésinol



#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY de l'HDPP-syringarésinol





#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY de l'HDPP-syringarésinol

✤ Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC de l'HDPP-syringarésinol





# Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC de l'HDPP-syringarésinol

#### ANNEXE 7 – Données RMN des précurseurs de la whisky-lactone (P-WL-1 et P-WL-2)

Déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du P-WL-1 et P-WL-2 (CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H NMR 600 MHz)

#### P-WL-1



P-WL-2



P-WL-1	Numéro de	$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité	$\delta^{13}$ C (en ppm)
	l'atome	(J en Hz)	177.26
	1	/	177,26
	2	2,14 m	37.16
	Z	2,56 d (15,1 ; 6,0)	01,20
	3	2,22 m	32,81
	4	3,63 m	82,33
		1,43 m	20.56
Chaîne	5	1,50 m	50,50
		1,22 m	07.11
	6	1,31 m	27,11
		1,12 m	
	7	1,18 m	21,8
	8	0,74 t (7,2)	12,34
	9	0,93 d (6,8)	13,09
	1'	4,51 d (7,8)	102,55
	2'	3,45 dd (9,4 ; 8,1)	72,7
	2 3'	5.1 t (9.2)	77,6
Glucopyranosyle	2' 4'	3 69 m	69,6
	5'	3,02 m	73,6
	5	4,45 dd (11.8 ; 6,4 Hz)	<b>(2</b> .00)
	6'	4,50 dd (11,6 ; 2,2 Hz)	63,08
	1"	/	120,12
	2"	7,13 s	108,8
	3"	/	138,4
Galloyle 1	4"	/	144,8
	5"	/	144,8
	6"	7,13 s	108,8
	7"	/	166,8
	1'''	/	119,75
	2'''	7,10 s	108,7
	3"'	/	138,5
Galloyle 2	4'''	/	144,8
	5'''	/	144,8
	6'''	7,10 s	108,7
	7'''	/	167,06

P-WL-2	Numéro de	$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité	$\delta^{13}$ C (en ppm)
	1 atomic	/	178,5
	1	$2 14 dd (14 5 \cdot 7 6)$	<b>y</b> -
	2	2,11  dd (11,5,7,7,0)	33,04
		2,55 dd (14,0 , 0,5)	22.17
	3	2,23 m	33,17
	4	3,65 m	82,15
	5	1,42 m	30.68
Chaîne	3	1,51 m	30,00
		1,22 m	07.11
	6	1,30 m	27,11
		1,12 m	
	7	1.18 m	21,8
	8	0,74 t (7,3)	12,34
	Q Q	0,94 d (7,0)	13,26
	1'	4,51 d (8)	102,77
	2'	3,30 m	74,3
	2	$373 \pm (0.6)$	74.4
Classication	J 41	5,75 ( (9,0)	71.3
Glucopyranosyle	4	5,04 t (10,0)	71,3
	5'	3,86 m	/1,4
	6'	4,26 m	62,76
		4,25 m	
	1"	/	119,52
	2"	7,10 s	108,63
	3"	/	138,52
Galloyle 1	4"	/	145,12
	5"	/	145,12
	6" 7"	/,10 s	108,63
	/	/	110,75
	ı 2'''	7 08 s	117,52
	2 3'''	/,003	138.52
Gallovle 2	4'''	. /	145,12
	5'''	/	145,12
	6'''	7,08 s	108,63
	7'''	/	166,75

# Spectre <sup>1</sup>H des **P-WL-1 et P-WL-2**



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY du **P-WL-1** 



#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY du **P-WL-1**



#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du **P-WL-1**



#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC du **P-WL-1**



#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY du **P-WL-2**



#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY du **P-WL-2**



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du **P-WL-2** 





# Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC du **P-WL-2**

#### ANNEXE 8 – Données RMN de la quercusnine A

♦ Déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de la quercusnine A (CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H NMR 600 MH)



	Numéro de	$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité	$\delta^{13}$ C (en ppm)
	l'atome	(J en Hz)	
	1	/	
	2	/	140,1
	3	/	149,1
	4	/	141,3
Cycle A	5	/	133,6
	6	7,86 s	116,1
	7	/	171,4
	8	7,32 s	77,1
	9	/	169,8
	1	/	122,9
	2	/	112,5
	3	/	147,5
Cycle B	4	/	138,1
	5	/	146,5
	6	6,96 s	112,5
	7	/	164,9
	1'	5,80 d (4,1)	84,9
	2'	4,27 d (4,1)	74,6
	3'	2,78 s	69,4
Glucose	4'	4,78 dd (8,3 ; 1,0)	76,2
	5'	5,14 dd (8,3 ; 2,6)	74,1
	6'	4,85 brd 3.82 brd	65,9
	1"	/	
	2"	/	116,1
	3"	/	144,1
HHDP	4"	/	137,2
(Glucose-4)	5"	/	145,1
	6"	6,72 s	109,8
	7"	/	163,6
	1'''	/	,
	2'''	/	116.2
	3'''	/	144,1
HHDP	4'''	/	136.9
(Glucose-6)	5'''	/	145.5
	6'''	6.56 s	108.9
	7'''	/	170.4

#### Spectre <sup>1</sup>H de la quercusnine A



# ✤ Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC de la quercusnine A





#### ✤ Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC de la quercusnine A

#### ANNEXE 9 – Données RMN de la pédunculagine

✤ Déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de la pédunculagine (CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H NMR 600 MHz)



		α-glucose		$\beta$ -glucose		
	Numéro de	$\delta^{1}$ H (en ppm)	$\delta^{13}$ C (en	$\delta^{1}$ H (en ppm)	$\delta^{13}$ C (en	
	l'atome	multiplicité (J en Hz)	ppm)	multiplicité ( <i>J</i> en Hz)	ppm)	
Glucose	1'	5,36 m	90,7	4,96 d (8,1)	94,2	
	2'	5,12 m	74,9	4,86 m	77,13	
	3'	5,49 m	75,1	5,27 m	76,5	
	4'	5,11 m	68,5	5,11 m	68,5	
	5'	4,15 t (7,8)	66,2	4,58 t (8,6)	71,4	
	6'	3,88 dd (13 ; 1,2) 5,32 m	62,4	3,82 dd (13 ; 1,4) 5,32 m	62,4	
	1	/	n.d	/	n.d	
	2	/	115,1	/	115,1	
	3	/	144,5	/	144,5	
Cycle A	4	/	135,9	/	135,6	
	5	/	144,5	/	144,5	
	6	6,50 s	106,5	6,53 s	106,5	
	7	/	167,7	/	167,7	
	1	/	n.d	/	n.d	
	2	/	113,6	/	113,6	
	3	/	144,1	/	144,1	
Cycle B	4	/	135,6	/	135,6	
	5	/	144,1	/	144,1	
	6	6,37 s	106,3	6,39 s	106,5	
	7	/	169,3	/	169,3	
	1	/	n.d	/	n.d	
	2	/	115,1	/	115,1	
	3	/	144,2	/	144,2	
Cycle C	4	/	135,6	/	135,6	
-	5	/	144,2	/	144,2	
	6	6,62 s	107,7	6,62 s	107,7	
	7	/	165,3	/	165,3	
	1	/	n.d	/	n.d	
	2	/	113,6	/	113,6	
	3	/	144,2	/	144,2	
Cycle D	4	/	136,0	/	136,0	
-	5	/	144,2	/	144,2	
	6	6,59 s	106,5	6,60 s	106,5	
	7	/	168,5	/	168,5	

Spectre <sup>1</sup>H de la pédunculagine



# ✤ Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC de la pédunculagine





#### ✤ Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC de la pédunculagine

#### ANNEXE 10 – Données RMN du composé *m/z* 539

Hypothèse de structure et déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé *m/z* 539 (CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H NMR 600 MHz)

	Numéro de	$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité	$\delta^{13}$ C (en
	l'atome	(J en Hz)	ppm)
	1	/	120,1
	2	7,1 s	108,7
	3	/	145,5
Gallate	4	/	138,4
	5	/	145,5
	6	7,1 s	108,7
	7	/	166,7
	1'	4,66 d (7,8)	98,3
	2'	3,20 t (8,7)	79,1
	3'	3,66 m	73,5
Hexose	4'	3,55 t (9,6)	70,6
	5'	3,77 m	75,9
	6'	4,62 dd (12,3 ; 2,5) 4,42 dd (12 ; 5,5)	62,9
	1"	4,48 dd (9,8 ; 5,6)	78,3
	2"	/	127,9
	3"	6,71 s	104,9
	4"	/	147,8
	5"	/	147,8
$C_{11}H_{14}O_{7}$	6"	6,51 s	106,3
C]]11]4O5	7"	/	124,5
	8"	3,39 m	60.7
		3,47 m	00,7
	9"	3,81 m	81,2
	10"	3,85 s	55,4
	11"	3,85 s	55,4



Spectre <sup>1</sup>H du composé m/z 539



• Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY du composé m/z 539



#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY du composé m/z 539



Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du composé m/z 539





# Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC du composé m/z 539

#### ANNEXE 11 – Données RMN de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle

Déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle (CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H NMR 600 MHz)



Numéro de l'atome	$\delta^{1}$ H (en ppm) multiplicité ( <i>J</i> en Hz)	$\delta^{13}$ C (en ppm)	
1	-	133,4	
2	6,95 d (1,8 Hz)	108,3	
3	-	147,3	
4	-	146,2	
5	6,77 d (8,3 Hz)	114,5	
6	6,82 dd (8 ; 2 Hz)	117,9	
7	5,5 d (6,5 Hz)	84,6	
8	3,47 dd (12,7 ; 6,3 Hz)	53,3	
9	3,83 m ; 3,75 m	63,3	
10	3,82 s	54,2	
1'	-	135,6	
2'	6,73 s	117,1	
3'	-	128,3	
4'	-	146,4	
5'	-	143,9	
6'	6,73 s	112,4	
7'	2,63 t (7,7 Hz)	30,82	
8'	1,82 m	34,0	
9'	3,57 t (6,3 Hz)	60,35	
10'	3,85 s	55,1	

#### Spectre <sup>1</sup>H de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle



### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle





#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle

Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle





#### Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC de l'alcool dihydrodéhydrodiconiféryle

#### ANNEXE 12 – Données brutes de quantification de la Partie IV

✤ Vins commerciaux

		Acide		Alc-	HHDP-		
	Num.	Millésime	Région	gallique	Syr. (µg/L)	diHDDC	syringarésinol
				(mg/L)		(µg/L)	(µg/L)
	VR-1	2011	Bordeaux	86,39	0,00	485,72	56,69
	VR-2	2011	Bordeaux	72,31	0,00	464,75	53,79
	VR-3	2011	Bordeaux	78,49	0,00	361,82	22,35
	VR-4	2011	Bordeaux	53,66	0,00	500,85	67,06
	VR-5	2011	Bordeaux	43,23	0,00	412,60	48,25
	VR-6	2011	Bordeaux	45,82	0,00	410,62	56,22
	VR-7	2006	Bordeaux	65,53	0,00	349,52	35,52
	VR-8	2006	Bordeaux	57,70	0,00	374,10	44,21
	VR-9	2014	Ahr Allemagne	52,32	0,00	252,93	30,35
	VR-10	2015	Languedoc- Roussillon	52,12	0,00	555,38	35,00
	VR-11	2015	Beaujolais	48,53	0,00	348,67	25,92
	VR-12	2003	Bordeaux	9,79	0,00	364,17	31,40
iaux	VR-13	2017	Languedoc- Roussillon	34,54	0,00	323,34	24,71
ner	VR-14	2012	Bordeaux	45,88	0,00	589,44	57,20
mm	VR-15	2005	Bordeaux	30,73	0,00	216,59	21,86
00 (	VR-16	2006	Bordeaux	44,04	0,00	277,14	30,79
ige	VR-17	2015	Bordeaux	45,16	389,13	391,69	63,48
Rou	VR-18	1999	Bordeaux	10,15	0,00	203,59	39,18
ns ]	VR-19	2017	Espagne	51,20	0,00	643,78	0,00
Vi	VR-20	2011	Bordeaux	44,35	0,00	326,52	34,64
	VR-21	2017	Bordeaux	36,63	0,00	395,94	21,55
	VR-22	2007	Bordeaux	30,97	0,00	348,04	45,72
	VR-23	2017	Espagne	33,67	0,00	359,45	21,56
	VR-24	2016	Espagne	32,91	305,36	409,54	32,47
	VR-25	2010	Espagne	28,88	0,00	395,15	52,91
	VR-26	2010	Espagne	56,38	0,00	479,51	37,67
	VR-27	2014	Espagne	32,29	320,14	490,77	34,45
	VR-28	2016	Espagne	32,01	0,00	665,35	21,14
	VR-29	2014	Vallée du Rhône	46,88	0,00	405,73	55,49
	VR-30	2010	Vallée du Rhône	57,43	295,75	459,52	63,27
	VR-31	2005	Bordeaux	58,79	0,00	509,74	26,34
	VR-32	2010	Bordeaux	54,00	196,56	454,30	31,38

	VR-33	2014	Bourgogne	12,29	358,40	207,20	30,24
	VR-34	2014	Bourgogne	49,08	0,00	215,75	28,21
	VR-35	2014	Bourgogne	52,13	0,00	258,79	32,81
	VR-36	2014	Bourgogne	59,82	0,00	258,44	44,86
	VR-37	2014	Bourgogne	25,77	0,00	159,66	31,53
	VR-38	2013	Bourgogne	32,87	264,56	252,40	44,25
	VR-39	2000	Bordeaux	38,16	191,43	264,15	35,20
	VR-40	2008	Bordeaux	44,92	0,00	329,84	42,17
	VR-41	1995	Bordeaux	11,63	0,00	202,68	36,16
	VR-42	2005	Bordeaux	12,92	0,00	287,93	43,78
	VR-43	2003	Bordeaux	40,42	0,00	212,45	27,79
	VB-1	2016	Alsace	0,80	0,00	85,74	0,00
	VB-2	2017	Languedoc-	2.02	0.00	204,28	0,00
		2017	Roussillon	2,92	0,00		
	VD 2	2014	Languedoc-	2,71	0,00	206,32	20,77
	VB-3	2014	Roussillon				
		2017	Languedoc-	0.67	0,00	157,17	21,19
	VB-4	2017	Roussillon	2,67			
	VB-5	2017	Bourgogne	1,28	0,00	109,12	0,00
	VB-6	2016	Bourgogne	0,52	0,00	94,81	0,00
	VB-7	2014	Bourgogne	0,73	0,00	156,77	0,00
	VB-8	2014	Bourgogne	4,80	1833,31	353,91	90,27
	VB-9	2013	Bourgogne	3,77	793,02	262,71	75,49
XI	VB-10	2016	Bourgogne	2,59	609,74	205,00	33,01
ciaı	VB-11	2014	Alsace	1,26	0,00	100,22	0,00
ıer	VB-12	2014	Alsace	0,51	0,00	133,82	0,00
um	VB-13	2014	Alsace	0,98	0,00	73,79	0,00
00 (	VB-14	2014	Alsace	0,90	0,00	71,07	0,00
nce	VB-15	2014	Alsace	0,36	0,00	66,49	0,00
Bla	VB-16	2015	Vallée du	2.60	408 75	370.92	34,30
ins		2013	Rhône	2,00	+00,75	570,92	
Ň	VB-17	2015	Bourgogne	4,47	348,87	336,74	34,90
	VB-18	2015	Bourgogne	0,59	0,00	147,69	0,00
	VB-19	2000	Bordeaux	4,85	494,17	182,26	26,24
	VB-20	2015	Bordeaux	3,27	256,23	196,84	20,97
	VB-21	2018	Val de Loire	1,28	0,00	115,91	0,00
	VB-22	2016	Bordeaux	2,01	0,00	153,32	0,00
	VB-23	2013	Bordeaux	5,12	1819,62	221,56	64,78
	VB-24	2003	Bordeaux	3,52	522,85	86,86	34,52
	VB-25	2015	Val de Loire	1,40	0,00	123,53	0,00
	VB-26	2014	Bordeaux	7,77	720,26	166,09	49,89
	VB-27	2017	Languedoc- Roussillon	1,55	100,47	112,44	0,00
	VB-28	2016	Alsace	0,87	0,00	75,00	0,00
2014	Alsace	2,22	0,00	114,23	0,00		
------	--	---	--	--	---		
2015	Alsace	0,92	0,00	175,07	0,00		
2016	Bordeaux	0,88	0,00	99,02	0,00		
2015	Bordeaux	3,29	661,76	165,39	34,91		
2016	Bordeaux	3,68	341,82	301,95	31,90		
2012	Vallée du	10 70	125 29	171.90	22.57		
2015	Rhône	10,70	423,38	1/1,89	25,57		
2010	Vallée du	2.25	520.01	175 15	21.65		
2010	Rhône	2,55	520,91	423,43	51,05		
2008	Vallée du	2 15	461 73	252.82	22.06		
2008	Rhône	5,45	401,75	233,82	22,00		
2016	Bourgogne	3,71	528,16	157,21	38,98		
2016	Bourgogne	5,37	2624,65	306,58	84,99		
2013	Bourgogne	4,49	1003,57	259,46	43,21		
2014	Bourgogne	3,44	874,58	306,83	45,37		
2015	Bourgogne	2,64	832,67	187,66	32,47		
2009	Val de Loire	7,86	224,61	85,25	0,00		
2017	Val de Loire	2,24	0,00	98,21	0,00		
2017	Val de Loire	3,15	0,00	87,68	0,00		
2009	Val de Loire	4,91	0,00	129,03	0,00		
2008	Alsace	0,65	0,00	136,83	0,00		
2017	Alsace	0,54	0,00	38,44	0,00		
	2014 2015 2016 2015 2016 2013 2010 2008 2016 2016 2016 2013 2014 2015 2009 2017 2017 2017 2017 2009 2008 2008 2017	2014Alsace2015Alsace2016Bordeaux2015Bordeaux2016Bordeaux2016Bordeaux2013Vallée du2010Rhône2010Vallée du2008Vallée du2016Bourgogne2016Bourgogne2013Bourgogne2014Bourgogne2015Bourgogne2017Val de Loire2017Val de Loire2018Alsace2019Val de Loire	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		

Num. : numérotation ; Syr. : Syringaldéhyde

## Vins issus du même cru sur plusieurs millésimes

Millesime	Barriques neuves (%)	Acide gallique (mg/L)	Syringaldéhyde (µg/L)	Alc- diHDDC (µg/L)	HHDP- syringarésinol (µg/L)
2016	100	33,89	935,46	324,31	61,03
2014	100	33,37	444,57	316,35	60,77
2012	80	32,04	870,12	355,04	47,73
2010	100	31,42	362,01	313,72	64,93
2008	100	36,85	234,17	375,64	79,70
2006	100	45,84	0,00	434,67	47,92
2004	90	39,00	318,08	373,56	52,22
2002	90	47,70	0,00	406,70	47,12
2000	85	37,14	291,54	402,28	49,16
1998	90	49,07	0,00	359,46	24,23
1996	83	16,58	0,00	176,62	25,01
1994	66	44,56	0,00	261,39	39,64
1992	72	13,66	0,00	235,19	31,35

Annexes

1988	78	36,00	0,00	267,28	32,87	
1986	78	58,24	0,00	359,00	26,00	
1984	95	34,32	0,00	341,77	44,05	
1982	98	38,09	0,00	337,08	27,22	

## ✤ Eaux-de-vie commerciales

			<i>a</i> :	Alc-	HDPP-	Acide	m/z,	D ( 1	Quer.	P-WL-	P-WL-
Num.	Туре	Syr.	Sina.	diHDDC	Syr.	gallique	539	Ped.	А	1	2
		(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	$(\mu g/L)$
C-1	Cognac	9,46	1,58	0,48	0,21	20,39	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00
C-2	Cognac	12,13	0,18	1,05	0,24	46,87	0,97	0,00	122,22	5,77	9,93
C-3	Cognac	18,60	0,08	1,21	0,36	34,53	0,76	74,67	162,28	14,67	23,55
C-4	Cognac	20,77	0,00	1,62	0,34	43,05	0,83	0,00	73,63	10,15	11,36
C-5	Cognac	15,21	2,07	1,21	0,67	60,52	1,59	0,00	228,39	5,73	6,65
C-6	Cognac	11,93	4,26	0,76	0,48	41,36	1,15	0,00	0,00	3,06	2,31
C-7	Cognac	14,00	4,11	1,19	0,67	85,75	2,33	0,00	39,45	1,82	3,12
C-8	Cognac	13,03	2,70	0,99	0,59	68,90	1,24	66,39	101,71	11,64	8,26
C-9	Cognac	9,77	4,52	0,66	0,46	34,09	0,72	67,04	118,29	3,43	1,61
C-10	Cognac	10,78	0,75	1,04	0,35	48,21	1,44	65,32	0,00	0,00	0,00
C-11	Cognac	5,38	1,75	0,51	0,16	25,55	0,92	65,32	0,00	0,00	0,00
C-12	Cognac	24,76	0,00	2,75	0,57	31,36	0,81	65,32	0,00	0,00	0,00
B-1	Brandy	14,16	0,18	1,23	0,56	20,89	0,63	0,00	0,00	0,00	0,00
B-2	Brandy	6,36	0,24	0,60	0,14	24,43	0,68	0,00	0,00	2,54	3,24
B-3	Brandy	4,83	0,02	0,61	0,11	19,08	0,38	0,00	0,00	2,91	0,00
B-4	Brandy	3,30	0,08	0,44	0,10	15,00	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00
W-1	Whisky	12,07	0,29	1,32	0,42	12,37	0,43	0,00	0,00	1,73	0,00
W-2	Whisky	4,08	0,25	0,58	0,07	4,73	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
W-3	Whisky	21,32	0,37	2,58	0,75	16,28	0,53	0,00	0,00	3,81	0,00
W-4	Whisky	29,21	0,08	2,66	0,49	5,12	0,00	0,00	0,00	0,82	0,00
W-5	Whisky	14,58	0,24	1,32	0,24	8,02	0,21	0,00	0,00	8,37	4,39
<b>R-1</b>	Rhum	28,92	0,26	2,79	0,45	10,89	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
R-2	Rhum	19,42	0,10	1,98	0,36	10,11	0,02	0,00	0,00	3,04	0,08
R-3	Rhum	34,45	11,22	3,74	0,72	24,44	0,02	0,00	0,00	64,60	42,72

Bo-1	Bourbon	31,03	0,03	3,37	0,27	0,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bo-2	Bourbon	33,57	0,08	3,65	0,72	7,41	0,01	0,00	0,00	3,75	1,90
Bo-3	Bourbon	42,97	1,05	3,96	1,19	10,73	0,01	0,00	0,00	2,76	0,71
Bo-4	Bourbon	25,58	0,69	2,65	0,75	8,23	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00

Num. : numérotation ; Syr. : Syringaldéhyde ; Sina. : Sinapaldéhyde ; HDPP-syr. : HDPPsyringarésinol ; Péd. : Pédunculagine ; Quer. A : Quercusnine A

✤ Eaux-de-vie millésimes

Millésime	Rép. (N°)	Syr. (mg/L)	Sina. (mg/L)	Alc- diHDDC (mg/L)	HDPP- Syr. (mg/L)	Acide gallique (mg/L)	<i>m/z</i> 539 (mg/L)	Péd. (µg/L)	Quer. A (µg/L)	P-WL-1 (μg/L)	P-WL-2 (µg/L)
	1	6,00	1,91	0,32	0,30	6,33	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	6,12	3,45	0,28	0,29	7,91	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
2015	3	5,16	1,36	0,30	0,21	8,89	0,40	0,00	59,21	0,00	0,00
	4	8,03	2,41	0,39	0,35	8,90	0,47	0,00	46,27	0,00	0,00
	5	6,44	2,08	0,37	0,32	6,12	0,46	0,00	44,16	0,00	0,00
	1	8,50	1,91	0,51	0,41	24,84	0,74	0,00	115,54	0,00	0,00
	2	13,62	2,87	0,86	0,65	21,33	1,11	0,00	83,62	2,39	0,00
2010	3	15,14	3,22	0,77	0,67	20,35	1,21	0,00	59,84	4,88	0,42
	4	26,85	8,84	1,15	1,06	28,99	1,65	0,00	68,05	11,09	5,34
	5	18,47	4,50	1,01	0,86	29,09	1,32	0,00	82,40	7,55	7,99
	1	26,25	9,96	1,46	1,59	50,32	1,41	0,00	118,75	0,00	0,00
	2	56,48	14,62	3,65	2,18	101,21	5,77	0,00	149,24	40,38	69,54
2008	3	18,28	6,31	1,08	1,03	30,50	1,44	0,00	99,13	0,00	0,00
	4	20,23	4,65	1,15	0,99	30,86	1,72	105,94	123,79	0,73	0,00
	5	17,63	4,07	1,10	0,85	35,53	2,17	0,00	135,32	0,00	0,00
	1	47,29	8,29	3,48	1,54	98,22	4,25	112,61	147,03	15,79	16,35
	2	22,04	3,91	1,13	0,86	34,40	1,39	0,00	79,29	0,00	0,00
2005	3	22,60	4,65	1,27	1,08	45,05	1,84	0,00	112,98	9,37	4,74
	4	22,63	4,15	1,24	1,09	52,10	2,39	0,00	157,18	12,88	20,15
	5	21,07	4,28	1,40	0,96	42,79	1,89	0,00	139,51	3,28	0,00
	1	26,41	2,86	1,76	1,12	53,84	2,14	0,00	130,94	4,53	0,00
	2	27,34	3,51	1,71	1,09	47,97	1,88	0,00	56,27	0,03	0,00
2000	3	27,10	3,56	1,68	1,21	43,88	1,83	0,00	77,62	2,92	0,00
	4	27,95	3,09	1,74	1,13	49,91	1,92	0,00	85,41	3,62	0,00
	5	26,85	2,90	1,72	1,17	57,23	2,05	0,00	53,55	4,32	0,00
	1	35,93	4,83	2,53	1,95	73,61	2,55	0,00	124,97	1,25	0,00
1995	2	33,94	2,14	2,72	1,60	72,29	2,79	0,00	0,00	2,17	1,51
	3	37,27	4,12	2,58	1,70	76,74	2,71	106,07	136,33	2,15	2,38

	4	24.05	4.05	0.04	1 70	74.00	2.02	0.00	150 65	0.45	0.00
	4	34,85	4,95	2,34	1,72	74,29	2,82	0,00	152,65	2,45	0,00
	5	33,16	3,62	2,40	1,65	83,86	3,37	0,00	118,52	3,21	0,00
	1	35,14	2,54	2,40	1,72	87,20	3,46	0,00	93,50	6,42	7,07
	2	25,85	1,19	2,45	1,21	73,32	3,33	0,00	69,97	13,03	4,48
1993	3	40,73	4,18	3,33	2,27	103,67	4,01	106,29	193,91	0,04	0,00
	4	28,38	1,97	2,44	1,48	76,56	2,91	0,00	72,34	2,12	0,07
	5	29,04	1,86	2,27	1,37	80,49	3,24	0,00	146,96	1,01	0,00
	1	33,59	1,36	2,84	1,50	66,69	2,24	0,00	53,03	1,49	0,63
	2	27,58	1,33	2,54	1,27	79,15	2,75	105,95	56,29	0,05	0,00
1990	3	39,70	2,22	3,15	1,87	110,01	3,36	0,00	109,62	-2,31	1,23
	4	26,65	0,99	2,28	0,94	78,71	2,73	105,99	51,43	3,29	0,00
	5	32,19	1,27	2,93	1,38	80,04	3,33	0,00	69,30	1,71	0,00
	1	28,12	0,61	2,74	1,12	84,04	2,38	68,01	31,30	2,02	1,57
1072	2	25,75	0,69	2,49	1,08	84,99	2,46	70,94	28,22	5,34	6,49
1975	3	27,39	0,48	3,01	1,23	104,24	2,71	66,76	30,70	9,53	5,51
	4	24,12	0,44	2,51	1,03	78,90	2,56	66,73	45,00	4,38	0,51
	1	30,82	0,63	3,45	1,34	94,29	3,19	68,64	40,93	7,59	3,13
1070	2	28,24	0,32	3,08	1,21	101,07	3,12	67,37	32,03	10,53	9,93
1970	3	30,36	0,62	3,32	1,18	105,92	3,02	66,75	33,81	6,18	9,43
	4	32,81	0,50	3,45	1,43	98,01	3,09	66,50	28,60	5,45	11,12

Rep. : réplicat ; Syr. : Syringaldéhyde ; Sina. : Sinapaldéhyde ; HDPP-syr. : HDPPsyringarésinol ; Péd. : Pédunculagine ; Quer. A : Quercusnine A

	Nom	Rép.	Cym	Sino	Alc-	HDPP-	Acide	m/z,	Dád	Quer.	P-WL-	P-WL-
	NOIII	(N°)	Syr.	Silla.	diHDDC	Syr.	gallique	539	Peu.	А	1	2
						()	ug/g de bo	ois sec)				
	BCF	1	303,15	436,25	10,86	11,31	111,29	14,29	0,00	0,00	0,10	0,20
	BCF	2	327,94	1603,67	13,85	21,52	95,00	17,18	2,25	0,92	0,01	0,00
	BCF	3	286,46	751,22	8,51	7,10	168,56	19,61	1,74	1,33	0,07	0,34
	BCF	4	333,40	1323,94	14,56	15,26	120,12	9,09	1,54	1,68	0,11	0,10
	BCF	5	337,25	742,88	7,34	6,82	149,48	21,06	0,00	0,64	0,05	0,23
	BCF	6	341,19	1217,14	13,92	12,05	105,25	43,52	1,68	0,90	0,05	0,00
	BCF	7	398,93	1658,31	17,32	19,72	94,79	5,06	0,00	0,79	0,10	0,08
ssile	BCF	8	319,86	1201,02	11,56	13,62	211,72	25,47	2,15	3,05	0,15	0,46
le se	BCF	9	345,40	662,19	7,33	7,88	134,12	17,35	0,00	0,60	0,07	0,26
Chêi	BCN	1	189,77	768,83	41,62	25,09	503,67	111,12	80,42	48,29	3,47	7,54

## Extraits de bois de chêne

	BCN	2	177,70	532,32	23,67	19,78	182,68	46,98	9,02	7,90	0,63	0,59
	BCN	3	186,49	700,71	31,00	21,52	600,09	85,63	24,26	18,41	2,08	4,64
	BCN	4	204,22	912,93	32,47	23,33	276,14	24,24	36,71	12,43	1,25	1,47
	BCN	5	192,97	879,47	40,10	27,13	623,44	137,73	16,74	2,84	3,02	6,56
	BCN	6	217,51	668,12	42,22	26,74	220,56	150,84	4,27	9,95	1,25	0,57
	BCN	7	206,83	878,43	37,28	23,20	265,20	18,51	33,72	22,63	1,47	1,81
	BCN	8	160,86	573,39	41,56	23,78	483,69	114,29	44,87	49,02	2,98	7,78
	BCN	9	152,74	736,05	38,58	24,10	483,78	115,72	24,93	31,30	3,02	6,59
	BNC	1	20,40	51,72	61,55	14,95	527,37	188,38	286,71	337,90	7,96	23,12
	BNC	2	24,76	39,60	36,15	13,58	251,87	79,50	105,15	124,80	1,74	1,91
	BNC	3	21,08	53,75	68,66	15,35	547,90	189,96	217,51	303,90	7,27	20,85
	BNC	4	27,86	29,52	40,46	11,05	316,03	37,44	322,01	304,86	4,28	6,25
	BNC	5	21,73	55,87	60,73	20,09	843,83	230,08	70,60	79,97	7,87	19,67
	BNC	6	23,33	55,33	64,95	16,17	372,32	247,79	137,84	215,20	3,80	1,82
	BNC	7	30,42	57,58	50,64	12,24	310,06	14,65	58,42	210,03	3,45	4,69
	BNC	8	23,44	34,50	49,47	14,72	625,46	123,81	159,83	305,22	6,67	19,59
	BNC	9	17,03	21,62	63,07	14,90	733,34	129,27	91,36	243,70	7,08	16,89
	BCF	1	360,91	852,68	6,31	2,87	222,29	3,67	2,90	1,10	0,00	0,00
	BCF	2	422,25	1935,33	18,86	21,00	183,21	1,03	2,22	3,59	0,00	0,00
	BCF	3	433,12	1793,73	11,29	8,29	146,46	0,62	4,25	5,60	0,00	0,00
	BCF	4	433,12	1793,73	11,29	8,29	147,13	17,89	5,27	8,13	0,00	0,00
	BCF	5	389,61	1200,17	9,01	3,33	266,07	37,83	14,35	4,11	0,00	0,00
	BCF	6	413,07	872,29	10,50	3,50	219,87	49,75	1,55	2,23	0,00	0,00
	BCF	7	437,26	1211,92	8,27	8,10	106,33	0,26	1,54	1,12	0,00	0,00
	BCF	8	467,03	1595,37	10,69	7,13	232,03	11,05	4,81	2,50	0,00	0,00
	BCF	9	467,80	1911,78	16,00	12,83	192,67	53,63	7,55	5,87	0,00	0,00
	BCN	1	238,44	1176,24	25,78	23,92	460,55	19,44	44,20	19,13	0,00	0,00
,	BCN	2	227,34	993,63	40,15	16,22	314,99	3,36	20,10	26,05	0,00	0,00
	BCN	3	202,05	1322,78	21,39	32,10	240,12	2,48	81,32	44,69	0,00	0,00
	BCN	4	244,35	1446,69	29,85	37,99	290,81	59,48	73,59	36,33	0,00	0,00
	BCN	5	246,54	1227,18	27,29	29,89	326,47	95,11	86,43	31,12	0,00	0,00
	BCN	6	249,01	1337,55	39,11	28,08	433,87	165,12	26,17	19,00	0,00	0,00
	BCN	7	262,54	1069,45	30,63	33,34	274,30	1,78	20,55	27,41	0,00	0,00

Chêne pédonculé

Annexes

BCN	8	275,20	1381,31	34,86	36,75	420,05	35,73	49,98	13,18	0,00	0,00
BCN	9	245,41	1079,62	44,78	29,78	253,02	112,07	36,16	23,39	0,00	0,00
BNC	1	35,68	50,86	37,03	15,40	687,03	42,44	386,17	273,72	0,00	0,00
BNC	2	20,47	37,99	59,49	6,48	388,39	5,53	259,81	387,11	0,00	0,00
BNC	3	26,22	58,96	25,92	11,74	349,68	1,14	131,93	306,94	0,00	0,00
BNC	4	21,65	30,66	36,67	12,80	427,61	95,59	584,66	430,94	0,00	0,00
BNC	5	25,95	46,42	37,38	15,70	610,93	266,46	639,23	465,91	0,00	0,00
BNC	6	21,26	21,61	61,03	14,25	662,58	475,52	252,69	284,96	0,00	0,00
BNC	7	23,86	56,60	38,68	17,86	380,37	3,39	255,84	550,58	0,00	0,00
BNC	8	31,86	43,15	54,49	15,30	458,72	74,18	289,02	367,76	0,00	0,00
BNC	9	21,64	13,64	69,37	9,11	434,38	239,57	232,05	299,13	0,00	0,00

Rep. : réplicat ; Syr. : Syringaldéhyde ; Sina. : Sinapaldéhyde ; HDPP-syr. : HDPPsyringarésinol ; Péd. : Pédunculagine ; Quer. A : Quercusnine A

## Extraits de bois de chêne macérés à 50 % d'alcool

Macération à 50 % d'alcool								
Espèce	Chauffe	P-WL-1 (µg/g de bois sec)	P-WL-2 (µg/g de bois sec)					
	BCF	6,96	5,91					
Sessile	BCN	16,09	12,63					
	BNC	53,81	43,25					
	BCF	0,69	0,50					
Pédonculé	BCN	1,57	1,51					
	BNC	6,62	10,02					