



**HAL**  
open science

# Utilisation de la métabolomique par RMN 1H au service de l'oenologie

Inès Le Mao

► **To cite this version:**

Inès Le Mao. Utilisation de la métabolomique par RMN 1H au service de l'oenologie. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0267 . tel-03957195

**HAL Id: tel-03957195**

**<https://theses.hal.science/tel-03957195v1>**

Submitted on 26 Jan 2023

**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 SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
SPÉCIALITÉ Œnologie

Par Inès LE MAO

**Utilisation de la métabolomique par RMN <sup>1</sup>H au service de l'œnologie**

Sous la direction de : Tristan RICHARD  
(Co-encadrant : Grégory DA COSTA)

Soutenue le 30 Septembre 2022

Membres du jury :

M. RICHARD Tristan	Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
M. SAUCIER Cédric	Professeur, Université de Montpellier	Rapporteur
Mme SALVIA Marie-Virginie	Maître de conférences, Université de Perpignan	Rapporteuse
M. ROLIN Dominique	Professeur, Université de Bordeaux	Examineur
M. TRAIKIA Mounir	Maître de conférences, Université de Clermont-Ferrand	Examineur
M. GUYON François	Directeur Unité Scientifique, SCL de Marseille	Examineur
Mme MARCHAND Stéphanie	Professeure, Université de Bordeaux	Invitée
M. TOURBIER Erick	Baron Philippe de Rothschild	Invité



## **Utilisation de la métabolomique par RMN <sup>1</sup>H au service de l'œnologie**

La métabolomique par RMN est une discipline en plein essor qui possède de nombreuses applications allant de l'étude des plantes à la santé humaine. Les sciences alimentaires ont fortement bénéficié de cet engouement, notamment pour la garantie de l'authenticité ou encore pour des études qualitatives. De par sa forte valeur ajoutée et dans un contexte de perte économique mondiale liée aux contrefaçons, le vin figure parmi les sujets d'étude phare. La garantie de l'authenticité des vins est un des objectifs majeurs de l'Organisation Internationale de la vigne et du vin. Le vin étant le fruit de multiples réactions physico-chimiques faisant intervenir de nombreuses voies de biosynthèse, la métabolomique par RMN s'avère être un outil particulièrement propice à son étude. Ce travail s'inscrit dans la poursuite des travaux de la plateforme VRAI (Vin Recherche Authenticité Identité) et a été réalisé en partenariat avec la société BARON PHILIPPE DE ROTHSCHILD SA. Ces travaux de thèse visent à déterminer comment la métabolomique par RMN peut s'intégrer en tant qu'outil d'analyses des vins. Au cours de ces travaux, des approches ciblées et non ciblées combinées à des analyses statistiques multivariées ont été développées pour l'analyse des vins. Le premier volet de cette thèse a porté sur le développement de l'utilisation de la métabolomique par RMN pour la garantie de l'authenticité des vins. Ces travaux ont été réalisés sur des vins tranquilles et sur des vins pétillants. L'élaboration d'un vin est un processus complexe allant du foulage de la vendange jusqu'à sa maturation. Le second volet de cette thèse concerne l'intérêt d'utiliser la métabolomique par RMN pour le suivi œnologique. Différents procédés œnologiques ont été analysés depuis la vendange jusqu'à l'élevage en barriques. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'intérêt de la métabolomique par RMN pour garantir l'authenticité et la qualité des vins.

Mots clés : RMN, vin, métabolomique

Unité de recherche Œnologie – Axe Molécules d'Intérêt Biologique

UMR OENO 1366 – Université de Bordeaux - INRAE – Institut des sciences de la vigne et du vin  
210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon Cedex

## **Use of $^1\text{H}$ NMR metabolomics in the service of oenology**

NMR metabolomics is a booming discipline with many applications ranging from the study of plants to human health. Food sciences have strongly benefited from this trend, in particular for authenticity guarantee or qualitative studies. Because of its high added value and in a context of worldwide economic loss due to counterfeiting, wine is one of the main subjects of study. The guarantee of the authenticity of wines is one of the major objectives of the International Organisation of Vine and Wine. Wine being the result of multiple physicochemical reactions involving many biosynthetic pathways, NMR metabolomics is a particularly suitable tool for its study. This work is part of the continuation of the VRAI (Vin Recherche Authenticité Identité) platform and was carried out in partnership with BARON PHILIPPE DE ROTHSCHILD SA. This thesis work aims to determine how NMR metabolomics can be integrated as a wine analysis tool. During this work, targeted and non-targeted approaches combined with multivariate statistical analysis were developed for wine analysis. The first part of this thesis focused on the development of the use of NMR metabolomics to guarantee the authenticity of wines. This work was carried out on still and sparkling wines. The elaboration of a wine is a complex process from the crushing of the grapes to their maturation. The second part of this thesis concerns the interest of using NMR metabolomics for oenological monitoring. Different oenological processes have been analyzed from the harvest to the maturation in barrels. These works have allowed to highlight the interest of NMR metabolomics to guarantee the authenticity and the quality of wines.

Keywords : NMR, wine, metabolomics

Unité de recherche Œnologie – Axe Molécules d'Intérêt Biologique

UMR OENO 1366 – Université de Bordeaux - INRAE – Institut des sciences de la vigne et du vin

210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon Cedex





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. A mes rapporteurs, le docteur Marie-Virginie Salvia de l'Université de Perpignan et le professeur Cédric Saucier de l'Université de Montpellier. A mes examinateurs, le professeur Dominique Rolin de l'Université de Bordeaux, le docteur Mounir Traikia de l'Université de Clermont-Ferrand et monsieur François Guyon du SCL de Marseille. Je vous remercie de me faire l'honneur d'examiner ces travaux.

Je remercie ensuite la société Baron Philippe de Rothschild ainsi que le Château Mouton Rothschild, pour avoir financé cette thèse et pour avoir contribué à ces travaux. Je remercie plus particulièrement Erick Tourbier, pour sa gentillesse, son regard critique et avisé sur le monde de l'œnologie. Travailler avec vous, même de loin, fût un véritable honneur. Je remercie également Mathias Robin et Magali Blanc pour les nombreux échanges, toujours très instructifs sur les résultats présentés. Mathias, je vous remercie particulièrement pour le temps que vous m'avez accordé et pour votre gentillesse.

Je voudrais ensuite remercier le professeur Tristan Richard, directeur de cette thèse mais aussi directeur de l'axe Molécule d'Intérêt Biologique, d'avoir cru en moi et de m'avoir donné l'opportunité de mener cette thèse. Je vous remercie pour votre confiance et l'autonomie que vous m'avez accordées tout au long de ces trois années mais aussi pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre patience infinie. Je tiens aussi à remercier vivement le docteur Grégory Da Costa, co-encadrant de cette thèse, pour sa contribution à mes travaux de recherche et ses précieux conseils. Merci pour tout ce que tu m'as apporté sur le plan personnel et professionnel.

Je remercie également les professeurs Gilles De Revel et Stéphanie Marchand Marion pour leurs précieux conseils et les discussions constructives que nous avons pu avoir tout au long de ces trois années.

Je tiens aussi à remercier le docteur Soizic Lacampagne, responsable de la plateforme Bordeaux Vinif à l'ISVV, Jean Martin-Perrier, Gauthier Lagarde ainsi que Virginie Moine et Arnaud Massiot de chez Biolaffort pour avoir fourni les échantillons, pour leurs conseils avisés et pour leur enthousiasme pour les différents projets que nous leur avons proposés.

Je remercie évidemment les membres de l'équipe de l'axe MIB, pour votre soutien permanent, car vous avez tous, de près ou de loin, participé à la réussite de ces travaux. Caroline Rouger, Stéphanie Krisa et Stéphanie Cluzet, je vous remercie particulièrement pour votre aide à la relecture de ce manuscrit. Je vous remercie aussi pour votre bienveillance, votre gentillesse et vos encouragements. Je remercie, bien évidemment, l'ensemble de



l'équipe du laboratoire pour les nombreux moments de convivialité mais aussi pour leur aide et leurs précieux conseils : Arnaud Courtois, Josep Valls-Fonayet, Elodie Renouf, Karen Gaudin, Pierre Waffo-Teguo, Alain Décendit, Alain Badoc, Marie Laure Iglesias, Antonio Palos Pinto et bien évidemment notre très cher Eric Pedrot. Eric, merci infiniment pour tout ce que tu as fait pour moi, je ne t'oublierai jamais. Je remercie chaleureusement, l'ensemble des doctorants et des post-doctorants de l'équipe pour leur soutien, les pauses café et les moments hors labo : Aleksandra, David, Anthony, Biranty, Lisa, Adeline, Aghiles, Guillaume et particulièrement Pauline, Charles et Eva. Je remercie aussi Toni El Khawand et Justine Laboyrie pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leurs encouragements.

Un grand merci à tous les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Pauline Ducau, Wiame El Batoul, Charlyne Bautista, Tristan Guiraud et Lucas Duclos. Merci pour votre travail et votre implication dans ce projet. C'était un réel plaisir de travailler avec vous tous.

Je remercie également les membres du RFMF (Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique) et particulièrement les membres Juniors, c'est un réel plaisir de vous avoir rencontré et de pouvoir collaborer avec vous.

Enfin, je remercie chaleureusement tous mes proches, pour leur présence et leur soutien.

A mes amis de toujours ; Léa, Antoine, Romain, Cindy, Clémence B., Eliot, Alex, Clémence D., Anthony et Guillaume. Et à toutes ces personnes formidables qui m'ont encouragé ces derniers mois : Coline, Arnaud, Lise, Stéphane, Enzo, Simon, Adrien, Charlotte, Leo, Ben, Coralie, Julia et Xavier. Merci pour votre présence et pour m'avoir permis de décompresser.

A ma famille pour leur éternel soutien, qu'ils soient à Bordeaux, Périgueux ou Lausanne. Timothé, merci pour tout ce que l'on partage, je suis extrêmement fière de toi. Maman, pour tes mots réconfortants. Papa, pour ton soutien même à 9000 km. A mes oncles, tantes et cousins ; Axelle, Gladys et Mathys, merci pour tous les moments passés ensemble. A ma grand-mère pour ses mots si doux. Merci infiniment.

Je tiens aussi à remercier ma belle-famille, pour leur soutien, leur gentillesse et l'intérêt porté à mes travaux.

Et enfin, Hugo, merci pour tout.





## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>VII</b>
<b>INDEX DES FIGURES</b> .....	<b>XV</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX</b> .....	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>5</b>
<b>ETAT DE L'ART</b> .....	<b>11</b>
<b>I Métabolomique appliquée aux sciences alimentaires</b> .....	<b>11</b>
<b>I.1 Introduction à la métabolomique</b> .....	<b>11</b>
<b>I.2 RMN et métabolomique</b> .....	<b>13</b>
I.2.1 Généralités .....	13
I.2.2 Analyse métabolomique par RMN <sup>1</sup> H .....	16
I.2.2.1 Préparation des échantillons .....	16
I.2.2.2 Séquences d'impulsions .....	17
I.2.2.3 Traitement du signal .....	18
I.2.2.4 Identification des métabolites et quantification .....	18
I.2.2.5 Analyses statistiques.....	19
<b>II Le vin en France</b> .....	<b>21</b>
<b>II.1 Les régions viticoles françaises</b> .....	<b>21</b>
<b>II.2 L'encépagement français</b> .....	<b>22</b>
<b>II.3 Les désignations des vins français</b> .....	<b>24</b>
II.3.1 Exemples de quelques cahiers des charges de vins français.....	25
<b>III Le métabolome du raisin au moût</b> .....	<b>27</b>
<b>III.1 Notions de maturité et impact des travaux viticoles sur la qualité des raisins</b> .....	<b>27</b>
<b>III.2 Principaux constituants du raisin et concentration dans les moûts</b> .....	<b>28</b>
III.2.1 Les sucres .....	29
III.2.2 Les acides organiques.....	29
III.2.3 Les acides aminés .....	30
III.2.4 Les composés phénoliques.....	32

<b>IV</b>	<b>Composition chimique du moût au vin .....</b>	<b>34</b>
<b>IV.1</b>	<b>Transformations liées aux fermentations .....</b>	<b>35</b>
IV.1.1	Transformations par les levures .....	36
IV.1.1.1	La fermentation alcoolique.....	36
IV.1.1.2	La fermentation glycéropyruvique .....	37
IV.1.1.3	Formation de métabolites secondaires à partir de l'acide pyruvique .....	38
IV.1.1.4	Formation des alcools supérieurs et dégradation des acides aminés .....	41
IV.1.1.5	La fermentation malo-alcoolique .....	42
IV.1.2	Transformations par les bactéries.....	43
IV.1.2.1	La fermentation malolactique .....	43
IV.1.2.2	Le métabolisme de l'acide citrique.....	44
IV.1.2.3	Autres transformations réalisées par les bactéries lactiques .....	45
<b>IV.2</b>	<b>Conduite des vinifications et composition chimique des différents vins .....</b>	<b>45</b>
IV.2.1	Les vins blancs .....	47
IV.2.2	Les vins rouges .....	47
IV.2.3	Les vins rosés.....	47
<b>V</b>	<b>L'impact des procédés œnologiques sur la composition chimique du vin.....</b>	<b>48</b>
<b>V.1</b>	<b>L'élevage du vin .....</b>	<b>49</b>
V.1.1	L'élevage en barriques .....	49
V.1.2	L'élevage sur lies .....	50
<b>V.2</b>	<b>Procédés œnologiques étudiés .....</b>	<b>50</b>
V.2.1	Le collage.....	50
V.2.2	L'enzymage.....	51
<b>VI</b>	<b>La RMN métabolomique comme outil pour l'analyse des vins .....</b>	<b>52</b>
	<b>OBJECTIFS DE THESE.....</b>	<b>73</b>
	<b>CHAPITRE 1 : RMN <sup>1</sup>H ET AUTHENTICITE DES VINS .....</b>	<b>77</b>
<b>I</b>	<b>Objectifs et stratégie .....</b>	<b>77</b>
<b>II</b>	<b>Annotation et quantification des spectres RMN <sup>1</sup>H.....</b>	<b>77</b>
II.1	Annotation des spectres RMN <sup>1</sup> H .....	77
II.2	Quantification des métabolites.....	79
<b>III</b>	<b>Développement des bases de données des vins de bordeaux.....</b>	<b>82</b>

III.1	Constitution d'une base de données grands vins de Bordeaux .....	82
III.2	Validité de la base de données dans le temps.....	85
III.2.1	Stabilité dans le temps des vins .....	86
III.2.2	Stabilité dans le temps des échantillons prélevés.....	89
<b>IV</b>	<b><i>Authenticité des vins mousseux</i></b> .....	<b>90</b>
IV.1	Collecte des échantillons .....	90
IV.2	Problèmes spécifiques à la préparation des échantillons .....	91
IV.3	Publication.....	92
<b>V</b>	<b><i>Synthèse des résultats et discussions</i></b> .....	<b>101</b>
	<b>CHAPITRE 2 : UTILISATION DE LA RMN POUR LE SUIVI DES VINS</b> .....	<b>105</b>
<b>I</b>	<b><i>Objectifs et stratégie</i></b> .....	<b>105</b>
<b>II</b>	<b><i>Suivi œnologique</i></b> .....	<b>105</b>
II.1	Suivi d'itinéraires de fermentation.....	105
II.2	Études en cuve de nano vinification .....	107
II.2.1	Impact de la date de la vendange .....	107
II.2.2	Collages et enzymages .....	107
II.2.3	Publication.....	108
II.3	Évolution des vins en barriques .....	123
II.3.1	Présentation de l'étude.....	123
II.3.2	Publication.....	123
<b>III</b>	<b><i>Synthèse des résultats et discussions</i></b> .....	<b>157</b>
	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>163</b>
	<b>REFERENCES</b> .....	<b>169</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>183</b>
	Annexe 1 : Protocoles d'analyses des vins .....	183
	Annexe 2 : Articles de vulgarisation .....	187



## INDEX DES FIGURES

Figure 1: Informations contenues dans un spectre RMN <sup>1</sup> H.....	14
Figure 2: Schéma général du workflow des analyses métabolomiques par RMN <sup>1</sup> H.....	16
Figure 3: Carte du vignoble Français (Source : <a href="https://vin-vigne.com">Https://vin-vigne.com</a> ).....	21
Figure 4 : Représentation schématique des différentes désignations des vins français. ....	24
Figure 5: Représentation schématique de l'évolution de la taille de la baie et de la concentration des composés majoritaire en fonction du temps (Schéma adapté de Blouin, 2000, Coombe et al. 2002 et Kennedy, 2002).....	28
Figure 6: Représentation graphique des différentes proportions et teneurs en 10 acides aminés au sein de 7 cépages français (adapté de Hernández-Orte et al. 2002). ....	31
Figure 7 : Schéma des différentes familles de composés phénoliques. ....	32
Figure 8 : Schéma des familles chimiques majoritaires retrouvées dans les matrices moût et vins. Les chiffres représentent les teneurs moyennes en g/L. ....	35
Figure 9: Voie de la glycolyse et de la fermentation alcoolique. 1: hexokinase, 2 :phosphoglucose isomerase, 3 :phosphofruktokinase, 4 : aldolase, 5 :triose phosphate isomérase, 6 :Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, 7 : phosphoglycérate kinase, 8 : phosphoglycéro mutase, 9 : Enolase, 10 : Pyruvate kinase, 11 : Pyruvate décarboxylase, 12 : Alcool déshydrogénase (d'après schéma Ribéreau-Gayon et al. 2017).....	37
Figure 10 : Voie de la fermentation glycéro-pyruvique (d'après schéma Ribéreau-Gayon et al. 2017).....	38
Figure 11: Formation de l'acide succinique par réductions successives de l'oxaloacétate et de ses dérivés. ....	39
Figure 12 : Voies de synthèse du diacétyle, de l'acétoïne et du 2,3-butanediol (d'après schéma Ribéreau-Gayon et al. 2017). ....	39
Figure 13: Voies de formation de l'acide acétique chez la levure d'après Ribéreau-Gayon et al. 2017. (1= pyruvate décarboxylase, 2 = alcool déshydrogénase, 3 = pyruvate déshydrogénase, 4 = aldéhyse déshydrogénase, 5 = acétyl-CoA hydrolase, 6 = acétyl-CoA synthétase). ....	40



Figure 14 : Voie de la fermentation malo-alcoolique réalisée par les levures d'après Ribéreau-Gayon et al. 2017. 1 = enzyme malique, 2 = pyruvate décarboxylase, 3 = alcool déshydrogénase. ....	42
Figure 15 : Voies métaboliques de la dégradation de l'acide citrique par les bactéries lactiques, d'après Ribéreau-Gayon et al. 2017.....	44
Figure 16 : Schéma comparatif des vinifications en blanc, rouge et rosé.....	46
Figure 17 : Schéma général des étapes de l'élaboration du vin.....	48
Figure 18 : Spectres RMN ZGPR et NOESYGPPS1D et composés dosés. L'astérisque représente les composés difficilement dosables mais identifiables en fortes concentrations. .	80
Figure 19: Comparaison des données RMN de grands vins de Bordeaux. A) ACP obtenue à partir des données RMN des vins de quatre propriétés (2 en AOC Pauillac en orange, 1 en AOC Saint-Emilion en bleu et 1 en AOC Pomerol en violet) sur cinq millésimes différents de 2009 à 2013. B) ACP obtenue à partir de deux propriétés de Pauillac sur les mêmes millésimes.....	84
Figure 20 : Représentation de la verticale du Château Mouton Rothschild divisé en 3 lots....	86
Figure 21 : ACP représentant les échantillons du lot A (bouteilles de vin « coravinées » pendant 2 ans avant l'analyse) et du lot C (bouteilles ouvertes au moment de l'analyse) pour trois millésimes différents de la verticale des vins de Mouton Rothschild.....	89
Figure 22 : ACP représentant les échantillons vinifiés de façon conventionnelle (en vert) et les échantillons « thermovinifiés » (en orange).....	106

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux avantages et inconvénients de la RMN et de la MS (à partir de Wishart et al. 2019 et Vignoli et al. 2019).....	12
Tableau 2: Liste des cépages majoritairement utilisés dans chaque région viticole française et surfaces plantées (en hectares) (CNIV & FranceAgriMer, 2016; Collombet, 2020; OIV, 2022).....	23
Tableau 3: Teneurs dans les vins des principaux alcools supérieurs produits et leurs acides aminés respectifs précurseurs (d'après Ribéreau Gayon et al. 2017). ....	41
Tableau 4: Liste des composés identifiés avec leur structure chimique ainsi que le signal utilisé pour la quantification avec le déplacement chimique, la multiplicité, la constante de couplage et le nombre de protons.....	78
Tableau 5: Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) exprimées en mg/L des 54 composés identifiés dans le vin. ....	81
Tableau 6: Heat map des Z-scores de la verticale du Château Mouton Rothschild de 2008 à 2017.....	88
Tableau 7: Données quantitatives (en mg/L) des 37 métabolites dosés dans un vin de champagne soumis à 5,10,15,20 et 30min de sonication. ....	91



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
AOP	Appellation d'Origine Protégée
CEN	Comité Européen de Normalisation
CG	chromatographie gazeuse
CNIV	Comité National des Interprofessions des Vins
CIVB	Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux
DGCCRF	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DGDDI	Direction Générale des Douanes et Droits Indirects
DSS	acide 3-triméthylsilylpropane-1-sulfonique
FCa	Formiate de calcium
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HR-MAS	haute résolution en rotation à l'angle magique
ICP	Plasma à couplage inductif
IR	infra-rouge
ISVV	Institut des Sciences de la Vigne et du Vin
LOD, LOQ	Limite de détection, limite de quantification
LOOCV	Leave One Out Cross-Validation
MIB	Molécules d'Intérêt Biologique
MS	spectrométrie de masse
OIV	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
ppm	parties par million
RMN <sup>1</sup> H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMNq	Résonance Magnétique Nucléaire quantitative
RMN-FINS	Fractionnement Isotopique Naturel et Spécifique par Résonance Magnétique Nucléaire
SCL	Services Communs des Laboratoires
SMA	Simple Mixture Analysis
SMRI	spectrométrie de masse des rapports isotopiques
TSP	acide triméthylsilylpropanoïque
UV	Ultraviolet



# *Communications scientifiques*



## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### Articles

1. GOUGEON L., DA COSTA G., **LE MAO I.**, MA W., TEISSEDRE P.L., GUYON F., and RICHARD T. *Wine analysis and authenticity using <sup>1</sup>H-NMR metabolomics data: application to Chinese wines*, Food Analytical Methods (2018)
2. BURDZIEJ A., DA COSTA G., DA COSTA G., **LE MAO I.**, BELLEE A., CORIO-COSTET M.F., MERILLON J.M., RICHARD T., SZAZIEL A., and CLUZET S. *Impact of different elicitors on grapevine leaf metabolism monitored by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy*. Metabolomics, (2019)
3. **LE MAO I.**, MARTIN-PERNIER M., EL-BATOUL W., LACAMPAGNE S., RICHARD T., and DA COSTA G. *<sup>1</sup>H-NMR metabolomics as a tool for winemaking process monitoring*, Molecules, (2021)
4. **LE MAO I.**, DA COSTA G., and RICHARD T., *<sup>1</sup>H-NMR metabolomics as tool for wine screening and analysis*, OenoOne, (2023)
5. **LE MAO I.**, DA COSTA G., BAUTISTA C., DE REVEL G., and RICHARD T. *Application of targeted <sup>1</sup>H-NMR metabolomics to French sparkling wines*, Food Control, (2022)
6. **LE MAO I.**, DA COSTA G., and RICHARD T., *Red wine evolution during oak barrels aging monitored by <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics* », Journal of Food Composition and Analysis, *soumis*

### Articles de vulgarisation

1. **LE MAO I.**, DA COSTA G., and RICHARD T., *La RMN, un outil pour garantir l'authenticité des vins*, Union Girondine, (2020)
2. RICHARD T., **LE MAO I.** and DA COSTA G. *RMN <sup>1</sup>H et authentification des vins*, Actualités Chimiques, (2022)



## Communications orales

1. GOUGEON L., **LE MAO I.**, DA COSTA G., RICHARD T., GAILLARD L., ROSSET S., ROSEC JP., GUYON F. *<sup>1</sup>H NMR as a solution for the authenticity of wines? Comparison with the results of the official multi-techniques analyzes, OIV Congress, Juillet 2019.*
2. **LE MAO I.**, DA COSTA G., RICHARD T, *OenoforumWebContest, Février 2021*
3. **LE MAO I.**, DA COSTA G., RICHARD T., *Metabolomic NMR at the service of authenticity and quality of wine, GERM, Avril 2021.*
4. **LE MAO I.**, DA COSTA G., BAUTISTA C., EL-BATOUL W., RICHARD T. *<sup>1</sup>H-NMR metabolomics at the service of wine identity, Journées RMN grand SUD, Juillet 2021*
5. **LE MAO I.** et RICHARD T., *Utilisation de la RMN pour l'authentification des vins, Journée des cadres Baron Philippe de Rothschild, Novembre 2021*
6. **LE MAO I.**, DA COSTA G., RICHARD T., *Metabolomic NMR at the service of authenticity and quality of wine, 14eme JS RFMF AUSSOIS, Novembre 2021*
7. **LE MAO I.**, DA COSTA G., RICHARD T, *RMN-<sup>1</sup>H métabolomique au service de l'œnologie, AFSEP Mai 2022*
8. **LE MAO I.**, DA COSTA G., RICHARD T, *qNMR metabolomics for wine analysis, Climetabolomics Juin 2022*
9. **LE MAO I.**, DA COSTA G, RICHARD T, *<sup>1</sup>H-NMR metabolomics at oenological service from traceability to identity, Analytics, Nantes 5-8 septembre 2022*

## Communications affichées

1. GOUGEON L., DA COSTA G., **LE MAO I.**, PEDROT E., GUYON F., RICHARD T. - *La RMN: un outil pour l'authenticité des vins*, Journée Technique du CIVB, Bordeaux 14 février 2017
2. GOUGEON L., VALLS J., **LE MAO I.**, BIAIS B., DA COSTA G., MERILLON J.M., RICHARD T. - *Quantitative analysis of complex stilbenes in wine*, Wine Active Compounds, Beaune 29 mars 2017

3. GOUGEON L., DA COSTA G., **LE MAO I.**, PEDROT E., GUYON F., RICHARD T. - *La RMN : un outil pour l'authenticité des vins*, Journée de l'Ecole Doctorale, Talence 12 avril 2017
4. GOUGEON L., DA COSTA G., **LE MAO I.**, PEDROT E., GUYON F., RICHARD T. – *NMR and Wine authenticity*, Nouvelle Aquitaine workshop, Pessac 16 mai 2017
5. GOUGEON L., DA COSTA G., **LE MAO I.**, PEDROT E., GUYON F., RICHARD T., DECENDIT A. - *La RMN : un outil pour l'authenticité des vins*, Journée Scientifique STOLON, Dijon 28-30 novembre 2017
6. GOUGEON L., VALLS J., **LE MAO I.**, BIAIS B., DA COSTA G., MERILLON J.M., RICHARD T., DECENDIT A. - *Quantitative analysis of complex stilbenes in wine*, Journée Scientifique STOLON, Dijon 28-30 novembre 2017
7. GOUGEON L., DA COSTA G., **LE MAO I.**, PEDROT E., GUYON F., RICHARD T. - *La RMN : un outil pour l'authenticité des vins*, Journée Scientifique de la Chimie du Vin, Villenave d'Ornon 24 novembre 2017
8. GOUGEON L., VALLS J., **LE MAO I.**, BIAIS B., DA COSTA G., MERILLON J.M., RICHARD T. - *Quantitative analysis of complex stilbenes in wine*, Journée Scientifique de la Chimie du Vin, Villenave d'Ornon 24 novembre 2017
9. **LE MAO I.**, DA COSTA G., GOUGEON L., PEDROT E., GUYON F., RICHARD T., *Quantitative analysis of wine composition applied to Bordeaux red wines by 1H-NMR metabolomics*, Indian- french symposium plants with health benefits and biomolecules of interest, Talence 27 novembre 2019
10. **LE MAO I.**, DA COSTA G., MARTIN-PERNIER J., EL BATOUL W., BAUTISTA C., LACAMPAGNE S., RICHARD T., *Winemaking processes discrimination by using qNMR metabolomics*, Macrowine Online 23-30 juin 2021
11. **LE MAO I.**, DA COSTA G., RICHARD T., *Effects of oak barrel aging monitored by 1H-NMR metabolomics*, Wine Active Compounds, Dijon 29 juin au 1er juillet 2022
12. **LE MAO I.**, DA COSTA G., RICHARD T., *1H-NMR metabolomics at oenological service from traceability to identity*, Analytics, Nantes 5-8 septembre 2022



# *Introduction générale*



## INTRODUCTION GENERALE

Le vin est un produit alimentaire largement consommé en Europe soumis depuis très longtemps à la problématique de la contrefaçon. Différentes fraudes sont largement connues depuis plusieurs siècles. Celles-ci seraient les plus anciennes et les plus courantes de l'industrie alimentaire allant de la dilution à la fraude à l'étiquette (Solovyev et al., 2021). De par la forte valeur ajoutée de certaines appellations ou de certains châteaux, il n'est pas rare de trouver des vins frauduleux sur le marché. Certains experts estiment que 20 % du commerce international du vin serait touché par la fraude et la contrefaçon (Taylor, 2013). Dans certains pays, comme la chine, 50 % des vins coûtant plus de 35 dollars seraient en réalité des contrefaçons (Muhammad & Countryman, 2019). Cela représente des pertes économiques considérables. Le dernier rapport de l'Office de l'Union européenne pour la propriété intellectuelle (EUIPO) fait état d'une hausse des pertes économiques en 2020 représentant, pour les vins et spiritueux, 2,3 milliards d'euros (European Union Intellectual Property Office., 2020).

Bien que les grands crus soient les plus touchés, les petits viticulteurs ne sont pas épargnés. D'autant plus que les techniques de falsification sont de plus en plus sophistiquées. Dans ce contexte, mais aussi pour répondre aux demandes des consommateurs quant à la transparence des produits consommés, le contrôle de l'authenticité des vins et de la qualité est apparu comme un des objectifs majeurs de l'Organisation Internationale de la vigne et du vin (Plan Stratégique de l'OIV 2020-2024). La garantie de l'authenticité nécessite des outils fiables et robustes. Parmi les outils pouvant répondre à ces attentes, la spectrométrie de masse et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) se révèlent être des outils particulièrement intéressants pour le profilage des vins grâce des approches métabolomiques.

La métabolomique est une science récente dont le but principal est une analyse exhaustive des « petites » molécules présentes dans un mélange complexe. Elle peut avoir de multiples applications, notamment sur la connaissance des métabolismes primaires et spécifiques des organismes vivants et de leurs produits. Parmi les nombreuses applications possibles, les sciences de la vigne et du vin ont trouvé leur place avec une constante augmentation du nombre de publications portant sur l'étude du métabolome de la vigne et du vin. Les applications possibles sont très variées et vont de la connaissance des cépages jusqu'à l'étude de la composition chimique du vin. En tant que matrice issue d'une multitude de métabolisme, le vin est donc adapté aux approches métabolomiques.

Il y a d'abord le métabolisme de la vigne, qui diffère en fonction des variétés, des climats spécifiques à chaque région et qui va être impacté par les conditions environnementales. Puis, les métabolismes des micro-organismes qui vont transformer le moût du raisin en vin. S'ajoute à cette complexité les nombreux procédés viticoles et œnologiques qui vont également avoir un impact sur la composition chimique du vin. La somme de tous ces facteurs contribue pleinement à l'identité d'un vin.

La RMN permet notamment l'identification et le dosage des composés majoritaires de plusieurs familles chimiques, à partir d'un faible volume d'échantillon et sans préparation préalable (Simmler et al., 2014). Cette technique analytique a été appliquée avec succès au contrôle de l'authenticité des vins (Amargianitaki & Spyros, 2017). Combinée à une approche statistique, elle a permis de contrôler l'effet du terroir (López-Rituerto et al., 2012; Son et al., 2009), du cépage (Ali et al., 2011; Godelmann et al., 2013), du millésime (Lee et al., 2009) ou de procédés de vinification (Anastasiadi et al., 2009; De Pascali et al., 2014; López-Rituerto et al., 2009). Notre équipe a récemment montré que la métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  permet de distinguer les vins rouges de Bordeaux des autres appellations d'origine protégée (AOP) françaises (Gougeon, da Costa, Guyon, et al., 2019b). Nous avons également montré que la RMN était capable de discriminer différentes appellations au sein des vins de Bordeaux. Les paramètres environnementaux tels que le cépage, le sol ou encore le climat sont à l'origine des profils métaboliques différents. Cependant, d'autres paramètres, tels que les pratiques viticoles ou œnologiques, pourraient être également impliqués dans les différences observées. La métabolomique par RMN pourrait donc offrir de nombreuses applications pour l'analyse du vin que ce soit en termes d'outils de certification/traçabilité afin de garantir l'authenticité d'un vin ou pour déterminer l'impact de différentes pratiques viticoles ou œnologiques sur la composition chimique du vin.

Cette thèse, financée par la société Baron Philippe de Rothschild, est divisée en deux axes de recherche. Le premier porte sur le développement de la métabolomique par RMN pour assurer l'authenticité des vins tranquilles et pétillants. Le second axe concerne le déploiement de la RMN métabolomique en œnologie pour l'analyse qualitative des vins via l'étude de l'impact de différentes pratiques viticole et œnologie sur le métabolome du vin. L'objectif de ces travaux est de montrer l'intérêt de la métabolomique par RMN comme outil d'analyse et de contrôle des vins pour garantir l'authenticité mais aussi en tant qu'outil d'aide à la décision tout au long du processus de vinification.

Ce manuscrit est divisé en deux grandes parties. La première est consacrée à une introduction bibliographique sur les sujets traités dans ce manuscrit. La seconde présente les principaux résultats obtenus. Cette seconde partie est elle-même divisée en deux chapitres sur l'utilisation de la RMN pour l'authenticité des vins et le suivi œnologique. Les principaux résultats sont présentés sous forme de publications. Enfin, une discussion générale conclut cette thèse.





## *État de l'art*



## ETAT DE L'ART

### I Métabolomique appliquée aux sciences alimentaires

#### I.1 Introduction à la métabolomique

La métabolomique a émergé au début des années 2000 parmi les sciences « omiques » et complète les autres approches globales que sont la génomique (étude de l'ensemble des gènes), la transcriptomique (études de l'ensemble des ARN messagers) et la protéomique (l'étude de l'ensemble des protéines). Elle permet notamment d'étudier des composés organiques, dits métabolites, de petites tailles (< 1500 Da) d'un système biologique (Vignoli et al., 2019).

La métabolomique repose sur l'identification du maximum de métabolites possibles d'une matrice biologique donnée. L'objectif est de mesurer et d'interpréter les variations de concentration de métabolites d'un échantillon à l'autre. En permettant d'étudier l'ensemble des métabolites primaires (acides aminés, acides organiques, sucres, acides gras, etc.) et spécialisés (issus de voies de biosynthèse spécialisées ou produits en réponses aux conditions environnementales), la métabolomique offre de nombreuses possibilités d'applications. On constate, ces vingt dernières années, une explosion du nombre d'études portant sur l'utilisation de la métabolomique dans les sciences biologiques.

Plus récemment, l'application de la métabolomique aux sciences alimentaires, *foodomics* en anglais, s'est considérablement développée allant de la simple caractérisation au contrôle en sécurité alimentaire (Li et al., 2021). Les sujets d'études sont très variés ; fruits et légumes, produits carnés, boissons, etc. (Balkir et al., 2021).

Les deux techniques les plus largement utilisées sont la spectrométrie de masse (souvent couplées à des techniques séparatives telles que les chromatographies liquide ou gazeuse) et la résonance magnétique nucléaire (Valdés et al., 2022). Chacune des deux méthodes possède ses avantages et ses inconvénients (Vignoli et al., 2019; Wishart, 2019). Ceux-ci sont listés dans le Tableau 1.

Deux approches complémentaires sont généralement utilisées : méthodes ciblées et non ciblées (Valdés et al., 2022). Les approches non-ciblées permettent de prendre en considération l'intégralité des métabolites détectés, sans *a priori*. *A contrario*, les analyses ciblées concernent les métabolites identifiés ou recherchés et sont souvent quantitatives. La

quantification peut être absolue ou relative. Les analyses non-ciblées visent à réaliser une empreinte tandis que les analyses ciblées permettent d'établir un profilage.

Tableau 1: Principaux avantages et inconvénients de la RMN et de la MS (à partir de Wishart et al. 2019 et Vignoli et al. 2019).

	RMN	MS
Reproductibilité	Excellente	Modérée
Sensibilité	Sensibilité faible à moyenne (dizaine de $\mu\text{M}$ ), une centaine de métabolites détectés	Très sensible (nM), des milliers de composés détectés
Préparation des échantillons	Minimale et/ou simple	Complexes, nécessitant généralement une séparation chromatographique préalable
Gamme de métabolites détectés	Couverture modeste de métabolites contenant des noyaux actifs en RMN (acides aminés, acides organiques, cétoacides, sucres, lipides et nucléotides)	Couverture étendue des métabolites, tels que la plupart des métabolites organiques et certains métabolites inorganiques : acides aminés, acides gras, phosphates, sucres, stéroïdes, nucléotides, stérols, glycérolipides, acides organiques et ions métalliques.
Type d'expérience	Tous les métabolites au-dessus de la limite de détection sont observés simultanément	Plusieurs, adaptés à des espèces chimiques spécifiques
Ambiguïté/ fausse identification	Technique intrinsèquement quantitative et détermination précise de la structure	Détermination partielle des structures
Instruments	Instrumentation robuste facilement automatisable	Instrumentation fragile difficilement automatisable
Résultats	Petites bases de données spectrales, et peu de ressources logicielles	Grandes bases de données spectrales, et nombreuses ressources logicielles

Une des applications phares de la métabolomique est la garantie de l'authenticité. Elle a été employée sur de nombreuses matrices comme le safran, le miel et les boissons fermentées (Balkir et al., 2021; Böhme et al., 2019; Cubero-Leon et al., 2014). La RMN s'est révélée être un outil particulièrement efficace grâce notamment à la rapidité et à la reproductibilité des analyses et permet de caractériser l'origine géographique, la détermination du vieillissement et la détection des fraudes de nombreux produits alimentaires (Consonni & Cagliani, 2018).

## I.2 RMN et métabolomique

### I.2.1 Généralités

La spectroscopie RMN est une technique basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Les noyaux de spin non nuls, placés dans un champ magnétique extérieur, vont donner naissance au phénomène de résonance nucléaire lorsqu'ils sont excités par un second champ électromagnétique. Les noyaux les plus utilisés en métabolomique sont le proton ( $^1\text{H}$ ) et le carbone ( $^{13}\text{C}$ ). En science des aliments, le proton est le noyau le plus étudié de par son abondance naturelle et sa sensibilité (Hatzakis, 2019).

L'utilisation de la RMN pour l'analyse des aliments a été initiée à la fin des années 1950 pour mesurer le taux d'humidité présent dans les aliments mais les analyses n'ont été développées pour le contrôle alimentaire que dans les années 1980 (Spyros & Dais, 2012). Une des premières applications a été la mesure de la chaptalisation (ajout de sucres exogènes) dans les vins grâce à la technique appelée RMN-FINS (Fractionnement Isotopique Naturel et Spécifique par Résonance Magnétique Nucléaire) (Martin et al., 1988). Cette technique, qui repose sur la mesure des rapports isotopiques naturels deutérium/hydrogène (D/H) et carbone 12/carbone 13 ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ), a été définie comme méthode officielle pour l'analyse des vins par l'OIV ; pour l'analyse des jus de fruits, des sirops d'érable et de la vanille par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ; et pour l'analyse des vinaigres par le CEN (Comité Européen de Normalisation) (Hatzakis, 2019).

Concernant le type de matrices pouvant être étudiées par RMN, on peut définir globalement deux types d'échantillons : les échantillons liquides (donnant des conditions idéales pour la RMN), représentant la majeure partie des études, et des échantillons de type solides mous, nécessitant l'utilisation de technique hybride entre la RMN du solide et la RMN du liquide. Les matrices liquides, injectées directement ou obtenues grâce à des procédures d'extraction, sont les conditions idéales d'analyses pour obtenir des spectres de bonne qualité (Corsaro et al., 2016). Toutefois les extractions peuvent générer une perte d'information (évaporation de composés) et certaines matrices alimentaires ne sont pas adaptées à ce type d'analyses (viande, poisson, fromages). Pour ces dernières, la technique de rotation à angle magique a été mise au point sur des systèmes semi-solides (Chen & Singer, 2007). La plus connue est la technique HR-MAS (haute résolution en rotation à l'angle magique, en français) mais reste peu utilisée en raison du temps d'analyses et des difficultés à la rendre aussi résolutive que l'analyse des liquides (Hatzakis, 2019).

La qualité des spectres RMN dépend de l'intensité du champ magnétique extérieur. Plus l'intensité du champ extérieur, et donc sa fréquence, est élevée plus le système est résolutif et sensible. On distingue donc les analyses à bas champ magnétique ( $\leq 100$  MHz) des analyses à haut champ magnétique. Actuellement les analyses métabolomiques par RMN sont réalisées principalement à haut champ magnétique. Pour autant, même si les spectromètres à bas champ n'apportent pas le même niveau d'information, il existe un intérêt croissant pour ces analyses en lien avec leur portabilité et leur accessibilité (faible coût d'achat et de maintenance) (Matviychuk et al., 2021).

Les spectres peuvent ensuite être analysés avec des approches ciblées ou non-ciblées (*fingerprinting*). Pour la première approche, les variables analysées correspondent aux composés identifiés, tandis que pour la seconde, où la globalité du spectre est prise en compte, les variables sont des petits morceaux (*binning* de généralement 0,05ppm) du spectre.

Un spectre RMN contient différentes informations représentées dans la Figure 1 (ci-dessous) : les déplacements chimiques, la multiplicité des signaux, les constantes de couplage et l'aire des signaux.

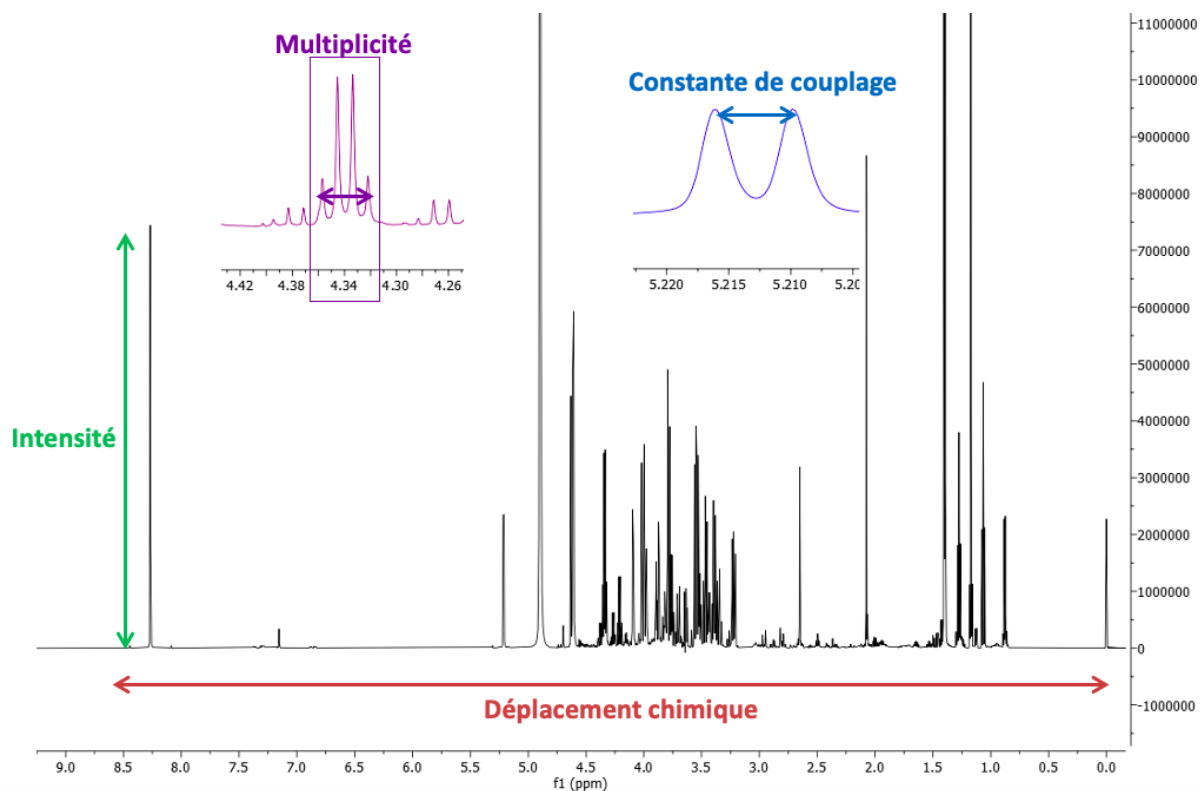


Figure 1: Informations contenues dans un spectre RMN  $^1H$ .

Le déplacement chimique ( $\delta$ ) est une unité relative qui caractérise la fréquence de résonance des noyaux étudiés et qui dépend de l'environnement chimique de chaque noyau. Il est exprimé en ppm. Un même métabolite peut donner une signature spectrale composée de plusieurs signaux à différents déplacements chimiques. Les déplacements chimiques donnent des informations sur les groupements chimiques portés par une molécule donnée.

La multiplicité des signaux (couplages scalaires) observée sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  est un élément essentiel pour l'identification des métabolites dans un mélange (Dona et al., 2016). Cette multiplicité dépend de l'environnement proche de chaque noyau. On distingue les signaux des protons dits « équivalents » des protons dits « non-équivalents ». La multiplicité étant régie par la règle dite du «  $n + 1$  », un proton ou un groupe de protons équivalents peut donner naissance à un singulet (s), un doublet (d), un triplet (t), un quadruplet (q), etc. Les intensités relatives des pics pour un multiplet sont données par le triangle de Pascal : 1:1 pour un doublet ; 1:2:1 pour un triplet ; 1:3:3:1 pour un quadruplet (Claridge, 2016). Les protons non-équivalents engendrent une démultiplication des signaux, doublet de doublets (dd), doublet de triplets (dt) etc...

L'écart entre les pics d'un multiplet est appelé constante de couplage. Elle est exprimée en Hz. Cette constante dépend principalement de la position relative des noyaux en interaction scalaire. Elle fournit donc une information importante pour l'identification des composés (Hatzakis, 2019).

Enfin, l'aire d'un signal RMN est directement proportionnelle au nombre de protons responsables de ce signal, ce qui en fait une méthode analytique directement quantitative. En fonction des conditions d'expériences (séquence, temps d'acquisition, délais de relaxation), la quantification peut être relative ou absolue (Bharti & Roy, 2012). La quantification peut être réalisée à partir d'un étalon interne ou d'un étalon externe. Et, contrairement aux autres techniques, un seul standard suffit à quantifier tous les métabolites connus (Bharti & Roy, 2012). Afin d'être dans les conditions de quantification absolue, il est nécessaire de tenir compte des temps de relaxation des métabolites contenus dans l'échantillon à analyser. Le délai de relaxation ( $D1$ ) choisi doit en général être au moins égal à 5 fois le temps de relaxation longitudinal ( $T_1$ ) des composés à doser (Weljie et al., 2006).



## I.2.2 Analyse métabolomique par RMN <sup>1</sup>H

Bien qu'il n'existe pas de consensus sur une méthodologie de préparation et d'analyses des échantillons, cette partie vise à résumer les grandes étapes d'une analyse métabolomique par RMN <sup>1</sup>H. Ces étapes sont représentées dans la Figure 2 ci-dessous et décrites dans les parties suivantes.

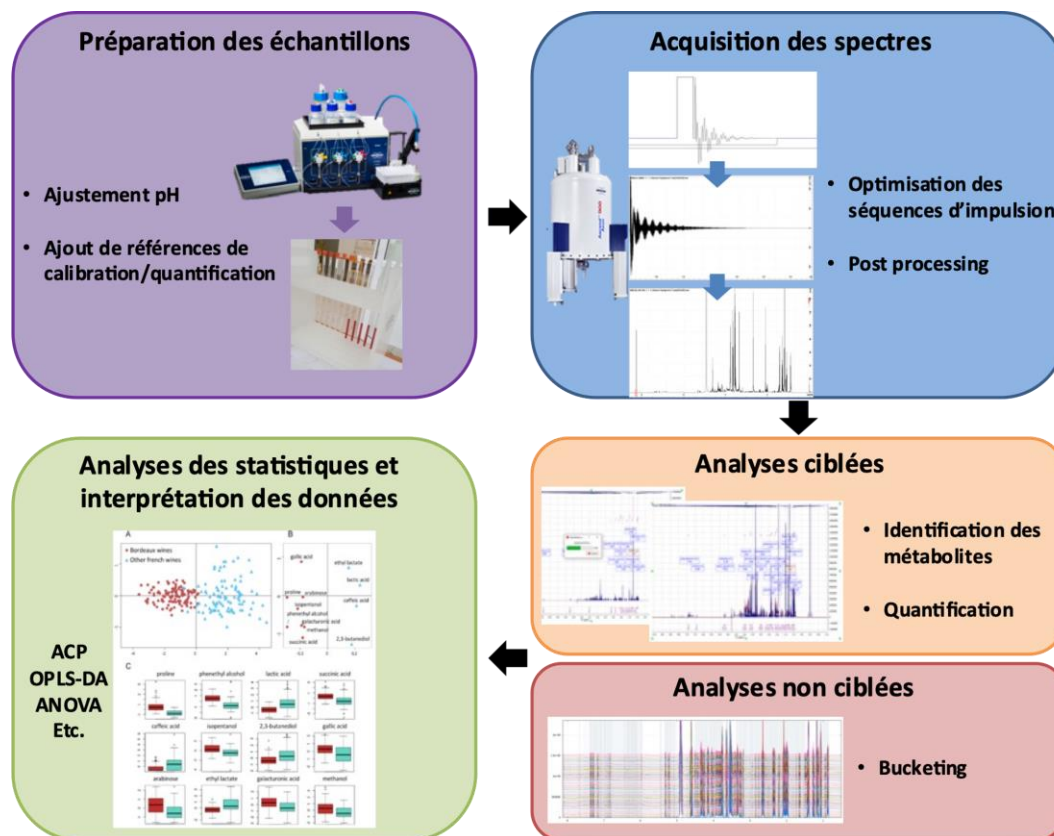


Figure 2: Schéma général du workflow des analyses métabolomiques par RMN <sup>1</sup>H.

### I.2.2.1 Préparation des échantillons

Dans le cas des matrices liquides, les échantillons analysés en RMN nécessitent relativement peu de préparation en comparaison avec d'autres techniques telles que la spectrométrie de masse ou la chromatographie (liquide ou gazeuse). Ils peuvent être analysés directement après ajout de 10 % de solvant deutéré (Ralli et al., 2018). Cependant, l'ajout d'une solution tampon est souvent nécessaire pour limiter les effets du pH (Vignoli et al., 2019).

Le principal avantage de la RMN est de pouvoir avoir une vision globale des métabolites majoritaires d'un échantillon. Mais si une classe spécifique de molécules est recherchée des étapes de préparation supplémentaires peuvent être ajoutées : extraction, lyophilisation,

concentration, etc. En revanche, ces techniques peuvent avoir un impact non négligeable sur la composition chimique globale en éliminant d'autres composés d'intérêts (Elnaker et al., 2021; Petrova et al., 2019).

### I.2.2.2 Séquences d'impulsions

Pour acquérir le spectre RMN  $^1\text{H}$ , une séquence d'impulsions va être utilisée pour enregistrer le signal de précession libre appelé FID (pour Free Induction Decay). Les spectres sont ensuite obtenus par transformée de Fourier. La qualité des spectres va fortement dépendre de la séquence d'impulsions utilisée. Dans le cas d'un échantillon préalablement lyophilisé et analysé en utilisant un solvant deutéré, une simple séquence proton (séquence zg) composée d'une seule impulsion radiofréquence (RF) à  $90^\circ$  est suffisante.

En absence de lyophilisation préalable, l'eau présente génère un signal qui occulte les résonances des autres métabolites et engendre une perte d'information. Pour pallier ce problème, des séquences d'impulsions spécifiques ont été développées. Elles utilisent soit une présaturation simple ou sont couplées à des impulsions sélectives (*shape pulse*) et à des gradients de champ pour supprimer les signaux des solvants (Hatzakis, 2019). Les séquences les plus fréquemment employées en métabolomique sont la ZGPR et la 1D-NOESY (Hatzakis, 2019).

La ZGPR est une séquence basique composée d'une irradiation continue à la fréquence de résonance du solvant (présaturation) suivie d'une impulsion à  $90^\circ$  qui génère l'aimantation observable (Giraudeau et al., 2015). La FID est ensuite enregistrée pendant le temps d'acquisition (AQ).

La séquence 1D-NOESY, appelée également NOE différence, est la plus utilisée pour les analyses métabolomiques car elle donne un meilleur rapport signal sur bruit ce qui rend l'identification et la quantification plus fiables (Grinde et al., 2019; Hatzakis, 2019; Navarro et al., 2020). Elle est basée sur effet Overhauser nucléaire lié à l'interaction entre deux noyaux dans l'espace. Leur excellente capacité à supprimer les solvants permet d'augmenter significativement le gain de récepteur (rg) et donc d'augmenter la sensibilité de l'analyse (Bharti & Roy, 2012)

Enfin, dans le cas d'analyses d'échantillons complexes contenant des macromolécules telles que des protéines ou des lipides, les signaux des spectres peuvent être élargis à cause des superpositions des signaux, conduisant à une perte de signal. La séquence d'impulsions

CPMG permet de surmonter ce problème en exploitant les différences de temps de relaxation des métabolites et des macromolécules (Mielko et al., 2021). Cette séquence permet de supprimer les signaux à relaxation rapide appartenant aux macromolécules en utilisant une séquence d'écho de spin (Carr & Purcell, 1954).

### I.2.2.3 Traitement du signal

Les spectres sont visualisés grâce à l'application d'une transformée de Fourier au signal de précession libre (FID). Avant d'être transformé, plusieurs traitements mathématiques peuvent également être utilisés pour améliorer le signal. D'abord, la taille du spectre est déterminée par le nombre de points après avoir appliqué la transformée de Fourier. La valeur doit être suffisamment élevée pour fournir une résolution optimale des petits signaux, il est préconisé d'avoir au moins 5 points au-dessus de la ligne à mi-hauteur d'un pic. Il est possible d'augmenter le nombre de points en appliquant un *zerofiling*, ce qui va améliorer la résolution du signal, la valeur préconisée est de 132000 points (Schoenberger, 2019). Ensuite, une fonction d'apodisation, contrôlée par le paramètre *line broadening* (lb), peut être appliquée pour améliorer le rapport signal sur bruit au détriment de la résolution.

Après la transformée de Fourier, les corrections de la phase et de la ligne de base du spectre sont classiquement utilisées pour corriger les éventuelles déformations et asymétries pouvant conduire à des erreurs significatives dans les intégrations et quantification des métabolites. D'après Bharti *et al.*, il est préférable d'utiliser une correction de phase manuelle plutôt qu'une correction automatique pour éviter les déformations des petits signaux (Bharti & Roy, 2012). Une correction de la ligne de base est souvent nécessaire pour prendre en compte correctement l'aire du pic intégré. Cette correction est faite automatiquement par différentes fonctions mathématiques (polynômes, etc.) à l'aide du logiciel de traitement utilisé (Wishart et al., 1995).

Enfin, le déplacement chimique du spectre est calibré pour permettre un traitement et une comparaison des différents spectres RMN  $^1\text{H}$  acquis. En général, la calibration consiste à ajuster à  $\delta$  0,00 ppm le signal de référence du standard de calibration interne (DSS, TSP, etc.).

### I.2.2.4 Identification des métabolites et quantification

Les spectres RMN des matrices alimentaires pouvant être très complexes nécessitent souvent une étape d'identification des métabolites (Bharti & Roy, 2014). Celle-ci est généralement réalisée à partir des données de la littérature, de l'utilisation de bases de données (HMDB,

SDBS, etc.) et d'ajouts dosés. Il est également possible d'utiliser des séquences bidimensionnelles : JRES, COSY, TOCSY, HMBC, etc. (Jimenez-Carvelo & Cuadros-Rodríguez, 2021). Les informations telles que les déplacements chimiques, la constante de couplage et la multiplicité des signaux seront indispensable à l'identification des métabolites.

Une fois les métabolites identifiés, ils peuvent être quantifiés à l'aide d'un étalon interne, externe ou d'un signal électronique (Bharti & Roy, 2012). Pour être dans des conditions quantitatives, il est toutefois indispensable d'utiliser un temps de répétition  $TR = AQ + D1$  supérieur à 5 fois la valeur du Temps de relaxation  $T1$  le plus long présent dans l'échantillon. L'aire des signaux étant directement proportionnelle au nombre de protons, il suffit de connaître la concentration d'un composé pour déterminer celle de tous les autres métabolites identifiés. A partir de la même expérience, la concentration de dizaines de métabolites de classes de famille chimiques différentes peut être réalisée à partir de la formule suivante (Godelmann et al., 2016):

$$C_x = \frac{M_x}{M_{ref}} \times \frac{N_{ref}}{N_x} \times \frac{I_x}{I_{ref}} \times C_{ref}$$

Où  $C$  équivaut à la concentration,  $M$  correspond à la masse molaire,  $N$  au nombre de proton et  $I$  à l'aire du signal ( $x$  : composé dosé ;  $ref$  : composé de référence). Il est également possible d'introduire un facteur de correction dans cette formule pour tenir compte des effets spécifiques aux séquences utilisées (Godelmann et al., 2016).

Toutefois, la quantification peut se révéler difficile lorsque les signaux se superposent. Dans ces cas, des outils de déconvolution du signal peuvent être utilisés (Bharti & Roy, 2012).

#### 1.2.2.5 Analyses statistiques

Les données des approches ciblées et non ciblées peuvent être traitées statistiquement afin de classer les échantillons analysés. Les analyses statistiques les plus répandues sont les analyses multivariées car elles permettent d'étudier simultanément l'ensemble des variables.

Plusieurs approches peuvent être employées. En général, les données sont d'abord traitées par une analyse non supervisée afin d'avoir une vision globale de la dispersion des échantillons. Puis, une analyse supervisée peut être réalisée pour améliorer la classification des échantillons et identifier les métabolites discriminants.

Les analyses non supervisées révèlent la distribution spontanée des échantillons en fonction des données (Ringné, 2008). Les analyses les plus courantes sont l'analyse de cluster

hiérarchique (HCA) et l'analyse en composantes principales (ACP). Elles permettent de représenter visuellement la distribution des échantillons en fonction des variables données (teneurs des métabolites, aires des signaux intégrés) (Granato et al., 2018)

Les méthodes supervisées ont pour but de faire ressortir des variables explicatives, c'est-à-dire dans notre cas les métabolites les plus discriminants entre des groupes d'échantillons prédéfinis. Contrairement à l'ACP, ce type d'analyse vise à différencier des groupes d'échantillons définis en amont et d'identifier les variables ayant le plus d'impact sur la séparation entre ces groupes spécifiques. Il existe différents types d'analyses supervisées, les plus couramment utilisées en métabolomique sont la PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) et l'OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis) (Szymańska et al., 2012). Afin de s'affranchir du caractère supervisé de ces analyses, il est nécessaire de valider les modèles obtenus (Szymańska et al., 2012): test de validation croisée, test de permutation, etc. Le test de validation croisée estime la capacité prédictive du modèle grâce aux indices  $Q^2$  et  $R^2$  (Szymańska et al., 2012b).  $Q^2$  représente l'estimation de la capacité prédictive du modèle alors que  $R^2$  explique l'appartenance aux différentes classes. Les valeurs de ces deux paramètres doivent idéalement être proches de 1,  $Q^2$  étant toujours plus petit que  $R^2$ . En métabolomique, un modèle est considéré comme bon lorsque  $R^2$  et  $Q^2$  sont supérieurs à 0,5 (Henseler et al., 2009; Triba et al., 2015). Le test de permutation permet quant à lui de s'assurer de la fiabilité de la classification des échantillons ; la distribution est considéré comme n'étant pas lié au hasard à partir d'une p-value < 0,05 (Szymańska et al., 2012).

Outre les statistiques multivariés, les outils statistiques univariés ont également leur place pour analyser les données générées par les analyses ciblées et non ciblées (Goodacre et al., 2007). En effet, les analyses multivariées peuvent avoir un effet « masque » et certaines variables jugées non significatives dans les modèles multivariés peuvent se révélées être significatives en analyses univariées. Ce genre d'analyses peut également être utilisé pour confirmer la signifiante des variables identifiées par les analyses multivariées (Percival et al., 2020). Les tests réalisés sont généralement des *t*-test ou des ANOVA, elles ont pour but de comparer les moyennes de chaque groupe d'échantillon métabolite par métabolite. Afin de garantir la fiabilité des résultats il est primordial de s'assurer de la distribution normale des données, si ce n'est pas le cas, des test non-paramétriques tel que le test de Kruskal-Wallis doivent être utilisés (Goodacre et al., 2007).

## II Le vin en France

### II.1 Les régions viticoles françaises

Selon le dernier rapport de l'OIV (OIV, 2022), la France est le 2<sup>ème</sup> producteur mondial de vin avec 16 principaux vignobles, représentés sur la Figure 3 : Alsace (1), Bordeaux (2), Beaujolais (3), Bourgogne (4), Bugey (5), Champagne (6), Corse (7), Jura (8), Languedoc (9), Lorraine (10), Loire (11), Provence et Côte d'azur (12), Roussillon (13), Rhône (14), Savoie (15) et Sud-Ouest (16).

Le plus grand vignoble de France est le Languedoc-Roussillon avec 246.000 hectares plantés et la Lorraine le plus petit avec 190 hectares (Collombet, 2020). Les vignobles français sont très différents entre eux et au sein de chaque région notamment au niveau de l'encépagement, de la densité de plantation ou de la conduite du vignoble. Les pratiques viticoles et œnologiques vont aussi beaucoup changer d'une région à une autre. Par conséquent, les vins des différentes régions auront des profils très différents. On parle ainsi de *terroir* qui selon l'OIV « est un concept qui se réfère à un espace sur lequel se développe un savoir collectif des interactions entre un milieu physique et biologique identifiable et les pratiques vitivinicoles appliquées, qui confèrent des caractéristiques distinctives aux produits originaires de cet espace. Le « terroir » inclut des caractéristiques spécifiques du sol, de la topographie, du climat, du paysage et de la biodiversité » (OIV, 2010).

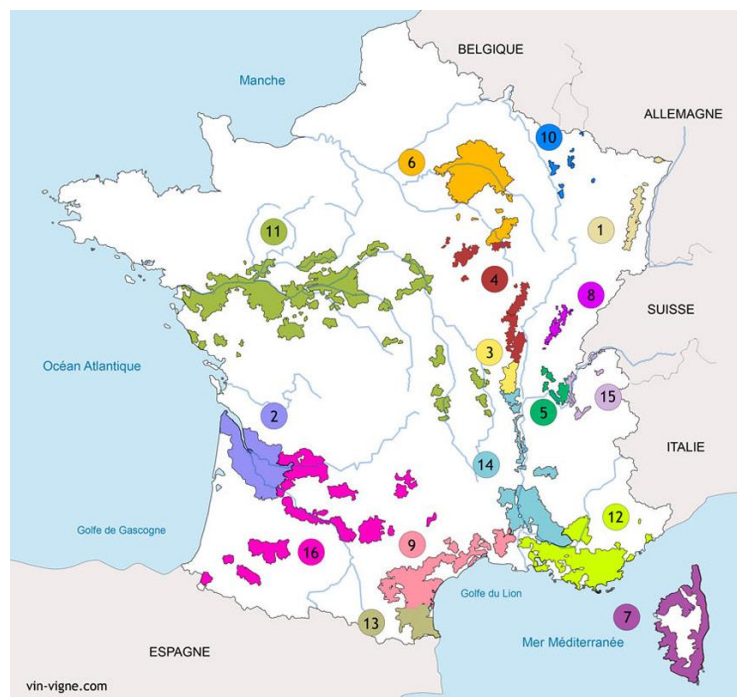


Figure 3: Carte du vignoble Français (Source : <https://vin-vigne.com>).

## II.2 L'encépagement français

L'encépagement en France a beaucoup évolué au cours des siècles et notamment au cours du 19<sup>ème</sup> et du 20<sup>ème</sup>. Parmi les évènements ayant conduit à cette évolution, le plus notable est sans aucun doute la crise du Phylloxera. Ce minuscule insecte importé de vignes américaines dans les années 1860 a profondément bouleversé le vignoble français et européen puisqu'il a conduit à son dépérissement (Carton, 2006). Cela a contraint à arracher la plupart des vignobles en France et en dans les autres pays producteurs en Europe. Les propriétés viticoles ayant tenu financièrement le coût et désireuses de conserver leur terroir ont replanté des cépages adaptés aux conditions climatiques greffés sur des vignes américaines résistantes aux attaques du Phylloxera.

Plus de 200 cépages sont autorisés pour la production de vin en France. Cependant, moins d'une dizaine de cépages représentent plus de 70 % des surfaces plantées (<http://www.vin-vigne.com>). Pour les cépages rouges on trouve le Merlot, le Grenache, la Syrah, le Cabernet Sauvignon, le Carignan, le Pinot Noir et le Gamay ; et pour les cépages blancs le chardonnay et le sauvignon blanc. Le choix de l'encépagement d'une région est multifactoriel. Il est, entre-autres, lié aux conditions environnementales (climat, sol) mais aussi fixé par les cahiers des charges de chaque appellation. Une liste non-exhaustive des cépages majoritaires utilisés par région est dressée dans le Tableau 2.

L'encépagement est très différent d'une région à l'autre. Il y a des cépages qui ne se développent bien que dans leur région ; c'est par exemple le cas des cépages alsaciens, et d'autres qui sont plus « plastiques » et s'adaptent aux conditions climatiques et pédologiques dans lesquelles ils sont plantés. C'est par exemple le cas du Cabernet Sauvignon, du Chardonnay ou du Pinot Noir qui peuvent s'exprimer dans des terroirs très variés et qu'on retrouve dans le monde entier. En revanche, ils ne vont pas du tout exprimer les mêmes arômes en fonction de leur provenance, cela étant lié, comme énoncé précédemment, à la notion de terroir.

La diversité génétique conduit invariablement à des profils métaboliques différents en fonction du cépage considéré. En effet, des études ont montré que la composition chimique des baies est très différente d'un cépage à l'autre que ce soit au niveau des concentrations en sucres, en acides organiques ou en acides aminés (Mulas et al., 2011; Pereira et al., 2005). Généralement, ce sont plus les teneurs qui diffèrent plutôt que la composition (Cosme et al., 2016; Hu et al., 2015; Liu et al., 2006).

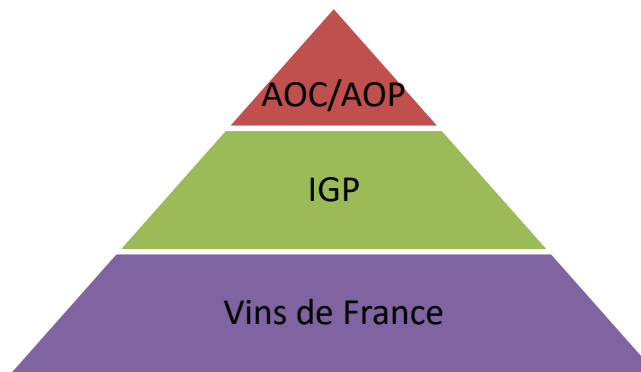
Tableau 2: Liste des cépages majoritairement utilisés dans chaque région viticole française et surfaces plantées (en hectares) (CNIV & FranceAgriMer, 2016; Collombet, 2020; OIV, 2022).

Régions viticoles	Surfaces (ha)	Cépages Rouges	Cépages Blancs
Alsace	15.600	Pinot Noir	Gewurztraminer, Pinot Gris, Riesling, Sylvaner
Bordelais	117.500	Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Petit Verdot, Côt	Sémillon, Sauvignon Blanc, Muscadelle
Beaujolais	19.000	Gamay	Chardonnay
Bourgogne	29.500	Gamay, Pinot Noir	Chardonnay
Champagne	33.344	Pinot noir, Pinot Meunier	Chardonnay
Corse	5.800	Aleatico, Nielluccio, Sciaccarellu	Barbarossa, Bianco gentile, Vermentino
Jura	1.850	Pinot noir, Trousseau, Poulsard	Savagnin, Chardonnay
Languedoc-Roussillon	246.000	Cabernet Sauvignon, Carignan, Grenache, Merlot, Syrah, Cinsault, Mourvèdre	Clairette, Grenache blanc, Marsanne, Picpoul, Rolle, Roussanne
Provence et Côte d'Azur	27.470	Grenache, Syrah, Mourvèdre, Cinsault	
Savoie, Haute-Savoie et Bugey	5.771	Gamay, Mondeuse, Pinot noir, Aligoté	Altesse, Chasselas, Jaquère, Roussane, Chardonnay
Sud-Ouest	50.000	Côt (= Malbec, Auxerrois), Duras, Fer-servadou, Negrette, Tannat	Arrufiac, Baroque, Courbu, Loin-de-l'œil, Gros Manseng, Petit Manseng, Mauzac,
Vallée de la Loire	70.000	Côt, Gamay, Gris meunier, Grolleau, Pineau d'Aunis, Pinot Noir, Pinot Gris,	Chasselas, Muscadet, Romorantin, Sauvignon
Vallée du Rhône	73.838	Carignan, Cinsault, Cournoise, Grenache, Syrah, Mourvèdre	Bourboulenc, Clairette, Grenache Blanc, Marsanne, Roussanne, Viognier



### II.3 Les désignations des vins français

Les vins français peuvent, selon certains critères régis par l'INAO (l'Institut National de l'Origine et de la Qualité), prétendre à des désignations pouvant garantir leur provenance et leur qualité (Vincent, 2018). Tout d'abord on distingue les vins sans indications géographiques (VSIG), connus sous le nom de vin de France, des vins avec indication géographique (IG). Ensuite, au sein des vins portant une indication géographique on trouve les vins d'indication géographique protégée (IGP) et les appellations d'origines protégées (AOP) au niveau européen ou leur déclinaison française, les appellations d'origines contrôlées (AOC). Les désignations sont souvent classées comme suit (Figure 4) en fonction du nombre de critères des cahiers des charges pour prétendre à l'appellation.



*Figure 4 : Représentation schématique des différentes désignations des vins français en fonction de la réglementation des cahiers des charges.*

Selon une étude réalisée en 2016 par le CNIV et FranceAgriMer, sur les 4,6 milliards de litres de vin produits en France, 48% étaient des vins d'AOC-AOP et 28% des IGP (CNIV & FranceAgriMer, 2016). Selon l'Institut National de l'Origine et de la Qualité (INAO), il y a actuellement 363 AOC-AOP en France. Ces désignations, validées par décrets ministériels, permettent à la fois de garantir la provenance d'un produit mais aussi d'être gage de qualité et de savoir-faire. Les producteurs qui utilisent une AOC-AOP sont donc contraints de suivre le cahier des charges de l'appellation. Ils offrent ainsi cinq principales garanties :

- L'aire de production
- Les cépages utilisés
- Le rendement à l'hectare (fixé par décret)
- Le degré d'alcool minimal
- Les pratiques de culture et de vinification

L'IGP est une désignation qui a été mise en place par réglementation européenne en 1992 (INAO, 2016). On compte aujourd'hui 74 IGP de vins en France. Selon l'INAO, une IGP permet de désigner un produit agricole, brut ou transformé, dont la qualité, la réputation ou d'autres caractéristiques sont liées à son origine géographique. Les cahiers des charges des IGP sont plus souples que ceux des AOC-AOP mais doivent tout de même respecter certains critères :

- Le rendement maximum par hectare
- Le degré d'alcool minimal

En revanche, les viticulteurs sont libres sur leur choix de cépage et sur les techniques de viticultures et de vinifications.

Enfin, une partie non négligeable de la production de vins en France, environ 8%, ne possède pas d'appellation. Ils ne subissent aucune contrainte en termes de rendement ou de degré d'alcool puisqu'ils n'ont pas de cahier des charges.

Des procédures de contrôles, vérifications et dégustations, mises en place par un organisme indépendant agréé par l'INAO sont réalisées pour les produits bénéficiant d'une AOC-AOP ou d'une IGP. Il est important de mentionner qu'un vin d'appellation n'est pas forcément synonyme de qualité organoleptique ou gustative. Il s'agit uniquement d'une certification de l'origine géographique.

### II.3.1 Exemples de quelques cahiers des charges de vins français

#### *II.3.1.1.1 Bordeaux*

Le vignoble bordelais recense 65 AOC-AOP réparties en six régions viticoles : le Médoc, le Libournais, le Graves, le Blayais et Bourgeais, le Sauternais, et l'Entre-deux-Mers. Les AOC-AOP du bordelais regroupent des appellations régionales (Bordeaux, Crémant de Bordeaux, etc.), des appellations sous-régionales (Médoc, Graves, etc.) et des appellations communales (Margaux, Pauillac, etc.). Les AOC ont donc des aires géographiques très différentes puisqu'elles vont de l'appellation Bordeaux avec 505 communes aux appellations communales telles que Pauillac. Chaque AOC définit ses propres règles. A titre d'exemple, les vins rouges d'AOC Bordeaux ne peuvent être produits qu'avec six cépages différents : Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Malbec (ou Côt), Carménère et Petit Verdot.

Les trois premiers sont les plus largement utilisés et le Merlot domine en représentant 66% des surfaces plantés (Collombet, 2020).

Dans la pratique, on observe une grande disparité de l'encépagement en fonction des régions productrices. Les cahiers des charges des différentes AOC ne contraignent pas les viticulteurs sur les proportions de plantations ; les laissant libres de réaliser l'assemblage qu'ils souhaitent.

Pour autant, le Cabernet Sauvignon est très utilisé dans le Médoc alors que le Merlot et le Cabernet Franc sont retrouvés en plus fortes proportions dans le Libournais (Collombet, 2020).

#### *II.3.1.1.2 Vin mousseux*

Les vins mousseux regroupent l'ensemble des vins contenant du gaz dans la bouteille. Plusieurs méthodes de fabrication sont décrites mais la plus répandue est la méthode traditionnelle, également appelée *méthode champenoise*. Cette méthode consiste à ajouter au vin après la mise en bouteille une liqueur (mélange de levures, de sucre et de vieux vin), ce qui entraîne une seconde fermentation en bouteille.

Selon les derniers chiffres publiés par l'OIV en 2020 (OIV, 2020), la France est le deuxième plus grand producteur de vins mousseux avec 4,4 millions d'hectolitre. Le champagne est majoritaire en représentant 61,5 % du volume total de la production de vins mousseux en France. Ces dernières années en France, d'autres vins mousseux appelés « crémants », et produits selon la méthode traditionnelle, ont augmenté leurs parts de marché. La distinction entre eux vient du fait qu'il a été légiféré que seuls les vins de la région de Champagne peuvent revendiquer l'appellation du même nom. En 2018, la part de la production de crémants dans la production totale de vins mousseux a atteint 7 % pour l'Alsace, 5,3 % pour la Bourgogne, 4,2 % pour la Loire et 1,5 % pour Bordeaux (OIV, 2020).

Bien que les champagnes et les crémants utilisent la même technique de vinification pour faire pétiller le vin, ils se distinguent en de nombreux points. Outre le fait de ne pas être produits dans les mêmes régions, ils se différencient aussi par les cépages utilisés ou les méthodes de fabrication. En effet, les crémants peuvent utiliser les cépages qu'ils souhaitent (Essentiellement les cépages produits dans leurs régions respectives) tandis que le cahier des charges de l'appellation Champagne n'autorise que sept cépages parmi lesquels le

Chardonnay, le Pinot Noir et le Pinot Meunier sont les plus largement utilisés. Puis, concernant les méthodes de fabrication ; une des étapes indispensables à la fabrication de vin mousseux suivant la méthode traditionnelle est l'élevage sur lies (levures mortes après la seconde fermentation). Les cahiers des charges stipulent que cette étape doit durer au minimum 15 mois pour les vins de Champagnes et de 3 ans pour les Champagnes millésimés, tandis que cette période est réduite à 9 mois pour les crémants.

### III Le métabolome du raisin au moût

Ces différences de cépages, de régions et de pratiques œnologiques vont avoir des conséquences sur la composition chimique des vins. Afin de mieux comprendre les différences pouvant être rencontrées, nous proposons dans le chapitre suivant de présenter les différents composants du raisin jusqu'au moût. Ces travaux de thèses portant sur le développement de la métabolomique par RMN, seuls les composés majoritaires analysables par RMN <sup>1</sup>H seront détaillés.

#### III.1 Notions de maturité et impact des travaux viticoles sur la qualité des raisins

La condition *sine qua non* pour obtenir un vin de qualité est de récolter un raisin arrivé à bonne maturité. Le développement des baies est asynchrone, que ce soit au sein de la même grappe ou entre les différentes grappes du pied. Il y a donc une très forte hétérogénéité de la maturité à la parcelle. A l'exception de production de vins particuliers, la plupart des raisins sont récoltés à maturité entre septembre et octobre. Les conditions idéales sont lorsque les maturités « physiologique », « phénolique » et « aromatique » sont réunies. La maturité physiologique est liée à la qualité des pulpes et aux teneurs en acides et en sucres. Elle est définie par le degré alcoolique potentiel. La maturité phénolique reflète de la qualité des composés phénoliques (anthocyanes et tanins) des pellicules et des pépins. La maturité aromatique correspond au bouquet odorant optimal des pulpes et des pellicules.

Il y a généralement un décalage entre les trois maturités et la détermination de la date de vendange est donc souvent un compromis entre ces niveaux de maturité et l'état sanitaire des baies. *In fine*, le choix de la date de vendange conditionne la composition chimique des baies.

### III.2 Principaux constituants du raisin et concentration dans les moûts

La maturation débute à partir de la véraison ; moment où les fruits prennent la couleur qu'ils auront à maturité. La durée de la phase de maturation dépend de la précocité du cépage et des conditions climatiques et peut varier entre 35 et 65 jours. Il est par exemple courant d'observer à Bordeaux la véraison quasi simultanée des raisins de Merlot et de Cabernet Sauvignon mais ces derniers arrivent à maturité 10 à 15 jours plus tard (Blouin, 2000, p. 26-29).

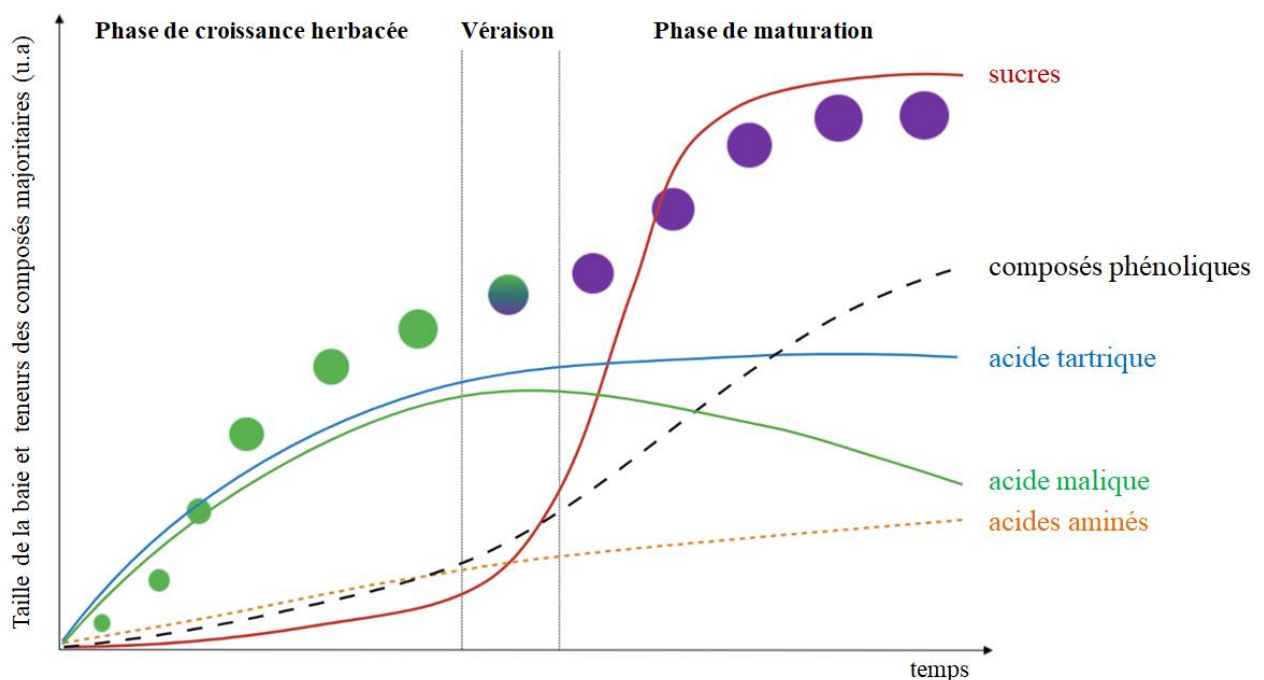


Figure 5: Représentation schématique de l'évolution de la taille de la baie et de la concentration des composés majoritaires en fonction du temps (Schéma adapté de Blouin, 2000, Coombe et al. 2002 et Kennedy, 2002).

La véraison est davantage visible pour les raisins de cépages rouges grâce à la biosynthèse des anthocyanes mais a également lieu pour les raisins de cépages blancs qui passent d'une couleur verte au jaune. Le phénomène peut prendre entre 8 et 15 jours au niveau d'une même grappe et se caractérise par un ramollissement, en quelques heures, des baies qui deviennent plus translucides. Cela se traduit par un changement important de la composition chimique des baies. En quelques jours, leur volume augmente car il y a entrée d'eau et de sucres tandis que les teneurs en acides diminuent.

Le développement de la baie et des teneurs des composés majoritaires et détectables par  $^1\text{H}$  RMN sont représentés dans la Figure 5 et sont décrites dans les parties suivantes.

### III.2.1 Les sucres

Les concentrations des différents sucres dans les baies de raisin sont principalement conditionnées par le cépage. De plus, les teneurs dépendent fortement des conditions environnementales et des pratiques culturales (Kuhn et al., 2014). Les sucres sont accumulés dans les baies à partir de la véraison. A maturité, ils sont les constituants majoritaires, après l'eau, en représentant 15 à 20 % de la composition (Blouin & Cruège, 2003).

Les sucres majoritaires sont le glucose et le fructose à des concentrations sensiblement équivalentes (Cosme et al., 2016; Ribéreau-Gayon, 2017). Ils représentent 99% des sucres solubles présents dans la baie. Ce sont des hexoses qui sont issus de l'hydrolyse du saccharose qui est synthétisé lors de la photosynthèse. Une étude portant sur 98 cépages différents a montré que les concentrations dans les moûts, en glucose et fructose, peuvent varier d'environ 90 à 260 g/L (Liu et al., 2006). Dans le cas des raisins produits pour les vins liquoreux, les teneurs peuvent atteindre 400 g/L grâce à des phénomènes de concentrations dans la baie (Ribéreau-Gayon, 2017). Au moment de la récolte il peut rester jusqu'à 5g/L de saccharose non hydrolysé.

Les autres sucres sont minoritaires. On retrouve principalement l'arabinose (jusqu'à 1g/L) puis le galactose et le xylose (entre quelques dizaines et quelques centaines de milligrammes). Enfin, des poly-oses tels que le mélibiose, le thréhalose, le maltose, le raffinose et le stachyose peuvent être présents dans les raisins, mais leurs très faibles concentrations et la polymérisation les rend difficilement visibles en RMN métabolomique.

### III.2.2 Les acides organiques

Les acides organiques majoritaires dans les baies sont l'acide tartrique, l'acide malique et l'acide citrique. Ils représentent 95 % des acides du raisin et sont les constituants majoritaires après les sucres (Cosme et al., 2016).

L'acide tartrique est caractéristique de la vigne, c'est une des rares plantes à en produire à des concentrations élevées. Il est majoritairement synthétisé jusqu'à la véraison à partir de l'acide ascorbique (vitamine C) produit par les feuilles. Ses teneurs sont relativement constantes au

cours de la maturation mais varient fortement en fonction du cépage et de l'origine géographique. Selon Ribéreau-Gayon, les concentrations dans les moûts à maturité peuvent aller de 3,8 à 11,3 g/L. C'est l'acide le plus fort qui va fortement jouer sur le pH des raisins et des vins (Picariello et al., 2019).

L'acide malique est produit à partir des sucres lors de la photosynthèse. Il s'accumule dans le raisin de façon importante jusqu'à la véraison où sa concentration chute jusqu'à maturité. Cette diminution s'explique par un changement du métabolisme de l'acide malique qui est dégradé pour produire de l'énergie pendant la maturation. Les teneurs à maturité dépendent fortement du cépage et de la température au cours de la maturation. En effet, on le retrouve en concentrations plus importantes dans les zones fraîches (4 à 8 g/L) que dans les régions chaudes (1 à 2 g/L) (Blouin & Guimberteau, 2000). L'acide malique est par conséquent un bon marqueur à la fois de la zone géographique mais aussi un marqueur du millésime car sa teneur va varier en fonction des températures de l'année.

L'acide citrique est généralement peu présent, entre 150 et 300 mg/L, et intervient dans le cycle de Krebs (Carbonneau & Torregrosa, 2020). Il est par conséquent un intermédiaire lors de la synthèse (jusqu'à véraison) et de la dégradation (jusqu'à maturité) de l'acide malique.

Les autres acides organiques sont minoritaires mais peuvent être de bons marqueurs de cépage, d'origine géographique ou de millésimes. C'est notamment le cas de l'acide shikimique et de l'acide galacturonique qui sont principalement localisés dans les pellicules des baies dont les teneurs sont très variables en fonction des cépages (Gougeon, da Costa, Guyon, et al., 2019; Román et al., 2018). On trouve également de petites concentrations d'acide succinique, d'acide lactique et d'acide acétique (Blouin & Guimberteau, 2000; Pavloušek & Kumšta, 2011; Picariello et al., 2019).

Dans le cas de raisins de « pourriture noble » qui servent à la production de vins liquoreux, on retrouve des quantités importantes d'acide gluconique (plusieurs grammes par litre) et d'acide mucique (Nigam, 2014).

### III.2.3 Les acides aminés

Les acides aminés sont accumulés dans les baies tout au long de leur croissance. Il y a une vingtaine d'acides aminés présents dans les raisins mais une poignée prédomine : l'alanine, l'arginine, la proline et la glutamine (Cosme et al., 2016; Ribéreau-Gayon, 2017; Stines et al., 2000). A des plus faibles teneurs, on trouve l'acide glutamique, la sérine et la thréonine.

La synthèse des acides aminés à lieu grâce à l'assimilation de nitrate dans les racines et dans les feuilles (Verdenal et al., 2021). Les nitrates sont convertis en nitrite puis en ammonium par actions enzymatiques. La principale voie de biosynthèse des acides aminés est la transformation de l'ammonium, toxique pour la plante, en glutamine et glutamate par le cycle glutamine synthase/glutamate synthase (cycle GS/GOGAT) (Bernard & Habash, 2009). La glutamine et le glutamate sont ensuite transformés en autres acides aminés par transaminations (Pandey et al., 1974; Son et al., 2008). Tandis que les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) proviennent de la voie l'acide shikimique (Bontpart et al., 2016).

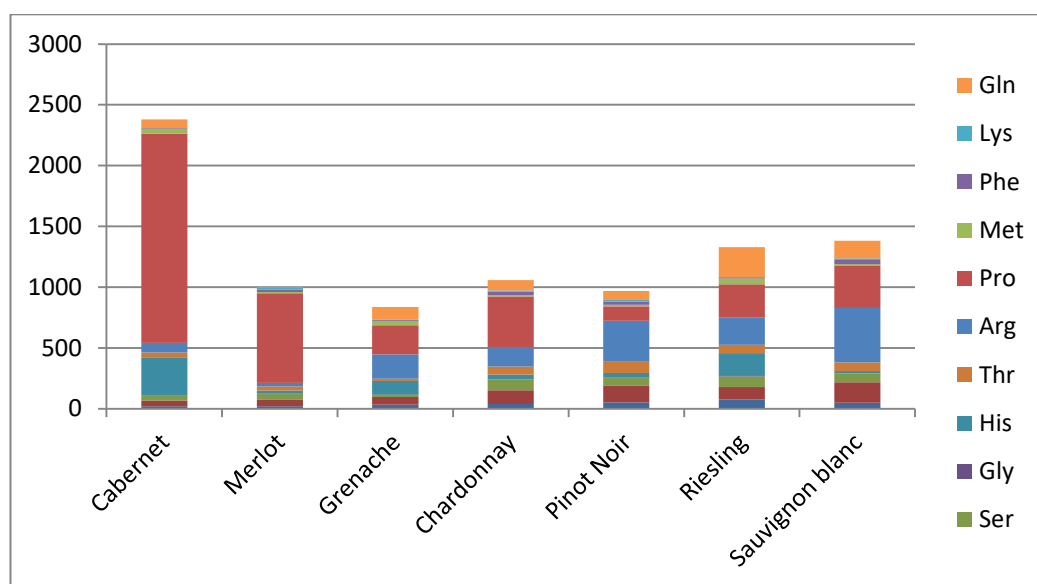


Figure 6: Représentation graphique des différentes proportions et teneurs en 10 acides aminés au sein de 7 cépages français (adapté de Hernández-Orte et al. 2002).

La composition et la quantité des différents acides aminés dépend du cépage (Figure 6), du mode de conduite de la vigne et des conditions pédo-climatiques (Hernández-Orte et al., 2002; Lee et al., 2009; Mulas et al., 2011; Pereira et al., 2006). Les teneurs peuvent aller de 300 à 5000 mg/L (2500 mg/L en moyenne) et sont plus élevées en climats plus froid (Blouin & Cruège, 2003). Les teneurs vont beaucoup varier d'une année à l'autre en fonction des conditions climatiques (Arrizabalaga-Arriazu et al., 2020; Pereira et al., 2006). Ils sont de ce fait d'excellents marqueurs de millésimes.



### III.2.4 Les composés phénoliques

La dernière famille chimique que l'on trouve en quantités suffisamment importantes pour être observée en RMN est celle des composés phénoliques. Par définition, les composés phénoliques possèdent une ou plusieurs fonctions phénol et représentent chez la vigne des centaines de composés différents. Ils sont issus du métabolisme secondaire de la vigne et on les retrouve dans les toutes les parties de la baie (pellicule, pulpe et pépins) en différentes proportions (Cosme et al., 2016). On distingue deux grandes familles : les composés non-flavonoïdes et les composés flavonoïdes (Figure 7).

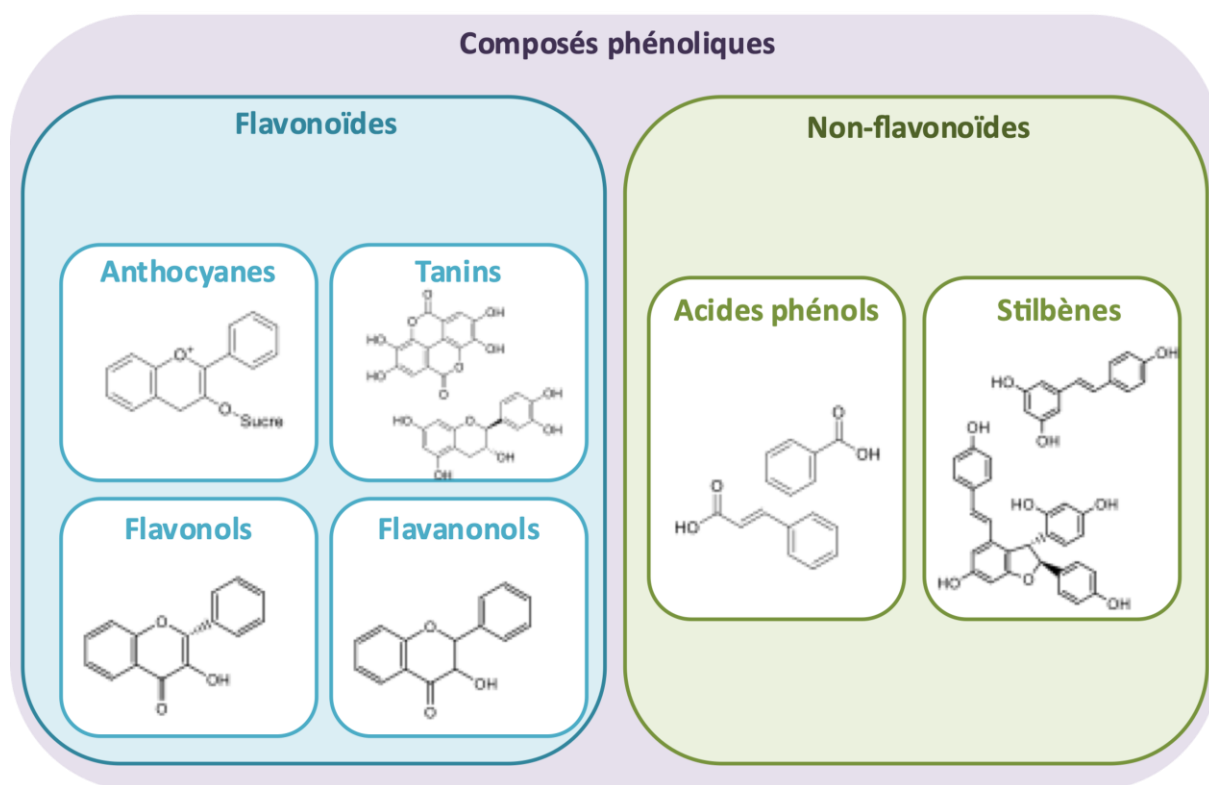


Figure 7 : Schéma des différentes familles de composés phénoliques.

Les principaux composés non-flavonoïdes recensés dans la baie de raisin sont les acides phénols, et en plus faibles teneurs les stilbènes. Ces derniers constituent une large famille de composés dont l'unité de base est le resvératrol (structure en C6-C2-C6). En revanche, leurs teneurs sont relativement faibles dans les baies (< 10 mg/kg) (Benbouguerra et al., 2021), ce qui les rend difficiles à observer en RMN métabolomique. En revanche, certains acides phénols présents en plus fortes quantités dans les baies peuvent être observés.

On distingue deux classes d'acides phénols : les acides hydroxybenzoïques (structure en C6-C1) et les acides hydroxycinnamiques (structure en C6-C3). De façon générale, les

concentrations sont nettement plus élevées dans les moûts issus de cépages rouges où un facteur 10 peut être observé (Šikuten et al., 2020). Les acides hydroxybenzoïques majoritaires sont l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide protocatéchique et l'acide syringique (Cosme et al., 2016; Šikuten et al., 2020). L'acide gallique est considéré comme le plus abondant avec des teneurs pouvant dépasser 100 mg/L dans les moûts (Šikuten et al., 2020). Les acides hydroxycinnamiques principalement retrouvés sont l'acide caftarique, l'acide caféique, l'acide coutarique et l'acide chlorogénique (Cosme et al., 2016; Šikuten et al., 2020). Dans une étude portant sur 344 cépages européens, les analyses ont montré que l'acide caftarique est largement majoritaire dans les baies, pouvant représenter jusqu'à 74 % de la totalité des acides hydroxycinnamiques dosés (Liang et al., 2011).

La famille des composés flavonoïdes est constituée de nombreuses sous classes telles que les anthocyanes, les flavanols (catéchines) ou les flavonols. La structure de base est organisée en C6-C3-C6 mais de nombreuses réactions conduisent à la formation de multiples dérivés. Les teneurs cumulée peuvent être relativement importantes dans les baies, pouvant atteindre en moyenne 1 g/kg (Liang et al., 2011). Cependant, l'observation des anthocyanes dans le vin par RMN est extrêmement complexe due aux échanges entre les différentes formes pour des pH >3, les associations entres-elles ou les complexations avec les autres molécules (Forino et al., 2019; Freitas et al., 2017). Par conséquent, les composés flavonoïdes, hormis la catéchine et l'épicatéchine, sont très peu étudiés par analyse directe, leurs faibles teneurs nécessitant des étapes supplémentaires de préparation des échantillons (extraction SPE, lyophilisation, etc.) (Ocaña-Rios et al., 2021 ; Šikuten et al., 2020).

On observe une nette augmentation des teneurs en composés phénoliques au cours de la maturation. Les tanins et les anthocyanes (pour les cépages rouges) sont accumulés respectivement dans les pépins et les pellicules des baies et leurs teneurs peuvent atteindre 9g/kg de baies (Blouin & Guimberteau, 2000; Ribéreau-Gayon, 2017). Les acides phénols sont quant à eux majoritairement présents dans la pulpe et les pellicules.

La grande diversité de cette famille chimique s'explique par la présence de plusieurs voies de biosynthèse régulées par de nombreuses enzymes spécifiques. Les composés phénoliques proviennent de la catalyse des sucres, par les voies des pentoses phosphates et de la glycolyse, de la voie de l'acide shikimique et de la voie des phénylpropanoïdes (Bontpart et al., 2016).

La composition chimique du moût est donc conditionnée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques et varie particulièrement en fonction des cépages. L'état sanitaire des baies et la maturité sont des éléments essentiels à prendre en compte pour élaborer un vin de qualité. Nous allons détailler dans le chapitre suivant les principales transformations qui ont lieu aux cours des vinifications.

## IV Composition chimique du moût au vin

La plus récente définition proposée par l'OIV en 1973 décrit le vin comme étant une boisson « *résultant exclusivement de la fermentation alcoolique complète ou partielle du raisin frais foulé ou non ou du moût de raisin* » (OIV, 2015). Cependant, en fonction du type de vin souhaité, le moût peut subir différents procédés conduisant à des vins aux profils métabolomiques très variés. Les étapes de fabrication varient principalement en fonction de la couleur (rouge, blanc ou rosé) ou du type de vin (tranquille, effervescent, sec ou liquoreux) souhaité. A titre d'exemple, les derniers chiffres publiés par le CNIV annoncent que sur les 4,2 milliards de litres de vin produits en France en 2019 il y avait : 40 % de vins rouges, 8 % de vins effervescents, 20 % de vins blancs, 15 % de vins rosés (source : <https://www.intervin.fr>). Des études utilisant la métabolomique par RMN ont montré des différences métabolomiques entre les vins rouges, blancs et rosés (Marsit & Dequin, 2015).

Si on veut comprendre les différences métabolomiques entre ces vins il faut d'abord étudier les grandes transformations qui ont lieu au cours de l'élaboration des vins puis s'intéresser aux spécificités de chaque type de vins. Les grandes transformations du moût au vin sont schématisées dans la Figure 8 et montre la complexification de la matrice au cours de l'élaboration du vin. Nous ne détaillerons pas toutes les étapes conduisant à l'élaboration du vin mais seulement celles pouvant avoir un impact sur les composés majoritaires visibles en RMN  $^1\text{H}$ .

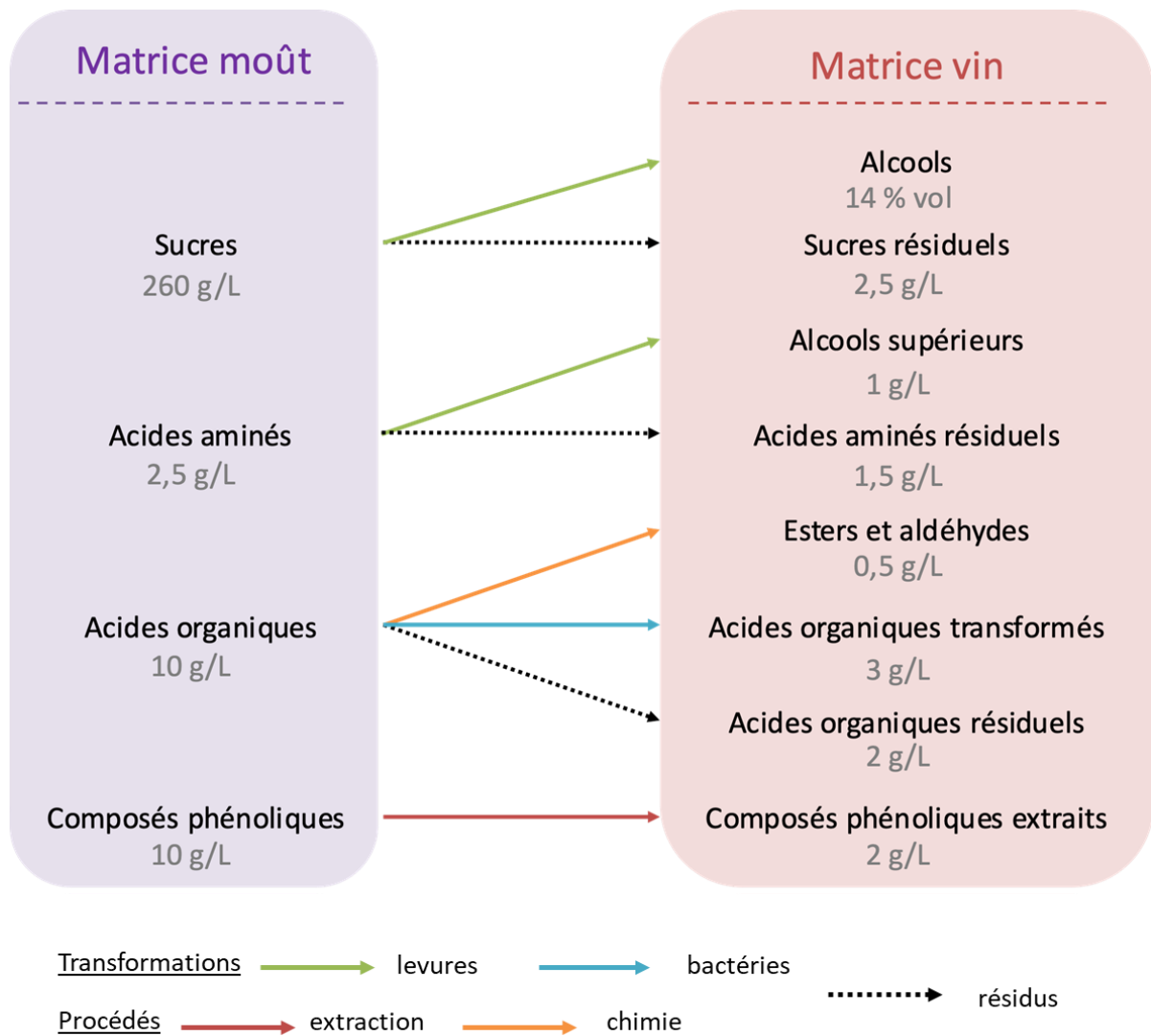


Figure 8 : Schéma des familles chimiques majoritaires retrouvées dans les matrices moût et vins. Les chiffres représentent les teneurs moyennes en g/L.

#### IV.1 Transformations liées aux fermentations

L'élaboration du vin est en grande partie due aux activités de micro-organismes : les levures et les bactéries. Bien que naturellement présents sur les baies à la vendange, ils sont souvent ajoutés par le vinificateur pour mieux contrôler le processus fermentaire. Que les fermentations soient réalisées spontanément par les micro-organismes indigènes ou maîtrisées par le vinificateur, cela conduit à de profonds changements du métabolome.

#### IV.1.1 Transformations par les levures

Les levures ont un rôle essentiel à la production de vin, puisqu'elles réalisent la fermentation alcoolique. On distingue de nombreuses espèces en concurrence dont les non-*Saccharomyces* et les *Saccharomyces*. Les espèces non-*saccharomyces* ont tendance à démarrer la fermentation alcoolique mais elles sont rapidement inhibées (production d'éthanol, augmentation de la température et concurrence avec d'autres espèces) au profit de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette dernière est majoritairement utilisée par les vinificateurs en raison de sa capacité à fermenter la quasi-totalité des sucres fermentescibles (Marsit & Dequin, 2015).

En raison des teneurs importantes en sucres, les levures sont incapables de réaliser la respiration et sont contraintes d'utiliser des voies fermentaires pour fournir de l'énergie et se développer. Cet effet, connu sous le nom de Crabtree, se traduit par une inhibition des mitochondries et du cycle respiratoire et a lieu dès que les taux de sucres dépassent 2g/L dans le milieu (Ribéreau-Gayon, 2017). Les levures vont donc utiliser les sucres grâce à des voies fermentaires. Outre le fait de produire majoritairement de l'éthanol, elles modifient la composition chimique des moûts en jouant également sur les teneurs en acides organiques, alcools supérieurs, esters et acides aminés.

##### IV.1.1.1 La fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique (FA), présentée dans la Figure 9, est la réaction qui, quantitativement, a le plus d'impact sur le métabolome du moût. En effet, on estime que 17 g/L de sucres conduisent à la production d'un degré volumique d'éthanol. La durée de la FA varie généralement entre 8 et 15 jours. Dans des conditions optimales de fermentation, les levures peuvent transformer la quasi-totalité des sucres fermentescibles (glucose et fructose) pour finir à des teneurs inférieures à 2g/L pour les vins secs.

Les sucres fermentescibles peuvent également être transformés en produits dits « secondaires » car présents en plus faibles teneurs. Ces métabolites, représentent environ 10% de la production, sont : le glycérol, l'acide acétique, l'acide succinique, le 2,3-butanediol, l'acide pyruvique, l'acétoïne et l'éthanal (Ribéreau-Gayon, 2017).

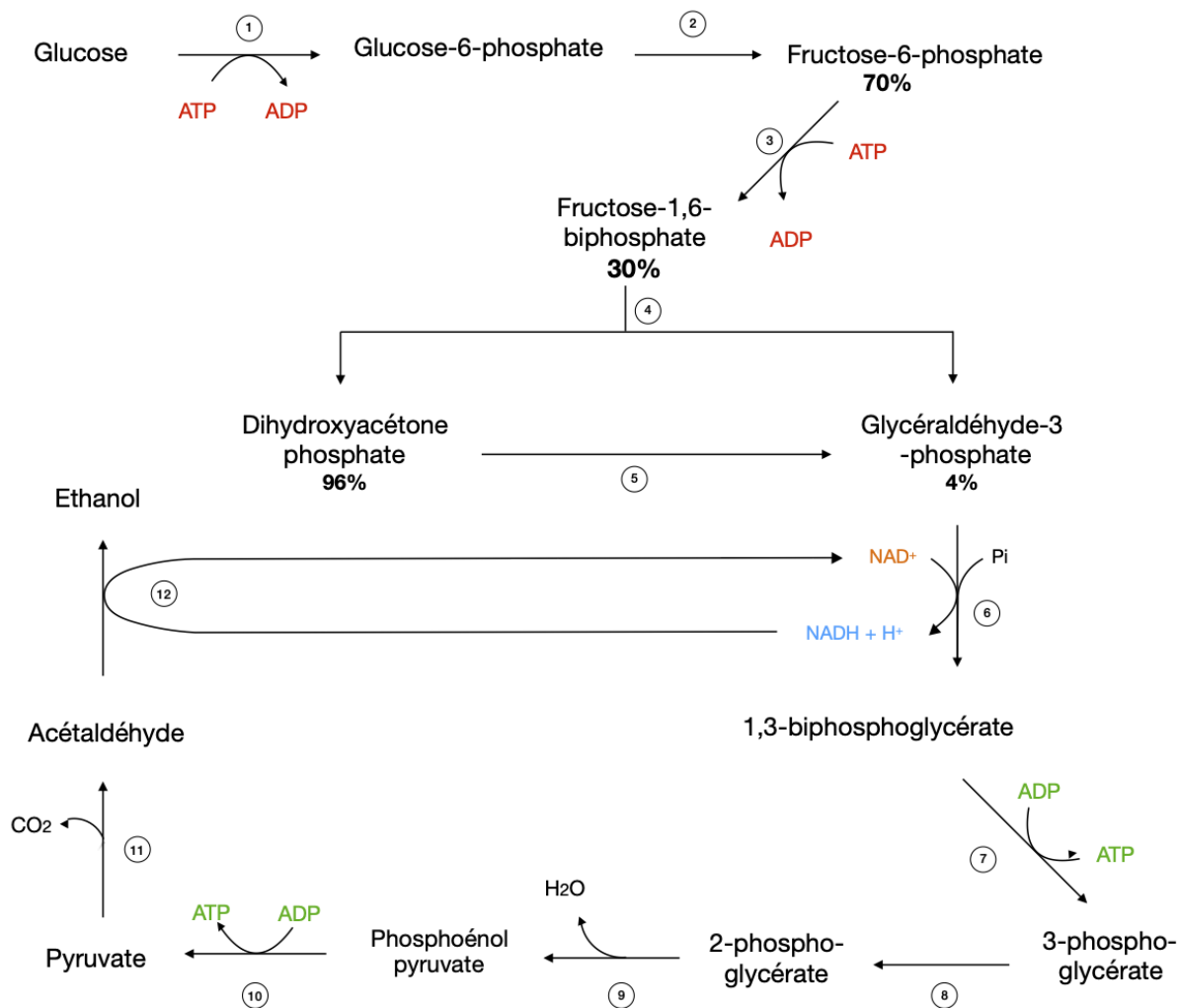


Figure 9: Voie de la glycolyse et de la fermentation alcoolique. 1 : hexokinase, 2 : phosphoglucose isomérase, 3 : phosphofructokinase, 4 : aldolase, 5 : triose phosphate isomérase, 6 : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, 7 : phosphoglycérate kinase, 8 : phosphoglycéro mutase, 9 : Enolase, 10 : Pyruvate kinase, 11 : Pyruvate décarboxylase, 12 : Alcool déshydrogénase (d'après schéma Ribéreau-Gayon et al. 2017).

#### IV.1.1.2 La fermentation glycéropyruvique

Le glycérol, formé par la fermentation glycéropyruvique (Figure 10), est le métabolite secondaire majoritaire avec des teneurs pouvant varier entre 1 et 15 g/L. Les concentrations varient en fonctions de nombreux paramètres tels que : le pH, la température ou encore les souches de levures (Yalcin & Ozbas, 2008).

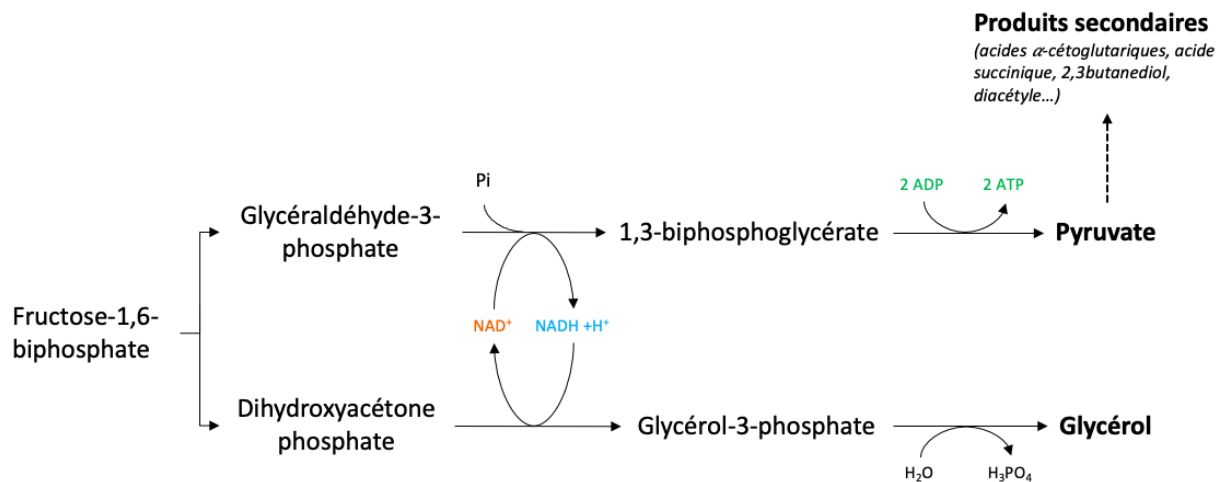


Figure 10 : Voie de la fermentation glycéro-pyruvique (d'après schéma Ribéreau-Gayon et al. 2017).

Cette voie, bien qu'étroitement imbriquée à la fermentation alcoolique, est favorisée en début de vinification. En effet, les enzymes permettant la transformation du pyruvate en acétaldéhyde puis en éthanol sont faiblement exprimées en début de fermentation alcoolique. L'équilibre du potentiel d'oxydoréduction (NAD<sup>+</sup>/ NADH) ne pouvant se faire avec l'alcool déshydrogénase a lieu grâce à la production de glycérol. Cela conduit à la formation de glycérol et à l'accumulation de pyruvate. Une fois que les enzymes de la voie de la fermentation sont actives, la production de glycérol est plus faible mais a toujours lieu, notamment à cause des ajouts de sulfites qui se combinent avec l'acétaldéhyde (Ribéreau-Gayon, 2017).

#### IV.1.1.3 Formation de métabolites secondaires à partir de l'acide pyruvique

Parallèlement, le pyruvate produit lors de la fermentation glycéropyruvique est dégradé par le biais de plusieurs voies métaboliques. Il est donc faiblement retrouvé en fin de fermentation. En revanche, il conduit à la formation d'acide succinique, d'acétoïne, de 2,3-butanediol, d'acide lactique et d'acide acétique (Ribéreau-Gayon, 2017)

##### IV.1.1.3.1 Formation de l'acide succinique

La formation d'acide succinique au cours de l'élaboration du vin représente entre 0,5 et 1,5 g/L (Baroň & Fiala, 2012). En condition anaérobie, le succinate peut être accumulé par deux voies : celle de l'oxaloacétate jusqu'au succinate car le cycle de Krebs n'est pas complet,

l'enzyme succinodéshydrogénase nécessitant une coenzyme strictement respiratoire (FAD) (Ribéreau-Gayon, 2017) ; ou bien, par réductions successives de l'oxaloacétate et ses dérivés. Selon Camarasa et al., cette dernière voie, représentée dans la Figure 11, est majoritaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Camarasa et al., 2003).

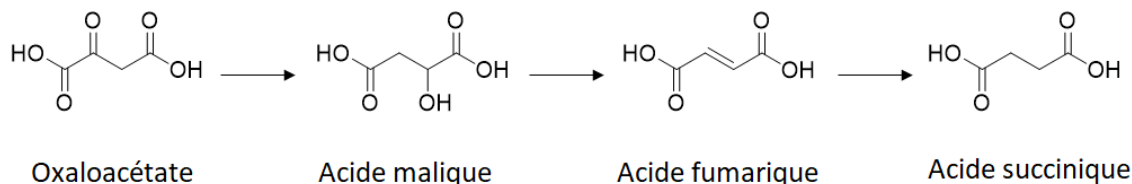


Figure 11: Formation de l'acide succinique par réductions successives de l'oxaloacétate et de ses dérivés.

#### IV.1.1.3.2 Formation de l'acétoïne et du 2,3-butanediol

L'acide pyruvique produit également dès le début de la fermentation alcoolique du diacétyle qui est rapidement réduit en acétoïne et 2,3-butanediol (Figure 12).

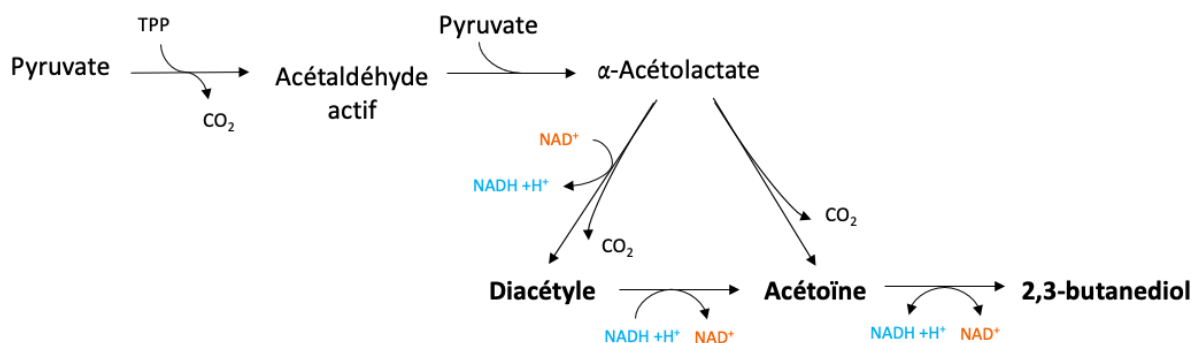


Figure 12 : Voies de synthèse du diacétyle, de l'acétoïne et du 2,3-butanediol (d'après schéma Ribéreau-Gayon et al. 2017).

Le 2,3-butanediol, produit final de cette voie métabolique, s'accumule tout au long de la fermentation alcoolique et ses teneurs peuvent atteindre entre 0,3 et 1,4 mg/L dans le vin (Blouin & Cruège, 2003). Toutefois, la réduction de l'acétoïne en 2,3 butanediol est un phénomène réversible pouvant conduire à des teneurs non négligeables d'acétoïne dans les vins (Ribéreau-Gayon, 2017).



#### IV.1.1.3.3 Formation d'acide lactique

Les levures peuvent également produire entre 200 et 300 mg/L d'acide lactique à partir de l'acide pyruvique grâce à l'activité enzymatique de la lactico-déshydrogénase (Ribéreau-Gayon, 2017). Au-delà de ces valeurs retrouvées dans les vins, c'est une activité bactérienne qui entre en jeu.

#### IV.1.1.3.4 Formation d'acide acétique

Les levures peuvent aussi produire de l'acide acétique, entre 100 et 300 mg/L, selon les voies métaboliques présentées dans la Figure 13.

Il y a un effet souche très important sur les teneurs finales (Erasmus et al., 2004). Certaines conditions de vinification peuvent conduire à une production anormalement élevée : teneurs initiales en sucres élevée, pH bas <3.1 ou très élevé >4 ou température trop élevée pendant la croissance (>25°C). Selon Ribéreau-Gayon, la voie biochimique n'est pas précisée clairement, mais il pourrait résulter de l'oxydation de l'acétaldéhyde par l'aldéhyde déshydrogénase (Ribéreau-Gayon, 2017)

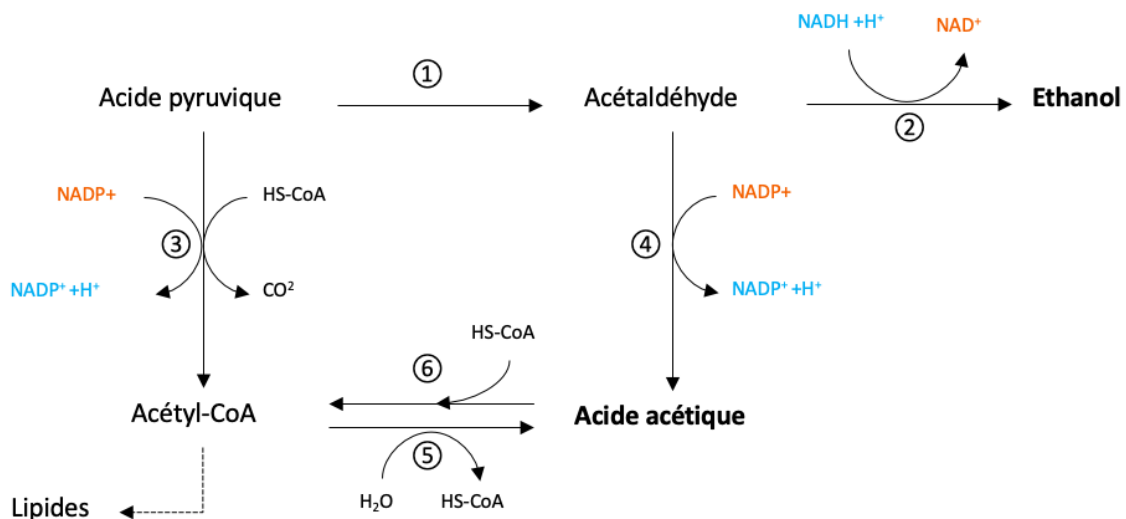


Figure 13: Voies de formation de l'acide acétique chez la levure d'après Ribéreau-Gayon et al. 2017. (1 = pyruvate décarboxylase, 2 = alcool déshydrogénase, 3 = pyruvate déshydrogénase, 4 = aldéhyde déshydrogénase, 5 = acétyl-CoA hydrolase, 6 = acétyl-CoA synthétase).

#### IV.1.1.4 Formation des alcools supérieurs et dégradation des acides aminés

Les levures peuvent également conduire à la formation d'alcools supérieurs soit directement à partir des sucres , soit à partir des acides aminés initialement présents, ou qu'elles auront elles-mêmes produits (Gonzalez & Morales, 2017; Ribéreau-Gayon, 2017). Les teneurs retrouvées dans les vins ainsi que les acides aminés précurseurs sont représentés dans le Tableau 3.

Tableau 3: Teneurs dans les vins des principaux alcools supérieurs produits et leurs acides aminés respectifs précurseurs (d'après Ribéreau Gayon et al. 2017).

Acide aminé précurseur	Alcool supérieur produit et teneurs retrouvés dans les vins
Leucine	Alcool isoamylique = 3-méthylbutan-1-ol 80-300 mg/L
Isoleucine	Alcool amylique actif = 2-méthylbutan-2-ol 30-100 mg/L
Valine	Alcool isobutylique = 2-méthylpropan-1-ol 50-150 mg/L
Phénylalanine	Alcool phénéthylique 10-200 mg/L
Tyrosine	Tyrosol 20-50 mg/L

On distingue deux groupes d'alcools supérieurs : les aliphatiques et les aromatiques.

- Les principaux alcools aliphatiques sont le propan-1-ol, le butan-1-ol, l'isobutanol, le 2-méthylbutan-1-ol et le 3-méthylbutan-1-ol (Lambrechts & Pretorius, 2000).
- Les principaux alcools supérieurs aromatiques retrouvés dans le vin sont le tyrosol et le 2-phényléthanol (Pino & Queris, 2011).

Les acides aminés sont en partie dégradés selon la réaction d'Ehrlich : désamination suivie d'une décarboxylation, en aldéhyde, puis sont ensuite réduits en alcools supérieurs (Ribéreau-Gayon, 2017). Ribéreau-Gayon *et al.* décrit plusieurs vitesses d'assimilations des acides aminés par les levures ; celles avec une assimilation immédiate (arginine, asparagine, acide aspartique, glutamine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, sérine et thréonine), celles où les acides aminés sont absorbés après un temps de latence et à vitesse moindre (alanine, glutamate, histidine, phénylalanine et valine), celles correspondant à une disparition après un long temps de latence (glycine, tryptophane et tyrosine) et enfin celles pour lesquelles il n'y a jamais d'assimilation comme la proline (Ribéreau-Gayon, 2017).

#### IV.1.1.4.1 Formation des esters

Les levures vont également conduire à la formation d'esters, d'une part grâce à une activité enzymatique (estérase) et d'autre part via la formation d'alcools qui mène à une estérification chimique (Virdis et al., 2021). L'éthanol étant l'alcool majoritaire, cela conduit à la formation majoritaire d'esters éthyliques. D'un vin à l'autre, les compositions sont relativement similaires, en revanche, les concentrations sont variables et dépendent fortement de la souche utilisée (Gammacurta et al., 2014).

Les esters peuvent être produits à partir des acides organiques, des acides volatils et des acides gras (Ribéreau-Gayon, 2017). Compte tenu de la prépondérance de l'éthanol dans les vins, les esters majoritairement formés sont des esters éthyliques. Les esters majoritaires sont l'acétate d'éthyle et le lactate d'éthyle avec des teneurs pouvant atteindre 200 mg/L (Ribéreau-Gayon, 2017).

#### IV.1.1.5 La fermentation malo-alcoolique

Les levures fermentaires peuvent également consommer entre 10 et 40% de l'acide malique présent dans le moût pour produire de l'éthanol et du gaz carbonique selon la réaction réécrite dans la Figure 14 (Ribéreau-Gayon, 2017).

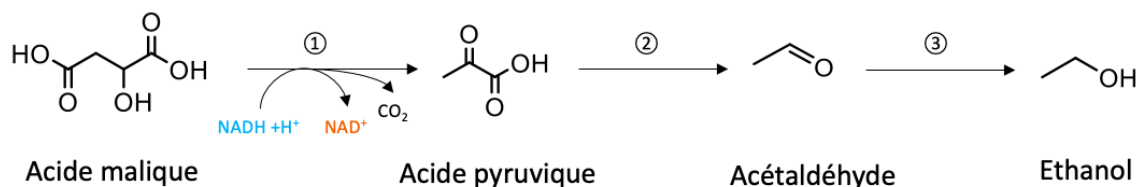


Figure 14 : Voie de la fermentation malo-alcoolique réalisée par les levures d'après Ribéreau-Gayon et al. 2017.

1 = enzyme malique, 2 = pyruvate décarboxylase, 3 = alcool déshydrogénase.

Bien que la formation d'éthanol soit négligeable au regard de la fermentation alcoolique (0,085% vol. d'éthanol produit pour 1g d'acide malique), cela conduit à une diminution des teneurs en acide malique.

L'activité des levures peut s'arrêter d'elle-même ou par l'intervention du vinificateur. L'arrêt d'activité des levures rend possible la prolifération d'autres microorganismes, telles que les bactéries, qui vont également influencer sur la composition chimique des moûts.

#### IV.1.2 Transformations par les bactéries

Les bactéries retrouvées majoritairement dans les moûts sont les bactéries lactiques et les bactéries acétiques. Les bactéries lactiques sont les plus connues car elles jouent un rôle primordial lors de la seconde fermentation du vin, appelée la fermentation malolactique (FML). Seuls quatre genres de bactéries lactiques sont associés au moût et au vin : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Pediococcus* (Fleet, 1993 ; Lonvaud-Funel, 1999). *Oenococcus oeni* est l'espèce bactérienne la plus souvent associée à la FML et la plus favorisée car elle métabolise préférentiellement l'acide malique puis les sucres résiduels et forme peu d'acidité volatile (acide acétique). La FML peut avoir lieu simultanément avec la FA ou plus tardivement et peut démarrer spontanément ou bien être déclenchée par inoculation. Les bactéries acétiques sont principalement représentées dans le vin par les genres *Acetobacter*, *Gluconobacter* et *Gluconacetobacter* (Ribéreau-Gayon, 2017). Elles sont considérées comme des bactéries néfastes car elles engendrent la production d'acide acétique par fermentation oxydative.

##### IV.1.2.1 La fermentation malolactique

La FML est souvent utilisée dans le but d'assouplir un vin jugé trop acide et permet aussi d'augmenter la complexité aromatique et d'améliorer la stabilité microbiologique du vin grâce à l'épuisement des substrats nutritifs (Inês et al., 2018).

Les bactéries lactiques utilisent d'abord les sucres résiduels (glucose, fructose ou pentose) pour la synthèse de biomasse (Ribéreau-Gayon, 2017). Elles réalisent ensuite la fermentation malolactique en dégradant l'acide L-malique en acide L-lactique (avec production de CO<sub>2</sub>) grâce à l'enzyme malolactique. Le taux de transformation est d'environ 0,67 g d'acide lactique produit pour 1g d'acide malique consommé (Blouin & Cruège, 2003). La fermentation malolactique est plus difficilement contrôlable que la fermentation alcoolique. Elle peut durer de quelques jours à plusieurs semaines et dans certain cas ne jamais démarrer. Bien que majoritairement réalisée pour la vinification des vins rouges, la fermentation malolactique peut également faire partie de l'itinéraire de vinification de certains vins blancs. Lorsqu'elle a lieu, cela induit une diminution de l'acidité totale car l'acide lactique est moins fort que l'acide malique.

#### IV.1.2.2 Le métabolisme de l'acide citrique

Parallèlement à la formation d'acide lactique, les bactéries lactiques possèdent d'autres métabolismes comme ceux de l'acide citrique et des acides aminés (Inês & Falco, 2018). Elles utilisent l'acide citrique pour produire de nombreux métabolites (Figure 15) : de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acétoïne, du diacétyl et du 2,3-butanediol (Ribéreau-Gayon, 2017) On parle d'ailleurs d'un co-métabolisme glucose-citrate chez les bactéries lactiques qui leur permet un développement plus rapide. Chaque molécule d'acide citrique est scindée, à l'intérieur de la bactérie, par une lyase en une molécule d'oxaloacétate et une molécule d'acide acétique. L'oxaloacétate est ensuite décarboxylé en acide pyruvique qui est à l'origine de la formation d'acétolactate (par combinaison de deux molécules de pyruvate) lui-même décarboxylé en acétoïne. L'acétoïne peut ensuite être oxydée en diacétyl ou réduite en 2,3-butanediol.

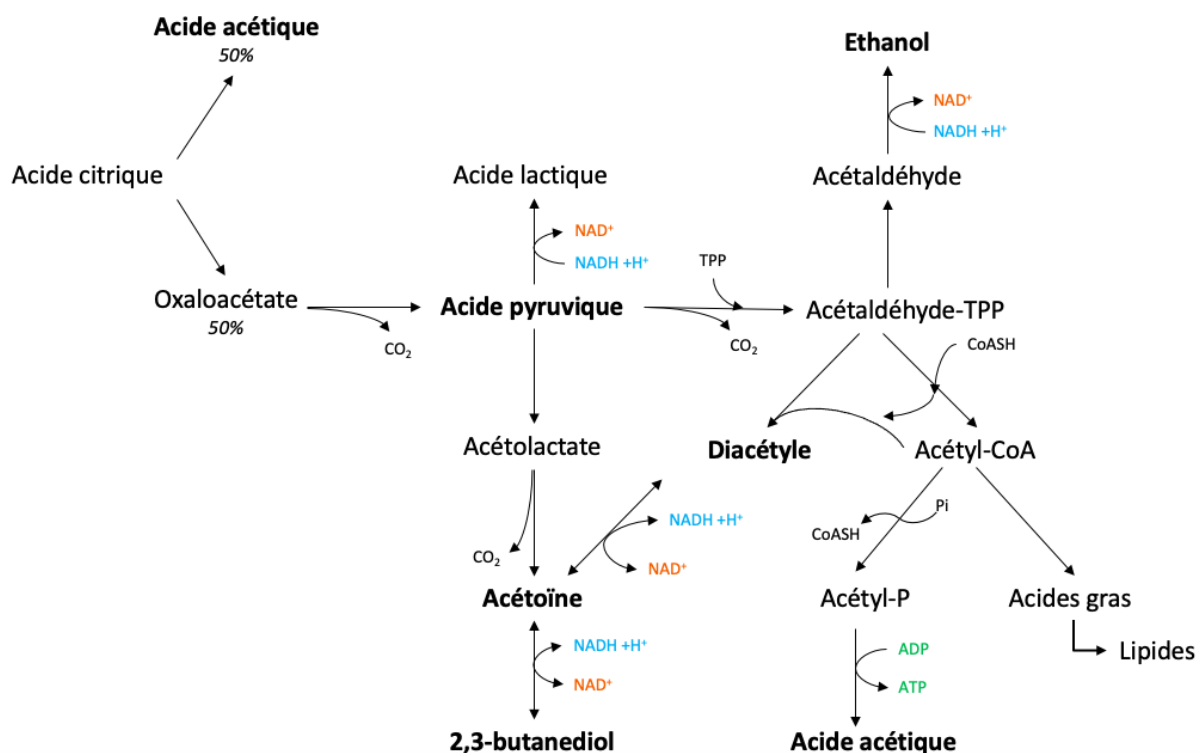


Figure 15 : Voies métaboliques de la dégradation de l'acide citrique par les bactéries lactiques, d'après Ribéreau-Gayon et al. 2017.

Le pyruvate produit peut également être transformé en acide lactique, s'il y a du co-enzyme NADH disponible, ou décarboxylé puis réduit en éthanol. Enfin, il peut aussi produire, via l'acétyl-coA, des acides gras et des lipides ou de l'acide acétique.

L'avantage du métabolisme de l'acide citrique est d'appauvrir le milieu afin de limiter le développement d'autres micro-organismes indésirables.

#### IV.1.2.3 Autres transformations réalisées par les bactéries lactiques

##### IV.1.2.3.1 Formation d'esters

Pour finir, les bactéries possèdent également une activité estérase conduisant à la formation d'esters. Cette activité est fortement conditionnée par les souches utilisées, le pH et la température (Antalick et al., 2012; Pérez-Martín et al., 2013). Une étude récente de Gammacurta *et al* portant sur des vins rouges Bordelais a montré que les principaux esters à être fortement influencé par l'activité bactérienne sont des esters hydroxylés ramifiés : le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle et le 2-hydroxy-4-méthylpentanoate d'éthyle à des teneurs équivalents à quelques dizaines de µg/L (Gammacurta et al., 2018).

##### IV.1.2.3.2 Formation d'amines biogènes

Les bactéries peuvent également utiliser les acides aminés pour produire de l'énergie et réguler leur pH interne ou encore pour former des arômes (Ribéreau-Gayon, 2017). Cela conduit à la formation d'amines biogènes tels que l'histamine, la tyramine, la putrécine et la cadavérine. Toutefois, peu d'espèces sont capables d'en produire (Moreno-Arribas et al., 2003). Les amines biogènes peuvent être rencontrés dès les moûts et se retrouver dans les vins à des teneurs de l'ordre de la dizaine de mg/L (Costantini et al., 2019).

## IV.2 Conduite des vinifications et composition chimique des différents vins

Après avoir passé en revue les composés majoritaires du vin, pouvant être influencés par la vendange ou par les transformations réalisées par les microorganismes, il est important de savoir qu'en fonction du type de vin souhaité, différents procédés pourront impacter le profil chimique de chaque vin.

En effet, alors qu'il existe une définition de ce qu'est le vin, il n'y en a aucune qui définisse en particulier les vins rouges, blancs et rosés. Cela donne lieu à une multitude de procédés car

en fonction de la couleur et du type de vin souhaité (tranquille, pétillant, liquoreux), la récolte ne va pas subir les mêmes procédés de fabrication.

De façon générale, les cépages utilisés conditionnent la couleur des vins produits ; les cépages blancs sont utilisés pour produire du vin blanc et les cépages rouges pour produire les vins rouges et rosés. Cependant, il est possible de produire du vin blanc à partir de cépages rouges étant donné que la chair est incolore. C'est par exemple le cas du champagne qui peut être produit à partir de Pinot Noir ou de Pinot Meunier. Ce sont donc les pratiques viticoles et œnologiques employés qui vont conditionner la couleur, mais aussi la composition chimique du vin.

Le but ici n'est pas de détailler les différentes vinifications mais de se focaliser sur les étapes qui vont particulièrement discriminer les composés majoritaires des vins rouges, blancs et rosé. Les étapes d'élaboration du vin les plus discriminantes des vins blancs, rouge et rosé sont représentées dans la Figure 16 et décrites brièvement dans les parties suivantes.

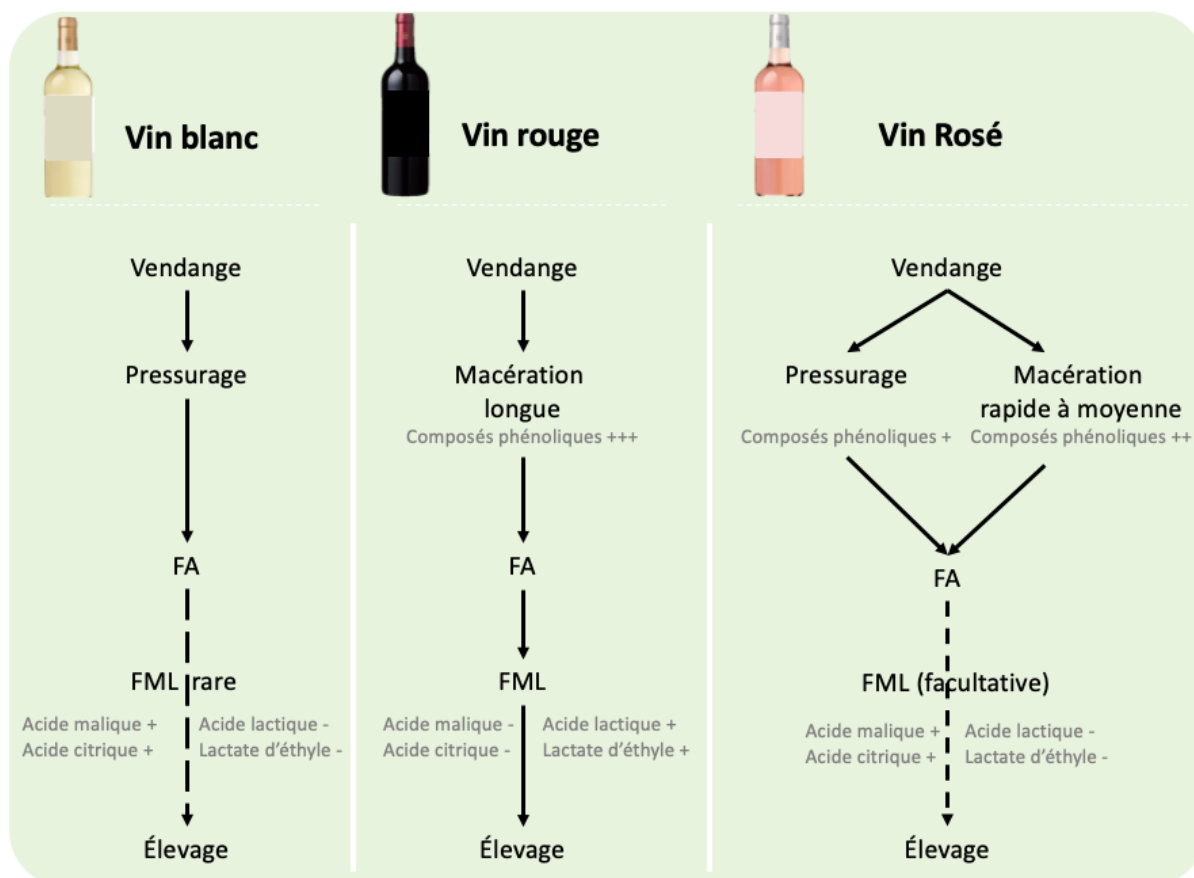


Figure 16 : Schéma comparatif des vinifications en blanc, rouge et rosé.

#### IV.2.1 Les vins blancs

Les vins blancs résultent de la fermentation du jus de la pulpe du raisin uniquement. Il n'y a pas de macération avec les pellicules et les pépins ce qui se traduit par de faibles teneurs en composés phénoliques et l'absence totale d'anthocyanes.

La fermentation malolactique est rarement utilisée, les concentrations en acide malique et en acide citrique sont donc plus élevées tandis qu'il y a peu d'acide lactique et quasiment pas de lactate d'éthyle.

#### IV.2.2 Les vins rouges

Les vins rouges sont des vins dont la matrice est enrichie par une étape de macération qui leur confère notamment leur couleur. Cette étape se décrit comme le temps de contact entre le moût et le marc (ensemble des pellicules, des pépins et éventuellement des rafles) et consiste à extraire les anthocyanes et les tanins. Selon le type de vin souhaité et la nature des raisins, la macération peut avoir une durée variable mais dure généralement pendant toute la fermentation alcoolique. Cela se traduit par des teneurs plus importantes en composés phénoliques et leurs précurseurs.

La plupart des vins rouges réalisent la fermentation malolactique ce qui se traduit par une diminution des teneurs en acide malique et en acide citrique et une augmentation des teneurs en acide lactique et lactate d'éthyle.

#### IV.2.3 Les vins rosés

Il est difficile de donner un profil type pour les vins rosés tant les vendanges et les techniques de vinifications peuvent être variées. Seule l'appellation Champagne est autorisée à mélanger du vin rouge et du vin blanc pour la fabrication de Champagne rosé. Les autres appellations utilisent généralement deux procédés : le « pressurage direct » et la « saignée ».

Le pressurage direct consiste à « vinifier en blanc » des raisins de cépages rouges. La vendange est pressée dès son arrivée au chai et ce de manière successive afin d'extraire le jus et les composés phénoliques.



Les vins rosés issus de saignée sont des vins issus de macération avec les pellicules et les pépins, visant à extraire beaucoup plus d'anthocyanes et de composés phénoliques que le pressurage direct. La couleur finale des rosés dépendra de la durée de la macération.

Les profils métabolomiques des vins rosés et des vins rouges peuvent être différents, de par les cépages utilisés mais aussi par la conduite du vignoble. En effet, dans la recherche de production de rosés qualitatifs, certaines pratiques viticoles peuvent être adaptées telles que les densités de plantation et la surface foliaire (généralement plus faibles) ayant un impact sur les teneurs en acides organiques, acides aminés et en sucres dans les baies.

L'utilisation de la fermentation malolactique tend à se généraliser ces dernières années alors qu'elle était plutôt évitée dans le passé conduisant à des profils très différents.

## V L'impact des procédés œnologiques sur la composition chimique du vin

L'élaboration du vin est la somme de nombreuses étapes pouvant avoir un impact sur la composition chimique du vin. Ces étapes peuvent changer en fonction du type de vin souhaité mais de façon générale sont organisées comme dans la Figure 17 ci-dessous :

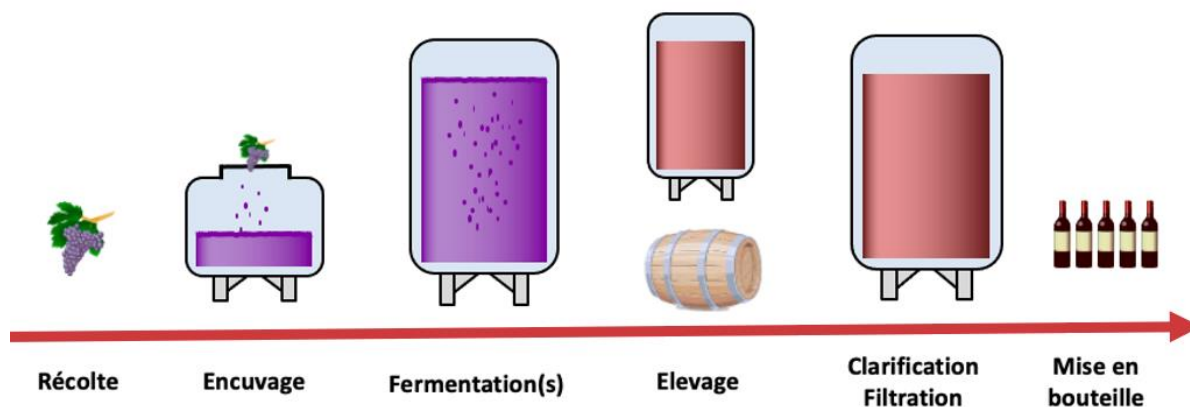


Figure 17 : Schéma général des étapes de l'élaboration du vin.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux dernières étapes de l'élaboration des vins ; de l'élevage jusqu'à la mise en bouteille. En effet, en fonction du profil de vin, les différents procédés employés vont également avoir un impact sur la composante chimique. Le procédé le plus connu est l'utilisation de fûts de chênes pour la maturation des vins mais des procédés

œnologiques tels que le collage ou l'utilisation d'enzymes vont également entraîner des transformations sur les vins.

## V.1 L'élevage du vin

L'élevage se déroule entre la fin de la vinification et la mise en bouteille et correspond à la période de maturation et de vieillissement des vins (Ribéreau-Gayon, 2017). Il peut être réalisé en cuve (inox, béton, etc.), en barrique et en présence lies (résidus des levures mortes). L'élevage est une étape indispensable qui garantit la stabilité et la qualité du vin. La durée de l'élevage varie considérablement en fonction des méthodes utilisées et du type de vin souhaité et peut durer entre 1 et 2 mois pour les vins nouveaux jusqu'à généralement 12 mois pour les vins les plus évolués. L'élevage en barriques peut prendre entre 6 et 18 mois et apporte une complexité chimique supplémentaire au vin (Ribéreau-Gayon, 2017).

### V.1.1 L'élevage en barriques

L'élevage en barrique est un procédé utilisé depuis l'antiquité, largement employé et qui contribue notamment au prestige des vins de la région Bordelaise. De nombreuses essences de bois peuvent être utilisées mais le chêne prédomine largement et plus particulièrement le chêne français (del Alamo-Sanza & Nevares, 2018).

Le vieillissement en fût de chêne entraîne de nombreuses transformations du vin avec d'une part des apports des composés du bois et d'autre part, des réactions d'oxydation en lien avec la porosité du bois (Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2006). Plusieurs variables relatives au choix des barriques peuvent également avoir un impact significatif sur la composition chimique du vin telles que l'origine géographique du bois, le volume, l'âge ou le niveau de chauffe de la barrique (Chira & Teissedre, 2015; Pérez-Prieto et al., 2002).

Au cours de l'élevage en barrique, le vin se clarifie par sédimentation et autolyse des levures et le bois favorise le dégazage des vins fraîchement fermentés (del Alamo-Sanza & Nevares, 2018). Ensuite, le bois à proprement parler va relarguer et absorber certains composés. Les composés extraits du bois sont principalement des composés phénoliques, des composés furaniques, des lactones et des aldéhydes (Coelho, Teixeira, et al., 2019). Parallèlement, plusieurs études ont constatés que le bois absorbe aussi de nombreux composés tels que des alcools, des acides, des composés volatils (Coelho, Domingues, et al., 2019; Ramirez Ramirez

et al., 2001) ou certains polyphénols tels que la catéchine, l'épicatéchine, l'acide gallique, le resvératrol (Barrera-García et al., 2007).

Enfin, de nombreuses réactions physico-chimiques ont lieu au cours de l'élevage : oxydation, estérification et polymérisation (Coetzee & du Toit, 2015; Ferreira-Lima et al., 2013; Lukić et al., 2020). Les principales réactions d'oxydation transforment les alcools oxydés en aldéhydes puis en acides. La réaction d'oxydation majoritaire conduit l'éthanol oxydé à l'éthanal puis à l'acide acétique. L'éthanol est également impliqué dans les réactions d'estérification des acides organiques. Les réactions de polymérisation interviennent au niveau des polysaccharides, des polyphénols, des anthocyanes et des tanins (Ma et al., 2022).

### V.1.2 L'élevage sur lies

L'élevage sur lies est une pratique qui consiste à élever le vin sur des résidus de levures mortes (parfois des bactéries). Ce procédé est majoritairement employé pour l'élaboration de vins blancs et des vins pétillants afin d'enrichir le vin en macromolécules, protéger de l'oxydation et apporter du gras ainsi que de la rondeur au vin (Gnoinski et al., 2021; Ma et al., 2022). L'élevage sur lies va également s'accompagner d'une activité enzymatique hydrolytique accrue qui va libérer de nombreux composés de faibles poids moléculaire tels que des acides aminés (Charpentier et al., 2005). Enfin, les lies vont également absorber de nombreux composés du vin tels que des composés aromatiques néfastes, des pesticides et composés phénoliques (Ma et al., 2022).

## V.2 Procédés œnologiques étudiés

### V.2.1 Le collage

Le collage est un procédé qui intervient avant l'embouteillage, fréquemment utilisé pour éliminer l'aspect trouble que peuvent avoir certains vins et améliorer leur stabilité. Le collage permet d'éviter qu'il y ait formation d'agrégats en bouteilles en accélérant et améliorant la précipitation des composés instables et la sédimentation des particules en suspension (Sims et al., 1995). Historiquement, ce processus de clarification était réalisé avec des blancs d'œufs, mais de nos jours, de nombreuses alternatives commerciales existent : animales, végétales et synthétiques (IFV & VBNA, 2020). Le principe de collage repose sur le fait que les agents de

collage porteurs de charges vont interagir avec les particules chargées du vin et les faire précipiter (González-Neves et al., 2014).

Le collage est connu pour avoir un impact sur les macromolécules et sur les composés phénoliques (anthocyanes et tanins) (Ghanem et al., 2017). Cela induit une stabilisation de la couleur mais aussi un impact organoleptique non négligeable (González-Neves et al., 2014). En effet, plusieurs études ont montré que l'utilisation d'agents de collage peut diminuer l'astringence et l'amertume des vins en interagissant avec les tanins (Karamanidou et al., 2011; Oberholster et al., 2013).

### V.2.2 L'enzymage

Bien que les enzymes soient naturellement présentes dans le vin, l'ajout d'enzymes commerciales est une pratique œnologique courante pouvant intervenir à différentes étapes de l'élaboration du vin (IFV, 2014). Elles sont utilisées pour leur activité pectolytique (pectinases

et  $\beta$ -glucanases) qui engendre la libération de composés d'intérêt tels que les anthocyanes, les tanins, composés phénoliques ou la dégradation de polysaccharides (Doco et al., 2007).

Elles possèdent donc de nombreuses applications avant et après fermentation notamment grâce à l'augmentation du potentiel de macération des vins rouges ou pour l'amélioration de la filtrabilité (Claus & Mojsov, 2018; El Darra et al., 2016; Stepanova et al., 2006). En effet, les polyphénols et polysaccharides peuvent se colmater sur les supports de filtrations. L'utilisation des enzymes va donc permettre de dégrader les liaisons des macromolécules. Dans le cas des polysaccharides, cela va entraîner une augmentation des teneurs en acide galacturonique, galactose, arabinose (Li et al., 2017).

## **VI La RMN métabolomique comme outil pour l'analyse des vins**

De par ses caractéristiques, la RMN est devenue une technique de choix pour l'analyse des vins. Une des applications de la RMN métabolomique est la garantie de l'authenticité des vins. En effet, les vins sont régulièrement la cible de falsifications et ce depuis des décennies. Pour s'en convaincre, il suffit de lire le recueil publié en 1883 « *Ce que l'on boit aujourd'hui quand on croit boire du vin* » écrit suite aux nombreuses dérives constatées. De nos jours, la fraude est estimée par certains experts à 20 % du commerce international (Taylor, 2013). Dans ce contexte, la RMN métabolomique s'est récemment révélée être un excellent outil de la garantie de l'authenticité recherchée par les consommateurs et les producteurs.

Parmi les autres applications possibles de la RMN métabolomique, la viticulture et l'œnologie ont trouvé leur place avec une constante augmentation du nombre de publications portant sur l'étude du métabolome de la vigne et du vin. Les applications possibles sont très variées et vont de la connaissance des cépages jusqu'à l'impact de procédés œnologiques sur la composition chimique du vin.

La revue suivante présente les travaux menés sur le vin par RMN métabolomique et s'intéresse notamment aux différentes approches développées et aux applications pour l'authenticité et pour l'étude de l'impact des pratiques viticoles et œnologiques sur le métabolome du vin. Dans une première partie, la revue présente les différentes méthodes développées de la préparation des échantillons aux analyses statistiques employées, en passant par les séquences d'impulsions utilisées. Dans une seconde partie, sont recensés et décrits les différents résultats obtenus par RMN métabolomique pour analyser l'authenticité et la qualité des vins.

# $^1\text{H-NMR}$ metabolomics as tool for wine screening and analysis

Inès Le Mao, Gregory Da Costa, and Tristan Richard

Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, INRAE, OENO, UMR 1366, ISVV, F-33140 Villenave d'Ornon, France

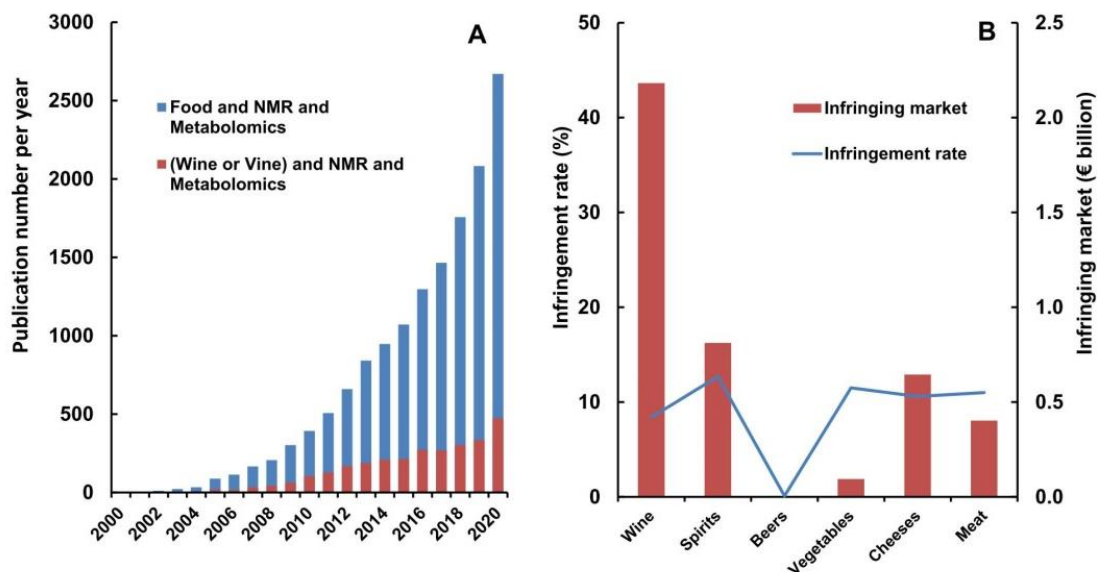
## Abstract

The number of metabolomic studies has been growing steadily over the last twenty years. Among the fields of application, food sciences are broadly represented. Proton NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ) is a commonly used technique for metabolomics and is particularly suitable for wine analysis because the major wine constituents are highly dependent on biotic and abiotic conditions. Studies have first demonstrated the interest of  $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics to guarantee the authenticity of wines, and more recently to determine the impact of viticultural or oenological practices using both targeted and untargeted protocols. This review establishes a state of the art on the different analytical methodologies developed to insure wine traceability from sample preparation to  $^1\text{H-NMR}$  spectrum analysis. The different potential applications in enology of  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy are described from wine authenticity control to winemaking monitoring. The challenge and perspectives of the deployment of NMR for oenological monitoring are also discussed.

Keywords: wine,  $^1\text{H-NMR}$ , metabolomics, authenticity, winemaking, targeted, untargeted

## 1. Introduction

Metabolomics is described as the scientific study of the small molecules (metabolites) of a biological system based on a complete chemical analysis (omics technologies) in order to detect as many substances as possible (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009; Rochfort, 2005). As a result, metabolomics is based on the chemical analysis of a biological matrix coupled with multivariate data analysis.



**Figure 1 – NMR-based metabolomics in food sciences and infringing rate in food.**

A: Number of publications including the keywords [Food and NMR and Metabolomics] (in blue) or [Food and NMR and [Vine or Wine]] (in red), indexed in Scopus. B: Infringing market and infringement rate by product class in Europe (Wajsman *et al.*, 2016).

NMR is an analytical technique used in food sciences since several decades (Hatzakis, 2019). The SNIF-NMR method is widely used to detect wine chaptalization (Viskić *et al.*, 2021). The NMR-based metabolomics really begins in the 80s, this approach based on  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy allowed characterizing human body fluids (Wishart, 2019). Nowadays, NMR is one of the most widely used techniques in metabolomics to analyzed complex mixtures body fluids or natural extracts. In the last twenty years, the application of NMR-based metabolomics in food sciences in general and for vine products in particular provided a new keen interest for this technique as it can be seen on Fig. 1. Among food, wine occupies an important place (Amargianitaki and Spyros, 2017). Over the past ten years, approximately twenty percent of NMR-based metabolomics in food were focused on vine or wine.

Compared to other food products, the chemical analysis of wine is a real challenge: the chemical composition is complex and can evolve over time. The main advantage of NMR spectroscopy is its ability to identify and quantify in a single experiment a large variety of chemical compounds such as amino acids, organic acids, alcohols, sugars or phenolic compounds (Gougeon *et al.*, 2018). As NMR signals are directly proportional to the number of resonating nuclei and compounds concentration, the relevance of  $^1\text{H}$ -NMR analysis as a methodology for the quantitative determination of wine components has recently been demonstrated in an international collaborative trial (Godelmann *et al.*, 2016).

The chemical information obtained by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy, constitutes the so-called wine metabolome, which is affected by many wine making factors: agronomic practices and pedoclimatic conditions (Mazzei *et al.*, 2010), grape variety (Son *et al.*, 2008), fermentation process (López-Rituerto *et al.*, 2009; López-Rituerto *et al.*, 2022) and geographical origin (Gougeon *et al.*, 2019a; Papotti *et al.*, 2013). NMR spectrum of wine sample can be considered as a molecular fingerprint and be used for traceability and authentication purposes (Solovyev *et al.*, 2021; Valls Fonayet *et al.*, 2021). The purpose of this review is to establish a state of the art on the potential use of  $^1\text{H}$ -NMR-based metabolomics in oenology from the authenticity problematic to wine quality study.

## 2. Experimental methodology for wine analysis

Initially, NMR was mainly used for structural elucidation of compounds in organic and inorganic chemistry. It has become an interesting tool in metabolomics especially because of its quantitative properties. From sample preparation to data processing, several approaches have been described in the literature. In order to present the different approaches, the analytical steps are divided in three parts corresponding first to the sample preparation, then to the spectra acquisition and finally to the post-acquisition and data treatment.

### 2.1. Wine sample preparation

The preparation of wine samples is a determinant step for quantitative NMR (qNMR) analysis of wine. Several protocols have been developed to prepare the samples including extraction steps or the use of internal standard and buffers. These main sample preparation methods are summarized in Table 1.

Wine is a beverage roughly made of 83% of water, 12% of ethanol and 5% of other compounds. In order to overcome the water and ethanol contents, many studies have chosen to pre-concentrate wine samples by a drying step using lyophilization or evaporation with nitrogen or argon. Although this operation improves the detection of compounds present in low concentrations in wine by increasing the signal-to-noise ratio, some studies have shown that the drying process causes the loss of volatile and semi-volatile compounds, modifying the chemical composition of the samples (Amaral and Caro, 2005; Aru *et al.*, 2018). Moreover, Amaral and Caro have demonstrated that freeze-drying was time consuming and posed reproducibility issues. As a result, most studies use wine directly after filtration or centrifugation (to remove solid residues) and addition of at least 10% deuterated solvent. Nevertheless, the quantification of minor constituents and specific families such as polyphenols steel a challenge. Recently, Ocaña-Rios *et al.* have combined solid-phase extraction (SPE) and NMR metabolomics to investigated phenolic acids and flavonoids (Ocaña-Rios *et al.*, 2021).

It has been shown that pH shift from one sample to another induce a variation in the chemical shifts of certain compounds (Son *et al.*, 2008). White wines are generally more acidic than red wines, which lead to acidic beverages with pH ranged from 2.8 to 4.2. The pH adjustment is used by many authors to allow spectra comparison even if some teams overcome this question by a post-acquisition data treatment (detailed in the post treatment paragraph). Most of studies adjust the pH of wines using a buffer solution. The oxalate and phosphate buffer, of variable pH and ionic strength, are the two buffers mainly used for the analysis of wines by  $^1\text{H}$ -NMR. It is important to adapt the buffer concentration because the ionic strength can make the tuning of the probe difficult (Bharti and Roy, 2012). In order to simplify and automatize this step, the use of a titration pH robot is becoming more widespread. The titration pH robot helps to add small amounts of concentrated acid and/or base to finely adjust the pH (Godelmann *et al.*, 2016; Gougeon *et al.*, 2019a).

Method	Solvent/Buffer	pH adjusted	Standards	References
<b>Liquid-liquid extraction</b>	methanol- $d_4$	no	no	(Ali <i>et al.</i> , 2011)
<b>XAD column extraction</b>	methanol- $d_4$	no	no	(Anastasiadi <i>et al.</i> , 2009)
<b>Solid-phase extraction</b>	methanol- $d_4$	no	TSP	(Ocaña-Rios <i>et al.</i> , 2021)
<b>Evaporation with nitrogen</b>	D <sub>2</sub> O	no	TSP	(Amaral and Caro, 2005)
	D <sub>2</sub> O/phosphate	yes (pH 6.0)	TSP	(Chang <i>et al.</i> , 2014)
<b>Evaporation with centrifugal evaporator</b>	D <sub>2</sub> O	no	TSP	(De Pascali <i>et al.</i> , 2014)
	D <sub>2</sub> O/phosphate	no	TSP	(Aru <i>et al.</i> , 2018)
	D <sub>2</sub> O	yes (pH 3.0)	TSP	(Alves Filho <i>et al.</i> , 2019)
<b>Evaporation with centrifugal evaporator and lyophilization</b>	D <sub>2</sub> O	no	TSP	(da Silva Neto <i>et al.</i> , 2009)
<b>Lyophilization</b>	D <sub>2</sub> O	no	TSP	(Pereira <i>et al.</i> , 2007)
	D <sub>2</sub> O	no	DSS	(Hu <i>et al.</i> , 2015; Viggiani and Morelli, 2008)
	D <sub>2</sub> O	yes (pH 2.0)	TSP	(Papotti <i>et al.</i> , 2013)
	D <sub>2</sub> O/oxalate	no	DSS	(Zhu <i>et al.</i> , 2018)
<b>Direct analysis</b>	D <sub>2</sub> O	no	formic acid	(Mazzei <i>et al.</i> , 2010)
	D <sub>2</sub> O	no	TSP, formic acid	(Mazzei <i>et al.</i> , 2013)
	D <sub>2</sub> O	yes (pH 3.2)	TSP	(Ragone <i>et al.</i> , 2015)
	D <sub>2</sub> O	yes (pH 3.0)	TSP	(López-Rituerto <i>et al.</i> , 2012; López-Rituerto <i>et al.</i> , 2022)
	D <sub>2</sub> O/oxalate	no	TSP	(Baiano <i>et al.</i> , 2012)
	D <sub>2</sub> O/acetate	no	TSP	(Martin-Pastor <i>et al.</i> , 2016)
	D <sub>2</sub> O/PBS	no	no	(Kioroglou <i>et al.</i> , 2020)
	D <sub>2</sub> O/phosphate	yes (pH 3.1)	TSP	(Godelmann <i>et al.</i> , 2016)
	D <sub>2</sub> O/phosphate	yes (pH 3.0)	TSP	(Fan <i>et al.</i> , 2018)
	D <sub>2</sub> O/phosphate	no	TSP	(Crook <i>et al.</i> , 2021; Magdas <i>et al.</i> , 2019)
	D <sub>2</sub> O/phosphate	no	TSP, calcium formate	(Gougeon <i>et al.</i> , 2018)
	D <sub>2</sub> O/phosphate	yes (pH 3.1)	TSP, calcium formate	(Gougeon <i>et al.</i> , 2019b)
	D <sub>2</sub> O/phosphate	Yes (pH 4.0)	DSS	(Mascellani <i>et al.</i> , 2021)

**Table 1 – Summary of wine sample preparation methods.**

The addition of a reference compound is commonly used to calibrate the spectra for NMR analyzes. This step facilitates both the identification of metabolites and the comparison of the spectra. The references commonly used are 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- $d_4$  acid sodium salt (TSP) and 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- $d_4$  sodium salt (DSS). In addition to the calibration reference, an internal standard could be added for quantification such as formic acid (Mazzei *et al.*, 2013) or calcium formate (Gougeon *et al.*, 2019a).

## 2.2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum acquisition

The <sup>1</sup>H-NMR experiments were acquired using different magnetic fields from benchtop NMR (62 MHz) to 800 MHz. But the wine analyzes were mainly carried out at 400 and 600 MHz. The sequence parameters are crucial to obtain an effective quantitative analyze by NMR (Bharti and Roy, 2012). The main acquisition



parameters used (sequence, temperature, etc.) are listed in Table 2 and are classified by spectrometer frequency.

Field (Hz)	T (K)	Sequence	Sequence parameters	PC	BC	Références
62	-	presaturation	ns 16, td 32K, d <sub>1</sub> 30 s	-	-	(Matviychuk <i>et al.</i> , 2021)
200	298	presaturation	ns 160, sw 25 ppm, td 16k, d <sub>1</sub> 3 s	-	-	(Amaral and Caro, 2005)
300	293	proton	ns 32, sw 15 ppm, td 32k, d <sub>1</sub> 3 s	-	-	(da Silva Neto <i>et al.</i> , 2009)
400	298	wet1d	ns 128, sw 12 ppm, td 32k, d <sub>1</sub> 1.5 s	manual	automatic	(Caruso <i>et al.</i> , 2012)
	298	zgpr	ns 128, sw 10 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 60 s	manual	automatic	(López-Rituerto <i>et al.</i> , 2009)
	298	zgpr	ns 128, sw 20 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 10 s, rg fixed	-	-	(López-Rituerto <i>et al.</i> , 2012)
300	zgpr	ns 8, sw 20 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 4 s, rg 1	-	-	(Godelmann <i>et al.</i> , 2013; Ragone <i>et al.</i> , 2015)	
300	zgpr	ns 4, sw 20 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 4 s, rg 1	-	-	(Ragone <i>et al.</i> , 2015)	
300	zgpr	ns 16, sw 20 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 1 s	-	-	(Geana <i>et al.</i> , 2016)	
298	zgesgp/mt1ir	ns 96, sw 16 ppm, td 32k, d <sub>1</sub> 3.5 s	-	automatic	(Mazzei <i>et al.</i> , 2013)	
300	noesygpps1d	ns 32, sw 20 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 4 s, rg 16	automatic	automatic	(Ehlers <i>et al.</i> , 2022; Godelmann <i>et al.</i> , 2013)	
300	noesygpps1d	ns 16, sw 18 ppm, d <sub>1</sub> 6 s, rg 16	local	-	(Godelmann <i>et al.</i> , 2016)	
300	noesygpps1d	ns 16, sw 15 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 4 s, rg 16	automatic	automatic	(Fan <i>et al.</i> , 2018)	
500	298	proton	ns 128, d <sub>1</sub> 1.5 s	manual	manual	(Ali <i>et al.</i> , 2011)
	300	noesypr1d	ns 256, sw 20 ppm, td 16k, d <sub>1</sub> 2 s	manual	manual	(Martin-Pastor <i>et al.</i> , 2016)
	298	noesypr1d	ns 128, sw 16 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 1 s, rg 18	-	-	(Mascellani <i>et al.</i> , 2021)
600	298	zgpr	ns 256, sw 20 ppm, td 64K, d <sub>1</sub> 4 s, rg fixed	-	-	(Aru <i>et al.</i> , 2018)
	293	zgpr	ns 8, sw 20 ppm, td 64K, d <sub>1</sub> 5 s, rg 5	manual	automatic	(Gougeon <i>et al.</i> , 2019a)
	298	zgpr	ns 32, sw 20 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 20 s, rg fixed	manual	automatic	(Alves Filho <i>et al.</i> , 2019)
	298	zgpr	ns 64, sw 20 ppm, td 64K, d <sub>1</sub> 10 s, rg fixed	manual	automatic	(López-Rituerto <i>et al.</i> , 2022)
	298	noesypr1d	ns 16, sw 16 ppm, td 32K, d <sub>1</sub> 1.5 s	automatic	automatic	(Son <i>et al.</i> , 2009a)
	298	noesypr1d	ns 256, sw 10 ppm, td 32K, d <sub>1</sub> 2 s	-	-	(Zhu <i>et al.</i> , 2018)
	300	noesypr1d	ns 256, sw 20 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 5 s	manual	automatic	(Kioroglou <i>et al.</i> , 2020)
	293	noesygpps1d	ns 32, sw 20 ppm, td 64K, d <sub>1</sub> 5 s, rg 64	manual	automatic	(Gougeon <i>et al.</i> , 2019a)
	298	noesygpps1d	ns 256, sw 12 ppm, td 32K, d <sub>1</sub> 2 s	-	-	(Hu <i>et al.</i> , 2020)
700	300	proton	ns 32, sw 20 ppm, td 64K, d <sub>1</sub> 2 s, rg 8	-	-	(Ocaña-Rios <i>et al.</i> , 2021)
	-	noesypr1d	ns 128, sw 20 ppm, td 64k, d <sub>1</sub> 4 s	automatic /manual	-	(Crook <i>et al.</i> , 2021)
	300	noesygpps1d	ns 128, sw 30 ppm, td 64K, d <sub>1</sub> 10 s, rg 16, lb 0.3 Hz	automatic	automatic	(Baiano <i>et al.</i> , 2012)
	300	noesygpps1d	ns 32, sw 20 ppm, td 64K, d <sub>1</sub> 4 s, rg 16	-	-	(Ocaña-Rios <i>et al.</i> , 2021)
800	300	zgpr	ns 32, sw 10 ppm, td 14K, d <sub>1</sub> 2 s, rg 64	manual	manual	(Rochfort <i>et al.</i> , 2010)

**Table 2 – Main acquisition parameters used in various studies of metabolomic analyzes of wines by <sup>1</sup>H-NMR.**  
(ns: number of scans, sw: window size, td: number of acquired points, d<sub>1</sub>: relaxation time, rg: receiver gain)

Due to the composition of the wine, a <sup>1</sup>H-NMR spectrum is dominated by the water signal ( $\delta$  4.8 ppm) and those of ethanol, a quadruplet at  $\delta$  3.6 ppm (CH<sub>2</sub>) and a triplet at  $\delta$  1.2 ppm (CH<sub>3</sub>). The concentration of the compounds of interest is low compared to these two major compounds, it is then impossible to detect and accurately measure them with a simple proton sequence. Therefore, there are two possibilities for those who want to study the composition of wine by NMR; either physically removing water and ethanol by evaporation and freeze-drying and then use simple proton sequences or removing solvents using specific pulse sequences. The first option has been widely used and NMR analysis consists of a single-pulse <sup>1</sup>H-NMR

sequence includes a 90° radio frequency pulse followed by a signal acquisition time and a relaxation delay ( $d_1$ ). In this case, the NMR analysis is simple and fast since only one sequence is needed but it has been shown that the evaporation step can lead to the loss of other volatile compounds as mentioned previously. This technique is therefore limiting for wine metabolomics. But it could be useful for specific compounds of interest such as polyphenols (Ocaña-Rios *et al.*, 2021).

One of the major interests of NMR is to be able to play with pulse sequences to suppress unwanted signals. Indeed, multiple solvent removal techniques are used to increase the signal-to-noise ratio of the compounds of interest. Regarding the removal of solvents, several methods can be used: solvent presaturation, WET and 1D-NOESY sequences being the most popular (Giraudeau *et al.*, 2015; Kew *et al.*, 2017). The simplest method of solvent removal is the presaturation of the solvent before the 90° pulse with continuous irradiation during the relaxation time (zgpr sequence). This method is not recommended for quantitative analysis because it is not sufficiently selective in frequency and it can induce signal saturation. Among the other available pulse sequences, the multi-solvent suppression based on 1D-NOESY experiment is very often used for the analysis of wines (Monakhova *et al.*, 2014a; Ragone *et al.*, 2015). This sequence makes it possible to significantly increase the receiver gain (rg), and therefore to increase the sensitivity of the analysis (Bharti & Roy, 2012). Selective suppression of the water and ethanol signals is achieved from specific pulse sequences during the relaxation time but also during the mixing time. This sequence is easy to optimize and calibrate and provides an easy way for high-throughput NMR-based metabolomics.

The acquisition parameters will depend on the method of preparation (sample concentration, direct analysis or drying, internal or external reference, etc.) and the chosen pulse sequence. However, an analysis of the literature listed in Table 2 allows us to draw a number of general characteristics concerning these parameters for wine analysis. The spectral width (sw) analyzed is, in general, between 10 and 20 ppm. The number of iterations of the experiment (number of scans, ns) is between 16 and 128. For accurate quantitative analysis, the number of scans need to be adjusted to reach the signal over noise ratio (SNR) higher or equal to 250:1 (Bharti and Roy, 2012). In NMR metabolomics, the smaller peaks (SNR<15:1) provide largest coefficients of variation and should be examined carefully (Wang *et al.*, 2013). For quantitative analysis, the relaxation time should be at least  $5 \times T_1$  (Bharti & Roy, 2012), where  $T_1$  is the time required for the compound that has been pulsed to return to thermal equilibrium, this process is called longitudinal relaxation. The relaxation time ( $d_1$ ) is generally fixed between 4 s and 6 s for direct wine analyses. The number of points acquired in the time domain (td) is usually between 32k and 64k for wine analyses. Still according to Bharti & Roy, lower number of points does not provide sufficient resolution for the quantization of signals, especially those that are partially superimposed and 32k data points are sufficient for quantitative analyses. Finally, temperature is also a critical factor that affects the reproducibility of the results (variations of chemical shifts). It is important to maintain a constant temperature for all analyses, especially for those using external quantitation standards, since a change in temperature can affect the relaxation properties, which can lead to quantitation errors. The analysis temperatures are generally set between 290 and 300 K.

### 2.3. <sup>1</sup>H-NMR spectrum processing

The acquired free precession signal (FID) then undergoes a Fourier transform. To increase the resolution, a zero-filling is generally applied. This consists in increasing the number of points, which are generally doubled. Finally, an exponential window function is often applied. This function makes possible the attenuation of the background noise and thus to improve the SNR but at the detriment of the resolution. This negative effect can be limited by the use of a single parameter called line broadening (lb), usually adjusted between 0.3 and 1.0 Hz (Bharti and Roy, 2012).

After the Fourier transform, a phase correction of the spectrum is performed in order to obtain symmetrical signals over the whole spectrum. This is an important step because misphased signals can lead to integration errors and thus induce incorrect quantization. Manual phase correction is preferable to automatic phase correction in metabolomic studies because small signals are distorted during automatic phase correction (Bharti and Roy, 2012). Baseline correction is often required to correctly account for the area of the integrated peak. This correction can be carried out manually or automatically by various mathematical functions with the help of processing software. Finally, the chemical shift of the spectrum is calibrated to allow processing and comparison of the different <sup>1</sup>H-NMR spectra acquired. In general, the calibration consists in adjusting the reference signal of the internal calibration standard (DSS, TSP) to  $\delta$  0.00 ppm.

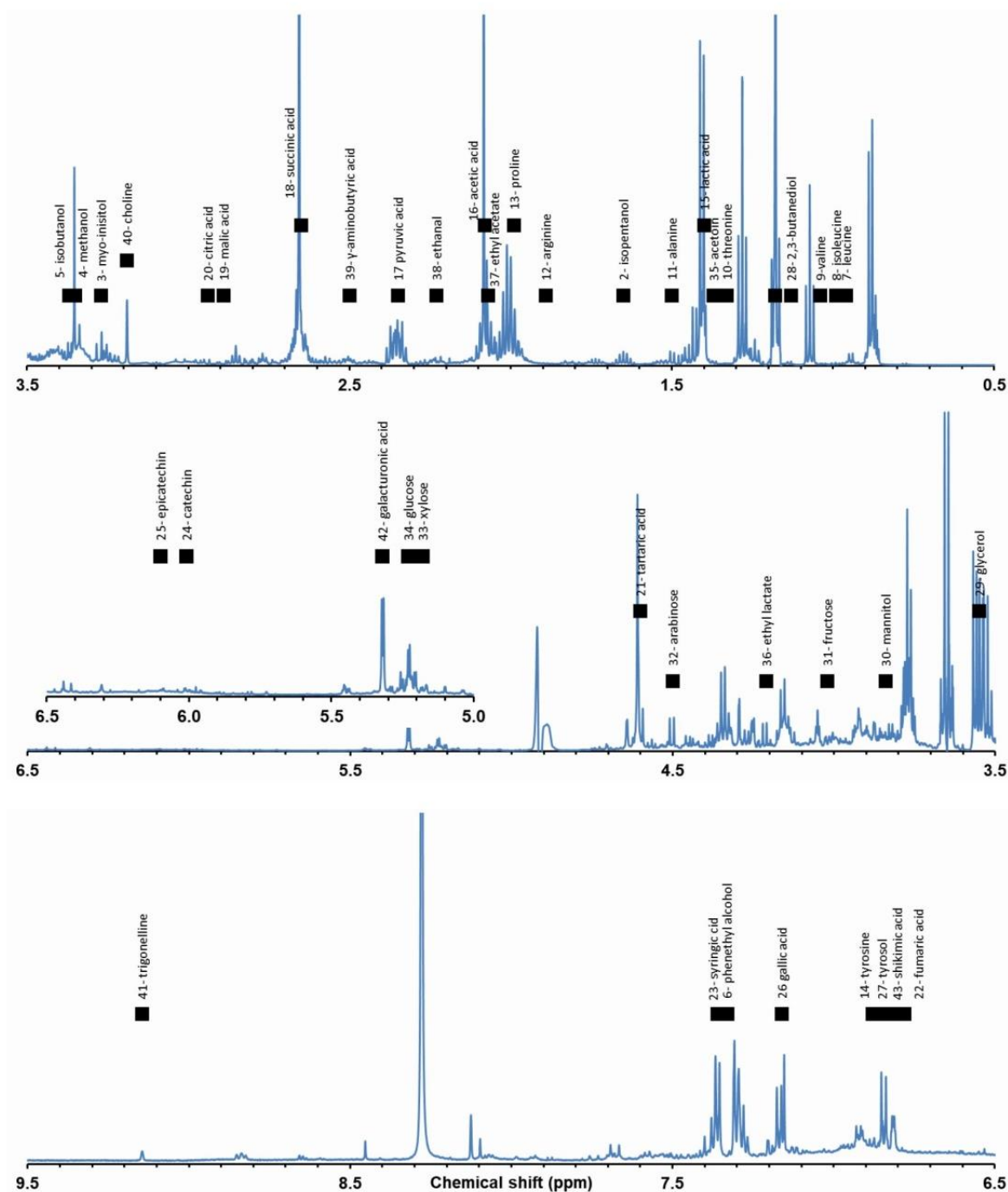
### 3. <sup>1</sup>H-NMR spectrum analysis

Two different methods can be applied to <sup>1</sup>H-NMR wine spectra (Vignoli *et al.*, 2019). The first one is the targeted analysis. This method is based on the identification and quantification of a panel of wine constituents. These compounds must be identified and quantified without ambiguities on the <sup>1</sup>H-NMR spectrum. The advantage of identifying the compounds present in wine is to be able to follow their evolution according to different parameters and to determine the metabolites involved in the differentiations. The

second one is the untargeted analysis (fingerprinting). This method provides a global view of all the observable wine constituents previously identified or not. This approach allows spectral pattern comparison to discriminate specific vine and wine behaviors (e.g. variety, vintage, geographic origin, winemaking process, etc.). Finally, data obtained from  $^1\text{H-NMR}$  spectra are usually combined with multivariate analysis using supervised and unsupervised methods. The application of chemometrics on the  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics data allows wine classification.

### 3.1. Targeted analyzes

#### 3.1.1 Wine constituents identification



**Figure 2 – Typical wine  $^1\text{H-NMR}$  spectrum using multi-solvent suppression based on 1D-NOESY experiment.**  
The spectrum is divided into three regions: 0.5-3.5 ppm; 3.5-6.5 ppm and 6.5-9.5 ppm.

Wine is a complex matrix made up of many metabolites. For metabolomics purpose, majority of studies reviewed preferred to use wine directly. This method allows a more reliable quantitative approach because

extraction, freeze-drying or evaporation steps can lead to the loss of all or part of certain compounds (Amaral and Caro, 2005; Aru *et al.*, 2018). In addition, this method limits the number of wine manipulations increasing the reproducibility of the analyses. Nevertheless, using this approach, only major constituents will be observable on the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum. The Fig. 2 shows a representative  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of wine obtained from direct analysis. The signals of water ( $\delta$  4.8 ppm) and ethanol at ( $\delta$  3.6 and 1.2 ppm) were suppressed using a 1D-NOESY experiment.

Family	Peak	Compound	$\delta^1_{\text{H}}$ (multiplicity, $J$ in Hz, assignment)		
			Used for quantification	Other signals	
Alcohols	1	ethanol	1.18( <i>t</i> , 7.2, $\text{CH}_3$ )	3.65 ( <i>q</i> , $\text{CH}_2$ )	
	2	isopentanol	1.65 ( <i>m</i> , CH)	0.88 ( <i>d</i> , 6.7, 2 $\text{CH}_3$ ), 1.44 ( <i>q</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.61 ( <i>t</i> , 6.7, $\text{CH}_2$ )	
	2	myo-inositol	3.27 ( <i>t</i> , 9.7, CH)	3.52 ( <i>dd</i> , 10.0, 2.8, 2CH), 3.61 ( <i>t</i> , 2.8, 2CH), 4.05 ( <i>t</i> , 2.8, CH)	
	3	methanol	3.35 ( <i>s</i> , $\text{CH}_3$ )	0.87 ( <i>d</i> , 6.7, 2 $\text{CH}_3$ ), 1.73 ( <i>m</i> , CH)	
	4	isobutanol	3.37 ( <i>d</i> , 6.7, $\text{CH}_2$ )		
Amino acids	5	phenethyl alcohol	7.33 ( <i>m</i> , 5CH)	2.85 ( <i>t</i> , 6.6, $\text{CH}_2$ ), 3.74 ( <i>t</i> , $\text{CH}_2$ )	
	6	leucine	0.96 ( <i>d</i> , 6.2, 2 $\text{CH}_3$ )	1.71 ( <i>m</i> , $\text{CHCH}_2$ ), 3.74 ( <i>m</i> , CH)	
	7	isoleucine	0.99 ( <i>d</i> , 7.0, $\text{CH}_3$ )	0.93 ( <i>t</i> , 7.4, $\text{CH}_3$ ), 1.24 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 1.45 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 1.97 ( <i>m</i> , CH), 3.66 ( <i>d</i> , 3.9, CH)	
	8	valine	1.04 ( <i>d</i> , 7.3, $\text{CH}_3$ )	0.99 ( <i>d</i> , 7.3, $\text{CH}_3$ ), 2.28 ( <i>m</i> , CH), 3.66 ( <i>d</i> , 4.3, CH)	
	9	threonine	1.33 ( <i>d</i> , 6.7, $\text{CH}_3$ )	2.58 ( <i>d</i> , 4.9, CH), 4.24 ( <i>m</i> , CH)	
	10	alanine	1.50( <i>d</i> , 7.2, $\text{CH}_3$ )	3.76 ( <i>q</i> , CH)	
	11	arginine	1.89 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ )	1.70 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.23 ( <i>t</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.75 ( <i>t</i> , 6.5, CH)	
	12	proline	1.99( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ )	2.06 ( <i>m</i> , CH), 2.33 ( <i>m</i> , CH); 3.32 ( <i>dt</i> , 14.0, 7.0, CH), 3.42 ( <i>dt</i> , 11.6, 7.0, CH); 4.11 ( <i>dd</i> , 8.6, 6.4, CH)	
	Organic acids	13	tyrosine	6.88 ( <i>m</i> , 8.4, 2CH)	3.02 ( <i>dd</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.17 ( <i>dd</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.92 ( <i>dd</i> , CH), 7.17 ( <i>m</i> , 8.6, 2CH)
		14	lactic acid	1.40 ( <i>d</i> , 7.0, $\text{CH}_3$ )	4.31 ( <i>q</i> , 7.0, CH)
		15	acetic acid	2.08 ( <i>s</i> , $\text{CH}_3$ )	
		16	pyruvic acid	2.35 ( <i>s</i> , $\text{CH}_3$ )	
17		succinic acid	2.65 ( <i>s</i> , 2 $\text{CH}_2$ )		
18		malic acid	2.89 ( <i>dd</i> , 16.3, 4.5, CH)	2.78 ( <i>dd</i> , 16.3, 7.0, CH), 4.53 ( <i>dd</i> , 7.0, 4.5, CH)	
19		citric acid	2.94 ( <i>d</i> , 15.6, $\text{CH}_2$ )	2.79 ( <i>d</i> , 15.6, $\text{CH}_2$ )	
20		tartaric acid	4.60 ( <i>s</i> , 2CH)		
21		fumaric acid	6.78 ( <i>s</i> , 2CH)		
22		syringic acid	7.36 ( <i>s</i> , 2CH)	3.84 ( <i>s</i> , 2 $\text{CH}_3$ )	
Phenolics	23	catechin	6.01 ( <i>d</i> , 2.0, CH)	2.53 ( <i>dd</i> , $\text{CH}_2$ ), 2.85 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 4.15 ( <i>m</i> , CH), 4.41 ( <i>d</i> , 7.0, CH), 6.08 ( <i>d</i> , 2.3, CH), 6.84 ( <i>d</i> , 8.6, CH), 6.92 ( <i>m</i> , 2CH)	
	24	epicatechin	6.10 ( <i>d</i> , 2.0, CH)	2.76 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 2.90 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 4.32 ( <i>m</i> , CH), 4.95 ( <i>m</i> , CH), 6.93 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 7.03 ( <i>d</i> , 2.0, CH)	
	25	gallic acid	7.16 ( <i>s</i> , 2CH)		
Polyols	26	tyrosol	6.85 ( <i>m</i> , 8.4, 2CH)	2.77 ( <i>t</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.77 ( <i>t</i> , $\text{CH}_2$ ), 7.17 ( <i>m</i> , 8.4, 2CH)	
	27	2,3-butanediol	1.13 ( <i>d</i> , 6.2, 2 $\text{CH}_3$ )	3.61 ( <i>m</i> , 2CH)	
	28	glycerol	3.55 ( <i>dd</i> , 11.8, 6.5, $\text{CH}_2$ )	3.64 ( <i>dd</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.77 ( <i>m</i> , CH)	
Sugars	29	mannitol	3.84 ( <i>dd</i> , 11.9, 2.8, $\text{CH}_2$ )	3.65 ( <i>dd</i> , 11.7, 6.2 $\text{CH}_2$ ), 3.73 ( <i>m</i> , CH), 3.77 ( <i>d</i> , 9.0, CH)	
	30	fructose	4.02 ( <i>dd</i> , 12.8, 1.0 $\text{CH}_2$ )	3.56 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.70 ( <i>m</i> , 2 $\text{CH}_2$ ), 3.77 ( <i>m</i> , $\text{CHCHCH}_2$ ), 3.87 ( <i>dd</i> , 9.9, 3.4, CH), 3.97 ( <i>m</i> , CH), 4.09 ( <i>m</i> , 2CH)	
	31	arabinose	4.50 ( <i>d</i> , 7.7, CH)	3.51 ( <i>dd</i> , CH), 3.68 ( <i>m</i> , $\text{CHCH}_2$ ), 3.83 ( <i>dd</i> , CH), 3.90 ( <i>m</i> , $\text{CHCH}_2$ ), 3.95( <i>m</i> , CH), 4.02 ( <i>m</i> , $\text{CHCH}_2$ ), 5.25 ( <i>d</i> , CH)	
	32	xylose	5.18 ( <i>d</i> , 3.7, CH)	3.21 ( <i>dd</i> , 9.3, 7.9, CH), 3.31 ( <i>t</i> , 11.4, $\text{CH}_2$ ), 3.42 ( <i>t</i> , 9.25, CH), 3.51 ( <i>dd</i> , 9.3, 3.7, CH), 3.63 ( <i>m</i> , $\text{CHCHCH}_2$ ), 3.91 ( <i>dd</i> , 11.5, 5.5, $\text{CH}_2$ ), 4.57 ( <i>d</i> , 7.9, CH)	
	33	glucose	5.23 ( <i>d</i> , 3.6, CH)	3.23 ( <i>dd</i> , 9.2, 8.0, CH), 3.39 ( <i>m</i> , CH), 3.45 ( <i>dd</i> , 9.8, 3.7, CH) 3.72 ( <i>m</i> , $\text{CHCH}_2$ ), 3.82 ( <i>m</i> , $\text{CHCH}_2$ ), 3.88 ( <i>dd</i> , 12.2, 2.1, $\text{CH}_2$ ), 4.63 ( <i>d</i> , 7.9, CH)	
Others	34	acetoin	1.37 ( <i>d</i> , 7.0, $\text{CH}_3$ )	2.21 ( <i>s</i> , $\text{CH}_3$ ), 4.42 ( <i>q</i> , CH)	
	35	ethyl lactate	4.21 ( <i>q</i> , 7.06, CH)	1.28 ( <i>t</i> , $\text{CH}_3$ ), 1.42 ( <i>d</i> , 7.0, $\text{CH}_3$ ), 4.39 ( <i>q</i> , 7.0, CH)	
	36	ethyl acetate	2.07 ( <i>s</i> , $\text{CH}_3$ )	1.26( <i>t</i> , 7.2, $\text{CH}_3$ ), 4.12 ( <i>q</i> , $\text{CH}_2$ )	
	37	ethanal	2.23 ( <i>d</i> , 3.0, $\text{CH}_3$ )	9.67 ( <i>q</i> , CH)	
	38	$\gamma$ -aminobutyric acid	2.50 ( <i>t</i> , 7.3, $\text{CH}_2$ )	1.96 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ ), 3.05 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ )	
	39	choline	3.19 ( <i>s</i> , 3 $\text{CH}_3$ )	3.51 ( <i>dd</i> , $\text{CH}_2$ ), 4.05 ( <i>m</i> , $\text{CH}_2$ )	
	40	trigonelline	9.14 ( <i>s</i> , CH)	4.42 ( <i>s</i> , $\text{CH}_3$ ), 8.07 ( <i>m</i> , CH), 8.82 ( <i>m</i> , 2CH)	
	41	galacturonic acid	5.32 ( <i>d</i> , 3.8, CH)	3.49 ( <i>dd</i> , 8.0, 10.0, CH), 3.69 ( <i>dd</i> , 9, 3.5, CH), 3.80 ( <i>dd</i> , 10.3, 3.8, CH), 3.92 ( <i>dd</i> , 10.3, 3.4, CH), 4.24 ( <i>dd</i> , 3.6, 1.2, CH), 4.26 ( <i>d</i> , 1.2, CH), 4.31 ( <i>dd</i> , 3.3, 1.4, CH)	
	42	shikimic acid	6.82 ( <i>dt</i> , CH)	2.21 ( <i>dd</i> , 18.2, 7.0, $\text{CH}_2$ ), 2.75 ( <i>dd</i> , 18.0, 5.3, $\text{CH}_2$ ), 3.74 ( <i>dd</i> , 8.6, 4.3, CH), 4.01 ( <i>m</i> , CH), 4.42 ( <i>t</i> , 4.1, CH)	

**Table 3 – Chemical shifts and coupling constants used for compound identification (Le Mao *et al.*, 2021).**

Dozens of compounds from different families are superimposed on the spectra obtained: alcohols and polyols, amino acids, organic acids, phenolics, sugars, esters, aldehydes and ketones. In a first approach,

signal assignments of the wine constituents can be performed by comparison with literature data and libraries provided by NMR data banks such as the Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB), the Yeast Metabolome Database (YMDB) or the Birmingham Metabolite Library (BML). To confirm the signal identification, spiking experiments directly in wine or in wine like matrix using standard molecules can be applied especially for compounds present in low concentration (Cassino *et al.*, 2017). Finally, besides the addition of pure standards a combination of 2D NMR spectra can be used to confirm metabolite identification including J-resolved spectroscopy (JRES), COSY and TOCSY experiments (Vignoli *et al.*, 2019). Table 3 provides the main wine constituents identified in wine and their chemical shifts, signal multiplicities and coupling constants (Le Mao *et al.*, 2021).

### 3.1.2. Wine constituents quantification

The integration of the signal area is one of the crucial steps of the qNMR analysis. The wine <sup>1</sup>H-NMR spectrum consists of a large number of signals. Each of them corresponds to the chemical shifts of the different non-exchangeable protons present in the analyzed extract. The area under each signal is directly proportional to the concentration and proton numbers of the corresponding compound (Bharti and Roy, 2012). The relative or absolute concentration of a compound can be obtained by comparing the area of the peak corresponding to that of the reference signal. Nevertheless the integration procedure needs to be performed carefully due to overlapping signals and under- or over-estimation effects requiring correction factors (Godelmann *et al.*, 2016).

Different procedures were applied to provide the reference signal used for quantification including internal standards, external standards, calibration curve methods, or even electronic methods (Bharti and Roy, 2012). An internal standard needs to be stable in the wine matrix. Ideally, its signal should be isolated from the metabolites of interest. Gougeon *et al.* used calcium formate as internal standard in wines (Gougeon *et al.*, 2018). Some studies have used succinic acid as external reference (López-Rituerto *et al.*, 2022). A third approach is the use of an electronic reference to avoid the problems provided by internal or external standards. Several specific procedures were developed and applied to wine such as ERETIC (electronic reference to access in vivo concentration), QUANTAS (quantification by artificial signal), or PULCON (pulse length based concentration determination) (Bharti and Roy, 2012). These methods are very sensitive to variations in the physicochemical properties of the samples to be analyzed (salt concentrations, analyte concentrations, etc.).

The integration of overlapped signals cannot be obtained accurately using global integration methods. A signal deconvolution can be performed to determine the contribution of an individual peak to the total area (Cobas *et al.*, 2011). NMR software has implemented algorithms to solve the problems of overlap by deconvolution of the signals (Gougeon *et al.*, 2019a). Although useful in some circumstances, this method cannot solve all overlaps seen across the spectrum. Moreover, it does not predict the number of components hidden under a series of superimposed signals (Monakhova *et al.*, 2014b).

Finally, to perform absolute quantification, specific constant response factors could be introduced for each compound depending of measuring conditions (Godelmann *et al.*, 2016). These factors depend of diverse parameters including NMR sequences for solvent suppression, duplet roof effect, etc.

### 3.2. Untargeted analyzes (fingerprinting)

The untargeted methods are based on global analysis of the <sup>1</sup>H-NMR spectral data (Alonso *et al.*, 2015; Riedl *et al.*, 2015). This approach seeks to take advantage of all the data contained in the NMR spectrum to build patterns for classifying wines. The aim is to discriminate different wine fingerprints grounded on their geographical origins, varieties or vintages (Magdas *et al.*, 2019). Untargeted analyses require a large number of wine samples to be relevant. They are therefore combined with chemometrics to discriminate the specific signatures of each class of wines.

Typically, untargeted methods consist to transform the <sup>1</sup>H-NMR wine spectra in matrices of data through binning or bucketing (Ehlers *et al.*, 2022). Each bin (bucket) represents a small area of the spectrum (between 0.01 and 0.05 ppm). This approach reduces the number of variables and smooths small shift fluctuations between spectra.

One of the main limitations of this procedure is the integration of fixed buckets, applied independently of potential deviations (variation in chemical shifts, local deformation of the baseline, etc.). For example, pH or salt concentration of wines may distort the <sup>1</sup>H-NMR spectra. Several methods have been developed to correct these fluctuations allowing an advanced bucketing (Monakhova *et al.*, 2013). For example, NMRProcFlow allows a semi-automatic procedure based on an adaptative intelligent bucketing (Jacob *et al.*, 2017).

## 4. Chemometrics

All metabolomics techniques, whether or not the analysis is targeted, produce a very large volume of data. NMR data are generally subjected to chemometrics based on multivariate data analysis, especially for food

authentication studies (Borràs *et al.*, 2015; Granato *et al.*, 2018). Two types of multivariate analysis are commonly used: unsupervised or/and supervised approaches. Although non-linear approaches are used in foodomics, the multivariate statistical analysis models generally used are principal component analysis (PCA) and partial least squares regression models (Bona *et al.*, 2018).

Unsupervised methods, such as principal component analysis (PCA) or hierarchical cluster analysis (HCA), are generally used to highlight patterns in the global data set. These methods make it possible to classify wines without allocation of samples to a membership group. The PCA is the most widely used unsupervised method. PCA reduces the number of variables by linear combination of the initial variables, providing a smaller set of variables (principal components). This method is used first to identify trends, clusters and outliers (Le Mao *et al.*, 2021; Mascellani *et al.*, 2021).

In contrast to unsupervised methods, the supervised approaches the clusters are known. The partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal projection to latent structures (OPLS-DA), are the most popular supervised methods. Like PCA, PLS-DA allows the dataset to be reduced and simplified, but differs in its supervised nature. This method uses learning sets with a priori known information (grape variety, geographical origin, etc.) to build a classification model (Amargianitaki and Spyros, 2017; Gougeon *et al.*, 2019a). PLS-DA is characterized by a high discriminatory power, but can lead to an artificial separation of groups with no real difference between them (Hatzakis, 2019).

A model validation procedure is of crucial importance in order to avoid overly optimistic classification results, which is currently one of the pitfalls of authenticity studies (Kjeldahl and Bro, 2010). The model validation procedure generally involves evaluating the acquired data, the variables selected to build the model, and the predictive capacity and relevance of the model. Depending on the models and statistical packages used (R Project, Matlab, SIMCA, etc.) different validation procedures are available. The best way to estimate a model is the external validation procedure using a training set to build the model and an independent test set to estimate the relevance of the model. Often in foodomics, an internal validation procedure, cross-validation is applied when the number of samples is limited (Gougeon *et al.*, 2019a; Magdas *et al.*, 2019; Triba *et al.*, 2015). The most commonly used method is the *k*-fold cross validation and its derivative the leave one out cross validation (LOOCV) for very small datasets (Spyros and Dais, 2013). The LOOCV procedure consists of excluding only one object at a time, the others being used to construct the model which is then applied to the discarded sample. In the case of the *k*-fold, it is a part of the dataset that is excluded and used as a test set for the rest of the data.

## 5. Application of NMR-based metabolomics to wine authenticity

The first highlighted application of NMR-based metabolomics is to guarantee the wine authenticity. A major new issue of the last decades, it is both a demand from customers and producers. Indeed, as wine is a product with high added value, it is the target of numerous counterfeits and customers are asking for better traceability of the products they consume. So far, three wine characteristics need to be addressed by NMR-based metabolomics: geographical origin, grape variety and vintage.

### 5.1. Geographical origin

As mentioned by Amargianitaki & Spyros, NMR-based metabolomics has been widely used to classify wines according to their geographical origin (Amargianitaki and Spyros, 2017). Initial studies first showed that wines from different countries or regions were dissociated by NMR analysis (Brescia *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2007). However, as this separation could be due to the grape varieties used, studies showed that the same grape variety vinified in different world regions gave a different metabolome (Caruso *et al.*, 2012; Gougeon *et al.*, 2019a; Magdas *et al.*, 2019; Son *et al.*, 2009a; Son *et al.*, 2008). These works clearly show the impact of the terroir to discriminate geographical origin of the wine. Finally, on a smaller scale, studies have shown that NMR-based metabolomics can also discriminate between wines from regional trademarks in the same area (Gougeon *et al.*, 2019a; López-Rituerto *et al.*, 2012; Mazzei *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2007). Among these studies, Pereira *et al.* showed for the first time the impact of soil composition on the metabolic profile of wines by highlighting an impact on amino acids, phenolic compounds, glycerol and some organic acids (Pereira *et al.*, 2007). These results were more recently confirmed by Gougeon *et al.* 2019 (Gougeon *et al.*, 2019a). Today, various studies have been carried out to establish the profiling of wines from different regions of the world (Table 4).

The main compounds related to the geographical discrimination of wines are listed in Table 5. Studies agree that proline, one of the major amino acid in wines, is also the one whose content varies the most according to the region, followed by alanine, leucine, threonine and histidine (Duley *et al.*, 2021; Gougeon *et al.*, 2018). Grape acids, such as malic acid or citric acid, but also acids resulting from fermentation, such as lactic or succinic acid, are also impacted (Mazzei *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2009a). In their previous study, Son *et al.* also found that  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucose are discriminative according to Cabernet sauvignon wines from France,

California and Australia (Son *et al.*, 2008). Other metabolites resulting from fermentation are regularly mentioned as discriminative according to the geographical origin, such as 2,3-butanediol, phenethyl alcohol and glycerol (Duley *et al.*, 2021; Gougeon *et al.*, 2018; Viggiani and Morelli, 2008). Among phenolics compounds, gallic acid seems to be involved in the geographical differences of wines (Gougeon *et al.*, 2018; Nyitrai Sárdy *et al.*, 2022; Son *et al.*, 2008). Interestingly, an untargeted NMR-based metabolomics approach has shown that the region of phenolic compounds (between 5.1 to 9.8 ppm) was the most discriminating area regarding geographical origin (Magdas *et al.*, 2019).

Geographical origin		Cultivars	Methods	Reference
Countries	Region			
Australia New-Zealand	-	Pinot noir	<sup>1</sup> H-NMR and ICP-MS targeted analysis	(Duley <i>et al.</i> , 2021)
China	Shanxi	Cabernet sauvignon, Shiraz	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(Zhu <i>et al.</i> , 2018)
	-	Cabernet sauvignon, Beihong	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(Gougeon <i>et al.</i> , 2018)
	Shacheng	Cabernet sauvignon, Merlot, Ruby cabernet, Syrah, Zinfandel	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(Hu <i>et al.</i> , 2015)
	Yeongdong, Yeongcheon and Chochiwon	Muscat bailey	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(Son <i>et al.</i> , 2009a)
Czech	-	Riesling, Chardonnay, Pinot gris, Sauvignon Blanc, Welschriesling, Pinot noir, Grüner veltliner, Gewürtztraminer, Pinot blanc, Blaufränkisch, Pálava, Cabernet sauvignon, Hibernal, Zweigeltrebe, Grüner silvaner, Saint laurent, Neuburger, Merlot, Muskat moravsky, Andre, Müller-Thurgau, Cabernet moravia, Blauer portugieser, Dornfelder, Kerner, Aurelius, Alibernet	<sup>1</sup> H-NMR targeted and untargeted analysis	(Mascellani <i>et al.</i> , 2021)
France	Bordeaux, Beaujolais, Burgundy, Côtes du Rhône, Languedoc-Roussillon, Loire Valley	-	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(Gougeon <i>et al.</i> , 2019a)
France, USA, Australia, South Korea	-	Cabernet sauvignon, Shiraz, Campbell Early	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(Son <i>et al.</i> , 2008)
Germany	Rheinpfalz, Rheinhessen, Mosel, Saar, Ruwer, Baden and Württemberg	Riesling, Pinot noir, Müller-Thurgau, Pinot blanc, Pinot gris, Pinot meunier, Dornfelder, Gewürtztraminer, Silvaner, Lamberger	<sup>1</sup> H-NMR targeted and untargeted analysis	(Godelmann <i>et al.</i> , 2013)
Greek	-	Red :Mandilaria, Agiorgitiko; White : Moschofilero, Asyrtiko	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(Anastasiadi <i>et al.</i> , 2009)
Italy	Verona	Amarone	<sup>1</sup> H-NMR untargeted and targeted analysis	(Consonni <i>et al.</i> , 2011)
Italy	Basilicata and Campagna	-	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(Viggiani and Morelli, 2008)
Hungary	Villány, Eger	Cabernet sauvignon, Blaufränkisch, Merlot, Pinot noir	<sup>1</sup> H-NMR untargeted analysis	(Nyitrai Sárdy <i>et al.</i> , 2022)
Romania	Romanian:	Romanian : Sauvignon blanc,	<sup>1</sup> H-NMR untargeted analysis	(Magdas <i>et al.</i> , 2019)
France	Transylvania, Oltenia, Moldova	Riesling, Chardonnay, Pinot gris; French : Sauvignon blanc, Chardonnay		
Romania	Murfatlar	Cabernet sauvignon, Merlot, Feteasca neagra, Pinot noir, Mamaia	<sup>1</sup> H-NMR untargeted analysis, HPLC and isotopes targeted analysis	(Geana <i>et al.</i> , 2016)
Spain	Galicia	Albariño, Godello, Treixadura, Palomino	<sup>1</sup> H-NMR and SPME-GC untargeted analysis	(Martin-Pastor <i>et al.</i> , 2016)
	La rioja	-	<sup>1</sup> H-NMR targeted analysis	(López-Rituerto <i>et al.</i> , 2012)

**Table 4 – Geographical origin discrimination by <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics.**

## 5.2. Grape variety

The influence of grape variety on wine chemical composition has been widely studied. Numerous studies have shown that <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics combined with multivariate statistical analysis allow the successful classification of wines according to grape variety. Several comparisons conducted on wines produced in various countries have been performed on red grape varieties (Anastasiadi *et al.*, 2009; Fan *et*

*al.*, 2018; Geana *et al.*, 2016; Gougeon *et al.*, 2019a), but also on white grape varieties (Ali *et al.*, 2011; Anastasiadi *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2018; Godelmann *et al.*, 2013). Recently, a study performed on near one thousand Czech wines showed the interest of <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics to classify wines according to the grape varieties (Mascellani *et al.*, 2021). Their statistical analyses showed the classification percentage of wines from thirteen different grape varieties. Among the grape varieties widely used in the world, they have for example pointed out that wines from Pinot noir, Riesling, Cabernet sauvignon and Chardonnay are well discriminated (good classification rate range between 76 and 96%) while those from Sauvignon blanc and Pinot gris have less good scores (45 and 48%, respectively). These results confirm the specificity of the metabolome of wines made from certain grape varieties. The <sup>1</sup>H-NMR based comparison of wines has the ability to discriminate between closely related varieties (Hu *et al.*, 2015). As some commercialized wines may be the result of a blend of several grape varieties (blended wine), one study has also shown that <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics can discriminate wines made with various proportions of different grape varieties (Imparato *et al.*, 2011).

Factors	Organic acids	Alcohols	Sugars	Amino acids	Phenolics
<b>Geographical origin</b>	malic acid, citric acid, lactic acid, succinic acid	2,3-butanediol, phenethyl alcohol, glycerol	glucose	proline, alanine, leucine, threonine, histidine	gallic acid
<b>Grape variety</b>	tartaric acid, citric acid, malic acid, lactic acid, succinic acid, acetic acid, shikimic acid	ethyl acetate, 2,3-butanediol, glycerol, methanol, acetone, isopentanol	glucose, fructose	proline, arginine, alanine, valine, leucine, isoleucine, choline, threonine, $\gamma$ -aminobutyric acid	gallic acid, catechin, syringic acid, caffeic acid
<b>Vintage</b>	lactic acid, tartaric acid, fumaric acid, malic acid, citric acid, succinic acid	2,3-butanediol, ethyl acetate, glycerol	glucose, xylose	proline, alanine, leucine, valine, choline, $\gamma$ -aminobutyric acid	catechin, gallic acid, syringic acid, epicatechin, caffeic acid

**Table 5 – Main discriminating metabolites of geographical origin, grape variety and vintage.**

As reported in Table 5, the majority of studies agree that amino acids are the main compounds involved, in particular proline, arginine, alanine and valine (Anastasiadi *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2018). Studies also agree that other compounds such as organic acids (malate, tartrate, citrate, succinate, acetate and lactate) and alcohols (2,3-butanediol, glycerol) are markers of grape varieties (Geana *et al.*, 2016; Godelmann *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015). This is because the initial levels of primary metabolites from the grape berry vary greatly depending on the grape variety used (Cosme *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2006). These compounds undergo numerous chemical processes leading to different wine metabolomic profiles. Finally, shikimic acid, extracted from skin during winemaking process, has also been identified as a grape variety marker (Godelmann *et al.*, 2013; Magdas *et al.*, 2019; Nyitrainé Sárdy *et al.*, 2022).

### 5.3. Vintage

Finally, the vintage is a crucial criterion to guarantee wine authenticity. Indeed, the climatic and environmental conditions being variable from one year to another, it plays strongly on the chemical composition of the grape berries. The vintage then plays an important role in evaluating the metabolic profile information of wines. Several publications have shown that <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics highlights differences in the metabolic profiles of wines depending on the vintage (Anastasiadi *et al.*, 2009; Consonni *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009a; López-Rituerto *et al.*, 2012). Even if the percentage of good classification could depend of the vintage (Gougeon *et al.*, 2019a). A recent study shows the impact of four vintages (2009-2012) on the chemical composition of wine from Cabernet Sauvignon. They pointed out that it is not so much the compositions of metabolites that change but rather the contents (Zhang *et al.*, 2021).

As indicated in Table 5, all studies agree that most organic acid, sugars and amino acid contents vary with vintage (Cassino *et al.*, 2017; Gougeon *et al.*, 2019a). Some studies have also shown that contents of phenolic compounds can change between vintage (Anastasiadi *et al.*, 2009; López-Rituerto *et al.*, 2012). Initial levels depend on climatic and environmental conditions, but a significant decrease in the bottle is observed, mainly due to condensation reactions involving anthocyanins and flavonols (Consonni *et al.*, 2011).

Looking at the impact of the vintage on the chemical composition of the wine is one thing, but the notion of aging greatly complicates the studies. Wine continues to evolve in the bottle, which can lead to variations in the results obtained over time. Cassino *et al.* have conducted a study on two white wines and ten red wines for respectively two and four years (Cassino *et al.*, 2019). They have shown that some compounds analyzed by <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics are impacted. Overall, they showed that for red wines 2,3-butanediol, acetic acid, ethyl lactate, ethyl acetate, gallic acid increase during aging while acetoin, lactic acid,



galacturonic acid, histidine, leucine, glucose, xylose, catechin and epicatechin decrease. For white wines, they also observed an increase in ethyl acetate and ethyl lactate but a decrease in malic acid, lactic acid and succinic acid contents. These results are partly explained by oxidation, reduction, hydrolysis and precipitation phenomena in wine (Cassino *et al.*, 2019). Similar results were obtained in the study of Gougeon *et al.* by comparing young wines (2013-2016) to older wines (2004-2007) from Bordeaux area (Gougeon *et al.*, 2019a). The study of vintage and aging effects is closely linked. Thus, in a context of wine authentication, Gougeon *et al.* proposed to use a z-score approach, taking into account compound evolution in bottles to ensure the comparison of samples over time, to compare old wines (Gougeon *et al.*, 2019b).

## 6. Application of NMR-based metabolomics for winemaking control

Another application of metabolic NMR applied to wine is for the control of winemaking through the study of the impact of different viticultural and oenological practices. This application is less studied than for wine authenticity but shows an interest for using <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics as comprehensive tool for studying the impact of different practices commonly used on wine's chemical composition.

### 6.1. Viticultural practices

The study of the impact of several viticultural practices on the chemical composition of wine has been increasingly studied by <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics over the past decade. To our knowledge, one of the first studies demonstrating the interest of <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics was performed on Cabernet Sauvignon produced under different cultivation techniques (Todasca *et al.*, 2011). Variations of wine metabolome depending on the viticultural practices were observed. The effects tilling the soil, fertilization or training system were also studied and the wines analyzed showed a different chemical composition depending of the process (Ciampa *et al.*, 2019; De Pascali *et al.*, 2014). It has proven to be an efficient tool for studying the influence of organic and biodynamic cultivation on wine's metabolome (Laghi *et al.*, 2014; Picone *et al.*, 2016). Several studies have recently used <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics to analyze wines from different stages of grape maturity (Alves Filho *et al.*, 2022; Chang *et al.*, 2014; Le Mao *et al.*, 2021). The primary metabolism being directly impacted by the maturity, the use of <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics is relevant. Each study was conducted on different grape varieties and showed an effect on amino acids, organic acids, sugars and phenolic compounds. In a context of climate change, this work is particularly interesting to continue to provide quality wines in the future.

### 6.2. Winemaking practices

The <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics has also been used to study the influence of oenological processes on wine metabolism in order to better understand and control the impact of practices commonly used in oenology. One of the first uses was to study the impact of different fermentation processes and evaluate the fermentation characteristics of different yeast strains (Hanganu *et al.*, 2011; Mazzei *et al.*, 2013; Son *et al.*, 2009b) and bacteria (Lee *et al.*, 2009b). The influence of *Botrytis cinerea* attack on grape berries used in Champagne wines has also been demonstrated (Hong *et al.*, 2011). NMR-based metabolomics analyses have also evaluated the interest and influence of using innovative winemaking technologies such as cryomaceration, reductive winemaking and ultrasound (Baiano *et al.*, 2012; De Pascali *et al.*, 2014). Recently, studies have shown that <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics is an effective tool to monitor the evolution of the majority compounds in wine during fermentation and barrel aging (López-Rituerto *et al.*, 2022) or to evaluate the impact of the use of different glues or enzymes on the chemical composition of wines (Le Mao *et al.*, 2021). Maceration time was also studied by <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics and although it showed a tendency to impact certain compounds but ANOVA results were found to be non-significant (Alves Filho *et al.*, 2022). An interesting non-targeted approach on Mexican Merlot wines was used by focusing on the phenolic compounds region (5.58-8.00 ppm) to study different aging processes (Herbert Pucheta, 2019). Finally, as previously indicated, <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics is an efficient tool to monitor the wine aging effect (Cassino *et al.*, 2019; Gougeon *et al.*, 2019a).

## 7. Challenges and perspectives

It can be concluded that <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics can both be used to guarantee the authenticity of wines and for the control of wine-growing parameters whether the approach is targeted or non-targeted and whether it is quantitative or not. NMR has important advantages for the analysis of complex mixtures compared to other usual metabolomics tools: easy sample preparation, short analysis times, great reproducibility and adequate specificity (Wishart, 2019). Nowadays, <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics enables rapid and efficient quantification of several wine constituents from different chemical classes: organic acids, amino acids, carbohydrates, alcohols and phenolics. In combination with chemometrics including multivariate data analysis, <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy allows the discrimination of fundamental wine parameters including geographical origins, grape varieties, or vintages.

However, one of the findings is that many different wine sample preparation protocols have been carried out. As a reminder, most of the wines studied were either freeze-dried, evaporated or used directly. Then, depending on the studies, the wine samples may or may not have undergone an addition of buffer, with different buffers listed, and the adjustment or not of the pH of the sample with different target pH depending on the study. This protocol variability leads inexorably to different spectra and can make comparisons of spectra and results difficult. Amaro and Caro quickly showed that, comparatively speaking, evaporation of wine led to better results than freeze-drying. Both methods allow a better resolution of the spectra but are time consuming and can lead to reproducibility problems (Amaral and Caro, 2005). The WineScreener™ system (Bruker Corporation), based on <sup>1</sup>H-NMR metabolomics, provides a commercial facility for wine traceability using a proprietary database (Spraul *et al.*, 2015). However, it suffers from a lack of transparency with regard to data validation and chemometric workflow. These factors represent a major limitation to the use of this valuable method by wine control laboratories. In particular, model validation approaches are necessary to verify the robustness of the method including long-term stability of the instruments and wine evolution to guarantee usability and transparency.

Wine authenticity studies can become extraordinarily complex in sophisticated counterfeits. The need for innovation in analytical techniques remains constant and the application of diverse technologies is a promising tool for revealing subtle differences among wines (Valls Fonayet *et al.*, 2021). Combination of <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics with others technics is a promising challenge. Some recent studies have attempted fusion of <sup>1</sup>H-NMR, LC-MS and GC-MS data for rums (Belmonte-Sánchez *et al.*, 2020) and wines (Kioroglou *et al.*, 2020) or 1D <sup>1</sup>H-NMR and ICP-MS data for wines (Duley *et al.*, 2021). These studies show non-redundancy of data and better prediction efficiency, reinforcing the interest of such approaches. Data fusion of outputs from different analytical techniques increases the reliability of authentication but it is not straightforward and represents major challenges of data integration with different tools of multiblock chemometrics (Borràs *et al.*, 2015).

Concerning monitoring of viticultural and oenological practices, the <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics has proven its usefulness. NMR metabolomics is rapid and sensitive enough to monitor the main wine constituents. This technic makes it possible to track major wine metabolites throughout the winemaking process from the grape berry to the bottled wine. However, there are challenges that still need to be addressed. First at all, the relationship between wine quality and <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics remains unclear. Rochfort *et al.* have investigated the relationship between NMR analysis and some sensory aspect of wine quality (Rochfort *et al.*, 2010). They demonstrated that <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics could be used full to predict some specific traits of interest correlated to organoleptic quality of wine. But wine quality is linked to many other compounds that are not currently analyzed by NMR. Among non-volatile compounds, phenolic compounds are important markers of organoleptic properties. Interestingly, Ocaña-Rios *et al.* have developed a Solid-phase extraction (SPE) method for <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics (Ocaña-Rios *et al.*, 2021). This method, by eliminating major polar wine constituents, allows access to several compounds including hydroxybenzoates and flavonols. The use of such approaches could be useful to access to constituents directly connected to wine quality such as phenolic compounds. The second point to examine to develop NMR in wine industry within oenology laboratories is the development of more simple and economic systems. In this sense, benchtop NMR spectrometers are promising tools (Giberson *et al.*, 2021). Such spectrometers are less expensive and more compact offering new perspectives to a wide range of new users in oenological laboratories. Recently, Matviychuk *et al.* have applied <sup>1</sup>H-based metabolomics to wine using a 60 Mhz benchtop spectrometer (Matviychuk *et al.*, 2021). This approach allowed quantifying more than fifteen wine constituents including alcohols, organic acids and amino acids. These spectrometers could be deployed very shortly where conventional NMR remains inaccessible in terms of cost, technical complexity or physical constraints.

**Acknowledgements:** This work was supported by Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (Inès Le Mao was the recipient of a CIFRE PhD fellowship from ANRT and Baron Philippe de Rothschild S.A.). We also want to thank Château Mouton Rothschild and Fondation of Bordeaux for its financial support (donors: Baron Philippe de Rothschild SA, Chateau Cheval Blanc, Château Lafite Rothschild, Le Domaine Clarence Dillon, Château Petrus). The work was supported by the WAPNMR project (ANR-21-CE21-0014 project).

## References

- OIV Strategic Plan 2015-2019, <http://www.oiv.int/public/medias/3345/ps-2015-2019-en.pdf>.
- Ali K., Maltese F., Toepfer R., Choi Y.H., Verpoorte R., 2011. Metabolic characterization of Palatinat German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *J. Biomol. NMR* **49**, 255-266.
- Alonso A., Marsal S., Julià A., 2015. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 23.

- Alves Filho E.G., Silva L.M.A., Lima T.O., Ribeiro P.R.V., Vidal C.S., Carvalho E.S.S., Druzian J.I., Marques A.T.B., Canuto K.M., 2022. <sup>1</sup>H NMR and UPLC-HRMS-based metabolomic approach for evaluation of the grape maturity and maceration time of Touriga Nacional wines and their correlation with the chemical stability. *Food Chem.* **382**, 132359.
- Alves Filho E.G., Silva L.M.A., Ribeiro P.R.V., Brito E.S., Zocolo G.J., Souza-Leão P.C., Marques A.T.B., Quintela A.L., Larsen F.H., Canuto K.M., 2019. <sup>1</sup>H NMR and LC-MS-based metabolomic approach for evaluation of the seasonality and viticultural practices in wines from São Francisco River Valley, a Brazilian semi-arid region. *Food Chem.* **289**, 558-567.
- Amaral F.M., Caro M.S.B., 2005. Investigation of different pre-concentration methods for NMR analyses of Brazilian white wine. *Food Chem.* **93**, 507-510.
- Amargianitaki M., Spyros A., 2017. NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **4**, 9.
- Anastasiadi M., Zira A., Magiatis P., Haroutounian S.A., Skaltsounis A.L., Mikros E., 2009. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics for the classification of Greek wines according to variety, region, and vintage. Comparison with HPLC data. *J. Agric. Food. Chem.* **57**, 11067-11074.
- Aru V., Sørensen K.M., Khakimov B., Toldam-Andersen T.B., Balling Engelsen S., 2018. Cool-climate red wine“ chemical composition and comparison of two protocols for <sup>1</sup>H-NMR analysis. *Molecules* **23**, 160.
- Baiano A., Terracone C., Longobardi F., Ventrella A., Agostiano A., Del Nobile M.A., 2012. Effects of different vinification technologies on physical and chemical characteristics of Sauvignon blanc wines. *Food Chem.* **135**, 2694-2701.
- Belmonte-Sánchez J.R., Romero-González R., Martínez Vidal J.L., Arrebola F.J., Garrido Frenich A., 2020. <sup>1</sup>H NMR and multi-technique data fusion as metabolomic tool for the classification of golden rums by multivariate statistical analysis. *Food Chem.* **317**, 126363.
- Bharti S.K., Roy R., 2012. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **35**, 5-26.
- Bona E., Março P.H., Valderrama P., 2018. Chapter 4 - Chemometrics applied to food control, in: Holban, A.M., Grumezescu, A.M. (Eds.), *Food control and biosecurity*. Academic Press, pp. 105-133.
- Borràs E., Ferré J., Boqué R., Mestres M., Aceña L., Busto O., 2015. Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment - a review. *Anal. Chim. Acta* **891**, 1-14.
- Brescia M.A., Caldarola V., De Giglio A., Benedetti D., Fanizzi F.P., Sacco A., 2002. Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Anal. Chim. Acta* **458**, 177-186.
- Caruso M., Galgano F., Castiglione Morelli M.A., Viggiani L., Lencioni L., Giussani B., Favati F., 2012. Chemical profile of white wines produced from 'Greco bianco' grape variety in different Italian areas by nuclear magnetic resonance (NMR) and conventional physicochemical analyses. *J. Agric. Food. Chem.* **60**, 7-15.
- Cassino C., Tsolakis C., Bonello F., Gianotti V., Osella D., 2017. Effects of area, year and climatic factors on Barbera wine characteristics studied by the combination of <sup>1</sup>H-NMR metabolomics and chemometrics. *Vitis* **28**, 259-277.
- Cassino C., Tsolakis C., Bonello F., Gianotti V., Osella D., 2019. Wine evolution during bottle aging, studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Res. Int.* **116**, 566-577.
- Cevallos-Cevallos J.M., Reyes-De-Corcuera J.I., Etxeberria E., Danyluk M.D., Rodrick G.E., 2009. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 557-566.
- Chang E.H., Jung S.M., Park S.J., Noh J.H., Hur Y., Nam J.C., Park K.-S., 2014. Wine quality of grapevine 'Cheongsoo' and the related metabolites on proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy at the different harvest times. *Plant OMICS* **7**, 80-86.
- Ciampa A., Dell'Abate M.T., Florio A., Tarricone L., Di Gennaro D., Picone G., Trimigno A., Capozzi F., Benedetti A., 2019. Combined magnetic resonance imaging and high resolution spectroscopy approaches to study the fertilization effects on metabolome, morphology and yeast community of wine grape berries, cultivar Nero di Troia. *Food Chem.* **274**, 831-839.
- Cobas C., Seoane F., Domínguez S., Sykora S., Davies A.N., 2011. A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD). *Spectrosc. Eur.* **23**, 26-30.
- Consonni R., Cagliani L.R., Guantieri V., Simonato B., 2011. Identification of metabolic content of selected Amarone wine. *Food Chem.* **129**, 693-699.
- Cosme F., Gonçalves B., Inês A., Jordão A., Vilela A., 2016. Grape and wine metabolites: biotechnological approaches to improve wine quality, in: Morata, A., Loira, I. (Eds.), *Grape and Wine Biotechnology*. InTech, Rijeka, pp. 187-224.
- Crook A.A., Zamora-Olivares D., Bhinderwala F., Woods J., Winkler M., Rivera S., Shannon C.E., Wagner H.R., Zhuang D.L., Lynch J.E., Berryhill N.R., Runnebaum R.C., Anslyn E.V., Powers R., 2021.

- Combination of two analytical techniques improves wine classification by Vineyard, Region, and vintage. *Food Chem.* **354**, 129531.
- da Silva Neto H.G., da Silva J.B.P., Pereira G.E., Hallwass F., 2009. Determination of metabolite profiles in tropical wines by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics. *Magn. Reson. Chem.* **47**, S127-S129.
- De Pascali S.A., Coletta A., Del Coco L., Basile T., Gambacorta G., Fanizzi F.P., 2014. Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chem.* **161**, 112-119.
- Du Y.-Y., Bai G.-Y., Zhang X., Liu M.-L., 2007. Classification of wines based on combination of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chin. J. Chem.* **25**, 930-936.
- Duley G., Dujourdy L., Klein S., Werwein A., Spartz C., Gougeon R.D., Taylor D.K., 2021. Regionality in Australian Pinot noir wines: A study on the use of NMR and ICP-MS on commercial wines. *Food Chem.* **340**, 127906.
- Ehlers M., Horn B., Raeke J., Fauhl-Hassek C., Hermann A., Brockmeyer J., Riedl J., 2022. Towards harmonization of non-targeted <sup>1</sup>H NMR spectroscopy-based wine authentication: Instrument comparison. *Food Control* **132**, 108508.
- Fan S., Zhong Q., Fauhl-Hassek C., Pfister M.K.H., Horn B., Huang Z., 2018. Classification of Chinese wine varieties using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Food Control* **88**, 113-122.
- Geana E.I., Popescu R., Costinel D., Dinca O.R., Ionete R.E., Stefanescu I., Artem V., Bala C., 2016. Classification of red wines using suitable markers coupled with multivariate statistic analysis. *Food Chem.* **192**, 1015-1024.
- Giberson J., Scicluna J., Legge N., Longstaffe J., 2021. Chapter Three - Developments in benchtop NMR spectroscopy 2015–2020, in: Webb, G.A. (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. Academic Press, pp. 153-246.
- Giraudeau P., Silvestre V., Akoka S., 2015. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics: a tutorial review. *Metabolomics* **11**, 1041-1055.
- Godelmann R., Fang F., Humpfer E., Schütz B., Bansbach M., Schäfer H., Spraul M., 2013. Targeted and nontargeted wine analysis by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. Differentiation of important parameters: grape variety, geographical origin, year of vintage. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 5610-5619.
- Godelmann R., Kost C., Patz C.-D., Ristow R., Wachter H., 2016. Quantitation of compounds in wine using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: description of the method and collaborative study. *J. AOAC Int.* **99**, 1295-1304.
- Gougeon L., da Costa G., Guyon F., Richard T., 2019a. <sup>1</sup>H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food Chem.* **301**, 125257.
- Gougeon L., Da Costa G., Le Mao I., Ma W., Teissedre P.-L., Guyon F., Richard T., 2018. Wine analysis and authenticity using <sup>1</sup>H-NMR metabolomics data: application to Chinese wines. *Food Anal. Methods* **11**, 3425-3434.
- Gougeon L., Da Costa G., Richard T., Guyon F., 2019b. Wine authenticity by quantitative <sup>1</sup>H NMR versus multitechnique analysis: a case study. *Food Anal. Methods* **12**, 956-965.
- Granato D., Putnik P., Kovačević D.B., Santos J.S., Calado V., Rocha R.S., Cruz A.G.D., Jarvis B., Rodionova O.Y., Pomerantsev A., 2018. Trends in chemometrics: food Authentication, microbiology, and effects of processing. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **17**, 663-677.
- Hanganu A., Todasca M.C., Chira N.A., Rosca S., 2011. Influence of common and selected yeasts on wine composition studied using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Rev. Chim.* **62**, 689-692.
- Hatzakis E., 2019. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in food science: a comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **18**, 189-220.
- Herbert Pucheta J.E., 2019. Spectroscopy in wine industry (Eno-NMR): recent advances of nuclear magnetic resonance. *Org. Med. Chem. Int. J.* **8**, 555741.
- Hong Y.S., Cilindre C., Liger-Belair G., Jeandet P., Hertkorn N., Schmitt-Kopplin P., 2011. Metabolic influence of Botrytis cinerea infection in champagne base wine. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 7237-7245.
- Hu B., Gao J., Xu S., Zhu J., Fan X., Zhou X., 2020. Quality evaluation of different varieties of dry red wine based on nuclear magnetic resonance metabolomics. *Appl. Biol. Chem.* **63**, 24.
- Hu B., Yue Y., Zhu Y., Wen W., Zhang F., Hardie J., 2015. Proton nuclear magnetic resonance-spectroscopic discrimination of wines reflects genetic homology of several different grape (*V. vinifera* L.) cultivars. *PLoS One* **10**, e0142840.
- Imparato G., Paolo E.D., Braca A., Lamanna R., 2011. Nuclear magnetic resonance profiling of wine blends. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 4429-4434.
- Jacob D., Deborde C., Lefebvre M., Maucourt M., Moing A., 2017. NMRProcFlow: a graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics* **13**, 36.

- Kew W., Bell N.G.A., Goodall I., Uhrin D., 2017. Advanced solvent signal suppression for the acquisition of 1D and 2D NMR spectra of Scotch Whisky. *Magn. Reson. Chem.* **55**, 785-796.
- Kioroglou D., Mas A., Portillo M.C., 2020. Qualitative Factor-Based Comparison of NMR, Targeted and Untargeted GC-MS and LC-MS on the Metabolomic Profiles of Rioja and Priorat Red Wines. *Foods* **9**, 1381.
- Kjeldahl K., Bro R., 2010. Some common misunderstandings in chemometrics. *J. Chemom.* **24**, 558-564.
- Laghi L., Versari A., Marcolini E., Parpinello G., 2014. Metabonomic investigation by <sup>1</sup>H-NMR to discriminate between red wines from organic and biodynamic grapes. *Food Nutrition Sci.* **05**, 52-59.
- Le Mao I., Martin-Pernier J., Bautista C., Lacampagne S., Richard T., Da Costa G., 2021. <sup>1</sup>H-NMR metabolomics as a tool for winemaking monitoring. *Molecules* **26**, 6771.
- Lee J.-E., Hwang G.-S., Van Den Berg F., Lee C.-H., Hong Y.-S., 2009a. Evidence of vintage effects on grape wines using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic study. *Anal. Chim. Acta* **648**, 71-76.
- Lee J.E., Hong Y.S., Lee C.H., 2009b. Characterization of fermentative behaviors of lactic acid bacteria in grape wines through <sup>1</sup>H NMR- and GC-based metabolic profiling. *J. Agric. Food. Chem.* **57**, 4810-4817.
- Liu H.-F., Wu B.-H., Fan P.-G., Li S.-H., Li L.-S., 2006. Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 1526-1536.
- López-Rituerto E., Cabredo S., López M., Avenzoza A., Busto J.H., Peregrina J.M., 2009. A thorough study on the use of quantitative <sup>1</sup>H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *J. Agric. Food. Chem.* **57**, 2112-2118.
- López-Rituerto E., Savorani F., Avenzoza A., Busto J.H., Peregrina J.M., Engelsen S.B., 2012. Investigations of la Rioja terroir for wine production using <sup>1</sup>H NMR metabolomics. *J. Agric. Food. Chem.* **60**, 3452-3461.
- López-Rituerto E., Sørensen K.M., Savorani F., Engelsen S.B., Avenzoza A., Peregrina J.M., Busto J.H., 2022. Monitoring of the Rioja red wine production process by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.* **102**, 3808-3816.
- Magdas D.A., Pirnau A., Feher I., Guyon F., Cozar B.I., 2019. Alternative approach of applying <sup>1</sup>H NMR in conjunction with chemometrics for wine classification. *LWT-Food Sci. Technol.* **109**, 422-428.
- Martin-Pastor M., Guitian E., Riguera R., 2016. Joint NMR and solid-phase microextraction-gas chromatography chemometric approach for very complex mixtures: grape and zone identification in wines. *Anal. Chem.* **88**, 6239-6246.
- Mascellani A., Hoca G., Babisz M., Krska P., Kloucek P., Havlik J., 2021. <sup>1</sup>H NMR chemometric models for classification of Czech wine type and variety. *Food Chem.* **339**, 127852.
- Matviychuk Y., Haycock S., Rutan T., Holland D.J., 2021. Quantitative analysis of wine and other fermented beverages with benchtop NMR. *Anal. Chim. Acta* **1182**, 338944.
- Mazzei P., Francesca N., Moschetti G., Piccolo A., 2010. NMR spectroscopy evaluation of direct relationship between soils and molecular composition of red wines from Aglianico grapes. *Anal. Chim. Acta* **673**, 167-172.
- Mazzei P., Spaccini R., Francesca N., Moschetti G., Piccolo A., 2013. Metabolomic by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy differentiates "Fiano Di Avellino" white wines obtained with different yeast strains. *J. Agric. Food. Chem.* **61**, 10816-10822.
- Monakhova Y.B., Godelmann R., Hermann A., Kuballa T., Cannet C., Schäfer H., Spraul M., Rutledge D.N., 2014a. Synergistic effect of the simultaneous chemometric analysis of <sup>1</sup>H NMR spectroscopic and stable isotope (SNIF-NMR, <sup>18</sup>O, <sup>13</sup>C) data: application to wine analysis. *Anal. Chim. Acta* **833**, 29-39.
- Monakhova Y.B., Kuballa T., Lachenmeier D.W., 2013. Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products. *J. Anal. Chem.* **68**, 755-766.
- Monakhova Y.B., Tsikin A.M., Kuballa T., Lachenmeier D.W., Mushtakova S.P., 2014b. Independent component analysis (ICA) algorithms for improved spectral deconvolution of overlapped signals in <sup>1</sup>H NMR analysis: application to foods and related products. *Magn. Reson. Chem.* **52**, 231-240.
- Nyitrainé Sárdy Á.D., Ladányi M., Varga Z., Szövényi Á.P., Matolcsi R., 2022. The effect of grapevine variety and wine region on the primer parameters of wine based on <sup>1</sup>H NMR-spectroscopy and machine learning methods. *Diversity* **14**, 74.
- Ocaña-Rios I., Ruiz-Terán F., García-Aguilera M.E., Tovar-Osorio K., Miguel E.R.d.S., Esturau-Escofet N., 2021. Comparison of two sample preparation methods for <sup>1</sup>H-NMR wine profiling: Direct analysis and solid-phase extraction. *Vitis* **60**, 69-75.
- Papotti G., Bertelli D., Graziosi R., Silvestri M., Bertacchini L., Durante C., Plessi M., 2013. Application of one- and two-dimensional NMR spectroscopy for the characterization of Protected Designation of Origin Lambrusco wines of Modena. *J. Agric. Food. Chem.* **61**, 1741-1746.
- Pereira G.E., Gaudillère J.P., Van Leeuwen C., Hilbert G., Maucourt M., Deborde C., Moing A., Rolin D., 2007. <sup>1</sup>H-NMR metabolic profiling of wines from three cultivars, three soil types and two contrasting vintages. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **41**, 103-109.

- Picone G., Trimigno A., Tessarin P., Donnini S., Rombolà A.D., Capozzi F., 2016. <sup>1</sup>H NMR foodomics reveals that the biodynamic and the organic cultivation managements produce different grape berries (*Vitis vinifera* L. cv. Sangiovese). *Food Chem.* **213**, 187-195.
- Ragone R., Crupi P., Piccinonna S., Bergamini C., Mazzone F., Fanizzi F.P., Schena F.P., Antonacci D., 2015. Classification and chemometric study of Southern Italy monovarietal wines based on NMR and HPLC-DAD-MS. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 817-826.
- Riedl J., Esslinger S., Fahl-Hassek C., 2015. Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication. *Anal. Chim. Acta* **885**, 17-32.
- Rochfort S., 2005. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J. Nat. Prod.* **68**, 1813-1820.
- Rochfort S., Ezernieks V., Bastian S.E.P., Downey M.O., 2010. Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chem.* **121**, 1296-1304.
- Solovyev P.A., Fahl-Hassek C., Riedl J., Esslinger S., Bontempo L., Camin F., 2021. NMR spectroscopy in wine authentication: an official control perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **20**, 2040-2062.
- Son H.-S., Hwang G.-S., Kim K.M., Ahn H.-J., Park W.-M., Van Den Berg F., Hong Y.-S., Lee C.-H., 2009a. Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using <sup>1</sup>H NMR analysis coupled with multivariate statistics. *J. Agric. Food. Chem.* **57**, 1481-1490.
- Son H.-S., Kim K.M., van den Berg F., Hwang G.-S., Park W.-M., Lee C.-H., Hong Y.-S., 2008. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. *J. Agric. Food. Chem.* **56**, 8007-8016.
- Son H.S., Hwang G.S., Park W.M., Hong Y.S., Lee C.H., 2009b. Metabolomic characterization of malolactic fermentation and fermentative behaviors of wine yeasts in grape wine. *J. Agric. Food. Chem.* **57**, 4801-4809.
- Spraul M., Link M., Schaefer H., Fang F., Schuetz B., 2015. Wine analysis to check quality and authenticity by fully-automated <sup>1</sup>H-NMR. *BIO Web of Conferences* **5**, 02022.
- Spyros A., Dais P., 2013. CHAPTER 6 Chemometrics in food analysis, NMR spectroscopy in food analysis. The Royal Society of Chemistry, pp. 126-148.
- Triba M.N., Le Moyec L., Amathieu R., Goossens C., Bouchemal N., Nahon P., Rutledge D.N., Savarin P., 2015. PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Mol. Biosyst.* **11**, 13-19.
- Valls Fonayet J., Loupit G., Richard T., 2021. MS- and NMR-metabolomic tools for the discrimination of wines: Applications for authenticity. *Adv. Bot. Res.* **98**, 297-357.
- Viggiani L., Morelli M.A.C., 2008. Characterization of wines by nuclear magnetic resonance: A work study on wines from the Basilicata region in Italy. *J. Agric. Food. Chem.* **56**, 8273-8279.
- Vignoli A., Ghini V., Meoni G., Licari C., Takis P.G., Tenori L., Turano P., Luchinat C., 2019. High-throughput metabolomics by 1D NMR. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 968-994.
- Viskić M., Bandić L.M., Korenika A.M.J., Jeromel A., 2021. NMR in the service of wine differentiation. *Foods* **10**, 120.
- Wajzman N., Arias Burgos C., Davies C., 2016. The economic cost of IPR infringement in spirits and wine, in: EUIPO (Ed.), Alicante, Spain, p. 31.
- Wang B., Goodpaster A.M., Kennedy M.A., 2013. Coefficient of variation, signal-to-noise ratio, and effects of normalization in validation of biomarkers from NMR-based metabonomics studies. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **128**, 9-16.
- Wishart D.S., 2019. NMR metabolomics: A look ahead. *J. Magn. Reson.* **306**, 155-161.
- Zhang H., Hu B., Xu S., Zhu J., Zhao Q., Gao J., 2021. Quality evaluation of Cabernet Sauvignon wines in different vintages by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance-based metabolomics. *Open Chemistry* **19**, 385-399.
- Zhu J., Hu B., Lu J., Xu S., 2018. Analysis of metabolites in Cabernet Sauvignon and Shiraz dry Red wines from Shanxi by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with pattern recognition analysis. *Open Chemistry* **16**, 446.



## *Objectifs de thèse*





## **OBJECTIFS DE THESE**

Le but de cette thèse était de poursuivre le développement de l'utilisation de la RMN pour l'identité et l'authenticité des vins qui ont été initié dans le Laboratoire. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de la création au sein de l'ISVV de la plateforme VRAI (Vin Recherche Authenticité et Identité) en partenariat avec le CIVB concernant la traçabilité analytique des vins. La présente thèse a été réalisée en partenariat avec la société Baron Philippe de Rothschild, et plus précisément avec le Château Mouton Rothschild, dans le cadre d'une convention CIFRE.

L'objectif principal était d'étendre les domaines d'application de la métabolomique par RMN au service de l'œnologie. Deux principales pistes ont été poursuivies : (1) le développement de la métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  pour l'authenticité des vins ; (2) l'utilisation de la métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  pour l'analyse œnologique.

La première piste a conduit à continuer de développer l'approche métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  pour assurer la traçabilité des vins. Cette traçabilité passe par la création d'une base de données des signatures spectrales des grands vins de Bordeaux, en général, et des vins de la société Baron Philippe de Rothschild, en particulier. Cette base permettra de garantir l'authenticité des vins de la société et d'étudier la signature singulière et la typicité de ces vins. Des travaux concernant la validité de cette base de données dans le temps ont été menés. Ces travaux ne seront pas développés dans le présent manuscrit. Enfin, il s'agissait de pouvoir appliquer l'approche métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  d'autres types de vins (liquoreux, mousseux, etc.). Les résultats obtenus sur l'analyse des vins effervescents français sont présentés ici.

La seconde piste a conduit à étudier l'intérêt d'une approche métabolomique par RMN pour le suivi œnologique depuis la vendange jusqu'au produit final. Plusieurs aspects de la chaîne d'élaboration d'un vin ont été analysés : maturité de la vendange, type de fermentation, ajouts d'intrants, maturation en barriques. Ces travaux ont fait l'objet d'une collaboration spécifique avec la société Biolaffort concernant l'usage des enzymes et des agents de collage. Les principaux résultats obtenus sont présentés ici.



*Chapitre 1 :*  
*RMN  $^1\text{H}$  et authenticité des vins*



## CHAPITRE 1 : RMN $^1\text{H}$ ET AUTHENTICITE DES VINS

### I Objectifs et stratégie

De nombreuses études ont confirmé qu'il est possible d'utiliser la RMN  $^1\text{H}$  pour discriminer des vins en fonction de différents paramètres : cépage, origine géographique, millésime, etc. Des approches ciblées et non ciblées ont toutes deux été employées. Au cours de la thèse de Louis Gougeon, une nouvelle méthode d'analyse des vins utilisant la RMNq a été développée permettant de doser une trentaine de métabolites du vin. Cette approche a principalement été appliquée aux vins rouges (Gougeon, da Costa, Guyon, et al., 2019b). Un outils mathématique, basé sur l'analyses des scores de similarité (S-score) (Gallo et al., 2015), a été optimisé pour garantir l'authenticité d'un vin en prenant en compte l'évolution du vin en bouteille au cours du temps et les conditions de conservation (Gougeon, da Costa, Richard, et al., 2019a). Les résultats des analyses par RMNq obtenues se sont révélés complémentaires des méthodes d'analyses officielles acceptées par l'OIV (OIVa-OIVj) et ont conduit à la création d'une base de données. La garantie de l'authenticité d'un échantillon par RMN peut ainsi être réalisée par comparaison à l'échantillon authentique ou à la base de données.

Les résultats ont particulièrement intéressé la société Baron Philippe de Rothschild et plus particulièrement le Château Mouton Rothschild. En effet, leurs vins sont souvent la cible de contrefaçons et les méthodes d'analyses officielles des vins nécessitent d'importants volumes de vin.

Ce volet de la thèse avait pour but de développer trois axes majeurs : (1) la poursuite de l'identification et l'annotation des spectres RMN  $^1\text{H}$  ainsi que la validation des approches par quantification absolue, (2) la constitution d'une base de données des grands vins de bordeaux, (3) le développement de l'approche RMN pour d'autres types de vins.

### II Annotation et quantification des spectres RMN $^1\text{H}$

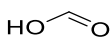
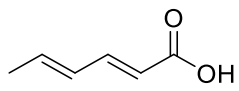
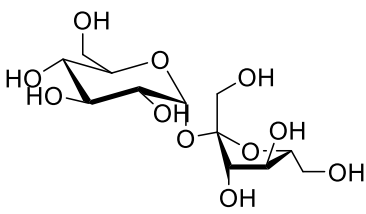
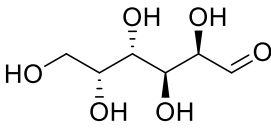
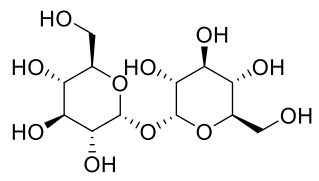
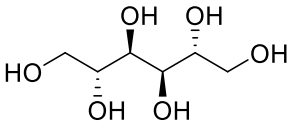
#### II.1 Annotation des spectres RMN $^1\text{H}$

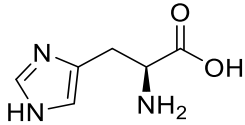
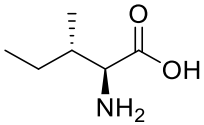
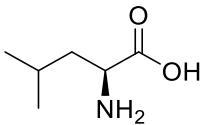
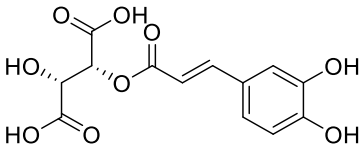
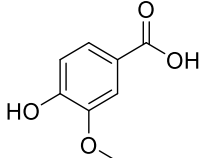
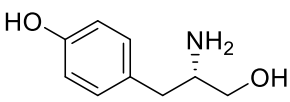
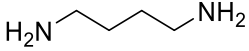
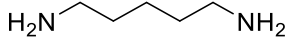
Suite à la thèse de Louis Gougeon, plus d'une trentaine de composés ont pu être dosés et quantifiés sur un vin rouge donné (Gougeon, da Costa, Guyon, et al., 2019a). Un des challenges des approches métabolomiques est de poursuivre le travail d'identification et d'annotation des spectres pour augmenter le nombre de métabolites analysés. Pour ce faire, à

partir des données de la littérature, des ajouts dosés ainsi que des expériences de RMN bidimensionnelle (notamment J-RES) ont été réalisés pour poursuivre le travail d'identification.

Ainsi, 13 métabolites ont été ajoutés aux composés déjà dosés : 2 acides organiques (acide formique et acide sorbique), 3 sucres (saccharose, galactose et tréhalose), 3 acides aminés (histidine, isoleucine et leucine), 3 composés phénoliques (acide caftarique, acide vanillique et tyrosol) et 2 amines biogènes (putrécine et cadavérine). Les structures, déplacements chimiques et constantes de couplage de ces métabolites sont reportés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Liste des composés identifiés avec leur structure chimique ainsi que le signal utilisé pour la quantification avec le déplacement chimique, la multiplicité, la constante de couplage et le nombre de protons.

Structure chimique	Composé	Signal RMN
	acide formique	8,36 ppm ( <i>s</i> ; CH)
	acide sorbique	5,82 ppm ( <i>d</i> ; 15,2 Hz ; CH)
	saccharose	5,39 ppm ( <i>d</i> ; 3,8 Hz ; CH)
	galactose	5,25 ppm ( <i>d</i> ; 3,65 Hz ; CH)
	tréhalose	5,17 ppm ( <i>d</i> ; 3,74 Hz ; CH)
	mannitol	3,84 ppm ( <i>dd</i> ; 11,9 - 2,8 Hz, CH <sub>2</sub> )

	histidine	8,65 ppm ( <i>d</i> ; 1,1 Hz ; CH)
	isoleucine	0,99 ppm ( <i>d</i> ; 7,0 Hz ; CH <sub>3</sub> )
	leucine	0,96 ppm ( <i>d</i> ; 6,2 Hz ; 2CH <sub>3</sub> )
	acide caftarique	6,42 ppm ( <i>d</i> ; 15,9 Hz ; CH)
	acide vanillique	6,97 ppm ( <i>d</i> ; 8,8 Hz ; CH)
	tyrosol	6,84 ppm ( <i>d</i> ; 8,5 Hz ; 2CH)
	Putrescine	1,75 ppm ( <i>m</i> )
	Cadaverine	1,70 ppm ( <i>m</i> )

## II.2 Quantification des métabolites

En parallèle du travail d'identification, le dosage par quantification absolue des métabolites nouvellement identifiés a été développé.

La quantification est réalisée à l'aide d'un étalon interne (formiate de calcium) dont la concentration est connue (1 g/L). Il permet de déterminer les concentrations de tous les métabolites identifiés grâce aux rapports des masses molaires et du nombre de protons des signaux intégrés.

Deux séquences d'impulsions différentes sont utilisées pour réaliser les analyses sur les vins (Gougeon, da Costa, Guyon, et al., 2019b). En effet, comme cela a été expliqué dans l'introduction bibliographique, la présence d'eau et d'éthanol va fortement masquer les autres



signaux. La première séquence (ZGPR) permet de supprimer le signal de l'eau par présaturation. La seconde séquence (NOESYGPPS1D) combine une présaturation du signal de l'eau et des impulsions sélectives et gradients pour affiner la suppression du signal de l'eau et supprimer les signaux de l'éthanol ( $\delta$  3,65 et 1,18 ppm).

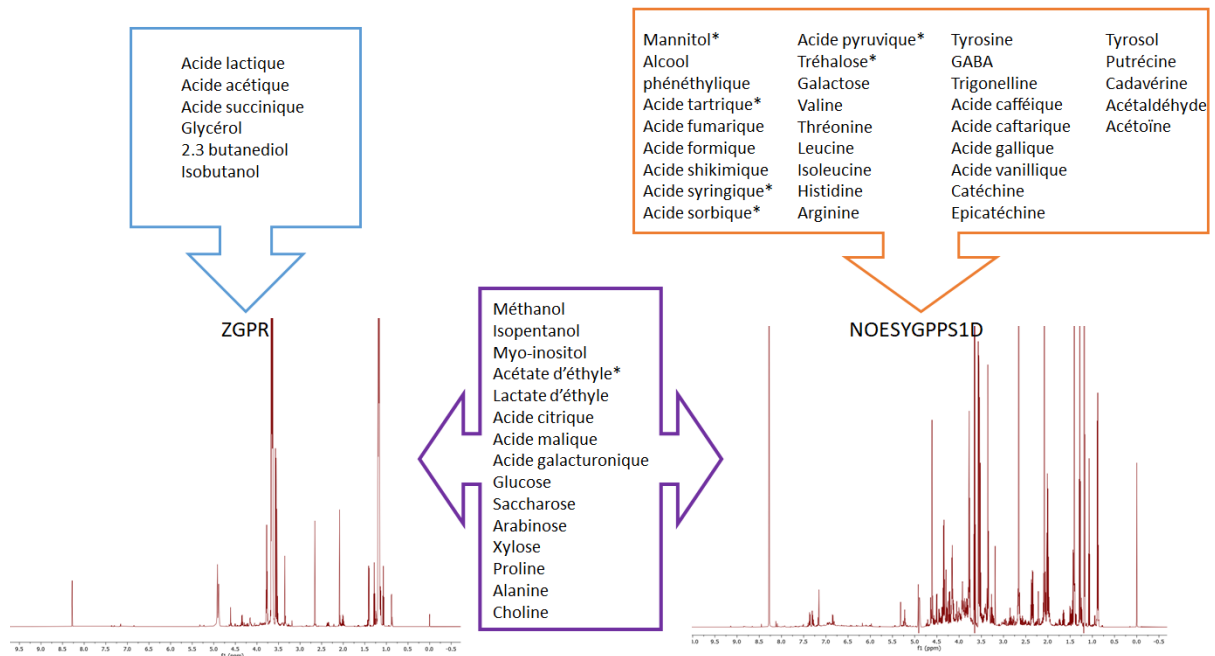


Figure 18 : Spectres RMN ZGPR et NOESYGPPS1D et composés dosés. L'astérisque représente les composés difficilement dosables mais identifiables en fortes concentrations.

Ces deux séquences impactent les résonances de plusieurs métabolites observés sur le spectre RMN, en particulier les signaux voisins des résonances supprimées. De plus la séquence ZGPR induit une déformation plus importante de la ligne de base. Cela nous a amené à évaluer l'effet de ces deux séquences sur les résonances des composés dosés et à définir la séquence à utiliser pour obtenir une quantification fidèle et exacte. La séquence ZGPR sera utilisée pour doser les composés suivants : acide lactique, acide acétique, acide succinique, glycérol, 2,3-butandiol, isobutanol. Certains composés peuvent être dosés sur la ZGPR ou sur la NOESYGPPS1D : méthanol, isopentanol, myo-inositol, acétate d'éthyle, lactate d'éthyle, acide citrique, acide malique, acide galacturonique, glucose, sucrose, arabinose, xylose, proline, alanine, choline. Les autres composés, en raison de leurs plus faibles teneurs, seront dosés sur la séquence NOESYGPPS1D (Figure 18) permettant d'obtenir un rapport signal/bruit plus grand.

Actuellement, 54 métabolites peuvent être recherchés dans un vin. Les signaux utilisés pour la quantification et les limites de détection et de quantification pour chaque métabolite dosé sont reportés dans le Tableau 5 .

Tableau 5: Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) exprimées en mg/L des 54 composés identifiés dans le vin.

Famille de composés	Composés	LOD (en mg/L)	LOQ (en mg/L)
Alcools et alcools supérieurs	éthanol	2	7
	2.3-butanediol	1	3
	glycérol	10	50
	méthanol	10	50
	mannitol	50	200
	myo-inositol	50	200
	isobutanol	10	50
	alcool phénéthylque	3	20
	isopentanol	20	80
Esters et aldéhydes	acétate d'éthyle	5	25
	lactate d'éthyle	10	50
	acétoïne	1	2
	acétaldéhyde	0,6	2
Sucres	arabinose	10	50
	fructose	34	100
	galactose	10	50
	glucose	40	120
	saccharose	5	25
	tréhalose	-	-
	xylose	5	25
Acides organiques	acide acétique	2	5
	acide citrique	3	10
	acide formique	1	3
	acide fumarique	1	3
	acide galacturonique	10	50
	acide lactique	40	120
	acide malique	50	250
	acide sorbique	1	3
	acide succinique	50	100
	acide syringique	-	-
	acide tartrique	35	120
	acide pyruvique	20	50
Acides aminés	alanine	3	10
	choline	5	20
	proline	60	200
	thréonine	2	5

	tyrosine	5	20
	valine	0,7	3
	arginine	5	20
	acide $\gamma$ -aminobutyrique	1	3
	histidine	1	3
	isoleucine	1	3
	leucine	5	15
	trigonelline	0,6	2
Composés phénoliques	acide caféique	3	10
	acide caftarique	3	10
	acide gallique	4	15
	acide shikimique	6	20
	acide vanillique	3	10
	catéchine	3	10
	épicatéchine	3	10
	tyrosol	5	20
Amines biogènes	putrécine	20	80
	cadavérine	20	80

Les quantifications sont ensuite réalisées à l'aide du logiciel MestReNova 14.0, où une base de données a été créée afin de pouvoir doser de façon semi-automatique tous les composés identifiés. Ce logiciel utilise un outil de déconvolution du spectre RMN (Cobas et al., 2011).

Il est important de souligner que parmi la liste des composés identifiés, certains se sont révélés difficilement quantifiables pour différentes raisons. Pour certains composés tels que l'acide syringique, l'acide pyruvique, le tréhalose et le mannitol, les signaux sont superposés à ceux d'autres composés. Les outils de déconvolution utilisés ne suffisent pas à pouvoir les intégrer, sauf si les concentrations sont très importantes. D'autres composés sont difficilement dosables comme l'acétaldéhyde ou l'acétate d'éthyle en raison de leur forte volatilité. Enfin, certains composés sont rarement, voire jamais, présents dans les vins mais ont été identifiés car ils sont des marqueurs d'altérations ou d'adultération, c'est le cas de l'acide sorbique, de l'acide formique, de la putrécine et de la cadavérine. Parmi les 54 métabolites identifiés, une quarantaine de composés sont généralement dosés.

### III Développement des bases de données des vins de bordeaux

#### III.1 Constitution d'une base de données grands vins de Bordeaux

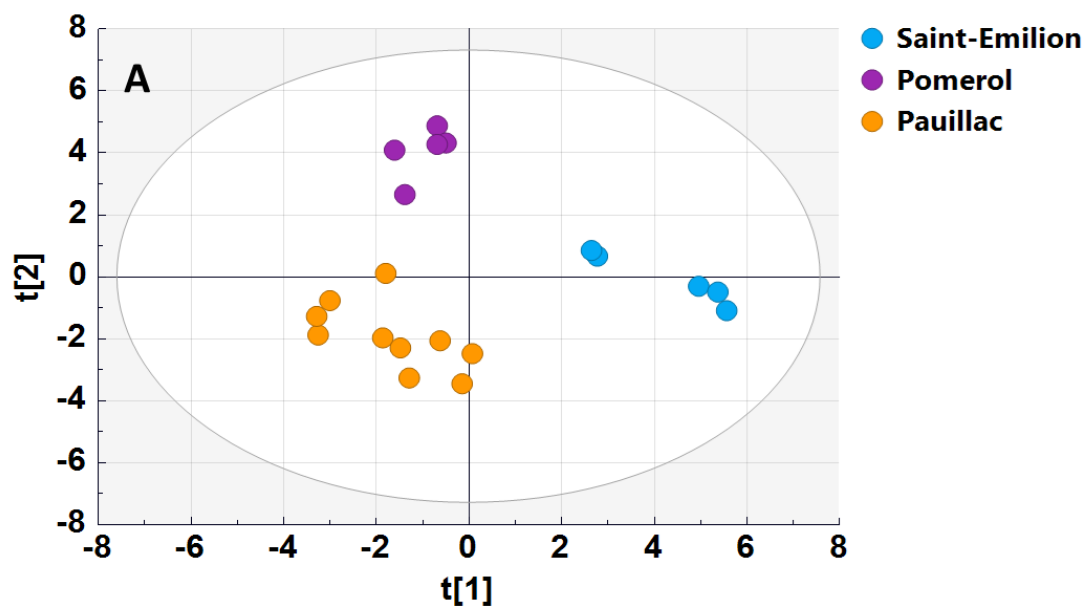
Les analyses de nombreux échantillons ont donné lieu à la création d'une base de données en 2018 afin de pouvoir conserver et comparer les résultats obtenus. L'objectif final étant de

pouvoir déterminer l'identité d'un vin par comparaison avec les données déjà acquises. Pour y parvenir, il est indispensable de collecter le plus d'échantillons possible afin de garantir la robustesse et la fiabilité des résultats. Lorsque j'ai commencé ma thèse, plus de 900 échantillons de toute la France avait déjà été analysés. Une étude portant sur les vins rouges a montré que les analyses par RMN <sup>1</sup>H ciblées permettaient de distinguer les vins à l'échelle de l'appellation (Gougeon, da Costa, Guyon, et al., 2019b).

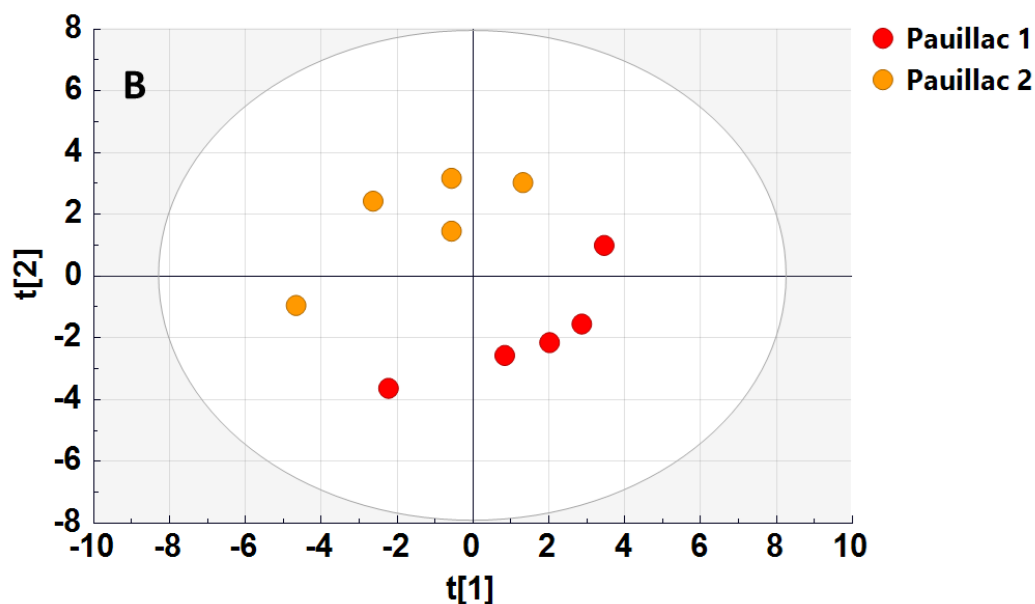
Dans ce contexte, en collaboration avec le Château Mouton Rothschild et la Société Baron Philippe de Rothschild, nous avons collectés des échantillons des vins de différentes propriétés de la région bordelaise sur plusieurs millésimes. Ces travaux nous ont permis de construire une base de données contenant les signatures spécifiques de chacune de ces propriétés.

Pour illustrer l'intérêt de la base donnée, la Figure 19 présente une analyse en composantes principales (ACP) obtenue à partir des données RMN des vins de quatre propriétés (2 en AOC Pauillac, 1 en AOC Saint-Emilion et 1 en AOC Pomerol) sur cinq millésimes différents de 2009 à 2013. Sur la Figure 19A une claire discrimination des trois appellations est observable, les deux propriétés de l'AOC Pauillac étant regroupées. Ce résultat confirme la capacité de la RMN métabolomique à classer les vins par appellation.

Les données quantitatives ont permis de confirmer les résultats de la littérature sur les métabolites discriminants et ainsi de mieux définir les profils chimiques de chaque région/appellation/château. Nous avons optimisé le protocole de validation des composés discriminant, ce qui nous permet de mieux cibler les métabolites impliqués dans les différences constatées.



$R^2X[1] = 0.274$ ;  $R^2X[2] = 0.254$ ; Ellipse: Hotelling's T2 (95%)



$R^2X[1] = 0.244$ ;  $R^2X[2] = 0.224$ ; Ellipse: Hotelling's T2 (95%)

Figure 19: Comparaison des données RMN de grands vins de Bordeaux. A) ACP obtenue à partir des données RMN des vins de quatre propriétés (2 en AOC Pauillac en orange, 1 en AOC Saint-Emilion en bleu et 1 en AOC Pomerol en violet) sur cinq millésimes différents de 2009 à 2013. B) ACP obtenue à partir de deux propriétés de Pauillac sur les mêmes millésimes.

Dans la Figure 19B, l'ACP a été réalisée en ne conservant que les vins de l'AOC Pauillac. Dans ce cas, il est possible d'observer une discrimination des deux propriétés de l'appellation. Les analyses par RMN  $^1\text{H}$  montrent une signature chimique propre à chaque propriété. A l'échelle d'une appellation, les causes des différences métabolomiques observées sont moins

nombreuses mais peuvent toujours être multifactorielle (cépages, composition chimique du sol, etc.). En effet, même si les propriétés sont soumises au même cahier des charges, elles peuvent réaliser des assemblages de cépages différents. En revanche, l'assemblage réalisé au sein d'une même propriété peut varier d'une année à l'autre. Les signatures chimiques de chaque château se distinguent ce qui montre que d'autres facteurs peuvent jouer un rôle dans les différences métabolomiques observées. Ces facteurs pourraient être la composition chimique du sol mais aussi les pratiques vitivinicoles. Pour confirmer ces hypothèses il serait intéressant de réaliser des études en collaboration avec plusieurs châteaux utilisant rigoureusement le même assemblage.

### III.2 Validité de la base de données dans le temps

Une des problématiques majeures pour l'analyse des vins et la garantie de l'authenticité concerne leur évolution dans le temps, liée à l'évolution naturelle des vins en bouteille et à leurs conditions de conservation. Précédemment, notre équipe a démontré que l'utilisation du Z-score permet de garantir l'authenticité d'un vin même pour de très vieux millésimes ayant subi des conditions de conservation différentes (Gougeon, da Costa, Richard, et al., 2019a). Au cours de ma thèse, nous avons voulu savoir si cet outil était toujours valable pour permettre une utilisation de la base de données dans le temps. Pour cela, une évaluation de la validité des analyses par RMN dans le temps a été initiée sur les vins d'une verticale du Château Mouton Rothschild allant de 1998 à 2017 (Figure 20).

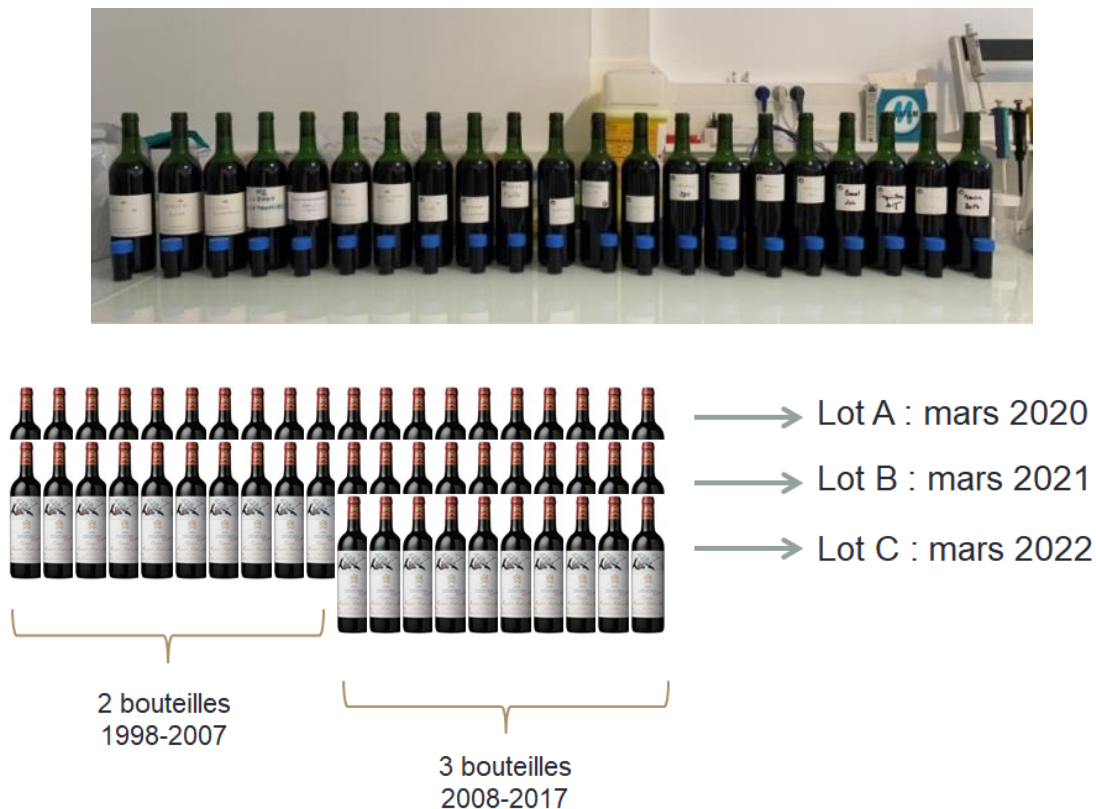


Figure 20 : Représentation de la verticale du Château Mouton Rothschild divisé en 3 lots.

### III.2.1 Stabilité dans le temps des vins

Pour évaluer la base de données et valider l'utilisation du Z-score, 50 bouteilles de vin fournies par le Château, représentant 20 millésimes différents, ont été étudiées. Chaque millésime a été fourni en double ou triple exemplaire (Figure 20). Les bouteilles en double exemplaires correspondaient aux millésimes allant de 1998 à 2007 et les bouteilles en triple exemplaire allaient des millésimes 2008 à 2017.

Comme présenté sur la Figure 20, les bouteilles ont été divisées en trois lots (A, B et C) et les premiers prélèvements de chaque lot ont été réalisés à un an d'intervalle.

Pour comparer les échantillons des trois lots, l'outil Z-score a été utilisé (Gougeon, da Costa, Richard, et al., 2019a). Brièvement cet outil permet de comparer des données quantitatives en intégrant une variation tolérée pour chaque composé en leur attribuant un score de similarité. La variation tolérée prend en compte l'évolution du vin et l'incertitude de mesure. D'après Gallo *et al.*, la différence entre les teneurs pour un composé est acceptable si le score correspondant est inférieur à 2, douteux entre 2 et 3 et irréfutable au-delà de 3. Avec cet outil,

il a été montré que deux échantillons sont significativement différents si le nombre total de Z-scores supérieurs à 2 est supérieur à quatre (Gougeon, da Costa, Richard, et al., 2019a).

Le Tableau 6 présente la comparaison des vins du Château Mouton Rothschild issus des millésimes 2008 à 2017, à l'aide du Z-score, sous forme d'une *heat-map* (vert < 4 métabolites significativement différents ; rouge > à 4 métabolites significativement différents).

Les résultats montrent que quel que soit le millésime, il n'y a pas de différences significatives entre les bouteilles d'un même millésime sur la durée de l'étude (3 ans). L'analyse de l'ensemble des millésimes montre que les millésimes sont globalement différents entre eux, et ce particulièrement pour les millésimes de 2008 à 2015. Les analyses semblent montrer que les millésimes récents sont plus homogènes car le nombre de métabolites dont le Z-score est supérieur à 2 est moins important. Des analyses complémentaires seraient nécessaires pour comprendre ce phénomène. Mais, il a été montré que la différence entre deux millésimes était intrinsèquement liée aux conditions spécifiques de chaque millésime (Gougeon, da Costa, Guyon, et al., 2019a).



Tableau 6: Heat map des Z-scores de la verticale du Château Mouton Rothschild de 2008 à 2017.

	2008-A	2008-B	2008-C	2009-A	2009-B	2009-C	2010-A	2010-B	2010-C	2011-A	2011-B	2011-C	2013-A	2013-B	2013-C	2014-A	2014-B	2014-C	2015-A	2015-B	2015-C	2016-A	2016-B	2016-C	2017-A	2017-B	2017-C
2008-A	0	1	2	6	7	7	6	6	9	9	9	9	7	12	7	6	6	7	11	8	7	6	8	6	9	9	10
2008-B	1	0	0	6	7	6	9	7	8	8	8	9	6	6	6	10	5	9	11	8	8	7	9	6	9	9	9
2008-C	2	0	0	5	7	6	7	6	8	6	7	7	6	9	4	8	7	8	11	9	9	8	10	7	8	7	9
2009-A	6	6	5	0	0	2	4	2	4	4	3	6	7	8	8	4	6	8	8	1	7	4	2	4	5	4	7
2009-B	7	7	7	0	0	2	5	1	5	4	4	5	9	9	7	6	5	10	11	1	8	5	2	6	9	7	8
2009-C	7	6	6	2	2	0	5	4	2	4	4	4	7	9	8	4	5	6	7	3	4	4	5	3	4	3	5
2010-A	6	9	7	4	5	5	0	2	0	7	8	4	9	11	7	2	4	5	3	2	3	3	4	1	3	3	4
2010-B	6	7	6	2	1	4	2	0	1	6	4	6	8	9	11	8	5	8	9	2	6	5	1	5	9	5	7
2010-C	9	8	8	4	5	2	0	1	0	7	7	5	10	10	10	2	4	4	4	1	2	1	1	1	3	3	4
2011-A	9	8	6	4	4	4	7	6	7	0	1	1	13	15	12	8	7	9	6	8	8	8	5	6	7	7	10
2011-B	9	8	7	3	4	4	8	4	7	1	0	2	11	10	10	8	8	10	13	8	9	9	9	8	7	8	11
2011-C	9	9	7	6	5	4	4	6	5	1	2	0	12	13	11	7	7	9	11	9	10	8	8	8	6	8	9
2013-A	7	6	6	7	9	7	9	8	10	13	11	12	0	1	0	9	8	12	11	6	6	11	8	9	7	6	7
2013-B	12	6	9	8	9	9	11	9	10	15	10	13	1	0	1	14	10	14	14	8	7	10	12	10	11	9	9
2013-C	7	6	4	8	7	8	7	11	10	12	10	11	0	1	0	10	10	9	11	6	6	10	10	7	7	8	6
2014-A	6	10	8	4	6	4	2	8	2	8	8	7	9	14	10	0	1	2	1	3	4	2	5	2	3	5	4
2014-B	6	5	7	6	5	5	4	5	4	7	8	7	8	10	10	1	0	0	4	3	4	3	4	3	4	4	6
2014-C	7	9	8	8	10	6	5	8	4	9	10	9	12	14	9	2	0	0	3	5	2	2	8	2	3	5	4
2015-A	11	11	11	8	11	7	3	9	4	6	13	11	11	14	11	1	4	3	0	2	2	2	7	2	4	8	6
2015-B	8	8	9	1	1	3	2	2	1	8	8	9	6	8	6	3	3	5	2	0	1	1	3	2	4	4	5
2015-C	7	8	9	7	8	4	3	6	2	8	9	10	6	7	6	4	4	2	2	1	0	2	5	0	4	6	4
2016-A	6	7	8	4	5	4	3	5	1	8	9	8	11	10	10	2	3	2	2	1	2	0	1	1	4	4	5
2016-B	8	9	10	2	2	5	4	1	1	5	9	8	8	12	10	5	4	8	7	3	5	1	0	2	7	5	9
2016-C	6	6	7	4	6	3	1	5	1	6	8	8	9	10	7	2	3	2	2	2	0	1	2	0	4	4	4
2017-A	9	9	8	5	9	4	3	9	3	7	7	6	7	11	7	3	4	3	4	4	4	4	7	4	0	1	0
2017-B	9	9	7	4	7	3	3	5	3	7	8	8	6	9	8	5	4	5	8	4	6	4	5	4	1	0	2
2017-C	10	9	9	7	8	5	4	7	4	10	11	9	7	9	6	4	6	4	6	5	4	5	9	4	0	2	0

### III.2.2 Stabilité dans le temps des échantillons prélevés

Les analyses précédentes ont été réalisées à l'aide de prélèvements d'échantillons avec un dispositif Coravin®. Nous avons donc en parallèle mené une étude sur l'impact de l'utilisation du coravin sur la composition chimique du vin. Le principe de cet outil est de prélever du vin à l'aide d'une seringue qui traverse le bouchon en liège et de remplacer le volume collecté par un gaz inerte (argon). Ce dispositif, sensé conserver le vin, est fréquemment utilisé au Château pour les dégustations requérant de faibles volumes de vin. Nous avons voulu vérifier que cet outil n'avait pas d'impact sur la composition chimique du vin détectable en RMN afin de déterminer, d'une part, si nous pouvions utiliser des bouteilles déjà « coravinées » pour garantir l'authenticité, et d'autre part, si cet outil pouvait permettre de conserver les bouteilles pour continuer les analyses pour la validité de la base de données dans le temps.

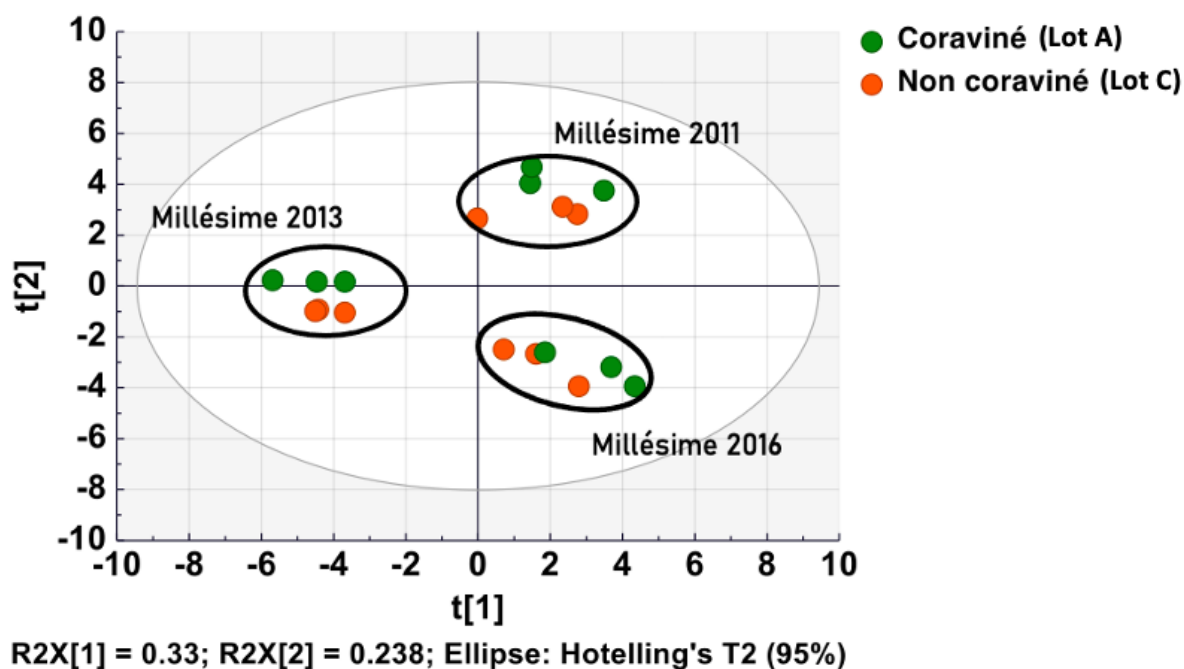


Figure 21 : ACP représentant les échantillons du lot A (bouteilles de vin « coravinées » pendant 2 ans avant l'analyse) et du lot C (bouteilles ouvertes au moment de l'analyse) pour trois millésimes différents de la verticale des vins de Mouton Rothschild.

Pour ce faire, nous avons comparé des échantillons provenant des bouteilles « coravinées » depuis deux ans (Lot A), dans lesquelles des prélèvements réguliers ont été effectués, à des échantillons dans des bouteilles jusqu'alors intactes (Lot C). Les données quantitatives

extraites des spectres RMN ont été comparées par analyses en composante principale. Un total de 43 métabolites différents a été dosé sur ces vins. Pour illustrer l'effet du Coravin, les échantillons issus de trois millésimes différents (2011, 2013 et 2016) sont comparés sur la Figure 21. Bien qu'un effet du Coravin semble apparaître entre les bouteilles du lot A « coravinées » et les bouteilles du lot C, les échantillons se distinguent toujours en fonctions du millésime et non pas par le fait qu'ils aient subi ou non des prélèvements réguliers avec le Coravin. Ces résultats indiquent que les prélèvements via Coravin n'altèrent pas l'empreinte métabolomique obtenue permettant de conserver les bouteilles de vins analysés pendant au moins deux ans pour garantir l'authenticité d'un vin.

### **IV Authenticité des vins mousseux**

Les travaux décrits précédemment portaient sur les problèmes d'authenticité des vins tranquilles. De par leur notoriété et leur forte valeur ajoutée, les vins pétillants, mousseux et plus particulièrement les champagnes, sont également la cible de contrefaçons. Alors que la RMN s'est révélée être un outil efficace pour garantir l'authenticité de vins de divers horizons, à notre connaissance, aucune ne s'est intéressée aux vins mousseux. Ainsi, nous avons transposé la méthodologie employée pour les vins tranquilles à d'autres types de vins tels que les vins mousseux.

#### **IV.1 Collecte des échantillons**

Dans le cadre d'un projet sur les vins mousseux mené avec le Professeur Gilles De Revel, nous avons eu accès à des vins provenant de différentes appellations françaises avec l'opportunité de les analyser par RMN.

L'échantillonnage était constitué de crémants provenant de Bordeaux, d'Alsace et de Bourgogne et d'une majorité de champagne ; avec une faible proportion de champagne rosés, des millésimés et des premiers crus. L'échantillonnage sur les crémants d'Alsace, Bourgogne et Bordeaux étant relativement faibles, des vins commerciaux ont été ajoutés à cette étude.

## IV.2 Problèmes spécifiques à la préparation des échantillons

Le développement de la méthode a nécessité quelques adaptations de la méthode utilisée sur les vins tranquilles. Ainsi, afin d'étudier les vins mousseux par RMN, il est nécessaire de s'affranchir de la présence de gaz pouvant fortement impacter la qualité des spectres. Plusieurs méthodes existent : agitation, sonication, etc. Au regard de la littérature, la sonication a été privilégiée par de nombreuses études portant sur la bière (Nord et al., 2004; Palmioli et al., 2020; Rodrigues et al., 2010). C'est pourquoi nous nous en sommes servis pour l'analyse des champagnes. Les durées de sonication reportées dans la littérature varient entre 10 et 20 minutes. Cependant la sonication peut altérer le vin. Nous avons donc réalisé une étude sur l'impact de la sonication sur la qualité des spectres RMN enregistrés. Plusieurs durées de sonication ont été utilisées sur une plage de 5 à 30 min,

L'échantillon de vin ayant été placé dans le bain à ultrasons pendant 5 min s'est révélé difficilement analysable (résolution et rapport signal sur bruit insuffisants) laissant penser une présence de dioxyde de carbone résiduelle. Les spectres obtenus après 10 min se sont tous révélés être identiques. De plus, les données quantitatives obtenues sur les 37 métabolites dosés sont similaires quelle que soit la durée de sonication utilisée (Tableau 7). Ce qui porte à croire que la sonication n'a pas ou peu d'influence sur la composition chimique détectable en RMN sur cette plage de temps.

Tableau 7: Données quantitatives (en mg/L) des 37 métabolites dosés dans un vin de champagne soumis à 5,10,15,20 et 30min de sonication.

Composé	5min	10 min	15 min	20 min	30 min	Moyenne	%var
éthanol (en % vol)	13,3	13,2	13,8	13,1	13,4	13,4 ± 0,3	2%
2.3-butanediol	1066,9	984,1	1015,5	962,0	1075,3	1020,7 ± 49,8	5%
glycérol	8683,8	9340,9	8964,7	9024,6	8400,6	8882,9 ± 356,7	4%
méthanol	25,3	26,0	25,4	24,9	25,0	25,3 ± 0,4	2%
myo-inositol	305,2	293,6	281,2	268,8	266,6	283,1 ± 16,4	6%
alcool phénéthylique	36,5	36,7	36,8	38,5	38,6	37,4 ± 1,1	3%
isopentanol	85,9	104,4	102,3	107,9	100,9	100,3 ± 8,5	8%
acétate d'éthyle	53,2	73,5	72,6	75,7	66,2	68,2 ± 9,1	13%
lactate d'éthyle	399,5	436,6	415,0	456,9	410,2	423,6 ± 23,0	5%
acétoïne	7,4	8,6	6,0	7,3	6,3	7,1 ± 1,0	15%
arabinose	60,5	59,4	53,9	55,1	55,3	56,8 ± 2,9	5%
fructose	5029,5	5902,8	5496,9	6085,6	5720,3	5647,0 ± 408,4	7%
galactose	14,6	17,8	17,6	13,4	13,6	15,4 ± 2,2	14%

glucose	1318,3	1442,2	1518,6	1558,7	1453,3	1458,2 ± 91,7	6%
xylose	129,3	137,8	132,2	150,6	143,8	138,7 ± 8,6	6%
acide acétique	396,8	400,9	406,6	398,9	392,1	399,0 ± 5,4	1%
acide citrique	169,4	192,6	182,1	206,1	217,0	193,4 ± 18,9	10%
acide galacturonique	103,2	113,3	107,0	127,8	123,0	114,9 ± 10,4	9%
acide lactique	2791,3	2766,2	2666,8	2700,1	2625,2	2709,9 ± 68,8	3%
acide malique	144,3	185,5	132,8	171,9	179,2	162,7 ± 23,0	14%
acide succinique	467,8	476,9	462,5	465,1	462,2	466,9 ± 6,0	1%
acide pyruvique	32,0	32,7	27,7	34,0	36,2	32,5 ± 3,1	10%
alanine	67,2	81,4	57,2	83,2	73,7	72,5 ± 10,7	15%
choline	2,1	2,3	2,4	2,0	1,7	2,1 ± 0,3	12%
proline	202,0	252,9	183,4	260,9	229,6	225,7 ± 32,9	15%
threonine	5,3	5,1	4,9	5,4	4,6	5,0 ± 0,3	6%
tyrosine	11,6	15,4	13,4	16,3	16,5	14,6 ± 2,1	15%
valine	5,0	6,9	5,1	6,5	5,0	5,7 ± 0,9	16%
acide γ-aminobutyrique	98,0	118,1	98,5	117,7	111,1	108,7 ± 9,9	9%
histidine	8,4	10,9	9,2	10,5	9,5	9,7 ± 1,1	10%
isoleucine	4,4	4,7	4,3	5,3	4,4	4,6 ± 0,4	9%
leucine	7,3	8,1	7,5	7,8	7,5	7,7 ± 0,3	4%
trigonelline	19,3	20,9	17,1	19,1	17,9	18,8 ± 1,5	8%
acide gallique	62,0	69,5	67,3	75,2	61,5	67,1 ± 5,7	8%
acide shikimique	42,3	55,7	43,9	51,6	52,0	49,1 ± 5,7	12%
tyrosol	8,8	11,1	9,8	11,9	11,6	10,6 ± 1,3	12%

Ces résultats nous ont permis d'établir les conditions expérimentales suivantes : 15 minutes de sonication puis une préparation similaire à celle des vins tranquilles suivis d'une centrifugation pendant 3 minutes à 10000 tpm. Les surnageants sont ensuite mélangés avec 20 % (vol/vol) de tampon phosphate à 200mM et 10 % (vol/vol) de solvant deutéré (D<sub>2</sub>O) contenant 76 mM de formiate de calcium (référence de quantification) et 4 mM TMPS (référence de calibration).

### IV.3 Publication

Les résultats obtenus concernant l'analyse des vins mousseux français sont présentés dans l'article suivant : « **Application of targeted <sup>1</sup>H-NMR metabolomics to French sparkling wines** », soumis pour publication dans le journal Food Control, le 10 juin 2022.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Application of <sup>1</sup>H NMR metabolomics to French sparkling wines

Inès Le Mao, Grégory Da Costa, Charlyne Bautista, Gilles de Revel, Tristan Richard\*

Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, UMR OENO, UMR 1366, ISVV, F-33140, Villenave d'Ornon, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sparkling wines  
Champagne  
Crémant  
Authenticity  
<sup>1</sup>H NMR  
Metabolomics

### ABSTRACT

Production and consumption of sparkling wines are constantly increasing and are confronted with substantial fraud problems. Last two decades have seen a significant increase in studies on wine metabolomics. In contrast, few metabolomics studies have focused on sparkling wines. A targeted approach based on <sup>1</sup>H NMR metabolomics was applied to study profiles of commercial French sparkling wines from four protected designation of origin (PDO): Champagne, Crémant d'Alsace, Crémant de Bourgogne and Crémant de Bordeaux. The collected data were statistically processed by principal component analysis (PCA) and partial orthogonal least squares discriminant analysis (OPLS-DA). For origin and quality discrimination, significant discriminating metabolites were identified based on variable importance in projection (VIP) and correlation coefficient (p-corr) values. The results showed that <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics combined with multivariate statistical analysis is an effective tool to discriminate commercial sparkling wines and sparkling wine quality. In addition, the targeted approach allowed identifying specific markers of each PDO.

### 1. Introduction

According to the latest report published by the International Organisation of Vine and Wine (OIV, 2020), world production and consumption of sparkling wines has increased significantly. Indeed, numbers show that over the last few years production has increased by 57% and consumption by 18%, France being the second largest producer of sparkling wines with 4.4 MhL. Champagne is the main sparkling wine produced in the country representing 61.5% of the total volume and one of the world's most prestigious sparkling wine. Champagne wines are produced using the traditional method also called "méthode champenoise" (Decree n° 2010-1441 of November 22, 2010 for Champagne PDO). This process consists in adding to the wine after bottling a liqueur (a sweet blend containing yeast and old wine), which leads to a second fermentation in the bottle. Then follows at low temperatures a stage of aging on lees (dead yeast after the second fermentation) which varies according to the specific rules of each protected designation of origin (PDO) (Jones, Kerlake, Close, & Dambergs, 2014). Some Champagnes wines may be labeled as "Premier cru" and "Grand cru". These labels refer to a qualitative classification of the communes of the Champagne region. In recent years, other French sparkling wines have increased their market share. The distinction comes from the fact that according to the regulation, only wines from the Champagne region can claim the appellation (Decree n° 2010-1441 of November 22, 2010 for

Champagne PDO). In France, the term "Crémant" refers to sparkling wines produced according to the traditional method in regions other than Champagne. It concerns eight French areas including Alsace, Bordeaux and Burgundy.

In its latest report on spirits and wine, the European Union intellectual property office (EUIPO) estimates that 2.3% of consumed wines are counterfeit for an amount exceeding 500 million euros per year (Wajzman, Arias Burgos, & Davies, 2016). To these direct costs, there also effects on other economic sectors estimated to more than 600 million euros. Beyond the problems of consumer confidence, image of wines and public health, the total economic loss due to wine counterfeiting amounts to one billion euros per year. In order to solve this problem, scientists have been looking for provenance markers of sparkling wines (Carlin et al., 2016; Epova et al., 2020; Izquierdo-Llopert & Saurina, 2021). Classical strategies to control wine authenticity are based on different chemical approaches including organoleptic testing, traditional liquid and gas chromatographic methods, mass spectrometry, NMR, RAMAN and ultra-low radioactivity (Medina et al., 2013). Recently, NMR-based metabolomics has emerged as a powerful tool to ensure the traceability of still wines (Amargianitaki & Spyros, 2017; Sobolev et al., 2019; Valls Fonayet, Loupit, & Richard, 2021). NMR is a non-destructive technique that can identify and quantify different classes of wine constituents in a single experiment. Additionally, it is highly repeatable and accurate over a wide dynamic range. Targeted or

\* Corresponding author.

E-mail address: [tristan.richard@u-bordeaux.fr](mailto:tristan.richard@u-bordeaux.fr) (T. Richard).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109423>

Received 15 June 2022; Received in revised form 8 September 2022; Accepted 2 October 2022

Available online 18 October 2022

0956-7135/© 2022 Published by Elsevier Ltd.

non-targeted approaches can be used to establish the chemical profile of a wine and ensure its authenticity (Solovyev et al., 2021). This complementary approach to classical analyzes makes it possible to guarantee wine traceability from a small volume of wine (Gougeon, Da Costa, Guyon, & Richard, 2019; Gougeon, Da Costa, Richard, & Guyon, 2019).

In this study, <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics was applied to the classification of French commercial sparkling wines. Champagne wines were compared to Crémant wines from three PDO: Crémant de Bordeaux, Crémant de Bourgogne and Crémant d'Alsace. Wine NMR spectra were analyzed by a targeted approach followed by multivariate statistical analysis. In addition, an attempt to classify champagne wines according to different collected criteria was investigated (grape variety, wine color, specific label of quality and vintage).

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and solvents

Deuterium oxide (D<sub>2</sub>O, 99.9%) and 3-(trimethylsilyl)propanoic-2,2,3,3-d<sub>4</sub> acid sodium salt (TMSP, > 98%) were purchased from Euriso-Top (Cambridge Isotop Laboratories, Inc, France). Calcium formate (FCa, 99.9%), sodium phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 96%), orthophosphoric acid 85% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, >99%), sodium hydroxide (NaOH, > 98%) and hydrochloric acid 37% (HCl, > 99%) were obtained from (Sigma-Aldrich, Germany).

### 2.2. Sample collection

A total of 77 French commercial sparkling wines (Table 1S) were collected from four different areas: Champagne (n = 50), Crémant d'Alsace (n = 13), Crémant de Bourgogne (n = 7) and Crémant de Bordeaux (n = 7). All sparkling wines were analyzed under a week after bottle opening.

### 2.3. Sample preparation

After opening the bottles, sparkling wines were degassed by sonication for 15 min at room temperature. After this first step, samples were prepared as in our previous work (Gougeon, Da Costa, Guyon, & Richard, 2019). Samples underwent a centrifugation step for 3 min at 10,000 rpm. 700 µL of wine was taken and mixed with 200 µL of phosphate buffer (1 M, pH 2.6), and 100 µL of deuterated water containing 0.5 mM TMSP and 7 mM FCa. The pH is then adjusted to 3.1 with a semi-automatic system (BTpH, Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) using a 1 M HCl or NaOH solutions.

### 2.4. <sup>1</sup>H NMR spectra acquisition

<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on an Avance III spectrometer (Bruker, France) operating at 600.27 MHz, equipped with a 5 mm TXI probe with z-gradient coils. Measurements were performed at 293 K, using the TopSpin 4.0.8 software (Bruker). Experiments were performed without sample rotation. Automated shimming was used followed by manual adjustment to have a line width at half maximum of less than 2 Hz for TMSP signal. Pulse calibration was performed before each sample. Two sequences were used for spectra acquisition, as indicated in our previous study (Gougeon, Da Costa, Guyon, & Richard, 2019). The first experiment, 1D proton spectrum was obtained using water suppression sequence (zgpr) with 8 scans (2 dummy scans). The second one, multi-solvent suppression based on 1D-NOESY experiment (noesygppps1d), aimed to suppress water (δ 4.80 ppm) and ethanol signals (δ 3.64 and 1.17 ppm), and was set to 32 scans (4 dummy scans) with mixing time 100 ms. For both sequences, Free Induction Decay (FID) signals are collected in a time domain (TD) of 65.536 data points, with a spectral width (SW) of 16 ppm, an acquisition time (AQ) of 3.40 s and a relaxation time (RD) of 5 s.

The FIDs were then multiplied by an exponential function corresponding to a baseline broadening factor of 0.3 Hz before Fourier transformation. Phase was manually corrected and spectra were aligned using TMSP signal (δ = 0 ppm). Wine constituent quantification was performed on the MestReNova 14.0.0 software (Mestrelab Research, Spain), thanks to the external module Simple Mixture Analysis (SMA). A library created by the laboratory allows a semi-automatic quantification of thirty-five compounds (Gougeon et al., 2018; Le Mao et al., 2021). Compounds affected by suppression of ethanol signals were quantified using the suppression sequence: ethanol, methanol, glycerol, succinic acid, acetic acid, lactic acid, ethyl lactate, myo-inositol, 2,3-butanediol and isobutanol.

### 2.5. Statistical analysis

The statistical analyses were achieved using SIMCA 16.0.1 software (Sartorius, Germany). No preprocessing was applied before statistical analysis. Data were centered and scaled to unit variance using the default procedure of SIMCA. A principal component analysis (PCA) was first performed to visualize the distribution of the dataset and identified possible outliers to exclude them of further statistical analysis. A maximum of three principal components were used. For each PCA model, the percentage of variance both explained and predicted (R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup>, respectively) were reported. An orthogonal projection to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) was then performed (Wheelock Å & Wheelock, 2013; Worley & Powers, 2016). The results of these analyses are represented in the form of a graph showing the distribution of the samples in a two-dimensional space. A Hotelling T<sup>2</sup> ellipse indicates the 95% confidence zone. The quality of all these analyses is described by a R-squared (R<sup>2</sup>) and a Q-squared (Q<sup>2</sup>) values. R<sup>2</sup> represents the goodness of fit or explained variation, and Q<sup>2</sup> represents the prediction quality or predicted variation. For each analysis, a cross-validation procedure was performed to validate the ranking of the samples. The loadings graph was then generated where the potential discriminating metabolites were identified by crossing their variable importance in projection (VIP) with their correlation coefficient (p-corr). Metabolites with absolute VIP and p-corr values greater than 1.0 and 0.5, respectively, were considered as potential discriminant compounds. Analysis of variance (ANOVA) or Student's t-test was performed for determination of compounds with significant variation using Graphpad Prism 9.1.0 (GraphPad Software, USA). For variables not following a normal distribution, non-parametric test was used (Mann Whitney's or Kruskal-Wallis's tests).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sparkling wine selection, sample preparation, data acquisition and pre-processing

In this study, targeted <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics experiments were performed to discriminate French commercial sparkling wines. The sparkling wines investigated are listed in Table S1. A total of 77 sparkling commercial French wines were analyzed: 50 wines of Champagne (39 whites, 11 rosés, 10 Cru and 9 vintages); 27 wines of Crémant from three French Crémant controlled designations of origin including 13 Crémant d'Alsace, 7 Crémant de Bourgogne and 7 Crémant de Bordeaux.

Before <sup>1</sup>H NMR spectra acquisition, wine samples were degassed for 15 min (Duarte et al., 2003; Nord et al., 2004). Experiments were done to adapt the sonication duration to remove dissolved gases without wine content alteration (data not shown). For acquisition of the <sup>1</sup>H NMR data, a set of two 1D-NMR experiments were performed (Gougeon et al., 2018; Le Mao et al., 2021). First, a basic <sup>1</sup>H NMR pre-saturation experiment was used to suppress the water signal. This experiment allows the quantification of ten wine constituents: ethanol, methanol, glycerol, succinic acid, acetic acid, lactic acid, ethyl lactate, myo-inositol, 2, 3-butanediol and isobutanol. Secondly, a multi-solvent suppression

based on 1D-NOESY experiment, was used to suppress water and ethanol signals. Finally, a total of thirty-five wine constituents (Table 2) were identified and quantified in sparkling wines including 8 alcohols (2, 3-butanediol, ethanol, isoamyl alcohol, myo-inositol, methanol, iso-butanol, glycerol, phenetyl alcohol), 7 amino acids (leucine, valine, threonine, alanine, proline,  $\gamma$ -aminobutyric acid and tyrosine), 8 organic acids (lactic, acetic, pyruvic, succinic, malic, citric, tartaric and galacturonic acids), 3 phenolic compounds (shikimic acid, tyrosol and gallic acid), 4 sugars (fructose, arabinose, xylose and glucose), and 5 others compounds (acetoin, ethyl lactate, choline, ethyl acetate and trigonelline). <sup>1</sup>H NMR spectra were directly processed using the simple mixture analysis (SMA) module of the software MestReNova. Metabolite quantification was performed semi-automatically using global spectral deconvolution method (Cobas, Seoane, Domínguez, Sykora, & Davies, 2011). All the data collected from targeted analyses were exported as an Excel XML file in SIMCA software to perform multivariate analyses.

3.2. Comparison of champagne versus Crémant wines

The ability of targeted <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics was evaluated to distinguish Champagne from Crémant wines. For that, wines of Champagne were gathered (n = 50) and compared to all Crémant wines (n = 27).

In this first trial, unsupervised principal component analysis (PCA) and supervised orthogonal projection to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) were applied to the data matrix obtained from analysis of NMR spectrum. In the first step, PCA was used to visualize the distribution of the dataset. The PCA score plot (Fig. 1A) showed significant separation between Champagne and Crémant, although an overlapping between the two wine classes is observed (R<sup>2</sup>X = 0.397 and Q<sup>2</sup> = 0.151). The first two principal components (PCs) explain 31% of the variance between the two wine classes. The values obtained are relatively low but of the same order of magnitude as those observed in the literature for this kind of study (Palmioli, Alberici, Ciaramelli, & Airoidi, 2020). The loss of information may be due to the dataset heterogeneity of the sampling. To further analysis, four observations were discarded as outliers (two Champagne and two Crémant wines) based on the DModX plot (DModX value > DCrit limit of 0.05). In the second step, supervised

**Table 1**  
Performance and validation results of OPLS-DA models. Discrimination of Champagne versus Crémant wines, Crémant wines (Alsace, Bordeaux and Bourgogne), wine color (white versus rosé Champagne wines) and grape varieties used in Champagne area (Chardonnay versus Pinot).

Model parameters	Champagne vs Crémant	Crémants	Color	Grape variety
No of observations	73	26	50	20
R <sup>2</sup> X	0.355	0.522	0.208	0.235
R <sup>2</sup> Y	0.931	0.931	0.737	0.916
Q <sup>2</sup>	0.831	0.646	0.565	0.633
NC <sup>a</sup>	1 + 3+0	2 + 3+0	2 + 3+0	1 + 1+0
Permutation tests (R <sup>2</sup> ; Q <sup>2</sup> )	0.352; - 0.661	0.675; - 0.924 (Alsace) 0.693; - 0.847 (Bordeaux) 0.687; - 0.815 (Bourgogne)	0.392; - 0.526	0.681; - 0.503
CV-ANOVA	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
ROC <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Fisher's probability	1.5 × 10 <sup>-21</sup>	2.9 × 10 <sup>-11</sup>	1.1 × 10 <sup>-9</sup>	7.9 × 10 <sup>-6</sup>
CCR (%) <sup>c</sup>	100%	100%	100% (white) 91% (rosé)	100%

<sup>a</sup> NC: No. of components.

<sup>b</sup> ROC: area under the (ROC) curve (AUC).

<sup>c</sup> CCR: correct classification rate.

**Table 2**

List of compounds quantified, chemical shifts and coupling constants used for compound quantification, minimal and maximal values in sparkling wines in mg/L.

Class	Name	$\delta_H^1$ (multiplicity, J in Hz, assignment)	Min	Max	
Alcohols	ethanol	1.17 (t, 7.2, CH <sub>3</sub> )	11%	16%	
	isoamyl alcohol	1.64 (m, CH)	vol	vol	
	myo-inositol	3.26 (t, 9.7, CH)	30	175	
	methanol	3.35 (s, CH <sub>3</sub> )	211	570	
	isobutanol	3.37 (d, 6.7, CH <sub>2</sub> )	19	70	
	phenethyl alcohol	7.33 (m, 5CH)	21	349	
	Amino acids	leucine	0.95 (d, 6.2, 2CH <sub>3</sub> )	nq	69
		valine	1.04 (d, 7.3, CH <sub>3</sub> )	nq	49
		threonine	1.32 (d, 6.7, CH <sub>3</sub> )	nq	22
		alanine	1.50 (d, 7.2, CH <sub>3</sub> )	nd	28
proline		1.99 (m, CH <sub>2</sub> )	5	214	
$\gamma$ -aminobutyric acid		2.50 (t, 7.3, CH <sub>2</sub> )	83	376	
tyrosine		6.88 (m, 8.4, 2CH)	nq	129	
Organic acids	lactic acid	1.40 (d, 7.0, CH <sub>3</sub> )	4	35	
	acetic acid	2.08 (s, CH <sub>3</sub> )	86	4258	
	pyruvic acid	2.37 (d, 7.3, CH <sub>3</sub> )	19	507	
	succinic acid	2.65 (s, 2CH <sub>2</sub> )	nq	62	
	malic acid	2.89 (dd, 16.3, 4.5, CH)	219	731	
	citric acid	2.95 (d, 15.6, CH <sub>2</sub> )	nq	6149	
	tartaric acid	4.59 (s, 2CH)	nq	327	
	gallic acid	7.15 (s, 2CH)	799	4204	
Phenolics	tyrosol	6.85 (m, 8.4, 2CH)	nd	61	
	2,3 butandiol	1.13 (d, 6.2, 2CH <sub>3</sub> )	5	49	
Polyols	glycerol	3.55 (dd, 11.8, 6.5, CH <sub>2</sub> )	468	1290	
	fructose	4.01 (dd, 12.8, 1.0 CH <sub>2</sub> )	6135	9769	
Sugars	arabinose	4.50 (d, 7.7, CH)	271	7179	
	xylose	4.50 (d, 7.7, CH)	23	146	
	glucose	5.17 (d, 3.8, CH)	nq	143	
	acetoin	5.23 (d, 3.8, CH)	91	2748	
	Others	ethyl acetate	1.36 (d, 7.0, CH <sub>3</sub> )	nq	24
choline		2.07 (s, CH <sub>3</sub> )	14	82	
ethyl lactate		3.19 (s, 3CH <sub>3</sub> )	1	14	
galacturonic acid		4.21 (q, 7.06, CH)	155	702	
shikimic acid		5.32 (d, 3.8, CH <sub>1</sub> )	78	275	
trigonellin		6.81 (dt, CH)	nq	72	
		9.16 (s, CH)	9	22	

nd: not detected; nq: not quantified.

OPLS-DA was performed to maximize the separation between Champagne and Crémant wines. The score plot (Fig. 1B) coupled with validation and permutation protocols confirmed the ability to discriminate the two wine classes. Model performances were summarized in Table 1. The relevant R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y and Q<sup>2</sup> were used to evaluate the model. R<sup>2</sup>X and R<sup>2</sup>Y represent the goodness of fit and Q<sup>2</sup> the goodness of prediction. Generally, Q<sup>2</sup> > 0.5 is considered as good and a difference between R<sup>2</sup>Y and Q<sup>2</sup> < 0.3 is recommended in metabolomics (Li et al., 2017). A satisfactory discrimination of the two wine classes was obtained with R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y and Q<sup>2</sup> values of 0.355, 0.931 and 0.832, respectively. Furthermore, permutation test (100 times) and CV-ANOVA were used to control model predictive ability and statistical significance (Yuan et al., 2020). All permuted R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup> values were lower the initial ones (Fig. 1C), the intercepted R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup> values in the Y axis were <0.5 and < 0, respectively, and p-values of CV-ANOVA was <0.05 (Fig. 1C), indicating that the OPLS-DA fit well. Finally, the model predictive ability was confirmed by the classification rate (CCR) and the AUC values from the ROC curves (100% and 1.0, respectively).

<sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with a targeted approach enables to correctly discriminate between Champagne and Crémant sparkling wines. Based on OPLS-DA model from targeted <sup>1</sup>H NMR data, the discriminant metabolites between Champagne and Crémant wines were identified. For this purpose, VIP and p-(corr) parameters were used (Le Mao et al., 2021), wine constituents presenting absolute VIP and p-(corr) values greater than 1.0 and 0.5, respectively, were selected as potential markers of wine. Additionally, the identified metabolites were checked



by unpaired *t*-test or Mann-Whitney's test. Only compounds with *p*-value < 0.05 were highlighted (Fig. 2D). Using this protocol, a total of 12 compounds were identified including one alcohol (myo-inositol), two organic acids (lactic acid and succinic acid), one phenolic (gallic acid), five amino acids (tyrosine,  $\gamma$ -aminobutyric acid, alanine, threonine and valine) and three others compounds (ethyl lactate, choline, trigonelline). These compounds have a significant influence to discriminate the two wine classes. Among these compounds, we notice that amino acids are widely represented. Alanine,  $\gamma$ -aminobutyric acid, tyrosine, valine, threonine are present in higher quantity in Champagne wines. Additionally, Champagne wines contain more lactic acid, ethyl lactate and gallic acid while there is more choline, succinic acid, trigonellin, myo-inositol and phenyl alcohol in Crémant wines. Interestingly, gallic and lactic acids were recently identified as markers of Cava sparkling wines (Izquierdo-Llopert & Saurina, 2021).

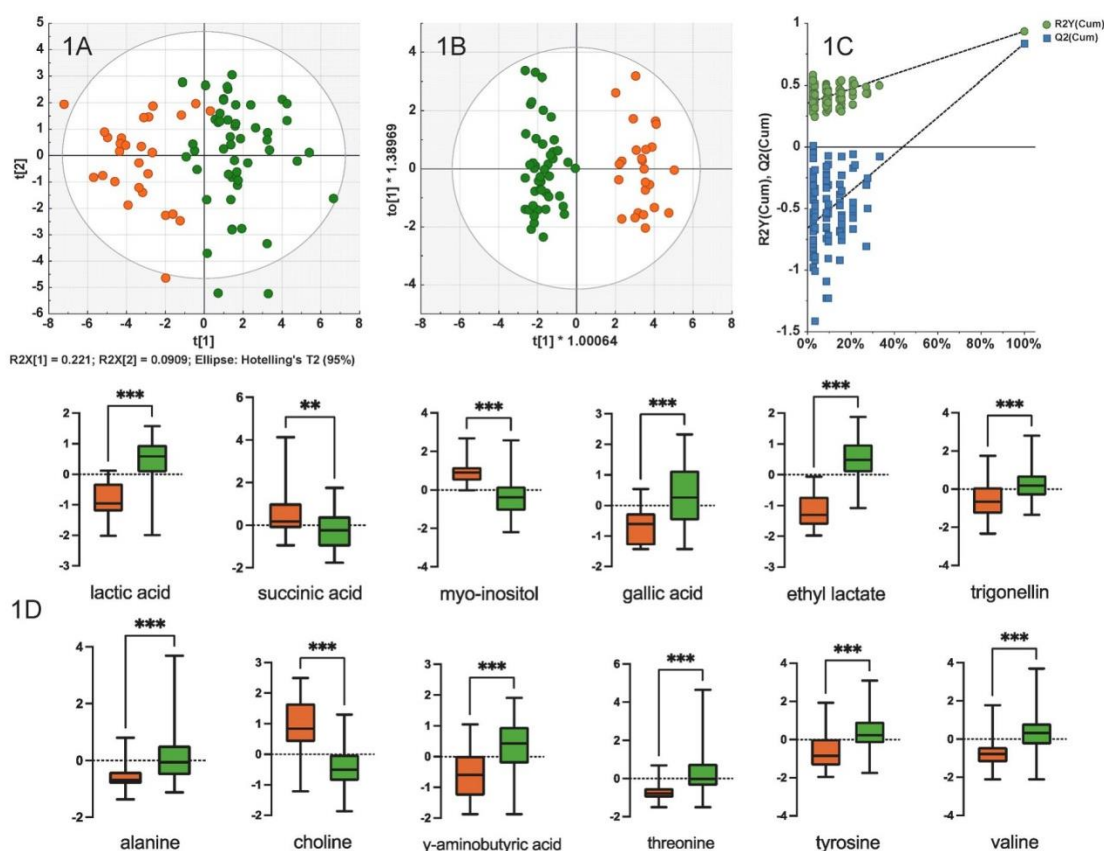
To our knowledge, no comparative study has been done on the metabolic profiles of these sparkling wines. Our results indicate that targeted NMR-based metabolomics is able to discriminate Champagne wines from other French sparkling wines. In addition, targeted analysis pointed out specific markers of Champagne wines. Several studies have been conducted on still wines and have shown that many parameters can influence wine's chemical composition, and this can be transposed to sparkling wines (Amargianitaki & Spyros, 2017; Gougeon, Da Costa, Guyon, & Richard, 2019). Champagne appellation is subject to many rules for wine growers and winemakers. First of all, the grapes must be grown in the wine region from which it takes its name. Moreover, only seven grape varieties (Arbane, Chardonnay, Pinot meunier, Petit meslier, Pinot blanc, Pinot gris and Pinot noir) are authorized for the

elaboration of Champagne wine. Chardonnay, Pinot noir and Pinot meunier are the three main grape varieties in Champagne area. Thus, a hypothesis explaining this separation could be the grape variety as previously suggested for still wines (Gougeon, Da Costa, Guyon, & Richard, 2019). The viticultural and oenological processes are also highly regulated and can be the source of metabolic divergence of sparkling wines. In addition to geographical origin and grape variety, some studies have pointed out the influence of aging time on lees, as well as the yeast strains used during fermentation (Izquierdo-Llopert & Saurina, 2021; Martínez-Lapuente, Guadalupe, Ayestarán, & Pérez-Magariño, 2015; Pérez-Magariño, Ortega-Heras, Martínez-Lapuente, Guadalupe, & Ayestarán, 2013). Given their respective specifications, the duration of maturation on lees is generally longer for Champagne than for Crémant wines. A longer time in contact with the lees can lead to higher levels of amino acids (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006).

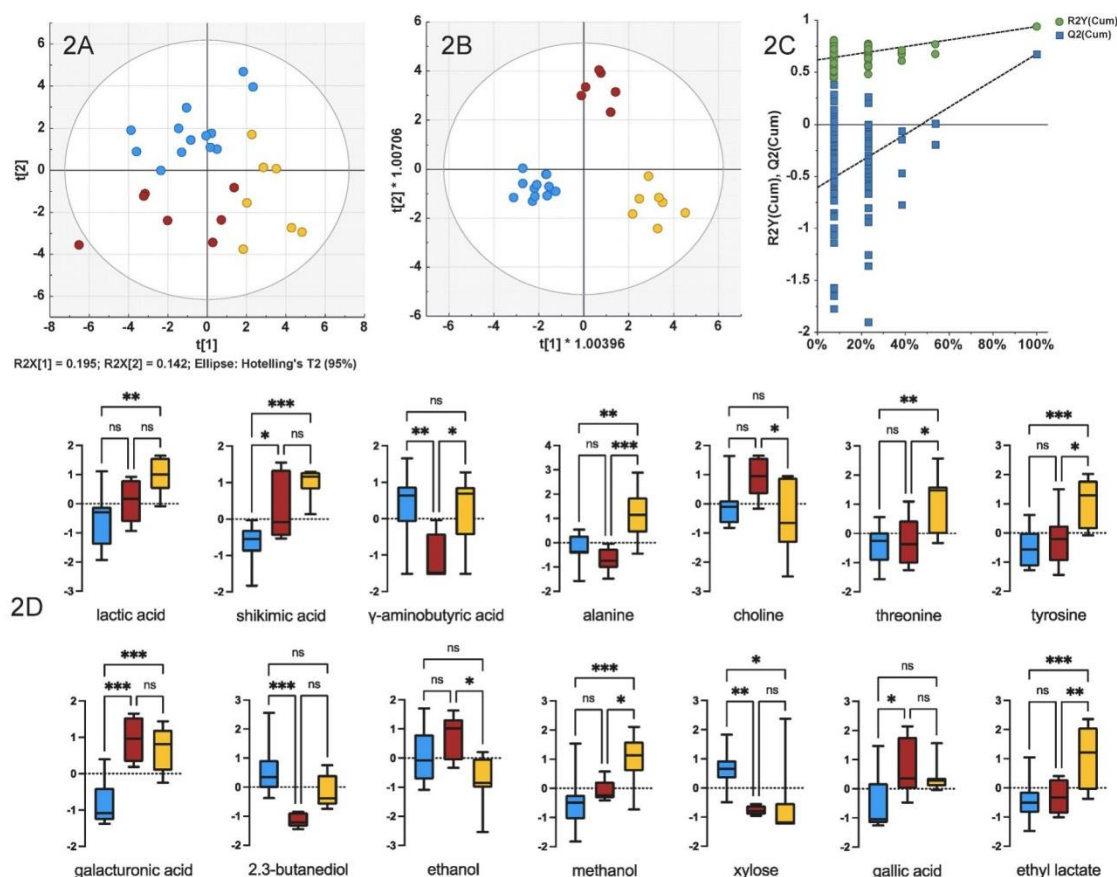
### 3.3. Comparison between Crémant wines

As for wine of Champagne versus Crémant wines, the ability of  $^1\text{H}$ -NMR-based metabolomics to discriminate the different types of Crémant wines was studied. Three different Crémant wines ( $n = 27$ ) were compared: Crémant de Bordeaux ( $n = 7$ ), Crémant de Bourgogne ( $n = 7$ ) and Crémant Alsace ( $n = 13$ ) wines. The data obtained from analysis of  $^1\text{H}$  NMR spectra were processed by unsupervised PCA followed by supervised OPLS-DA.

The PCA scores plot (Fig. 2A) displayed discrimination between Crémant wine samples ( $R^2X = 0.461$  and  $Q^2 = 0.121$ ). The first two PCs



**Fig. 1.** Multivariate analysis of data extracted from  $^1\text{H}$  NMR spectra of Champagne and Crémant wines. (A) PCA score plot of untargeted data; (B) OPLS-DA score plot of untargeted data; (C) 100-permutation test of untargeted data; (D) Boxplots of significantly discriminating compounds. Statistical significance was checked by unpaired *t*-test or Mann-Whitney's test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Green: Champagne wines; orange: Crémant wines.



**Fig. 2.** Multivariate analysis and boxplots of significantly discriminating compounds of Crémant wines. (A) PCA score plot; (B) OPLS-DA score plot; (C) 100-permutation test; (D) Boxplots of significantly discriminating compounds. Statistical significance was controlled by one-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD or Kruskal-Wallis's test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Yellow: Crémant de Bourgogne wines; red: Crémant de Bordeaux wines; Blue: Crémant d'Alsace wines.

explain 34% of the variance between the three wine classes of wine. For OPLS-DA modelling, an outlier was discarded based on the DModX plot. Following PCA, supervised OPLS-DA was performed to maximize the separation between Crémant wines (Fig. 2B and C). The performance and the validation of model are summarized in Table 1. The OPLS-DA model discriminated the three geographical origin of Crémant with  $R^2X$ ,  $R^2Y$  and  $Q^2$  values of 0.522, 0.931 and 0.646, respectively. The  $R^2Y$  and  $Q^2$  values  $> 0.5$  and a difference between these two parameters  $< 0.3$  indicated good classification between the three classes of sparkling wines based on their geographical origin. Permutation test (100 permutations) and CV-ANOVA value ( $< 0.05$ ) assessed the model validity. In addition, the CCR (100% of correct classification) and AUC values from the ROC curves (1.0 for each) proved the predictive efficiency of the OPLS-DA model.

Based on the OPLS-DA model obtained from  $^1\text{H}$  NMR targeted data, the discriminant metabolites were identified. As for wines of Champagne, a total of thirty-five compounds were identified and quantified in Crémant wines. Quantified constituents possessing the highest VIP and a  $p$ -corr values (greater than 1.0 and 0.5, respectively) were considered as potential discriminating compounds. To confirm the identification of such compounds, the identified discriminant metabolites were examined by one-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD or Kruskal-Wallis's test, for compounds not following a normal distribution. Fourteen compounds explain significantly the separation between the three classes of Crémant (Fig. 2D): 2 organic acids (galacturonic and lactic acids), 5 amino acids (alanine,  $\gamma$ -aminobutyric acid, choline, threonine and tyrosine), 3 alcohols (2,3-butanediol, ethanol and methanol), 1 sugar (xylose), 1 phenolic compound (shikimic acid) and 2 others (ethyl

lactate and acetoin). Among all these compounds, some are characteristic of a specific geographical origin. The Crémant d'Alsace wines present the significant lowest contents in galacturonic acid and shikimic acid, and the highest content in xylose. The highest contents in alanine, threonine, tyrosine, methanol and ethyl lactate were observed in Crémant de Bourgogne wines. Whereas the highest levels of galacturonic acid, choline and gallic acid and the lowest content in 2,3-butanediol and  $\gamma$ -aminobutyric acid were found in Crémant de Bordeaux wines.

As previously stated, no study has yet been done on the difference in metabolomic profile between the three Crémant producing regions. Like for the comparison of Champagne versus Crémant, several hypotheses can explain the differences in metabolomic profiles of the three Crémant appellations such as climate, soil and grape varieties used. This last hypothesis seems relevant since the grape varieties used differ from one region to another. Semillon and Sauvignon blanc are the main grape varieties used for Crémant de Bordeaux wines. In Burgundy, eight grape varieties are authorized to produce Crémant de Bourgogne with at least thirty percent of Chardonnay, Pinot blanc, Pinot noir or Pinot gris. Finally, the controlled designation of origin Crémant d'Alsace is usually made of Auxerrois, Chardonnay, Pinot blanc, Pinot gris, Pinot noir and Riesling. Lactic acid, shikimic acid, gallic acid,  $\gamma$ -aminobutyric acid, alanine, choline, 2,3-butanediol and glucose have already been identified as metabolites that can vary according to the grape variety considered (Fan et al., 2018; Godelmann et al., 2013; Mascellani et al., 2021). However, this is the first time that galacturonic acid, tyrosine, trigonelline, ethyl lactate and xylose have been identified as molecules that can vary according to geographic origin. As already suggested for

still wines (Gougeon, Da Costa, Guyon, & Richard, 2019), classification of controlled designation of origin Crémants is undoubtedly the result of the conjunction of different parameters including the grape variety but also other biotic or abiotic factors (climate, vinification process, etc.).

### 3.4. Classification of champagne based on quality criteria

As shown in the table of wines analyzed, among the wines of Champagne different quality criteria are specified: vintage, quality label, color and grape variety. In this part, the ability of <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics combined with multivariate data analysis was evaluated to classify Champagne based on these criteria.

Generally, Champagne wines are a blend from different vintages. Nevertheless, in some favorable cases, vintage Champagne wines are produced using only grapes from a single vintage year. NMR-based metabolomics was successfully applied to discriminate vintages of still wines (Zhang et al., 2021). In this first trial, a classification based on vintage label was evaluated. Vintage Champagne wines (n = 9) were compared by PCA to the other Champagne wines (n = 41) obtained from a blend of different vintages. No significant discrimination was observed between these two classes of wines (data not shown). However, a classification according to the different vintages studied seems to emerge (data not shown). To confirm this trend, a more representative sampling of vintage Champagne wines would be necessary. In a second trial, similarly to vintage, Champagne wines with "Cru" label (n = 10) were compared to the other Champagne wines (n = 40). In this case too, no discrimination was observed on the PCA model from the targeted data (data not shown). The Cru label in Champagne area designates more a geographical origin than a quality label. A wine labeled Cru must come exclusively from vineyards of specific geographic areas. In this case too, a more representative sampling would be needed to be able to observe an effect of geographical origin for these wines.

The sampling of Champagne wines is composed of white (n = 39) and rosé (n = 11) sparkling wines. Rosé Champagne wines are produced by several methods; direct pressing of red grapes, maceration of the must with red grape skin and seeds for a brief time or blend a small amount of red wine. The <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics was used to classify these two classes of Champagne wines. The PCA scores plot (Fig. 3A) displayed discrimination between rosé and white Champagne wine samples even if a partial overlapping between the two sets of wines is observed. The first two PCs explain 26% of the variance. For further analyses, two white Champagne sample outliers were excluded based on the DModX plot. Supervised OPLS-DA model (Fig. 3B) combined with validation procedure confirmed the ability of <sup>1</sup>H NMR targeted analysis to discriminate white and rosé Champagne wines (R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y and Q<sup>2</sup> values of 0.208, 0.737 and 0.565, respectively). The model performances were summarized in Table 1. The OPLS-DA model accuracy was confirmed by significant CV-ANOVA p-value (<0.05), AUC values from ROC curves (1.0), CCR value (>91%), and permutation tests (100 permutations). Based on VIP and p-(corr) values (greater than 1.0 and 0.5, respectively), discriminating compounds were selected and confirmed by Student's t-test or Mann Whitney's test, for compounds not following a normal distribution. Only three compounds were identified to distinguish the Champagne wine color (Fig. 3C): methanol, isoamyl alcohol and galacturonic acid. The methanol in wine results mainly from hydrolysis of pectin. The methanol level depends of the pectin content of the substrate. Due to the maceration time of grape skins, red wines contain more methanol than white wines (Hodson, Wilkes, Azevedo, & Battaglene, 2017). It is not surprising that methanol is a marker of rosé Champagne wines, due to the contact time with black grapes' skin or the mixture with red wine. This may also explain the significantly higher level of galacturonic acid observed in rosé Champagne wines. The higher levels of isoamyl alcohol in rosé champagnes may have multiple origins. Isoamyl alcohol is one of the main higher alcohols identified in wine formed by yeast from leucine during fermentation (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkee, 1999). Its levels will therefore depend on

the yeast strains used and the initial leucine levels, but also on the conduct of the vinification such as the fermentation temperature or clarification (Aleixandre-Tudo, Weightman, Panzeri, Nieuwoudt, & Du Toit, 2015).

Concerning the grape variety, Pinot noir and Chardonnay are the two of the most famous Champagne grape varieties. They are widely used to make Champagne wines. Champagne wines made from Chardonnay (100%, n = 12) were compared to wines made from Pinot noir (at least 75%, n = 8) by multivariate analyses following the same process as described above for wine color. The results are shown in Fig. 3. The PCA scores (Fig. 3D) displayed a clear discrimination between Champagne samples made from the two grape varieties. The first two PCs explain 33% of the variance. Supervised OPLS-DA model (Fig. 3E) combined with validation procedure confirmed the ability of <sup>1</sup>H NMR targeted analysis to discriminate grape varieties used in Champagne area (R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y and Q<sup>2</sup> values of 0.235, 0.916 and 0.633, respectively). The performance and the validation of the OPLS-DA model are summarized in Table 1. Based on VIP a p-(corr) values (greater than 1.0 and 0.5, respectively) and confirmed Student's t-tests, a total of six discriminating compounds were identified (Fig. 3F): one alcohol (myo-inositol), two amino acids (alanine and proline), two sugars (xylose and arabinose) and one phenolic compound (shikimic acid). Wines produced from Chardonnay grapes contained more amino acids (alanine and proline) and shikimic acid, whereas wines made from Pinot noir grapes contained more myo-inositol and sugars (xylose and arabinose). These results confirm the importance of the grape variety used to classify sparkling wines. Among the discriminating wine constituents, shikimic acid and proline are well known markers of the grape variety (Godlmann et al., 2013; Hu et al., 2015).

## 4. Conclusions

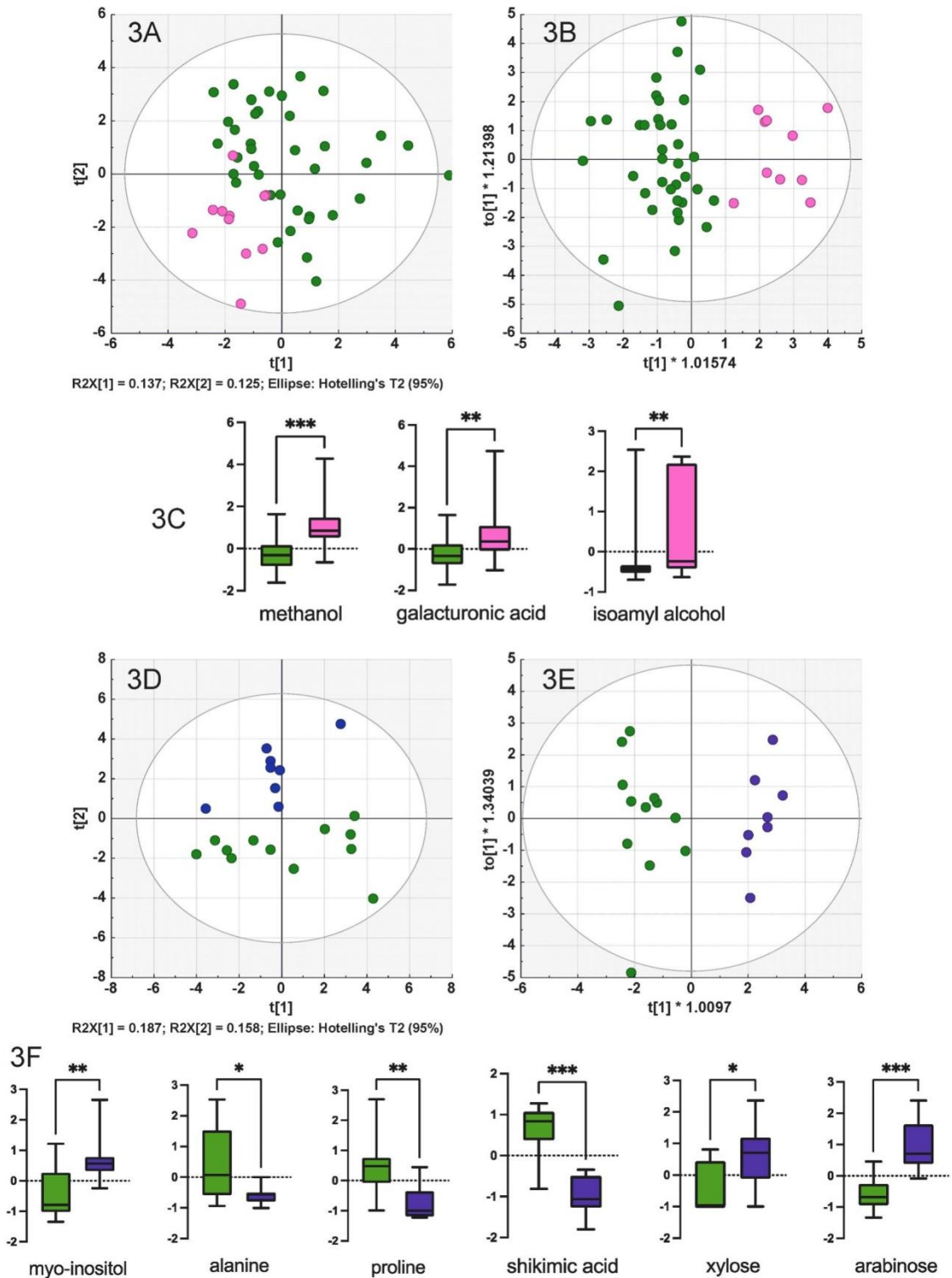
To our knowledge, very few metabolomics approaches have been applied to sparkling wines (Schmitt et al., 2019). This first NMR metabolomics study on sparkling wines shows the potential of <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics to classify sparkling wines according to their geographical origin. Either for the comparison of Champagne with Crémant wines or the comparison of Crémant wines between them. <sup>1</sup>H NMR data combined with multivariate statistical analysis reveal that Champagne and Crémant present different metabolic profiles, allowing the identification of discriminant metabolites of Champagne wines such as the highest levels of amino acids. In addition, potential markers of each Crémant wines were identified revealing some influencing compounds on the composition of sparkling wines. Grape variety but also other biotic or abiotic factors such as winemaking process discriminate geographical origin. Finally, even if a more representative sampling of Champagne wine would be useful, some specific trends were observed concerning grape variety or color, indicating some specific discriminant metabolites. In conclusion, this study provided valuable data concerning the use of <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics for discrimination purposes and quality control of sparkling wines.

## Knowledge

This work was supported by Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (Inès Le Mao was the recipient of a CIFRE PhD fellowship from ANRT and Baron Philippe de Rothschild S.A.). We also want to thank the Fondation of Bordeaux for its financial support (donors: Baron Philippe de Rothschild SA, Chateau Cheval Blanc, Chateau Lafite Rothschild, Le Domaine Clarence Dillon, Chateau Petrus). The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

## CRedit authorship contribution statement

Inès Le Mao: Formal analysis, Investigation, Writing - original draft,



**Fig. 3.** Multivariate analysis and boxplots of significantly discriminating compounds of Champagne wine color (green: white Champagne; pink: rosé Champagne) and grape variety (green: Chardonnay; blue: Pinot noir). (A) PCA score plot of color discrimination; (B) OPLS-DA score plot of color discrimination; (C) Boxplots of significantly discriminating compounds of wine color; (D) PCA score plot of grape variety discrimination; (E) OPLS-DA score plot of grape variety discrimination; (F) Boxplots of significantly discriminating compounds of grape variety. Statistical significance was controlled by unpaired *t*-test or Mann-Whitney's test (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

review & editing. **Grégory Da Costa**: Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing - review & editing. **Charlyne Bautista**: Investigation. **Gilles de Revel**: Conceptualization, Resources, Writing - review & editing. **Tristan Richard**: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Supervision, Writing - original draft, review & editing.

#### Data availability

The authors do not have permission to share data.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109423>.

#### References

- Alexandre-Tudo, J. L., Weightman, C., Panzeri, V., Nieuwoudt, H. H., & Du Toit, W. J. (2015). Effect of skin contact before and during alcoholic fermentation on the chemical and sensory profile of South African Chenin blanc white wines. *South African Journal for Enology & Viticulture*, 36(3), 366–377.
- Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 119–127.
- Amargianitaki, M., & Spyros, A. (2017). NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 9.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1999). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In R. B. Boulton, V. L. Singleton, L. F. Bisson, & R. E. Kunkee (Eds.), *Principles and practices of winemaking* (pp. 102–192). Boston, MA: Springer US.
- Carlin, S., Vrhovsek, U., Franceschi, P., Lotti, C., Bontempo, L., Camin, F., et al. (2016). Regional features of northern Italian sparkling wines, identified using solid-phase micro extraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 208, 68–80.
- Cobas, C., Seoane, F., Domínguez, S., Sykora, S., & Davies, A. N. (2011). A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD). *Spectroscopy Europe*, 23(1), 26–30.
- Epova, E. N., Bérail, S., Séby, F., Barre, J. P. G., Vacchina, V., Médina, B., et al. (2020). Potential of lead elemental and isotopic signatures for authenticity and geographical origin of Bordeaux wines. *Food Chemistry*, 303, Article 125277.
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., et al. (2013). Targeted and nontargeted wine analysis by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. Differentiation of important parameters: Grape variety, geographical origin, year of vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610–5619.
- Gougeon, L., Da Costa, G., Guyon, F., & Richard, T. (2019). <sup>1</sup>H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food Chemistry*, 301, Article 125257.
- Gougeon, L., Da Costa, G., Le Mao, I., Ma, W., Teissedre, P.-L., Guyon, F., et al. (2018). Wine analysis and authenticity using <sup>1</sup>H-NMR metabolomics data: Application to Chinese wines. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3425–3434.
- Gougeon, L., Da Costa, G., Richard, T., & Guyon, F. (2019). Wine authenticity by quantitative <sup>1</sup>H NMR versus multitechnique analysis: A case study. *Food Analytical Methods*, 12, 956–965.
- Hodson, G., Wilkes, E., Azevedo, S., & Battaglene, T. (2017). Methanol in wine. *BIO Web of Conferences*, 9, Article 02028.
- Hu, B., Yue, Y., Zhu, Y., Wen, W., Zhang, F., & Hardie, J. (2015). Proton nuclear magnetic resonance-spectroscopic discrimination of wines reflects genetic homology of several different grape (*V. vinifera* L.) cultivars. *PLoS One*, 10, Article e0142840.
- Izquierdo-Llopert, A., & Saurina, J. (2021). Multi-sensor characterization of sparkling wines based on data fusion. *Chemosensors*, 9(8), 200.
- Jones, J. E., Kerslake, F. L., Close, D. C., & Damberg, R. G. (2014). Viticulture for sparkling wine production: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(4), 407–416.
- Le Mao, I., Martin-Pernier, J., Bautista, C., Lacampagne, S., Richard, T., & Da Costa, G. (2021). <sup>1</sup>H-NMR metabolomics as a tool for winemaking monitoring. *Molecules*, 26(22), 6771.
- Li, C.-Y., Song, H.-T., Wang, X.-X., Wan, Y.-Y., Ding, X.-S., Liu, S.-J., et al. (2017). Urinary metabolomics reveals the therapeutic effect of HuangQi Injections in cisplatin-induced nephrotoxic rats. *Scientific Reports*, 7(1), 3619.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., & Pérez-Magariño, S. (2015). Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *Food Chemistry*, 174, 330–338.
- OIV. (2020). OIV Focus: The global sparkling wine market. In *International organisation of vine and wine*.
- Palmioli, A., Alberici, D., Ciaramelli, C., & Airoidi, C. (2020). Metabolomic profiling of beers: Combining <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometric approaches to discriminate craft and industrial products. *Food Chemistry*, 327, Article 127025.
- Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2013). Multivariate analysis for the differentiation of sparkling wines elaborated from autochthonous Spanish grape varieties: Volatile compounds, amino acids and biogenic amines. *European Food Research and Technology*, 236, 827–841.
- Schmitt, M., Broschart, S., Patz, C.-D., Rauhut, D., Friedel, M., & Häge, D. (2019). Application of yeast with reduced alcohol yield for sparkling wine production. *BIO Web Conf*, 12, Article 02021.
- Sobolev, A. P., Thomas, F., Donarski, J., Ingallina, C., Circi, S., Cesare Marincola, F., et al. (2019). Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 347–353.
- Solovjev, P. A., Fahl-Hassek, C., Riedl, J., Esslinger, S., Bontempo, L., & Camin, F. (2021). NMR spectroscopy in wine authentication: An official control perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 2040–2062.
- Valls Fonayet, J., Loupit, G., & Richard, T. (2021). MS- and NMR-metabolomic tools for the discrimination of wines: Applications for authenticity. *Advances in Botanical Research*, 98, 297–357.
- Wajsman, N., Arias Burgos, C., Davies, C., & EUIPO. (2016). In *The economic cost of IPR infringement in spirits and wine* (p. 31).
- Wheelock, A. M., & Wheelock, C. E. (2013). Trials and tribulations of 'omics data analysis: Assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine. *Molecular BioSystems*, 9(11), 2589–2596.
- Worley, B., & Powers, R. (2016). PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. *Current Metabolomics*, 4(2), 97–103.
- Yuan, Z.-y., Li, J., Zhou, X.-j., Wu, M.-h., Li, L., Pei, G., et al. (2020). HS-GC-IMS-Based metabolomics study of Baihe Jizihuang Tang in a rat model of chronic unpredictable mild stress. *Journal of Chromatography B*, 1148, Article 122143.
- Zhang, H., Hu, B., Xu, S., Zhu, J., Zhao, Q., & Gao, J. (2021). Quality evaluation of Cabernet Sauvignon wines in different vintages by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance-based metabolomics. *Open Chemistry*, 19(1), 385–399.

## V Synthèse des résultats et discussions

Dans cette première partie du projet, les méthodes d'analyses des vins par RMN  $^1\text{H}$  ont été développées. **13 nouveaux métabolites** ont été identifiés et les limites de détection et de quantification ont été affinées dans le but d'améliorer la fiabilité des analyses quantitatives. A ce jour, un total de 54 métabolites peut être quantifié dans les vins. L'ensemble des travaux a permis de mieux définir les profils chimiques des différentes appellations étudiées et d'enrichir la base de données de plus de 200 nouveaux vins commerciaux (vins rouges et vins blancs). De plus, de nouvelles matrices, jusqu'alors jamais étudiées par RMN, ont été analysées telles que les vins mousseux, ce qui a nécessité l'optimisation des protocoles d'analyses.

Les analyses réalisées sur les grands vins de bordeaux ont permis de mettre en évidence que les spectres RMN  $^1\text{H}$  pouvaient permettre de **discriminer des vins provenant de châteaux voisins**. Une **base de données spécifique à Mouton Rothschild** a été créée et l'étude pendant 2 ans de leurs vins nous a permis **d'initier les travaux sur la validité de la base de données dans le temps**. Les analyses montrent que la base de données reste utilisable sur une période d'au moins trois ans. Cette étude nous a également permis de constater que les composés dosés par RMN sont peu altérés par l'utilisation du Coravin, et ce même après deux ans de prélèvements réguliers. Il est donc possible d'utiliser des bouteilles de vins « coravinées » pour la garantie de l'authenticité. Ce travail doit se poursuivre pour déterminer la durée de validité de la base de données.

Les analyses sur les vins mousseux ont permis de montrer que la RMN  $^1\text{H}$  peut être utilisée pour permettre de garantir **l'authenticité des vins mousseux**. En effet, les analyses RMN couplées aux analyses statistiques multivariées (ACP, OPLS, ANOVA), ont permis de mettre en évidence la singularité des vins de champagne et les signatures chimiques spécifiques des différentes appellations de Crémant étudiées. Les analyses ont également permis d'identifier les composés discriminants des différentes appellations productrices de Crémant. Parmi les facteurs discriminants, le cépage semble jouer un rôle majeur. Les analyses par RMN  $^1\text{H}$  ont également permis de distinguer au sein de l'appellation Champagne les différents cépages utilisés (Chardonnay et Pinot Noir) et les champagnes rosés. Ces résultats s'expliquent par le fait que les cahiers des charges des différentes appellations autorisent les producteurs à utiliser des cépages de leur région. Cela conduit à une plus grande variabilité des

métabolomes liée à la fois à des conditions climatiques différentes mais aussi à des cépages utilisés très différents. Les analyses ont permis d'initier le profilage de chaque région productrice de crémant mais nécessite un plus grand échantillonnage pour augmenter la robustesse des données.

En revanche, les analyses n'ont pas permis de distinguer les Champagnes 1<sup>er</sup> Cru et les Champagnes millésimés. Cela est peut-être lié au fait que le nombre d'échantillons dont nous disposions était trop faible. Ainsi, il serait intéressant de disposer d'un échantillonnage plus important afin de poursuivre plus finement cette étude. Un autre moyen de répondre à ces questions serait d'utiliser d'autres approches métabolomiques comme la spectrométrie de masse pour accéder à un plus grand nombre de composés présents en plus faibles concentrations.

Jusqu'à présent nous avons choisi d'utiliser une approche ciblée pour garantir l'authenticité des vins. Un challenge est le développement des analyses non-ciblées pour l'authenticité des vins. Bien que cela n'ait pas été évoqué dans ce manuscrit, ces travaux ont été initiés. Les résultats obtenus sont encourageants. Mais, une application concrète des approches non-ciblées pour l'authenticité reste problématique comme cela a été souligné dans une revue parue en 2021, les analyses non-ciblées manquent d'une procédure normalisée et communément acceptée (Solovyev et al., 2021).

Enfin, pour poursuivre ces travaux il serait intéressant de construire des bases de données nationales et internationales que ce soit dans le cas des vins tranquilles et des vins pétillants en intégrant d'autres appellations et d'autres pays producteurs afin de collecter des vins représentatifs de chaque appellation. De plus la standardisation d'une méthode d'analyses des vins semble nécessaire pour pouvoir être utilisé par tous les opérateurs.

*Chapitre 2 :  
Utilisation de la RMN pour le suivi des  
vins*





## CHAPITRE 2 : UTILISATION DE LA RMN POUR LE SUIVI DES VINS

### I Objectifs et stratégie

Nos travaux ont montré que l'approche par RMN métabolomique permettait d'assurer la traçabilité des vins notamment à travers plusieurs facteurs tels que : les cépages, l'origine géographique, etc. Cependant, plusieurs indices suggèrent que les pratiques viticoles et œnologiques pourraient également avoir une influence sur les classifications observées. En effet, si les analyses par RMN permettent de discriminer des vins de châteaux voisins, qui partagent la même appellation, et qui sont donc soumis aux mêmes conditions environnementales et aux mêmes cahiers des charges, c'est que les pratiques viticoles et œnologiques entrent en jeu. Comme indiqué dans la synthèse bibliographique, des études ont montré que la RMN  $^1\text{H}$  permet de discriminer différents itinéraires vitivinicoles. En collaboration avec le Château Mouton Rothschild, et également avec la société Biolaffect, nous avons souhaité étudier l'intérêt de la métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  pour le suivi de l'élaboration du vin depuis la sélection des baies jusqu'à la mise en bouteille.

Dans le chapitre suivant, les effets de la thermovinification, du stade des maturités des baies, du collage et de l'enzymage ont été étudiés à partir de vins élaborés sur le plateau de vinification de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (plateau Bordeaux Vinif) en collaboration avec la société Biolaffect.

Une étude sur l'évolution des vins en fûts de chêne a été réalisée sur des vins produits par le Château Mouton Rothschild. Ces différents itinéraires d'élaboration des vins nous ont permis de vérifier l'intérêt de la RMNq pour le suivi œnologique à travers l'utilisation d'approches ciblées et non ciblées. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des signatures chimiques propres aux procédés utilisés ainsi que les composés impactés par ces différentes pratiques.

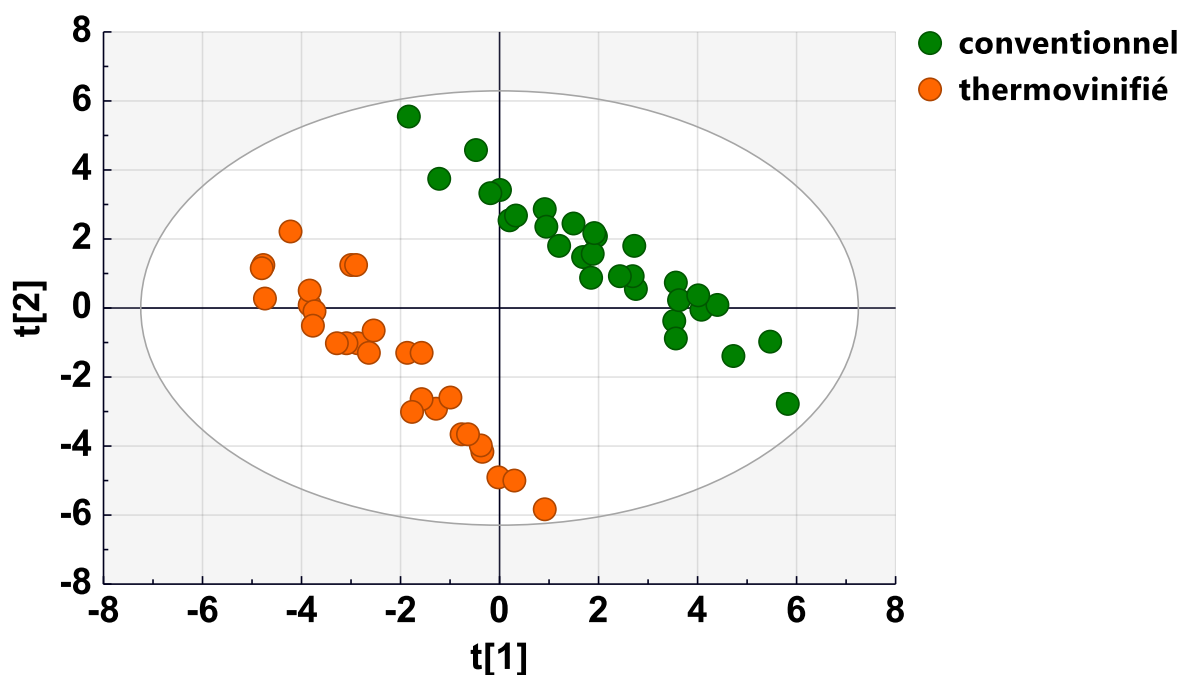
### II Suivi œnologique

#### II.1 Suivi d'itinéraires de fermentation

Un essai préliminaire a été réalisé en collaboration avec le plateau Bordeaux Vinif sur un moût de raisin (cépage Cabernet sauvignon) soumis à deux procédés de vinification différents : une vinification classique et une thermovinification. Les deux lots ont par la suite

subi différents traitements. La thermovinification est un procédé qui a longtemps été préconisé pour limiter les activités enzymatiques néfastes (laccases) des vendanges altérées visant une amélioration de la qualité organoleptique du vin (Davaux & Noilet, 2012). Le procédé consiste à faire chauffer la vendange entre 70 et 75°C pendant 30 à 40 minutes (El Darra et al., 2016). Les deux lots de vin ( $n = 60$  échantillons) ont ensuite subi différents traitements (enzymage, collage, filtration, etc.). Nous avons analysé l'ensemble des vins obtenus à partir des deux procédés par RMN  $^1\text{H}$ , dosés les composés majoritaires et comparés les résultats obtenus par des analyses statistiques multivariées, comme indiqué dans la partie « matériel et méthodes » de la publication associée à ce chapitre.

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'une ACP dans la Figure 22 ci-dessous. Les vins issus de thermovinification ( $n=30$ ) et de vinification classique ( $n=30$ ) forment deux groupes distincts. Au-delà des traitements spécifiques subis par chaque échantillon analysé, cette ACP montre que les données extraites des spectres RMN  $^1\text{H}$  permettent de distinguer les deux différents procédés de vinification. La thermovinification a donc un impact significatif sur la composition chimique des vins observée par RMN.



**$R^2X[1] = 0.227$ ;  $R^2X[2] = 0.171$ ; Ellipse: Hotelling's T2 (95%)**

Figure 22 : ACP représentant les échantillons vinifiés de façon conventionnelle (en vert) et les échantillons « thermovinifiés » (en orange).

Cette étude préliminaire a montré l'intérêt des analyses par RMN pour observer rapidement l'impact du procédé sur la composition chimique du vin. Par la suite nous nous sommes

intéressés à l'étude de procédés plus spécifiques. Pour valider l'intérêt de la RMN  $^1\text{H}$ , nous avons étudié, en petits contenants (volume inférieur à 5kg), l'effet de différents procédés spécifiques : état de la vendange, collage et enzymage. Puis, en collaboration avec le Château Mouton Rothschild, nous avons suivi par RMN  $^1\text{H}$  l'élevage en fût de chêne des vins produits par le Château.

### II.2 Études en cuve de nano vinification

#### II.2.1 Impact de la date de la vendange

Comme cela a été évoqué dans l'état de l'art, le stade de maturité va avoir un impact non négligeable sur la composition chimique des raisins et donc des vins. Au cours de ces travaux, nous avons voulu montrer l'intérêt d'utiliser la RMN  $^1\text{H}$  pour étudier l'impact de la date de vendange sur la composition chimique majoritaire du vin. Cette étude a été menée sur du Cabernet Sauvignon récolté en sous maturité (7 jours avant la date de maturité prévisionnelle), à maturité et en sur maturité (7 jours après la date de vendange).

Les vins issus de raisin récoltés en sous maturité peuvent se révéler trop acides et la maturité phénolique insuffisante des baies peut engendrer un déséquilibre en composés phénoliques impactant sur la couleur des vins. A contrario, les vins issus de raisins récoltés en sur-maturité peuvent se retrouver avec des teneurs trop faibles en acides organiques et les teneurs trop élevés en sucres peuvent gêner le développement des levures. Il y a également un risque accru de vendanges altérées par des moisissures.

Les résultats des analyses quantitatives permettent de mettre en évidence l'impact de la maturité du raisin sur les activités des micro-organismes.

#### II.2.2 Collages et enzymages

L'utilisation de procédés pour clarifier les vins avant la filtration et la mise en bouteille sont des procédés couramment employés en œnologie. La plupart des études menées sur les agents de collages portent sur l'influence de leur utilisation sur les composés phénoliques et les mannoprotéines (Ghanem et al., 2017). Très peu d'entre elles s'intéressent à l'impact de telles pratiques sur la composition chimique globale. De même, pour l'utilisation d'enzymes, la majorité des études s'intéressent à l'effet de leur utilisation sur les arômes, la couleur ou la

matière colloïdale (Kassara et al., 2019; Li et al., 2017; Sparrow et al., 2021). A notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à l'impact de ces pratiques sur la composition majoritaire du vin et aucune n'a utilisé la RMN en tant qu'outil d'analyse.

Face à ces constats et dans le but de démontrer l'intérêt d'utiliser la RMN pour étudier l'influence de ces pratiques œnologiques, l'analyse de deux agents de collages et de deux enzymes commercialisés ont été comparées à des témoins non-traités. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec la société Biolaffort. Celle-ci a observé que différents agents de collage ou d'enzymage induisent des différentes sensorielles perceptibles mais aucune analyse chimique n'avait permis jusqu'à présent de mettre en évidence des composés significativement impactés.

### II.2.3 Publication

Les résultats obtenus concernant l'influence de la qualité de la vendange et l'impact du collage et de l'enzymage ont fait l'objet de la publication « **<sup>1</sup>H-NMR metabolomics as a tool for winemaking monitoring** » parue en novembre 2021 dans le journal Molecules.

Article

# $^1\text{H-NMR}$ Metabolomics as a Tool for Winemaking Monitoring

Inès Le Mao, Jean Martin-Pernier, Charlyne Bautista, Soizic Lacampagne, Tristan Richard \* and Gregory Da Costa

University of Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, UR OENO, EA 4577, USC 1366, F-33140 Villenave d'Ornon, France; ines.le-mao@u-bordeaux.fr (I.L.M.); jean.martin@u-bordeaux.fr (J.M.-P.); charlynebautista@hotmail.com (C.B.); soizic.lacampagne@u-bordeaux.fr (S.L.); gregory.da-costa@u-bordeaux.fr (G.D.C.)

\* Correspondence: tristan.richard@u-bordeaux.fr; Tel.: +33-557575957

**Abstract:** The chemical composition of wine is known to be influenced by multiple factors including some viticulture practices and winemaking processes.  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics has been successfully applied to the study of wine authenticity. In the present study,  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics in combination with multivariate analysis was applied to investigate the effects of grape maturity and enzyme and fining treatments on Cabernet Sauvignon wines. A total of forty wine metabolites were quantified. Three different stages of maturity were studied (under-maturity, maturity and over-maturity). Enzyme treatments were carried out using two pectolytic enzymes (E1 and E2). Finally, two proteinaceous fining treatments were compared (vegetable protein, fining F1; pea protein and PVPP, fining F2). The results show a clear difference between the three stages of maturity, with an impact on different classes of metabolites including amino acids, organic acids, sugars, phenolic compounds, alcohols and esters. A clear separation between enzymes E1 and E2 was observed. Both fining agents had a significant effect on metabolite concentrations. The results demonstrate that  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics provides a fast and robust approach to study the effect of winemaking processes on wine metabolites. These results support the interest to pursue the development of  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics to investigate the effects of winemaking on wine quality.

**Keywords:**  $^1\text{H-NMR}$ ; metabolomics; wine; winemaking

**Citation:** Le Mao, I.; Martin-Pernier, J.; Bautista, C.; Lacampagne, S.; Richard, T.; Da Costa, G.  $^1\text{H-NMR}$  Metabolomics as a Tool for Winemaking Monitoring. *Molecules* **2021**, *26*, 6771. <https://doi.org/10.3390/molecules26226771>

Academic Editor: Fulvio Mattivi

Received: 13 October 2021

Accepted: 5 November 2021

Published: 9 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Over the last decade, the number of studies on wine has grown steadily as quality and authenticity have become major concerns for both producers and consumers. Thus, fine wine analysis has blossomed to study and characterize each step of the production chain from the vineyard to the finished wine. Metabolomics has emerged from the studies that have flourished, which studies all the small molecules of a biological system. Metabolomics science, by adopting a targeted or non-targeted approach, can be discriminating, predictive and informative depending on the subject of the study [1,2].

A well-known challenge in the study of wine is the complexity of the matrix. Indeed, hundreds of compounds of different chemical families make analysis complex. The two most commonly used analytical techniques for wine metabolomics are mass spectrometry and NMR [3]. Although MS is a more sensitive tool, NMR combines many advantages that make it a tool of choice for metabolomic analysis of wines [4–7]: no complex sample preparation, low volume requirements, fast and reproducible analysis and detection of a large number of compounds belonging to different chemical families, such as organic acids, alcohols, sugars, phenolic compounds and amino acids [8,9]. Moreover, NMR is a wine screening tool that can also provide quantitative data thanks to [10].

Since the chemical composition of wine is known to be influenced by multiple factors, many wine NMR studies have been focused on the impact of grape variety [11,12], geographical origin [9,13,14], vintage and aging [15,16]. Comparatively, few NMR technique-based studies have been carried out on viticultural practices and winemaking processes, which can also influence the metabolite profile of wine, and thus its

organoleptic properties [17,18]. Fermentation processing was explored by establishing the difference between alcoholic and malolactic fermentation processes on metabolites with a time course evolution [19], while other studies focused on the impact of using different yeast strains during white wine fermentation [20], and red wine fermentation [11]. Lee and collaborators established, by a combination of  $^1\text{H-NMR}$  and gas chromatography approaches, the fermentative behaviors and the metabolic variations of five bacteria strains during malolactic fermentation in Meoru wines, in order to reduce wine acidity [15]. Concerning winemaking technologies, through metabolite profiles, De Pascali and collaborators analyzed the difference between winemaking processes (ultrasound, cryomaceration and traditional processes) on Negroamaro red wine [21], while Baiano and collaborators examined the difference between traditional, cryomaceration and reductive processes and a combination of the last two procedures on Sauvignon Blanc wine [22].

Wines are subjected to different winemaking processes including the addition of different agents for better wine stability and limpidity, such as finings, used to obtain clarified and limpid wines [23], and enzymatic treatments, used to enhance the degradation of grape berry cell walls and the extraction of aroma and phenolic compounds [24]. The control of these different processes is a crucial point in order to produce quality wines. The impact of finings on wine composition has been studied using different techniques including spectrophotometry or liquid and gas chromatography [23,25]. In the same way, different techniques have been used to study the effect of enzymatic addition on the release of phenols, monosaccharides and polysaccharides, by different chromatographic techniques [24,26].

The aim of this study was to determine the ability of  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy combined with multivariate statistical analyses to discriminate different winemaking parameters and processes (maturity, fining and enzymatic addition) and to explore the impact of these processes on wine composition.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. $^1\text{H-NMR}$ Analysis of Wine

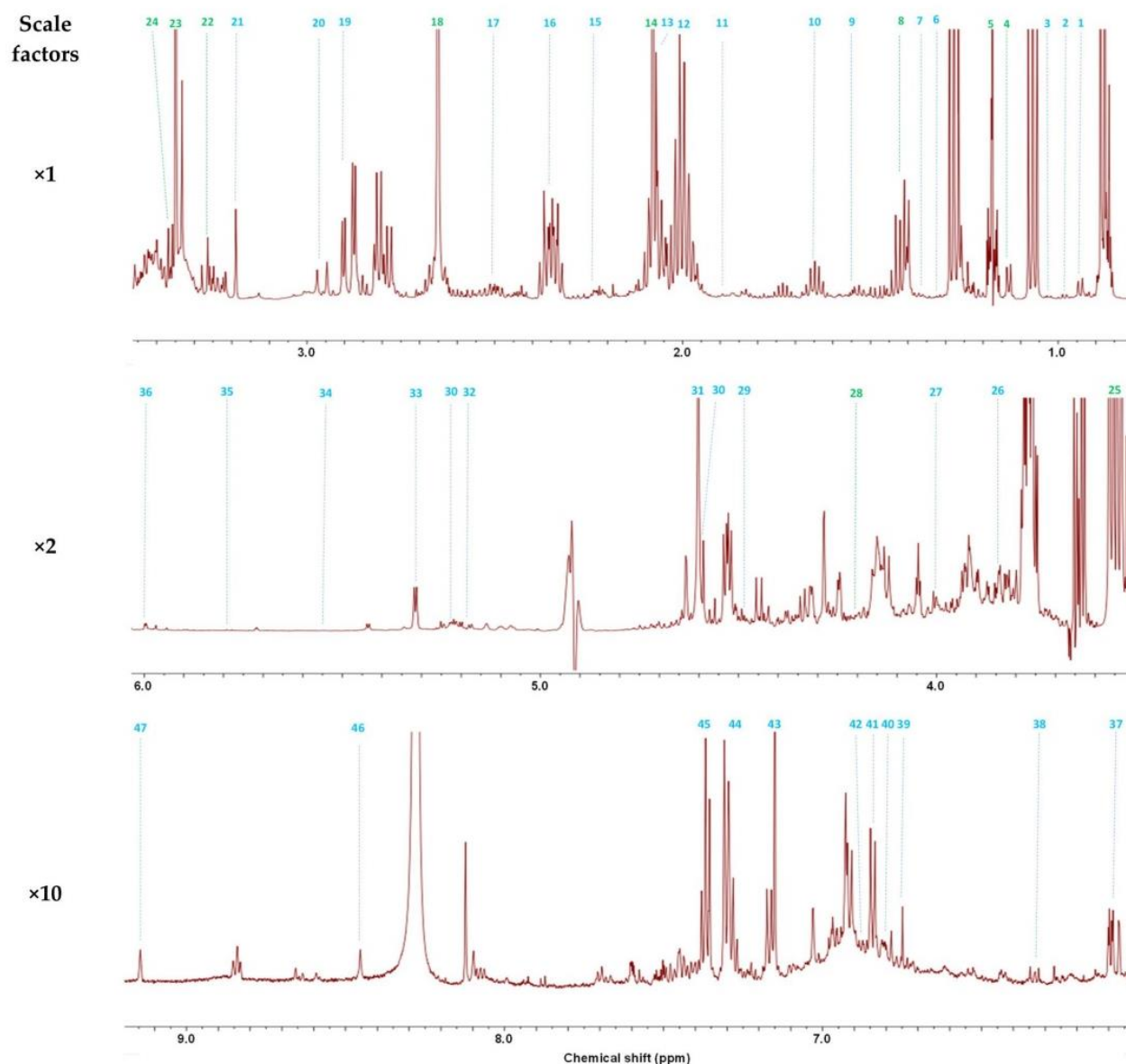
The typical  $^1\text{H-NMR}$  spectra of wine after solvent suppression are presented in Figure 1. The signals at 0.00 and 8.28 ppm correspond to TMS and calcium formate, respectively. All other signals correspond to wine constituents. Based on previous studies [8,17], 2D NMR analyses and pure chemical standards, forty-eight constituents were identified (Table 1), including amino acids, organic acids, alcohols, carbohydrates, phenolic compounds, esters, ketones and aldehydes.

**Table 1.** Chemical shifts and coupling constants used for compound identification. The signals chosen for quantitation are in bold.

Compound	$\delta^1\text{H}$ (Multiplicity, <i>J</i> in Hz, Assignment)
1 leucine	<b>0.96</b> ( <i>d</i> , 6.2, 2CH <sub>3</sub> ), 1.71 ( <i>m</i> , CHCH <sub>2</sub> ), 3.74 ( <i>m</i> , CH)
2 isoleucine	0.93 ( <i>t</i> , 7.4, CH <sub>3</sub> ), <b>0.99</b> ( <i>d</i> , 7.0, CH <sub>3</sub> ), 1.24 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 1.45 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 1.97 ( <i>m</i> , CH), 3.66 ( <i>d</i> , 3.9, CH)
3 valine	0.99 ( <i>d</i> , 7.3, CH <sub>3</sub> ), <b>1.04</b> ( <i>d</i> , 7.3, CH <sub>3</sub> ), 2.28 ( <i>m</i> , CH), 3.66 ( <i>d</i> , 4.3, CH)
4 2,3-butanediol	<b>1.13</b> ( <i>d</i> , 6.2, 2CH <sub>3</sub> ), 3.61 ( <i>m</i> , 2CH)
5 ethanol	<b>1.17</b> ( <i>t</i> , 7.2, CH <sub>3</sub> ), 3.65 ( <i>q</i> , CH <sub>2</sub> )
6 threonine	<b>1.32</b> ( <i>d</i> , 6.7, CH <sub>3</sub> ), 2.58 ( <i>d</i> , 4.9, CH), 4.24 ( <i>m</i> , CH)
7 acetoin	<b>1.37</b> ( <i>d</i> , 7.0, CH <sub>3</sub> ), 2.21 ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> ), 4.42 ( <i>q</i> , CH)
8 lactic acid	<b>1.40</b> ( <i>d</i> , 7.0, CH <sub>3</sub> ), 4.31 ( <i>q</i> , 7.0, CH)
9 alanine	<b>1.50</b> ( <i>d</i> , 7.2, CH <sub>3</sub> ), 3.76 ( <i>q</i> , CH)
10 isopentanol	0.88 ( <i>d</i> , 6.7, 2CH <sub>3</sub> ), 1.44 ( <i>q</i> , CH <sub>2</sub> ); <b>1.66</b> ( <i>m</i> , CH), 3.61 ( <i>t</i> , 6.7, CH <sub>2</sub> )
11 arginine	1.70 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), <b>1.89</b> ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 3.23 ( <i>t</i> , CH <sub>2</sub> ), 3.75 ( <i>t</i> , 6.5, CH)

12 proline	1.99 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 2.06 ( <i>m</i> , CH), 2.33 ( <i>m</i> , CH), 3.32 ( <i>dt</i> , 14.0, 7.1, CH), 3.42 ( <i>dt</i> , 11.6 and 7.0, CH), 4.11 ( <i>dd</i> , 8.6 and 6.4, CH)
13 ethyl acetate	1.26 ( <i>t</i> , 7.2, CH <sub>3</sub> ), 4.12 ( <i>q</i> , CH <sub>2</sub> ), 2.07 ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> )
14 acetic acid	2.08 ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> )
15 ethanal	2.23 ( <i>d</i> , 3.0, CH <sub>3</sub> ), 9.67 ( <i>q</i> , CH)
16 pyruvic acid	2.35 ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> )
17 γ-aminobutyric acid	1.96 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 2.50 ( <i>t</i> , 7.3, CH <sub>2</sub> ), 3.05 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> )
18 succinic acid	2.65 ( <i>s</i> , 2CH <sub>2</sub> )
19 malic acid	2.78 ( <i>dd</i> , 16.3 and 7.0, CH), 2.89 ( <i>dd</i> , 16.3 and 4.5, CH), 4.53 ( <i>dd</i> , CH)
20 citric acid	2.79 ( <i>d</i> , 15.6, CH <sub>2</sub> ), 2.94 ( <i>d</i> , 15.6, CH <sub>2</sub> )
21 choline	3.19 ( <i>s</i> , 3CH <sub>3</sub> ), 3.51 ( <i>dd</i> , CH <sub>2</sub> ), 4.05 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> )
22 myo-inositol	3.27 ( <i>t</i> , 9.7, CH), 3.52 ( <i>dd</i> , 10.0 and 2.8, 2CH), 3.61 ( <i>t</i> , 2.8, 2CH), 4.05 ( <i>t</i> , 2.8, CH)
23 methanol	3.35 ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> )
24 isobutanol	0.87 ( <i>d</i> , 6.7, 2CH <sub>3</sub> ), 1.73 ( <i>m</i> , CH), 3.36 ( <i>d</i> , 6.7, CH <sub>2</sub> )
25 glycerol	3.55 ( <i>dd</i> , 11.8 and 6.5, CH <sub>2</sub> ), 3.64 ( <i>dd</i> , CH <sub>2</sub> ), 3.77 ( <i>m</i> , CH)
26 mannitol	3.65 ( <i>dd</i> , 11.7, 6.2 CH <sub>2</sub> ), 3.73 ( <i>m</i> , CH), 3.77 ( <i>d</i> , 9.0, CH), 3.84 ( <i>dd</i> , 11.9, 2.8, CH <sub>2</sub> )
27 fructose	3.56 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 3.70 ( <i>m</i> , 2CH <sub>2</sub> ), 3.77 ( <i>m</i> , CHCHCH <sub>2</sub> ), 3.87 ( <i>dd</i> , 9.9, 3.4, CH), 3.97 ( <i>m</i> , CH), 4.00 ( <i>dd</i> , 12.8, 1.0 CH <sub>2</sub> ), 4.09 ( <i>m</i> , 2CH)
28 ethyl lactate	1.28 ( <i>t</i> , CH <sub>3</sub> ), 1.42 ( <i>d</i> , 7.0, CH <sub>3</sub> ), 4.22 ( <i>q</i> , 7.06, CH), 4.39 ( <i>q</i> , 7.0, CH)
29 arabinose	3.51 ( <i>dd</i> , CH), 3.68 ( <i>m</i> , CHCH <sub>2</sub> ), 3.83 ( <i>dd</i> , CH), 3.90 ( <i>m</i> , CHCH <sub>2</sub> ), 3.95 ( <i>m</i> , CH), 4.02 ( <i>m</i> , CHCH <sub>2</sub> ), 4.50 ( <i>d</i> , 7.7, CH), 5.25 ( <i>d</i> , CH)
30 glucose	3.23 ( <i>dd</i> , 9.2, 8.0, CH), 3.39 ( <i>m</i> , CH), 3.45 ( <i>dd</i> , 9.8, 3.7, CH), 3.72 ( <i>m</i> , CHCH <sub>2</sub> ), 3.82 ( <i>m</i> , CHCH <sub>2</sub> ), 3.88 ( <i>dd</i> , 12.2, 2.1, CH <sub>2</sub> ), 4.63 ( <i>d</i> , 7.9, CH), 5.22 ( <i>d</i> , 3.6, CH)
31 tartaric acid	4.60 ( <i>s</i> , 2CH)
32 xylose	3.21 ( <i>dd</i> , 9.3, 7.9, CH), 3.31 ( <i>t</i> , 11.4, CH <sub>2</sub> ), 3.42 ( <i>t</i> , 9.25, CH), 3.51 ( <i>dd</i> , 9.3, 3.7, CH), 3.63 ( <i>m</i> , CHCHCH <sub>2</sub> ), 3.91 ( <i>dd</i> , 11.5, 5.5, CH <sub>2</sub> ), 4.57 ( <i>d</i> , 7.9, CH), 5.19 ( <i>d</i> , 3.7, CH)
33 galacturonic acid	3.49 ( <i>dd</i> , 8.0, 10.0, CH), 3.69 ( <i>dd</i> , 9, 3.5, CH), 3.80 ( <i>dd</i> , 10.3, 3.8, CH), 3.92 ( <i>dd</i> , 10.3, 3.4, CH), 4.24 ( <i>dd</i> , 3.6, 1.2, CH), 4.26 ( <i>d</i> , 1.2, CH), 4.31 ( <i>dd</i> , 3.3, 1.4, CH), 5.32 ( <i>d</i> , 3.8, CH)
34 glucuronic acid	3.29 ( <i>t</i> , 8.6, CH), 3.51 ( <i>m</i> , 2CH), 3.58 ( <i>dd</i> , 9.7, 3.7, CH), 3.73 ( <i>m</i> , 2CH), 4.08 ( <i>d</i> , 10.8, CH), 4.64 ( <i>d</i> , 7.9, CH), 5.25 ( <i>d</i> , 3.7, CH), 5.55 ( <i>d</i> , 4, CH)
35 sorbic acid	1.82 ( <i>d</i> , 6.2, CH <sub>3</sub> ), 5.78 ( <i>d</i> , 15.3, CH), 6.25 ( <i>m</i> , 2CH), 7.16 ( <i>dd</i> , 15.3, 10.3, CH)
36 epicatechin	2.76 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 2.90 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 4.32 ( <i>m</i> , CH), 4.95 ( <i>m</i> , CH), 6.09 ( <i>d</i> , 2.0, CH), 6.12 ( <i>d</i> , 2.0, CH), 6.93 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 7.03 ( <i>d</i> , 2.0, CH)
37 catechin	2.53 ( <i>dd</i> , CH <sub>2</sub> ), 2.85 ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> ), 4.15 ( <i>m</i> , CH), 4.41 ( <i>d</i> , 7.0, CH), 5.99 ( <i>d</i> , 2.0, CH), 6.08 ( <i>d</i> , 2.3, CH), 6.84 ( <i>d</i> , 8.6, CH), 6.92 ( <i>m</i> , 2CH)
38 caffeic acid	6.33 ( <i>d</i> , 16.0, CH), 6.92 ( <i>d</i> , 8.0, CH), 7.07 ( <i>dd</i> , 8.2, 2.0, CH), 7.14 ( <i>d</i> , 2.0, CH), 7.29 ( <i>d</i> , CH)
39 fumaric acid	6.78 ( <i>s</i> , 2CH)
40 shikimic acid	2.21 ( <i>dd</i> , 18.2, 7.0, CH <sub>2</sub> ), 2.75 ( <i>dd</i> , 18.0, 5.3, CH <sub>2</sub> ), 3.74 ( <i>dd</i> , 8.6, 4.3, CH), 4.01 ( <i>m</i> , CH), 4.42 ( <i>t</i> , 4.1, CH), 6.82 ( <i>dt</i> , CH)
41 tyrosol	2.77 ( <i>t</i> , CH <sub>2</sub> ), 3.77 ( <i>t</i> , CH <sub>2</sub> ), 6.84 ( <i>m</i> , 8.4, 2CH), 7.17 ( <i>m</i> , 8.4, 2CH)
42 tyrosine	3.02 ( <i>dd</i> , CH <sub>2</sub> ), 3.17 ( <i>dd</i> , CH <sub>2</sub> ), 3.92 ( <i>dd</i> , CH), 6.86 ( <i>m</i> , 8.4, 2CH), 7.17 ( <i>m</i> , 8.6, 2CH)
43 gallic acid	7.16 ( <i>s</i> , 2CH)
44 phenethyl alcohol	2.85 ( <i>t</i> , 6.62, CH <sub>2</sub> ), 3.74 ( <i>t</i> , CH <sub>2</sub> ), 7.33 ( <i>m</i> , 5CH)
45 syringic acid	3.84 ( <i>s</i> , 2CH <sub>3</sub> ), 7.36 ( <i>s</i> , 2CH)
46 histidine	3.16 ( <i>dd</i> , 15.6, 7.7, CH), 3.23 ( <i>dd</i> , 16.0, 5.0, CH), 3.98 ( <i>dd</i> , 7.7, 5.0, CH), 7.09 ( <i>d</i> , 5.0, CH), 7.90 ( <i>d</i> , 1.1, CH)
47 trigonelline	4.42 ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> ), 8.07 ( <i>m</i> , CH), 8.82 ( <i>m</i> , 2CH), 9.11 ( <i>s</i> , CH)





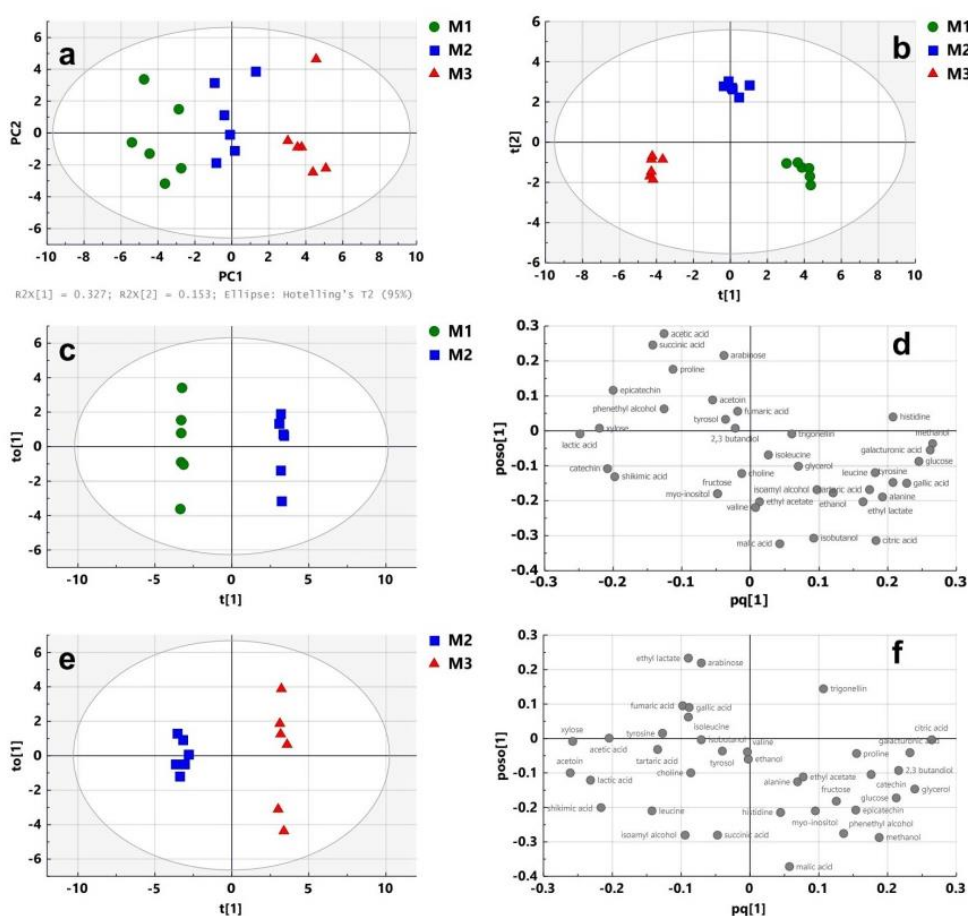
**Figure 1.** Typical  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of wine after water and ethanol suppression (NOESYGPPSID sequence). Identified constituents are listed in Table 1 (compounds in green are quantified on the ZGPR sequence).

## 2.2. Maturity Stages

The ability of  $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics to discriminate wines produced from grapes harvested at three different stages of maturity (M1: under-maturity; M2: maturity; M3: over-maturity) was assessed using multivariate analysis. Principal component analysis (PCA) followed by orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) was performed on the quantification data extracted from the  $^1\text{H-NMR}$  spectra. The analysis of the maturity effect was carried out using six replicates for each maturity stage.

The PCA score plot ( $R^2\text{X}(\text{cum})$  and  $Q^2(\text{cum})$  of 0.480 and 0.130, respectively) showed separation between the three stages of maturity (Figure 2a). To confirm this observation, OPLS-DA (number of latent variables 2 + 2 + 0) was performed (Figure 2b). The OPLS-DA score plots confirmed discrimination between wines with high validated predictability ( $Q^2 = 0.873$ ) and goodness of fit values ( $R^2\text{X}$  and  $R^2\text{Y}$  of 0.615 and 0.975, respectively). The validity of the OPLS-DA model was confirmed by cross-validated ANOVA (CV-ANOVA)

providing a significant  $p$ -value ( $3.12 \times 10^{-5}$ ). The recognition ability of the model was 100%, as shown in the misclassification table (Table S2). The under-maturity, maturity and over-maturity stages were completely distinguished from one another. This first result indicates that  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics is able to discriminate wines made from berries collected at different stages of maturity. To analyze the effect of under-mature and over-mature grapes on wine quality, the OPLS-DA model was further applied to discriminate the differential constituents between these wines and those made with grapes harvested at maturity. The OPLS-DA score and loading plots are shown in Figure 2c,d, respectively, for comparison of under-maturity/maturity (M1/M2), and in Figure 2e,f, respectively, for comparison of over-maturity/maturity (M3/M2). The OPLS-DA model parameters (Table S3) and cross-validation procedure demonstrated an excellent modeling and predictive ability in each case.



**Figure 2.** Multivariate analysis of  $^1\text{H-NMR}$  spectra of wine samples from grapes harvested at three different stages of maturity (M1: under-maturity; M2: maturity; M3: over-maturity): (a) PCA score plot; (b) OPLS-DA score plot; (c) OPLS-DA score showing separation of M1 and M2 samples; (d) loadings from OPLS-DA between M1 and M2 samples; (e) OPLS-DA score showing separation of M2 and M3 samples; (f) loadings from OPLS-DA between M2 and M3 samples ( $t[1]$  and  $to[1]$ : first predictive and orthogonal components;  $t[2]$ : second predictive component;  $pq[1]$  and  $poso[1]$ : predictive and orthogonal component loadings).

To identify the contribution of wine constituents to the discrimination between different groups, a combination of variable importance in projection (VIP) and  $p(\text{corr})$  values was used [27]. Potential differential compounds were selected with absolute VIP and  $p(\text{corr})$  values greater than 1.0 and 0.5, respectively. The highlighted wine

constituents were further controlled by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, and only those with a  $p$ -value of  $< 0.05$  were conserved. A total of 16 wine constituents including amino acids (alanine, histidine, leucine and tyrosine), organic acids (citric, lactic, tartaric and shikimic acids), sugar derivatives (glucose, galacturonic acids and xylose), phenolic compounds (catechin, epicatechin and gallic acid), an alcohol (methanol) and an ester (ethyl lactate) had a strong influence in distinguishing M2 from M1 wines. Wines made with grapes harvested at under-maturity contained less alanine, histidine, leucine, tyrosine, citric acid, tartaric acid, glucose, galacturonic acid, gallic acid, ethyl lactate and methanol (Figure S1). On the contrary, they contained more lactic acid, shikimic acid, xylose, catechin and epicatechin than wines made with grapes harvested at maturity. Similarly, a total of 10 wine constituents including organic acids (citric acid, lactic acid and shikimic acid), sugar derivatives (glucose, galacturonic acids and xylose) and alcohols (acetoin, 2,3-butanediol, glycerol and methanol) had a strong influence in separating M3 and M2. Wines made with grapes harvested at over-maturity contained more citric acid, glucose, galacturonic acid, 2,3-butanediol, glycerol and methanol (Figure S2). On the contrary, they contained less lactic acid, shikimic acid, xylose and acetoin than wines made with grapes harvested at maturity.

Most studies explored the ripening effect on the berries' metabolome [28], but few focused on the wine metabolome. Nevertheless, grape maturity generated significant sensory effects on wines [29]. In this study, a significant effect of grape maturity was observed on the Cabernet Sauvignon wine metabolome using  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics.

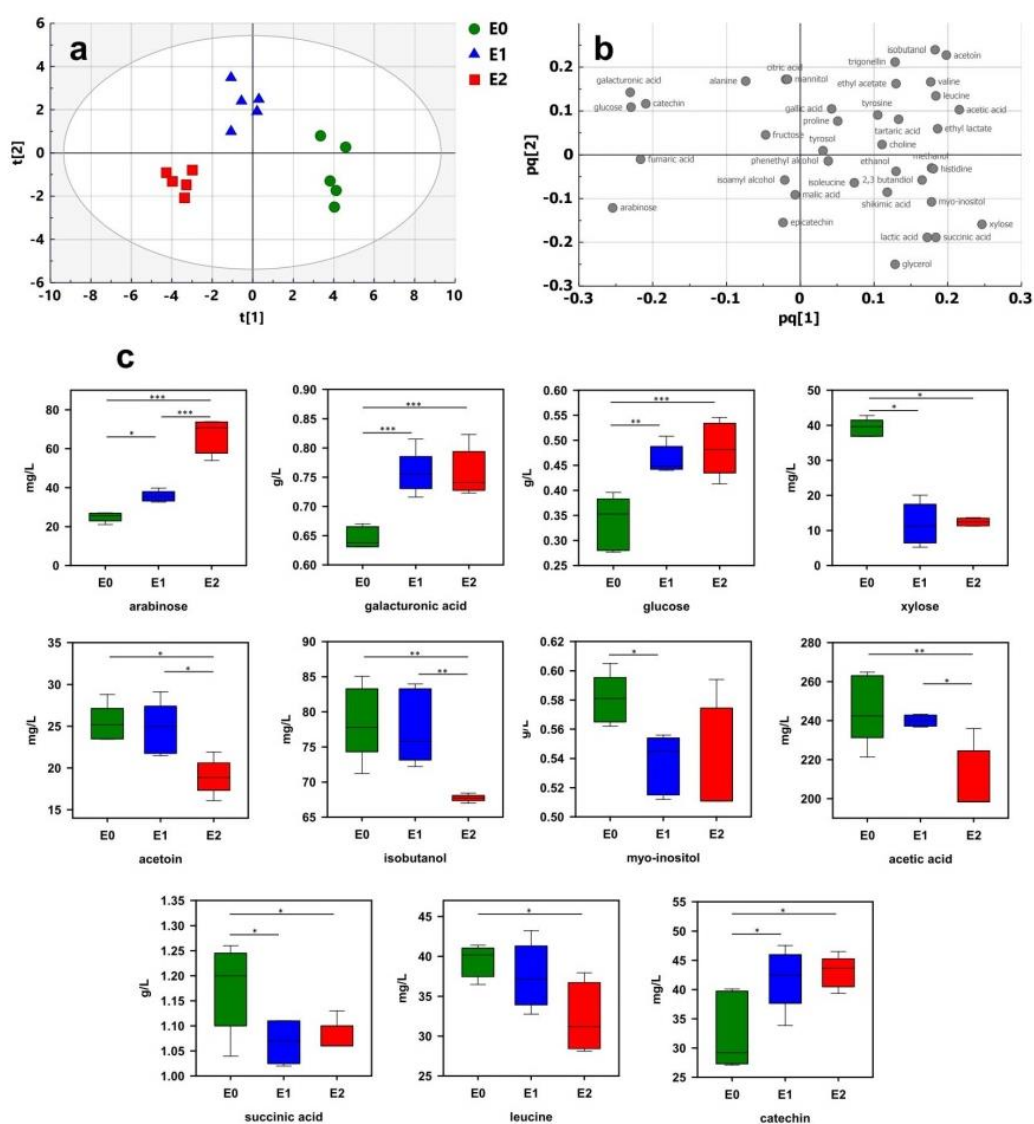
The overall trends observed are in agreement with the results obtained by Bindon et al. on Cabernet Sauvignon [30]. Even though the ethanol concentration increased from 13.7 at M1 to 14.2% at M3, this variation was not significant. Nevertheless, a significant increase in other alcohols such glycerol was observed, particularly between M2 and M3 (Figure S2). As expected, the higher lactic acid concentrations in M1 (mean  $1.90 \pm 0.09$  g/L) samples can be explained by the higher initial malic acid concentrations in grapes harvested at under-ripeness (Table S1). Indeed, as the finished wines underwent malolactic fermentation, the initial malate was partly transformed into lactate by lactic acid bacteria [31]. On the contrary, a significant increase in tartaric acid was observed between M1 and M2 samples. This result could be associated with the increase in tartaric acid in grapes between under-maturity and maturity (Table S1). Regarding the other acids, no significant variation was observed except for citric acid and shikimic acid. This observation is in agreement with literature data [30]. Practically all reducing sugars (glucose and fructose) were consumed, indicating the efficiency of fermentation. A higher content was observed in M3 samples (mean  $0.89 \pm 0.15$  g/L for glucose and fructose). As previously reported [32], proline was the main amino acid observed in wines (mean range 0.801–0.962 g/L), and the highest concentration was measured in M3 samples but with no significant difference from other modalities. In addition, a significant increase in four amino acids was observed between M1 and M2 samples (Figure S3). Interestingly, some specific trends were observed such as the significant variation in acetoin between M2 and M3 samples (means  $23 \pm 2$  and  $11 \pm 3$  mg/L, respectively). This compound is a well-known precursor of the biosynthesis of 2,3-butanediol, which contributes to the bouquet of the wine. To conclude,  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics was able to discriminate wines produced from grapes at different stages of ripeness, providing informative trends on the potential quality of the wine.

### 2.3. Enzyme Treatments

Enzymes are used to facilitate hydrolysis of the cell walls, providing a more efficient extraction of phenolic compounds [33]. The effect of two different preparations, E1 and E2, was monitored using  $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics and multivariate analysis. Both preparations are pectolytic enzymes. Five replicates for each enzyme were analyzed.

Wine samples were treated by enzymes E1 and E2. The data extracted from  $^1\text{H-NMR}$  spectra were compared by PCA and OPLS-DA. The PCA score plot exhibited separation

between the three modalities (Figure S3a). To better emphasize the discrimination, OPLS-DA was performed. Score and loading plots are shown in Figure 3a,b, respectively. A clear tendency to discriminate the enzyme treatments was observed ( $Q^2$ ,  $R^2X$  and  $R^2Y$  of 0.617, 0.869 and 0.518, respectively). To validate the model, a cross-validation procedure was performed, which indicated that all wines were correctly classified (Table S4).  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics allows observing the effect of the use of enzymes independent of the grape maturity stage. To analyze the effect of each enzymatic preparation, the OPLS-DA model was further applied to discriminate the differential constituents between these wines and untreated samples. Discriminating constituents were identified based on VIP and absolute  $p(\text{corr})$  values and confirmed by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. A total of 11 compounds were identified (Figure 3c).



**Figure 3.** Multivariate analysis of  $^1\text{H}$ -NMR spectra of wine samples treated by different enzymes (E0: untreated; E1: enzyme 1; E2: enzyme 2): (a) OPLS-DA score plot; (b) loading plot; (c) boxplots of 11 most discriminant wine constituents ( $t[1]$  and  $t[2]$ : first and second predictive components;  $pq[1]$  and  $pq[2]$ : first and second predictive component loadings). The significance in the difference was calculated by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (indicated as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

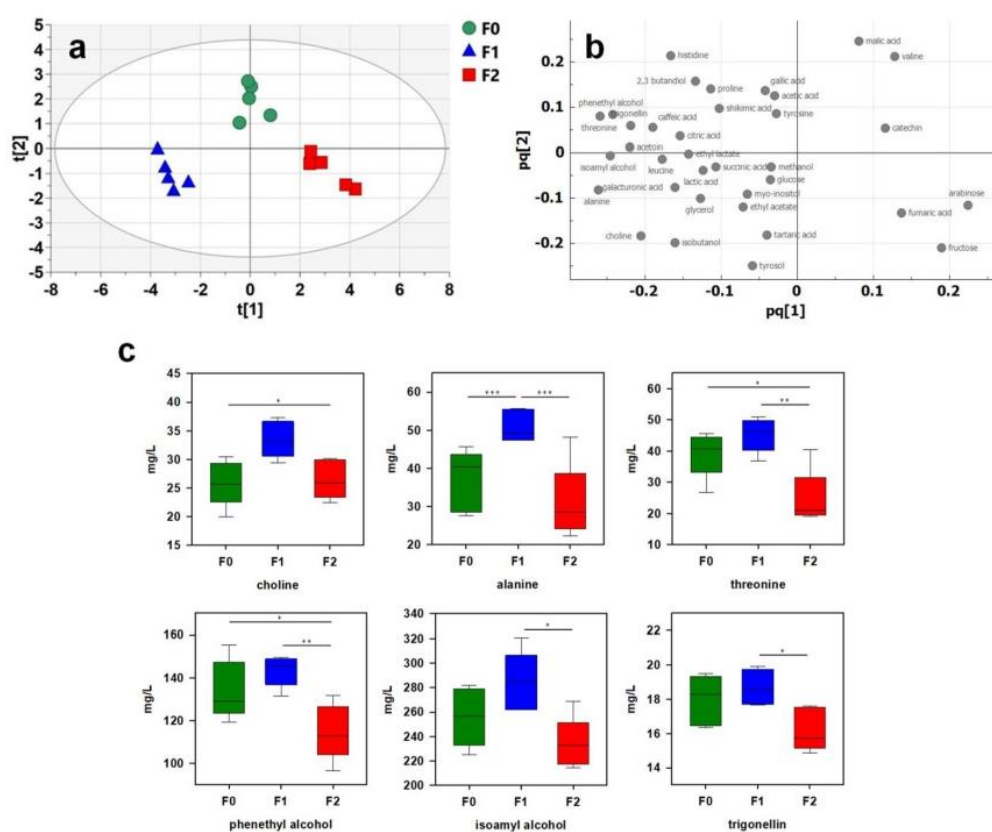
Wine samples treated by enzymes contained significantly more arabinose, galacturonic acid, glucose and catechin and less xylose, myo-inositol and succinic acid. As expected, the enzyme treatments had a significant effect on wine polysaccharide composition [24]. Pectolytic enzymes reduce the molecular weight of polysaccharides, resulting in an increase in free monosaccharides. Significant increases in galacturonic acid, arabinose and glucose have previously been reported in wine samples treated by enzyme preparations [34]. These are clear indicators of the pectolytic activity of enzymes resulting from the degradation of pectic polysaccharides in the cell walls of the grape berry. The increase in galacturonic acid, well above the sensory detection threshold (125 mg/L [35]), could contribute to the wine sourness. Surprisingly, the levels of xylose decreased in both enzymatic treatments. A similar effect was observed in Merlot red wines after enzyme treatments [36]. This could be due to a competitive effect between the used enzymes and endogenous pectinases that are naturally present in the grape solids. The specific significant increase in catechin confirms the ability of enzymes to enhance phenolic extraction during winemaking [36]. Succinic acid is the main nonvolatile acid produced by yeasts during alcoholic fermentation [37]. Even though this compound could be formed by yeasts until the stationary phase of alcoholic fermentation, the decrease in succinic acid observed with both enzymes cannot be explained by the modulation of yeast activity. An interaction with the products released by the enzymes could be at the origin of this decrease. Interestingly, specific trends of enzymatic preparation E2 were observed (Figure 3c). The use of preparation E2 induced a higher level of arabinose than that from E1. The release of significant quantities of arabinose could be due to an extensive and specific degradation of arabinose-rich polysaccharides by E2. On the contrary, E2 significantly reduced the production of acetoin, isobutanol, acetic acid and leucine in comparison to the E1 and control modalities. As previously mentioned, acetoin is the precursor of 2,3-butanediol, and isobutanol is a higher alcohol involved in wine aroma perception [38]. These results demonstrate the ability of  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics to monitor the effects of enzyme treatment in winemaking processes.

#### 2.4. Fining Treatments

Fining treatments are mainly used in winemaking to clarify and stabilize the wine [39]. They bind to specific compounds (proteins, polymeric phenols or tannins) and form insoluble complexes that can be removed from the wine. Depending on the desired objective, different classes of fining agents can be used. Due to their capacity to bind with tannins, fining agents having a proteinaceous origin are widely used. In this study, the effects of two different fining agents on the wine metabolome were studied by using  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics. Two fining agents of proteinaceous origin were investigated: a vegetable protein (F1), and a mix of pea protein and PVPP (F2).

Wine samples were treated by finings F1 and F2. The data extracted from  $^1\text{H-NMR}$  spectra were compared by PCA (Figure S3b) followed by OPLS-DA to confirm the observed trends. OPLS-DA score and loading plots are shown in Figure 4a,b, respectively. A clear discrimination between the three sets of wine was observed in the OPLS-DA score plot ( $Q^2$ ,  $R^2X$  and  $R^2Y$  of 0.666, 0.897 and 0.455, respectively). To validate the model, a cross-validation procedure was performed, which indicated that all wines were correctly classified (Table S5). As a first result, these data indicate that  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics is able to monitor the impact of proteinaceous finings on the wine metabolome. These treatments can induce precipitation of phenolic compounds, particularly polymerized and galloyled tannins [40], affecting the wine organoleptic properties. As shown in Figure 4C, the wines treated by fining F1 presented a higher concentration of amino acids than the untreated wines. These wines contained significantly higher concentrations of alanine and threonine ( $51 \pm 4$  and  $45 \pm 5$  mg/L, respectively) in addition to showing an increase in choline (mean  $33 \pm 3$  mg/L) in comparison to the untreated wines and fining F2 treatment. It is surprising to observe an increase in some constituents under the action of the finings. These agents are rather known to precipitate wine constituents. Nevertheless, Maury et

al. observed a significant increase in amino acids due to proteinaceous fining treatment in a model wine solution [41]. In addition, a specific action of each fining could be observed. While fining F1 had no significant impact on the main constituents observed by  $^1\text{H-NMR}$ , fining F2 induced a significant decrease in some wine constituents such as trigonelline, phenethyl alcohol and isoamyl alcohol (Figure 4c). Phenethyl alcohol is the most important phenolic higher alcohol present in wine [42]. A recent study showed that certain processes can reduce the content of phenyl alcohol in addition to other volatile compounds [43]. Isoamyl alcohol, together with phenethyl alcohol, isobutanol and methionol, is considered one of the most aroma-powerful higher alcohols [38]. In addition, isoamyl alcohol seems to reduce fruity and woody notes in wines. Even though higher alcohol effects depend on the wine aromatic context,  $^1\text{H-NMR}$  metabolomics approaches could provide valuable data concerning the effects of fining treatments on wine organic properties.



**Figure 4.** Multivariate analysis of  $^1\text{H-NMR}$  spectra of wine samples treated by different finings (F0: untreated; F1: fining 1; F2: fining 2): (a) OPLS-DA score plot; (b) loading plot; (c) boxplots of 6 most discriminant wine constituents ( $t[1]$  and  $t[2]$ : first and second predictive components;  $pq[1]$  and  $pq[2]$ : first and second predictive component loadings). The significance in the difference was calculated by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (indicated as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Wine Samples

For this study, Cabernet Sauvignon grapes were harvested in 2019 from a vineyard of the Bordeaux Superieur wine region. The grapes were harvested at three different stages of maturity: under-maturity (M1), maturity (M2) and over-maturity (M3), one week between each harvest was observed. Maturity was monitored using a set of different parameters including pH, sugar content, total acidity and malic acid level. These parameters were measured following OIV methods (OIV-OENO 598-2018, OIV-OENO

599-2018, OIV-OENO 600-2018, OIV-MA-AS311-02, OIV-MA-F1-06, OIV-MA-F1-09, OIV-MA-AS313-01) using an Analyzer Y15 (BioSystems, Spain). Data are reported in Table S1.

### 3.2. Winemaking

Wines were elaborated at the nanovinification platform (Bordeaux Vinif) of the Institute of Vine and Wine Sciences of Bordeaux (ISVV) following a specific nanovinification method [44]. Briefly, grapes from each of the 3 modalities were destemmed and crushed. The crushed grapes were macerated in 10 L stainless-steel tanks. At the same time, bisulfite (5 mg/L of must) was added. Fermentations were initiated with Actiflore F33 (commercial dry *Saccharomyces cerevisiae* yeast, Laffort, France) inoculated at 0.1 g/L. Each lot was fermented to completion. The process was monitored by density measurement using the electronic densimeter DMA 35 Basic (Anton Paar France, Ullis, France). At the end of alcoholic fermentation, each lot was pressed at 1 bar and transferred to 5 L glass tanks. Malolactic fermentations were performed after direct inoculation with commercial *Oenococcus oeni* bacteria SB3 Direct (Laffort, Bordeaux, France). Three weeks after the beginning of winemaking, the wines were racked, and sulfur dioxide was adjusted to 50 mg/L of wine. The wines were cold stabilized at 4 °C for 1 week, bottled and stored in the experimental wine cellar at 15 °C until treatment and analysis. The effects of two enzymes and two fining agents were compared to untreated samples. For enzyme treatments, two different pectolytic enzymes were used at the concentration recommended by the provider: enzyme 1 (E1) at 4 g/hL, and enzyme 2 (E2) at 3mL/hL. The preparations were added at the end of malolactic fermentation. Samples were kept at 15 °C for 15 days before analysis. For fining processes, fining agents were added, after malolactic fermentation, to 50 mL of wine respecting the proportions commonly used in wineries: fining 1 (F1), vegetable protein at 3 g/hL; fining 2 (F2), pea protein and PVPP (polyvinylpyrrolidone) at 80 g/hL. Samples were kept at 15 °C for 3 days before analysis. The supernatants were collected for the preparation of the NMR analyses. At least five biological replicates were analyzed for each treatment.

### 3.3. Sample Preparation

Wines samples were prepared according to our previous work [9]. Briefly, 420 µL wine was mixed with 120 µL phosphate buffer (1 M, pH 2.6), and 60 µL deuterated water containing 0.5 mM sodium trimethylsilylpropanoic acid (TMSP) and 7 mM calcium formate. The pH was adjusted to 3.1 using a small-scale semi-automatic system (BTpH, Bruker BioSpin, Germany) using a 1M HCl solution.

### 3.4. NMR Analysis

The <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on a 600 Mhz Avance III NMR spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 600.27 MHz, equipped with a TXI 5 mm probe with z gradient coils. The measurements were performed at 293 K, using Topspin 4.0.8 software (Bruker, Wissembourg, France). Three different sequences were used: the ZG30 and ZGPR sequences were set at 8 ns (number of scans) and NOESYGPPS1D was set at 32 ns for water and ethanol suppressions.

The acquisition parameters were set as follows: The free induction decay (FID) was collected into a time domain (TD) of 64K data points, with a spectral width (SW) of 16 ppm, an acquisition time (AQ) of 3.40 s and a relaxation delay (RD) of 5 s per scan. Then, 90° pulse calibration was carried out for each sample automatically, and the shimming was set manually in gs mode for each spectrum in order to obtain the finest possible line width (lower than 1 Hz). Water and ethanol signal suppressions were achieved during RD using a shaped pulse with a multiple-band selective solvent suppression (7 Hz centered on each ethanol signal, and 20 Hz for water), with a power level for presaturation of 50.37 dB and a shaped pulse for presaturation of 34.83 dB.

The FID was multiplied by an exponential function corresponding to a 0.3 Hz line-broadening factor prior to the Fourier transform. Manual phase and baseline correction was applied to the resulting spectrum, which was then manually phased and aligned to zero using the TMS signal. Wine constituents were identified based on previous studies [8,17], 2D NMR analyses and pure chemical standards. Compounds were quantified by targeted analysis, by the global spectral deconvolution method (GSD) [45], using the simple mixture analysis (SMA) plugin of MestReNova 12.0 software (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain). Calcium formate was used as an internal standard for quantitation.

### 3.5. Multivariate Data Analysis

Statistical analyses were carried out using SIMCA 16.0 software (Sartorius, Goettingen, Germany). No data preprocessing was performed prior to statistical analysis. Principal component analysis (PCA) was performed to visualize and observe the distribution of the metabolic variance of the dataset. Orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) was performed to sharpen the separation between observation groups [27,46]. OPLS-DA was developed as an improvement of the PLS-DA procedure to discriminate classes [47,48]. The results were visualized in the form of score plots and loading plots. Hotelling's  $T^2$  ellipse, in score plots, defines the 95% confidence region. The model quality was described by R-squared ( $R^2$ ) and Q-squared ( $Q^2$ ) values.  $R^2X$  and  $R^2Y$  represent the goodness of fit or explained variation, and  $Q^2$  represents the goodness of prediction or predicted variation [49]. Results are presented in the form of score plots (each point shows an individual wine sample) and loading plots (each coordinate shows one wine constituent). The variable importance of projection (VIP) represents the total importance of each variable in explaining the model. The  $p(\text{corr})$  value represents the correlation coefficient between the model and original data (ranged between  $-1.0$  and  $1.0$ ) for each loading. OPLS-DA models were validated by analysis of variance testing of cross-validated predictive residuals (CV-ANOVA), with the  $p$ -value indicating the model significance. The recognition abilities of the OPLS-DA models were assessed using misclassification tables. The potential discriminant metabolites were identified using VIP and  $p(\text{corr})$  values [27]. Metabolites with VIP and absolute  $p(\text{corr})$  values larger than  $1.0$  and  $0.5$ , respectively, were considered potential discriminant metabolites. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison procedure was used to identify the discriminant metabolites.

## 4. Conclusions

In our previous studies, we showed that NMR is a valuable tool for ensuring wine traceability complementary to the OIV's official methods [9,50]. NMR combines several advantages that make it a tool of choice for wine metabolomic analysis. In this study, our main goal was to elucidate whether NMR metabolomics could provide valuable data to monitor the effects of winemaking processes including grape maturation and enzyme and fining treatments. The results indicate that NMR metabolomics can discriminate these different winemaking processes. This technique is efficient in quantifying different wine constituents and has the advantages of being fast and reproducible. Combined with multivariate statistical analyses, it allows the identification of some impacted metabolites by each specific winemaking practice. As a complement to other analytical techniques and sensory evaluations, NMR metabolomics could provide valuable new data concerning the impact of winemaking practices on wine organoleptic properties. Additionally, more research is needed to better understand the potential contribution of NMR metabolomics to the investigation of the effects of winemaking practices on wine quality.

**Supplementary Materials:** The following are available online, Figure S1: Boxplots of 16 most discriminant wine constituents based on  $^1\text{H}$ -NMR analysis of wines produced from grapes harvested at under-maturity (M1) and at maturity (M2), Figure S2: Boxplots of 10 most discriminant wine constituents based on  $^1\text{H}$ -NMR analysis of wines produced from grapes harvested at maturity



(M2) and at over-maturity (M3), Figure S3: PCA score plots of <sup>1</sup>H-NMR spectra of wine samples, Table S1: Grape pH, sugar content, total acidity and malic acid contents at the three different harvest times (M1: under-maturity; M2: maturity; M3: over-maturity), Table S2: Cross-validation tables of OPLS analyses of wine samples from grapes at different stages of maturity (M1: under-maturity; M2: maturity; M3: over-maturity), Table S3: OPLS-DA model parameters for discrimination between M1 (under-maturity), M2 (maturity) and M3 (over-maturity). OPLS-DA models were controlled using cross-validation for discrimination between the three groups, and 100 permutation tests of the corresponding validation plots, Table S4: Cross-validation tables of OPLS analyses of wine samples treated by enzymes (E0: control; E1: enzyme 1; E2: enzyme 2), Table S5: Cross-validation tables of OPLS analyses of wine samples treated by fining agents (F0: control; F1: fining 1; F2: fining 2).

**Author Contributions:** Conceptualization, methodology, method validation, formal analysis, investigation, data curation, I.L.M., J.M.-P., C.B., S.L., T.R. and G.D.C.; writing—original draft preparation, I.L.M. and T.R.; writing—review and editing, I.L.M., J.M.-P., S.L., T.R. and G.D.C.; supervision, S.L., T.R. and G.D.C.; funding acquisition, S.L. and T.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (Inès Le Mao was the recipient of a CIFRE PhD fellowship from ANRT and Baron Philippe de Rothschild S.A.), Bordeaux Metabolome Facility, MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project), and the nanovinification platform Bordeaux Vinif. We also want to thank Biolaffort for the financial support during the study.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article, and they are available from the first corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Sample Availability:** Samples are available from the first corresponding author.

## References

1. Cevallos-Cevallos, J.M.; Reyes-De-Corcuera, J.I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M.D.; Rodrick, G.E. Metabolomic analysis in food science: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 557–566.
2. Kim, S.; Kim, J.; Yun, E.J.; Kim, K.H. Food metabolomics: From farm to human. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *37*, 16–23.
3. Valls Fonayet, J.; Loupit, G.; Richard, T. Chapter Ten—MS- and NMR-metabolomic tools for the discrimination of wines: Applications for authenticity. *Adv. Bot. Res.* **2021**, *98*, 297–357.
4. Viskić, M.; Bandić, L.M.; Korenika, A.-M. J.; Jeromel, A. NMR in the service of wine differentiation. *Foods* **2021**, *10*, 120.
5. Solovyev, P.A.; Fauhl-Hassek, C.; Riedl, J.; Esslinger, S.; Bontempo, L.; Camin, F. NMR spectroscopy in wine authentication: An official control perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 2040–2062.
6. Sobolev, A.P.; Thomas, F.; Donarski, J.; Ingallina, C.; Circi, S.; Cesare Marincola, F.; Capitani, D.; Mannina, L. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *91*, 347–353.
7. Tabago, M.K.A.G.; Calingacion, M.N.; Garcia, J. Recent advances in NMR-based metabolomics of alcoholic beverages. *Food Chem. Mol. Sci.* **2021**, *2*, 100009.
8. Gougeon, L.; Da Costa, G.; Le Mao, I.; Ma, W.; Teissedre, P.-L.; Guyon, F.; Richard, T. Wine analysis and authenticity using <sup>1</sup>H-NMR metabolomics data: Application to Chinese wines. *Food Anal. Methods* **2018**, *11*, 3425–3434.
9. Gougeon, L.; da Costa, G.; Guyon, F.; Richard, T. <sup>1</sup>H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food Chem.* **2019**, *301*, 125257.
10. Godelmann, R.; Kost, C.; Patz, C.-D.; Ristow, R.; Wachter, H. Quantitation of compounds in wine using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: Description of the method and collaborative study. *J. AOAC Int.* **2016**, *99*, 1295–1304.
11. Son, H.-S.; Hwang, G.-S.; Kim, K.M.; Ahn, H.-J.; Park, W.-M.; Van Den Berg, F.; Hong, Y.-S.; Lee, C.-H. Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using <sup>1</sup>H NMR analysis coupled with multivariate statistics. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57*, 1481–1490.
12. Fan, S.; Zhong, Q.; Fauhl-Hassek, C.; Pfister, M.K.H.; Horn, B.; Huang, Z. Classification of Chinese wine varieties using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Food Control* **2018**, *88*, 113–122.
13. Caruso, M.; Galgano, F.; Castiglione Morelli, M.A.; Viggiani, L.; Lencioni, L.; Giussani, B.; Favati, F. Chemical profile of white wines produced from ‘Greco bianco’ grape variety in different Italian areas by nuclear magnetic resonance (NMR) and conventional physicochemical analyses. *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60*, 7–15.
14. Pereira, G.E.; Gaudillère, J.P.; Van Leeuwen, C.; Hilbert, G.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D. <sup>1</sup>H-NMR metabolic profiling of wines from three cultivars, three soil types and two contrasting vintages. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2007**, *41*, 103–109.

15. Lee, J.-E.; Hwang, G.-S.; Van Den Berg, F.; Lee, C.-H.; Hong, Y.-S. Evidence of vintage effects on grape wines using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic study. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *648*, 71–76.
16. Cassino, C.; Tsolakis, C.; Bonello, F.; Gianotti, V.; Osella, D. Wine evolution during bottle aging, studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Res. Int.* **2018**, *116*, 566–577.
17. Amargianitaki, M.; Spyros, A. NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2017**, *4*, 9.
18. Alves Filho, E.G.; Silva, L.M.A.; Ribeiro, P.R.V.; de Brito, E.S.; Zocolo, G.J.; Souza-Leão, P.C.; Marques, A.T.B.; Quintela, A.L.; Larsen, F.H.; Canuto, K.M. <sup>1</sup>H NMR and LC-MS-based metabolomic approach for evaluation of the seasonality and viticultural practices in wines from São Francisco River Valley, a Brazilian semi-arid region. *Food Chem.* **2019**, *289*, 558–567.
19. López-Rituerto, E.; Savorani, F.; Avenoza, A.; Busto, J.H.; Peregrina, J.M.; Engelsen, S.B. Investigations of la Rioja terroir for wine production using <sup>1</sup>H NMR metabolomics. *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60*, 3452–3461.
20. Mazzei, P.; Spaccini, R.; Francesca, N.; Moschetti, G.; Piccolo, A. Metabolomic by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy differentiates “Fiano Di Avellino” white wines obtained with different yeast strains. *J. Agric. Food. Chem.* **2013**, *61*, 10816–10822.
21. De Pascali, S.A.; Coletta, A.; Del Coco, L.; Basile, T.; Gambacorta, G.; Fanizzi, F.P. Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chem.* **2014**, *161*, 112–119.
22. Baiano, A.; Terracone, C.; Longobardi, F.; Ventrella, A.; Agostiano, A.; Del Nobile, M.A. Effects of different vinification technologies on physical and chemical characteristics of Sauvignon blanc wines. *Food Chem.* **2012**, *135*, 2694–2701.
23. González-Neves, G.; Favre, G.; Gil, G. Effect of fining on the colour and pigment composition of young red wines. *Food Chem.* **2014**, *157*, 385–392.
24. Doco, T.; Williams, P.; Cheynier, V. Effect of flash Release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 6643–6649.
25. Parish, K.J.; Herbst-Johnstone, M.; Bouda, F.; Klaere, S.; Fedrizzi, B. Pre-fermentation fining effects on the aroma chemistry of Marlborough Sauvignon blanc press fractions. *Food Chem.* **2016**, *208*, 326–335.
26. Arnous, A.; Meyer, A.S. Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera* L.) by multicomponent enzymes treatment. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *49*, 68–77.
27. Wheelock, Å.M.; Wheelock, C.E. Trials and tribulations of ‘omics data analysis: Assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 2589–2596.
28. Benbouguerra, N.; Valls-Fonayet, J.; Krisa, S.; Garcia, F.; Saucier, C.; Richard, T.; Hornedo-Ortega, R. Polyphenolic characterization of Merlot, Tannat and Syrah skin extracts at different degrees of maturity and anti-inflammatory potential in RAW 264.7 cells. *Foods* **2021**, *10*, 541.
29. Ferrero-del-Teso, S.; Arias, I.; Escudero, A.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P.; Sáenz-Navajas, M.-P. Effect of grape maturity on wine sensory and chemical features: The case of Moristel wines. *LWT* **2020**, *118*, 108848.
30. Bindon, K.; Varela, C.; Kennedy, J.; Holt, H.; Herderich, M. Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 1. Grape and wine chemistry. *Food Chem.* **2013**, *138*, 1696–1705.
31. Lee, J.E.; Hong, Y.S.; Lee, C.H. Characterization of fermentative behaviors of lactic acid bacteria in grape wines through <sup>1</sup>H NMR- and GC-based metabolic profiling. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57*, 4810–4817.
32. Long, D.; Wilkinson, K.L.; Poole, K.; Taylor, D.K.; Warren, T.; Astorga, A.M.; Jiranek, V. Rapid method for proline determination in grape juice and wine. *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60*, 4259–4264.
33. Muñoz, O.; Sepúlveda, M.; Schwartz, M. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. *Food Chem.* **2004**, *87*, 487–490.
34. Li, S.; Bindon, K.; Bastian, S.E.P.; Jiranek, V.; Wilkinson, K.L. Use of winemaking supplements to modify the composition and sensory properties of Shiraz wine. *J. Agric. Food. Chem.* **2017**, *65*, 1353–1364.
35. Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, *56*, 9190–9199.
36. Ducasse, M.-A.; Canal-Llauberes, R.-M.; de Lumley, M.; Williams, P.; Souquet, J.-M.; Fulcrand, H.; Doco, T.; Cheynier, V. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chem.* **2010**, *118*, 369–376.
37. Thoukis, G.; Ueda, M.; Wright, D. The formation of succinic acid during alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 1–8.
38. De-la-Fuente-Blanco, A.; Sáenz-Navajas, M.-P.; Ferreira, V. On the effects of higher alcohols on red wine aroma. *Food Chem.* **2016**, *210*, 107–114.
39. Marangon, M.; Vincenzi, S.; Curioni, A. Wine Fining with Plant Proteins. *Molecules* **2019**, *24*, 2186.
40. Gil, M.; Louazil, P.; Iturmendi, N.; Moine, V.; Cheynier, V.; Saucier, C. Effect of polyvinylpyrrolidone treatment on rosé wines during fermentation: Impact on color, polyphenols and thiol aromas. *Food Chem.* **2019**, *295*, 493–498.
41. Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V. Highlighting protein fining residues in a model red wine. *Food Chem.* **2019**, *279*, 272–278.
42. Jackson, R.S. Chapter 6—Chemical constituents of grapes and wine. In *Wine Science*, 5th ed.; Jackson, R.S. Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 375–459.
43. Ma, T.-Z.; Gong, P.-F.; Lu, R.-R.; Zhang, B.; Morata, A.; Han, S.-Y. Effect of different clarification treatments on the volatile composition and aromatic attributes of ‘Italian Riesling’ icewine. *Molecules* **2020**, *25*, 2657.

44. Rousserie, P.; Lacampagne, S.; Vanbrabant, S.; Rabot, A.; Geny-Denis, L. Wine tannins: Where are they coming from? A method to access the importance of berry part on wine tannins content. *MethodsX* **2020**, *7*, 100961.
45. Cobas, C.; Seoane, F.; Domínguez, S.; Sykora, S.; Davies, A.N. A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD). *Spectrosc. Eur.* **2011**, *23*, 26–30.
46. Tyagi, R.; Maan, K.; Khushu, S.; Rana, P. Urine metabolomics based prediction model approach for radiation exposure. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16063.
47. Westerhuis, J.A.; van Velzen, E.J.J.; Hoefsloot, H.C.J.; Smilde, A.K. Multivariate paired data analysis: Multilevel PLSDA versus OPLSDA. *Metabolomics* **2010**, *6*, 119–128.
48. Trygg, J.; Wold, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* **2002**, *16*, 119–128.
49. Ruiying, C.; Zeyun, L.; Yongliang, Y.; Zijia, Z.; Ji, Z.; Xin, T.; Xiaojian, Z. A comprehensive analysis of metabolomics and transcriptomics in non-small cell lung cancer. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232272.
50. Gougeon, L.; da Costa, G.; Richard, T.; Guyon, F. Wine authenticity by quantitative <sup>1</sup>H NMR versus multitechnique analysis: A case study. *Food Anal. Methods* **2019**, *12*, 956–965.

## II.3 Évolution des vins en barriques

### II.3.1 Présentation de l'étude

Dans le cadre des recherches réalisées pour le Château Mouton Rothschild et en complément des analyses sensorielles réalisées par le château lui-même, nous avons suivi par RMNq l'évolution des vins en barriques en fonction de la qualité des fûts de chênes utilisés.

En effet, comme indiqué dans l'introduction bibliographique, la maturation en fût de chêne impacte fortement sur la qualité du vin, l'évolution étant liée aux qualités du contenant. Dans cette étude nous avons suivi le vieillissement des vins du Château dans des barriques achetées chez différents fabricants. Nous avons réalisé des prélèvements au bout d'un mois et au bout de douze mois.

### II.3.2 Publication

Les résultats de cette étude ont été rédigés sous forme d'un article scientifique intitulé « **Red wine evolution during oak barrels aging monitored by <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics** », en cours de soumission dans la revue Journal of Food Composition and Analysis.

1 **Red wine evolution during oak barrels aging monitored by <sup>1</sup>H-NMR-based**

2 **metabolomics**

3

4 Inès Le Mao, Gregory Da Costa, Tristan Richard\*

5

6 *Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, UMR OENO, UMR 1366, ISVV, F-33140 Villenave d'Ornon,*

7 *France*

8

9 \* Corresponding author: T. Richard, [tristan.richard@u-bordeaux.fr](mailto:tristan.richard@u-bordeaux.fr)

10

11

12

### 13 **Abstract**

14           Wine aging in oak barrel is a well-known winemaking practice that allows among  
15 other things to bring roundness and complexity to the wine. The study of wine evolution  
16 during barrel aging is crucial to insure wine quality. In this study, red wines produced in a  
17 wine growing estate of Bordeaux region were monitored after one and twelve months of aging  
18 in oak barrels in the estate cellar. Wines were kept in oak barrels from three different  
19 manufacturers. The evolution of wine constituents during aging was monitored by <sup>1</sup>H-NMR-  
20 based metabolomics combined to multivariate statistical analysis. NMR spectra were  
21 suggested to targeted and untargeted analysis. This approach permitted to observe wine  
22 maturation effect and to identify discriminant metabolites. Wines analyzed after one month of  
23 aging exhibit higher contents in amino acids, catechin and epicatechin, acetoin and choline.  
24 Whereas wine analyzed twelve months after aging present higher contents in acetic acid, ethyl  
25 lactate, arabinose and glucose. In addition, significant differences were observed between  
26 wines depending on the barrel manufacturers.

27

28

29 **Keywords:** Wine; Oak barrels; aging; NMR metabolomics; fingerprinting

### 30 **1. Introduction**

31           The maturing of wine is the period between the end of the maceration and the  
32 bottling stage. The aging of wine can be done in different containers including stainless steel  
33 tanks, concrete tanks, or oak barrels. Oak barrel aging is very popular nowadays because it  
34 greatly influences the quality and aromas of the wines (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta,  
35 2006). Majority of Bordeaux wines, and especially the famous wines, are vinified in oak  
36 barrels. The use of a barrel is not enough to produce a wine of great quality, it is also  
37 necessary to practice this oenological method in a reasoned way, and with expertise. This  
38 practice has become popular because aging wine in an oak barrel promotes the balance  
39 between oxygen and the various constituents of wine such as tannins, colors, aromas, proteins  
40 or enzymes. During this stage, wine is subject to many chemical reactions due to reactions  
41 between the wine constituents, the micro-oxygenation through the staves and the compounds  
42 extracted from oak barrel (Fernández de Simón et al., 2014; Maioli et al., 2022).

43           Nowadays, <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics emerged as a meaningful tool to insure  
44 wine traceability (Alañón et al., 2015; Amargianitaki and Spyros, 2017; Solovyev et al., 2021;  
45 Valls Fonayet et al., 2021). Based on quantitative analysis (targeted approach) or  
46 metabolomic fingerprinting (untargeted approach), NMR metabolomics allows to control  
47 geographical origin, real composition including grape variety for example and vintage. More  
48 recently, <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics was successfully used to monitor wine quality during  
49 winemaking process (Le Mao et al., 2021; López-Rituerto et al., 2021). In addition, it has  
50 been shown that <sup>1</sup>H-NMR spectrometry combined with multivariate statistical analysis  
51 provides a reliable tools to monitor wine evolution during bottle aging (Cassino et al., 2019).  
52 NMR permits to follow overall wine metabolite changes.

53           The aim of the present study is to investigate the evolution of wine during aging in oak  
54 barrels by NMR-based metabolomics. The wine compound variation during aging could be  
55 useful to control the overall wine quality. Red wine (blend of Cabernet Sauvignon, Merlot and

56 Cabernet Franc varieties) was analyzed a month after running into barrels and after twelve  
57 months conservation in a cellar controlled environment. Red wine was conserved in new oak  
58 barrels provided by three different manufacturers. Wine constituent evolution was monitored  
59 by  $^1\text{H-NMR}$  spectrometry combined to multivariate statistical analysis.

60

### 61 **2. Materials and methods**

#### 62 **2.1. Wine Sample preparation**

63 The red wines used for the experiment was produced in a Bordeaux winery, located in  
64 Pauillac (France) within the Medoc geographical indication from a blend of three varieties  
65 Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc, harvested in 2018. Following malolactic  
66 fermentation, the wine was submitted to clarification and stabilization treatments. Next the  
67 wine was pressed and transferred to 225 L new oak barrels for a year from three different  
68 manufacturers (MA, MB and MC), one with two different qualities (MC1 and MC2). Wine  
69 samples were collected from six different barrels for each manufacturer after a month and  
70 twelve months of aging.

71 For NMR analysis, samples were prepared as our previous works (Le Mao et al.,  
72 2021). Briefly, wine samples underwent a first step of centrifugation during 3 minutes at  
73 10000 rpm. They are next prepared as follows: (7:2:1, v/v/v) wine, phosphate buffer (1 M, pH  
74 2.6) and  $\text{D}_2\text{O}$  containing 0.5 mM trimethylsilylpropanoic acid (TMSP) and 7 mM calcium  
75 formate (FCa). Finally, the pH is adjusted at 3.1 with HCl and NaOH solutions (1 M) by a  
76 small-scale semi-automatic system (BTpH, Bruker BioSpin, Germany). Finally, 600  $\mu\text{L}$  of the  
77 wine solution was introduced into 5 mm tubes for NMR analysis.

78

#### 79 **2.2. NMR spectroscopic analysis of wines**

80  $^1\text{H-NMR}$  Experiments were performed on an Avance III NMR spectrometer (Bruker,  
81 France) operating at 600.27 MHz, equipped with a 5 mm TXI probe with Z-gradient coils. All  
82 measurements were performed at 293 K, using Topspin 4.0.8 software (Bruker, France).

4



83 Three magnetic pulse sequences are used: zg30 to determine the resonance frequency of the  
84 water signal; zgpr and noesygpps1d for the suppression of the water and ethanol signals with  
85 8 and 32 ns (number of scans), respectively. Data acquisition parameters were set as follows,  
86 free induction decay (FID) was collected in a time domain (TD) of 64K data points, with a  
87 spectral width (SW) of 16 ppm, an acquisition time (AQ) of 3.40 s, and a relaxation time  
88 (RD) of 5 s per scan. The 90° pulse calibration was automatically calibrated for each sample  
89 (pulsecal). The FID was multiplied by an exponential function corresponding to a line  
90 broadening factor of 0.3 Hz before Fourier transformation. Manual phase and baseline  
91 correction was applied to the resulting spectrum, which was then manually phased and zero  
92 aligned using the TMSP signal.

93 For targeted analyses, 32 components (Table 1S) were quantified using the Simple  
94 Mixture Analysis (SMA) plugin of the MestReNova 12.0 software (Mestrelab Research,  
95 Spain). The untargeted approach was performed with NMRProcFlow 1.4 online. The spectra  
96 were first calibrated to 0.00 ppm using TMSP and then underwent local baseline correction by  
97 selecting the areas upstream and downstream of the water and ethanol signals. The signals  
98 were then aligned and cut into 536 fragments (Table 2S). The generated data were then  
99 statistically processed similarly to targeted approach.

100

### 101 **2.3. Statistical analysis**

102 Multivariate statistical analysis (MSA) was performed using SIMCA 16.0 software  
103 (Sartorius, Germany). Scaling to unit variance (uv) and mean centring were applied. Principal  
104 component analysis (PCA) and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-  
105 DA) were used to visualize the distribution of the metabolic variance and to sharpen the  
106 separation between observations groups, respectively. Reliability of the models was  
107 controlled by analysis of variance testing of cross-validated predictive residuals (CV-  
108 ANOVA). Validity and the degree of overfit were checked by permutation test. The accuracy  
109 of the models was estimated based on receiver operating characteristic (ROC) curves and

5

110 misclassification tables. The potential discriminant metabolites were identified using the  
111 variable importance of projection (VIP) and the loadings scaled as the correlation coefficient  
112 (p(corr)) values. For the selected compounds, the statistical significance based on the analysis  
113 of variance (ANOVA) or t-test were calculated using GraphPad Prism 9.3.0 software  
114 (GraphPad Software, USA).

115

### 116 **3. Results and discussion**

#### 117 **3.1 Effect of the wine aging in oak barrels**

##### 118 **3.1.1 <sup>1</sup>H-NMR Fingerprinting**

119 Red wine aging in oak barrels produces a lot of chemical transformations due to  
120 different mechanisms including oxidative reactions and compounds released from oak  
121 (Alcaide-Hidalgo et al., 2007; Ma et al., 2022). This maturation process induces significant  
122 sensory changes in the final wine. Recently, Cassino et al. have demonstrated the interest of  
123 <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics for investigate wine evolution during bottle aging (Cassino et  
124 al., 2019). In this first trial, the effect of the wine aging in oak barrels was monitored by  
125 combination of <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics and multivariate statistical analysis (MSA).  
126 The wines matured in the different oak barrels of each manufacturer were analysed one and  
127 twelve months of aging (n = 24, each).

128 To observe the effect of the maturation process on the overall <sup>1</sup>H-NMR spectrum,  
129 metabolomics approach based on <sup>1</sup>H-NMR fingerprinting was applied to the wine spectra.  
130 Representative <sup>1</sup>H-NMR spectra corresponding to one and twelve months of aging are  
131 presented in Fig. 1. For untargeted analysis, <sup>1</sup>H-NMR spectra were processed using the  
132 software NMRProcFlow (Jacob et al., 2017). Briefly, 1D-NOESY spectra were exported into  
133 NMRProcFlow for alignment, baseline correction and intelligent bucketing with variable size  
134 bucket (De Meyer et al., 2008). Regions affected by solvent suppression were excluded from  
135 the bucketing. A total 536 buckets were obtained with the full range of 10.0-0.5 ppm

6

136 (Table 2S). All the data collected from targeted and untargeted analyses were independently  
137 exported as an Excel XML file in SIMCA software to perform MSA.

138 Unsupervised PCA followed by supervised OPLS-DA were applied to observe  
139 classification trending based on fingerprinting data (Wheelock Å and Wheelock, 2013;  
140 Worley and Powers, 2016). MSA was applied to the entire peak lists derived from the full  
141 spectrum bucketing (full spectrum, 10.0 – 0.5 ppm). In addition, to better observe the  
142 influence of the different families of compounds, the data were divided into three parts:  
143 aromatic region (10.0 – 5.5 ppm) containing mainly the phenolic compound signals; cabinolic  
144 region (5.5 – 3.7 ppm) containing mainly the sugar signals; and aliphatic region (3.6 – 0.5  
145 ppm) containing the signals of organic acids and alcohols. Depending on their side chain,  
146 Signals of amino acids are distributed in the three areas. The PCA score plot ( $R^2X = 0.857$ ;  
147  $Q^2 = 0.729$ ) applied on the data matrix obtained from  $^1\text{H-NMR}$  full spectrum is presented in  
148 Fig. 2A. A clear differentiation appears between the two classes of wines along the first  
149 principal component (PC1). The two first principal components explain 48.5% and 15.9% of  
150 the variance between the wine matured one and twelve months in oak barrels, respectively.  
151 For further classification of wines, the OPLS-DA score plot based on the full spectrum data is  
152 showed in Fig. 2B. The performance and validation parameters for the OPLS-DA model are  
153 summarized in Table 1. A highly satisfactory OPLS-DA model was obtained to discriminate  
154 the two stages of wine maturation in oak barrels. The model quality evaluation is generally  
155 based on the values of  $R^2Y$  and  $Q^2$  (Li et al., 2017).  $Q^2 > 0.5$  is considered as good in  
156 metabolomics and  $Q^2 > 0.9$  as excellent. In addition, difference between  $R^2Y$  and  $Q^2 > 0.3$   
157 suggests irrelevant or outlying data. The values obtained based on full spectrum data ( $R^2Y$   
158 and  $Q^2$  of 0.995 and 0.993, respectively) indicate the excellent quality of the OPLS-DA  
159 model. Validation of the model was confirmed by the CV-ANOVA p-value ( $< 0.05$ ) and  
160 permutation test for which  $R^2Y$  and  $Q^2$  values intercept in Y-axis are expected to be  $< 0.4$  and  
161 negative, respectively (Yuan et al., 2020). As shown in Table 1,  $R^2Y$ - and  $Q^2$ -intercept values  
162 (100 permutations) meet these criteria. In addition, the correct classification rate (CCR)

163 obtained from the misclassification table and the area under the curve (AUC) obtained from  
164 the receiver operating characteristic (ROC) plot (100% and 1.0, respectively) confirm the  
165 highly predictive performance of the model.

166 The OPLS-DA loadings plot for the discrimination between one and twelve months  
167 aging in oak barrels indicates both positive and negative contributions of the different regions  
168 of the NMR spectrum (Fig. 1S). To further identify the NMR signals involved in the  
169 classification, PCA and OPLS-DA were applied on the three different areas selected above.  
170 The score plots are presented in Fig. 2C-H, PCA and OPLS-DA models for the aromatic area  
171 (Fig. 2C and 2D, respectively), carbinolic area (Fig. 2E and 2F, respectively) and aliphatic  
172 area (Fig. 2G and 2H, respectively). Looking the PCA score plots, a clear and significant  
173 separation appears between one and twelve months of aging samples along PC1 for the three  
174 regions ( $R^2X > 0.7$  and  $Q^2 > 0.6$  for each region). The first principal component explains 55.3,  
175 49.8 and 47.4% for the aromatic, carbinolic and aliphatic regions, respectively. Wine samples  
176 analyzed after twelve months of aging seem to be more homogeneous than those analyzed  
177 after one month. Similarly to full spectrum analysis, the OPLS-DA models exhibit two well-  
178 differentiated clusters to classify one and twelve months aging wine samples. Results of  
179 model performances and validation tests are summarized in Table 1. All models present  $R^2Y$   
180 and  $Q^2$  values  $> 0.99$ , and CV-ANOVA p-value  $< 0.05$ . The permutation tests  
181 (100 permutations) indicated the absence of overfitting. CCR and AUC values (100% and 1.0  
182 for each model) confirm the excellent performance of the different models.

183 Nowadays, aging wines in oak barrels is a common practice. Wines aged into barrels  
184 develop more complex aromas, and take on roundness. Many studies have shown that barrel  
185 act as an active vessel on wine constituents (del Alamo-Sanza and Nevares, 2018; Jordão and  
186 Cosme, 2022; Li and Duan, 2019). Nevertheless, the know-how of the winegrower will be  
187 decisive for the quality of the wine. In this study,  $^1\text{H-NMR}$  fingerprinting combined to MSA  
188 yield to investigate wine aging into oak barrels. These results show that aging in oak barrels  
189 has a significant impact on all families of compounds observable by  $^1\text{H-NMR}$ -based

190 metabolomics. Interestingly, a higher degree of dispersion was observed in the orthogonal  
191 components for the wine samples analyzed one month than those analyzed twelve months of  
192 aging.

193

### 194 **3.1.2 Marker identification of wine aging in barrels**

195         These results show that aging in oak barrels has a significant impact on all families of  
196 compounds observable by <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics. The complexity of <sup>1</sup>H-NMR  
197 spectrum and numerous spectral features extracted from MSA make direct profiling from  
198 untargeted analysis difficult. To identify the aging markers, a targeted analysis of the main  
199 compounds was carried out using the method developed in the laboratory (Le Mao et al.,  
200 2021). Briefly, compounds were identified by a combination of 2D NMR experiments and  
201 pure standards. This method makes it possible to identify different wine metabolites including  
202 organic acids, amino acids, alcohols, sugars, polyphenols, sugars, and other organic  
203 compounds (Table 1S). Compounds were quantified by global spectral deconvolution using  
204 our own spectral database implemented in the simple mixture analysis (SMA) plugin of  
205 MestReNova 12.0 software. In this study, thirty-two compounds were assayed from the  
206 targeted data. As for the fingerprinting, the data was processed by MSA. The PCA and OPLS-  
207 DA score plots are presented in Fig. 3A and 3B, respectively. The PCA model ( $R^2X = 0.647$ ;  
208  $Q^2 = 0.547$ ) exhibits a clear differentiation between the two classes of wines along PC1. The  
209 two first principal components explain 42.4 and 12.9% of the variance, respectively. The  
210 OPLS-DA model exhibits two clusters to discriminate one and twelve months aging samples.  
211 The values of  $R^2Y$  and  $Q^2$  close to 1 (0.985 and 0.964, respectively), and CV-ANOVA p-  
212 value ( $< 0.05$ ) indicate the goodness of the model (Table 1). The permutation test (100  
213 permutations) indicates the absence of over fit. In addition, the CCR and AUC from ROC  
214 curves (100% and 1.0, respectively) values confirm the excellent performance of the model.

215         The main discriminant metabolites between the two classes of wine were identified  
216 based on a combination of variable importance in projection (VIP) and p(corr) values (Le

9

217 Mao et al., 2021). Only metabolites presenting VIP and  $p(\text{corr})$  values  $> 1.0$  and  $> 0.5$ ,  
218 respectively, were considered as potential markers and confirmed by t-test ( $p < 0.05$ ).  
219 Following this methodology, a total of twelve discriminant markers were identified (Fig. 3C):  
220 five amino acids (tyrosine, threonine, alanine, proline and leucine), an organic acids (acetic  
221 acid), two sugars (glucose and arabinose), two phenolic compounds (catechin and  
222 epicatechin), an ester (ethyl lactate) and choline. Wines analyzed after one month of aging  
223 exhibit higher contents in amino acids, catechin and epicatechin, acetoin and choline.  
224 Whereas wine analyzed twelve months after aging present higher contents in acetic acid, ethyl  
225 lactate, arabinose and glucose.

226 The results show that  $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics makes it possible to monitor the  
227 wine aging in barrels. Targeted and untargeted approaches discriminate the two classes of  
228 wines. The latter seems to be more informative but is more difficult to analyze. The  
229 discriminant metabolites identified in this study are globally in agreement with those  
230 previously highlighted during the wine aging in bottle (Cassino et al., 2019). Increasing of  
231 acetic acid amounts could be connected to presence of acetic acid bacteria or to ethanol  
232 oxidation into acetaldehyde and later into acetic acid, due to oxygenation process in oak  
233 barrels. Similarly, increasing ester levels during aging, such as ethyl lactate, could be  
234 resulting from the reaction of ethanol with organic acids (Shinohara and Shimizu, 1981).  
235 Amino acid content and its variation during wine aging are strongly correlated to the  
236 production methods (Alcaide-Hidalgo et al., 2007). In our case, the decrease of amino acids is  
237 probably due to different phenomena including filtering and racking processes of the wine  
238 before and during maturation in oak barrels. In addition, the decrease of amino acids could be  
239 due to interaction with tannins or Strecker reaction with aldehydes (Pripis-Nicolau et al.,  
240 2000). Decreasing of catechin and epicatechin levels during wine aging was expected. These  
241 monomeric flavanols are submitted to various polymerization and condensation reactions  
242 during wine aging (Pérez-Magariño and González-San José, 2004). Even if few studies have  
243 been done on residual sugars in red wines, they can be source of energy for microorganisms

244 and suggested to different reactions. Evolution of monosaccharide content during wine aging  
245 could be due to different phenomena such as wood hemicellulose hydrolysis or polyphenol  
246 degradation on the one hand, and microorganism consumption or Maillard reactions with  
247 amino acids on the other hand (del Alamo et al., 2000; Zhang et al., 2018). In this study, an  
248 increase of two monosaccharides (glucose and arabinose) during wine aging was observed.  
249 Specific increasing of arabinose content was associated to the hemicellulose degradation of  
250 the barrel (del Alamo et al., 2000). Increasing of acetoin level in red wine during wine aging  
251 in bottle has been previously described (Han et al., 2019). Acetoin formation has been  
252 associated with acetaldehyde levels and diacetyl reduction during wine aging. In this study, a  
253 decrease of acetoin was observed during barrel aging. This trend is in agreement with  
254 decrease in acetoin content during wine aging in bottle reported by Cassino et al. (Cassino et  
255 al., 2019). Further studies will be necessary to clarify the relationship between acetaldehyde  
256 and acetoin during wine aging. Even if choline is considered as an essential nutrient for  
257 humans coming mainly from the diet (Zeisel et al., 1991), little is known about the presence  
258 of choline in wine. In agreement with Cassino et al., a decrease in its level is observed during  
259 wine aging (Cassino et al., 2019).

260

### 261 **3.2 Effect of oak barrel origin**

262 As indicated before, MSA from NMR fingerprinting show higher sample  
263 heterogeneity after one month of aging than after 12 months. One of the possible reasons  
264 would be the quality of the barrels. Barrel properties can act both on oxygenation process and  
265 oak compounds release. To confirm this hypothesis, MSA was redone taking into account the  
266 origin of the barrel. Indeed, barrels come from three different manufacturers (MA, MB and  
267 MC) with two different qualities for the manufacturer MC (MC1 and MC2).

268 The PCA score plot of all wine samples from NMR fingerprinting taking into account  
269 the barrel origin from the different manufactures is presented in Fig. 4A. It is clearly visible  
270 that heterogeneity observed after one month of aging into barrels is linked to the origin of the

11

271 manufacturer. Whereas wine samples are more homogeny after twelve months of aging  
272 whatever the manufacturer. To confirm this trend, the samples taken at one month ( $n = 24$ )  
273 and after twelve months ( $n = 24$ ) of aging were analysed separately. Concerning wine samples  
274 analysed after one month of aging, PCA score plot from NMR fingerprinting ( $R^2X = 0.647$ ;  
275  $Q^2 = 0.547$ ) shows a clear discrimination between the three manufacturers (Fig. 4B). The first  
276 two principal components explain 41.1% and 17.4% of the total variance. Wine samples from  
277 manufacturers MA and MB ( $n = 6$ , each) are discriminated from those of MC ( $n = 12$ ) along  
278 PC1. A clear classification between MA and MB wine sample appears along PC2. Whereas  
279 no evident separation is observed between the two barrel qualities of the third manufacturer  
280 (MC1 and MC2,  $n = 6$  each). In contrast, no clear classification appears on PCA score plot  
281 based on barrel origin for wine samples analysed after twelve months of aging (Fig. 2AS).  
282 These results seem to indicate that wines have undergone different aging kinetics depending  
283 of the barrel quality but tend towards a fairly similar chemical profile. Similarly to PCA  
284 models from NMR fingerprinting, no discrimination was observed on PCA model builds from  
285 NMR targeted data of wine samples collected after twelve months of aging (Fig. 2BS). The  
286 Fig. 5A presents the PCA score plot from NMR targeted data of wines after one month into  
287 barrels ( $R^2X = 0.476$ ;  $Q^2 = 0.200$ ). Even if the model is less efficient than the one built from  
288 untargeted NMR data, a clear separation between MC wine samples and the other wine  
289 samples (MA and MB). The first two principal components explain 31.9 and 15.7% of the  
290 total variance. This result is in agreement with non-targeted analysis data, wines kept into  
291 manufacturer MC barrels undergo a process significantly different from wines aging into MA  
292 and MB manufacturer barrels.

293 Supervised OPLS-DA combined with validation protocol was performed on  
294 untargeted data extracted from full NMR spectrum of wine samples after one month of aging.  
295 The resulting OPLS-DA score plot confirms the discrimination between wine samples  
296 produced in barrels from the three different manufacturers (Fig. 4C). The model performances  
297 were summarized in Table 2.  $R^2Y$ ,  $Q^2$  ( $> 0.71$ ) and CV-ANOVA p-value ( $< 0.05$ ) indicate the



298 goodness of the model. Permutation test (100 permutations) indicates the absence of  
299 overfitting. CCR and AUC from ROC curves ( $> 83\%$  and  $> 0.84$ , respectively) values  
300 confirmed the good performance of the model. Wine samples kept in MA and MB barrels are  
301 discriminated from those kept in MC barrels along the first component. Whereas, the  
302 difference between wines kept in MA and MB barrels is observed in first orthogonal  
303 component. Wines can be classified in two main groups, wine samples kept in MC barrels  
304 being significantly different from the others. To visualize the variables involved in the  
305 discrimination between wine samples, the OPLS-DA loading plot ( $VIP > 1$ ) is presented in  
306 Fig. 4D. Loadings have been classified according to the three different spectral regions  
307 previously indicated: aromatic, carbinolic and aliphatic areas. Among the discriminating  
308 loadings, those from NMR signals of aliphatic region are distributed on either side of the  
309 vertical axis. This spectral area specific of alcohol and organic acid signals is strongly  
310 impacted by storage in oak barrels for one month. Loadings from signals of carbinolic spectral  
311 region are specific of wine samples kept in MA and MB barrels. This spectral area is  
312 characteristic of monosaccharides. A higher content in monosaccharides could be due to oak  
313 quality between the different producers (del Alamo et al., 2000). Finally, some loadings from  
314 aromatic region distributed on either side were observed indicating that phenolic compounds  
315 release depends on the barrel quality of each manufacturer.

316 To identify specific markers data from targeted analysis of NMR spectra was used. As  
317 PCA model based on targeted analysis discriminated correctly MC wines after one month of  
318 aging from others (Fig. 5A), wine samples were classified in two groups. The first set  
319 includes MA and MB samples ( $n = 12$ ), whereas the second includes all MC wines ( $n = 12$ ).  
320 Based of targeted NMR data, OPLS-DA modelling (Table 2) was performed giving  
321 satisfactory  $R^2Y$ ,  $Q^2$  ( $> 0.96$ ) and CV-ANOVA p-value ( $< 0.05$ ). Fig. 5B shows the OPLS-DA  
322 score plot comparing the two sets of wines (MA and MB versus MC). A clear discrimination  
323 between the two groups was observed. As indicated in Table 2, Permutation tests (100  
324 permutations) indicated the absence of overfitting. CCR and AUC from ROC curves (100%

325 and 1.0, respectively) values proved the efficiency of the model. As indicate above the main  
326 discriminant metabolites between the two classes were identified using VIP and  $p(\text{corr})$  values  
327 ( $> 1.0$  and  $> 0.5$ , respectively) and confirmed by t-test ( $p < 0.05$ ). Based on this strategy, four  
328 discriminant markers were identified (Fig. 5C): acetic acid, acetoin, ethyl acetate and  
329 isobutanol. Wines stored in MC barrels have significantly higher contents of these four  
330 compounds after one month of aging. As we have already indicated the first three compounds  
331 are directly related to the process of oxidation. The increase in isobutanol content is more  
332 difficult to explain since this compound is mainly associated with the fermentation process.  
333 Nevertheless, an additional amount can come from the metabolic activity of microorganisms  
334 (yeasts and bacteria). Its synthesis is favored by the presence of oxygen (Jackson, 2020). All  
335 these data clearly indicate a difference in oxygen permeability of the two groups of wines.  
336 MC barrels regardless of their quality have a greater permeability to oxygen at least during  
337 the first month. This difference can come from different factors such as oak origin and  
338 anatomy or barrel manufacture (del Alamo-Sanza and Nevares, 2018).

339

#### 340 **4. Conclusion**

341 Both targeted and non-targeted  $^1\text{H-NMR}$  analyses show a clear distinction between  
342 samples taken after one and twelve months in barrels. Non-targeted analysis indicates that  
343 phenolic, carbinolic and aliphatic regions are impacted, wine samples being more  
344 homogeneous after twelve months of aging. Targeted analyses identified twelve molecules  
345 whose levels vary significantly during barrel maturation. A decrease of amino acids, catechin,  
346 epicatechin and acetoin was observed during aging while acetic acid, ethyl lactate and sugars  
347 (arabinose and glucose) increased. In addition, a significant difference of aging kinetic was  
348 observed between the manufacturers that could be due to oxygen permeability. NMR-based  
349 metabolomics provided an interesting tool for an overall analysis of wine aging in oak barrels.  
350 It would be interesting to repeat the experiment taking more samples during barrel aging to

351 determine when and why the samples seem to homogenize over time in combination with  
352 other analytical methods.

353

### 354 **5. Acknowledgements**

355 This work was supported by *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie* (Inès  
356 Le Mao was the recipient of a CIFRE PhD fellowship from ANRT and Baron Philippe de  
357 Rothschild S.A.). We also want to thank Château Mouton Rothschild and Fondation of  
358 Bordeaux (donors: Baron Philippe de Rothschild SA, Chateau Cheval Blanc, Château Lafite  
359 Rothschild, Le Domaine Clarence Dillon, Château Petrus) for its financial support. The work  
360 was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010  
361 project).

362

### 363 **References**

- 364 Alañón, M.E., Pérez-Coello, M.S., Marina, M.L., (2015). Wine science in the metabolomics era. *TRAC*  
365 *Trends in Analytical Chemistry* 74, 1-20.
- 366 Alcaide-Hidalgo, J.M., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Polo, M.C., (2007). Influence of  
367 malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds  
368 of red wines. *Food Chemistry* 103(2), 572-581.
- 369 Amargianitaki, M., Spyros, A., (2017). NMR-based metabolomics in wine quality control and  
370 authentication. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4(1), 9.
- 371 Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., Osella, D., (2019). Wine evolution during bottle  
372 aging, studied by 1H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Research*  
373 *International* 116, 566-577.
- 374 De Meyer, T., Sinnaeve, D., Van Gasse, B., Tsiportkova, E., Rietzschel, E.R., De Buyzere, M.L., Gillebert,  
375 T.C., Bekaert, S., Martins, J.C., Van Criekinge, W., (2008). NMR-based characterization of metabolic  
376 alterations in hypertension using an adaptive, intelligent binning algorithm. *Analytical Chemistry*  
377 80(10), 3783-3790.
- 378 del Alamo-Sanza, M., Nevares, I., (2018). Oak wine barrel as an active vessel: A critical review of past  
379 and current knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58(16), 2711-2726.
- 380 del Alamo, M.a., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Gómez-Cordovés, C., (2000). Red wine aging in oak  
381 barrels: evolution of the monosaccharides content. *Food Chemistry* 71(2), 189-193.
- 382 Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Martínez, J., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., (2014).  
383 Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false  
384 acacia, ash and oak wood. *Food Chemistry* 143, 66-76.
- 385 Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C., (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak  
386 barrels. *Trends in Food Science & Technology* 17(8), 438-447.
- 387 Han, G., Webb, M.R., Waterhouse, A.L., (2019). Acetaldehyde reactions during wine bottle storage.  
388 *Food Chemistry* 290, 208-215.

- 389 Jackson, R.S., (2020). Chapter 6 - Chemical constituents of grapes and wine, in: Jackson, R.S. (Ed.),  
 390 *Wine Science (Fifth Edition)*. Academic Press, pp. 375-459.
- 391 Jacob, D., Deborde, C., Lefebvre, M., Maucourt, M., Moing, A., (2017). NMRProcFlow: a graphical and  
 392 interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics*  
 393 13(4), 36.
- 394 Jordão, A.M., Cosme, F., (2022). The Application of Wood Species in Enology: Chemical Wood  
 395 Composition and Effect on Wine Quality. *Applied Sciences* 12(6), 3179.
- 396 Le Mao, I., Martin-Pernier, J., Bautista, C., Lacampagne, S., Richard, T., Da Costa, G., (2021). 1H-NMR  
 397 metabolomics as a tool for winemaking monitoring. *Molecules* 26(22), 6771.
- 398 Li, C.-Y., Song, H.-T., Wang, X.-X., Wan, Y.-Y., Ding, X.-S., Liu, S.-J., Dai, G.-L., Liu, Y.-H., Ju, W.-Z.,  
 399 (2017). Urinary metabolomics reveals the therapeutic effect of HuangQi Injections in cisplatin-  
 400 induced nephrotoxic rats. *Scientific Reports* 7(1), 3619-3619.
- 401 Li, S.Y., Duan, C.Q., (2019). Astringency, bitterness and color changes in dry red wines before and  
 402 during oak barrel aging: An updated phenolic perspective review. *Critical Reviews in Food Science*  
 403 and *Nutrition* 59(12), 1840-1867.
- 404 López-Rituerto, E., Sørensen, K.M., Savorani, F., Engelsen, S.B., Avenoza, A., Peregrina, J.M., Busto,  
 405 J.H., (2021). Monitoring of the Rioja red wine production process by 1H-NMR spectroscopy. *Journal*  
 406 *of the Science of Food and Agriculture* n/a(n/a).
- 407 Ma, T., Wang, J., Wang, H., Zhao, Q., Zhang, F., Ge, Q., Li, C., Gamboa, G.G., Fang, Y., Sun, X., (2022).  
 408 Wine aging and artificial simulated wine aging: Technologies, applications, challenges, and  
 409 perspectives. *Food Research International* 153, 110953.
- 410 Maioli, F., Picchi, M., Guerrini, L., Parenti, A., Domizio, P., Andrenelli, L., Zanoni, B., Canuti, V., (2022).  
 411 Monitoring of Sangiovese Red Wine Chemical and Sensory Parameters along One-Year Aging in  
 412 Different Tank Materials and Glass Bottle. *ACS Food Science & Technology* 2(2), 221-239.
- 413 Pérez-Magariño, S., González-San José, M.L., (2004). Evolution of Flavanols, Anthocyanins, and Their  
 414 Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes Harvested at Different Stages of  
 415 Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(5), 1181-1189.
- 416 Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A., Maujean, A., (2000). Formation of Flavor Components by  
 417 the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions. *Journal of Agricultural and*  
 418 *Food Chemistry* 48(9), 3761-3766.
- 419 Shinohara, T., Shimizu, J.-i., (1981). Formation of Ethyl Ester of Main Organic Acids during Aging of  
 420 Wine and Indications of Aging. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi* 55(8), 679-687.
- 421 Solovyev, P.A., Fahl-Hassek, C., Riedl, J., Esslinger, S., Bontempo, L., Camin, F., (2021). NMR  
 422 spectroscopy in wine authentication: an official control perspective. *Comprehensive reviews in food*  
 423 *science and food safety* 20(2), 2040-2062.
- 424 Valls Fonayet, J., Loupit, G., Richard, T., (2021). Chapter Ten - MS- and NMR-metabolomic tools for  
 425 the discrimination of wines: Applications for authenticity, in: Pétriacq, P., Bouchereau, A. (Eds.),  
 426 *Advances in Botanical Research*. Academic Press, pp. 297-357.
- 427 Wheelock Å, M., Wheelock, C.E., (2013). Trials and tribulations of 'omics data analysis: assessing  
 428 quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine. *Mol Biosyst*  
 429 9(11), 2589-2596.
- 430 Worley, B., Powers, R., (2016). PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. *Current*  
 431 *Metabolomics* 4(2), 97-103.
- 432 Yuan, Z.-y., Li, J., Zhou, X.-j., Wu, M.-h., Li, L., Pei, G., Chen, N.-h., Liu, K.-l., Xie, M.-z., Huang, H.-y.,  
 433 (2020). HS-GC-IMS-Based metabolomics study of Baihe Jizhuang Tang in a rat model of chronic  
 434 unpredictable mild stress. *Journal of Chromatography B* 1148, 122143.
- 435 Zeisel, S.H., Da Costa, K.A., Franklin, P.D., Alexander, E.A., Lamont, J.T., Sheard, N.F., Beiser, A.,  
 436 (1991). Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB Journal* 5(7), 2093-2098.
- 437 Zhang, X.K., Lan, Y.B., Zhu, B.Q., Xiang, X.F., Duan, C.Q., Shi, Y., (2018). Changes in monosaccharides,  
 438 organic acids and amino acids during Cabernet Sauvignon wine ageing based on a simultaneous  
 439 analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and*  
 440 *Agriculture* 98(1), 104-112.

441

442 **Figure legends**

443 **Figure 1.**

444 Typical  $^1\text{H-NMR}$  spectra of wine samples after one (green) and twelve months (blue) of aging  
445 in oak barrels after water and ethanol signals suppression.

446

447 **Figure 2.**

448 MSA of  $^1\text{H-NMR}$  fingerprinting data of wine after one and twelve months of aging in oak  
449 barrels ( $n = 24$ , each). A and B: PCA and OPLS-DA score plots from full spectrum data  
450 (10.0-0.5 ppm), respectively; C and D: PCA and OPLS-DA score plots from aromatic area  
451 data (10.0-5.5 ppm), respectively; E and F: PCA and OPLS-DA score plots from carbinolic  
452 area data (5.5-3.7 ppm); G and H: PCA and OPLS-DA score plots from aliphatic area data  
453 (3.6-0.5 ppm). Green: one month of aging; blue: twelve months of aging.

454

455 **Figure 3.**

456 MSA of  $^1\text{H-NMR}$  targeted data of wine after one and twelve months of aging in oak barrels  
457 ( $n = 24$ , each). A and B: PCA and OPLS-DA score plots, respectively; C: Boxplots of  
458 significantly discriminant metabolites. Statistical significance was checked by unpaired t test  
459 or Mann-Whitney's test ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). Green: one month of aging;  
460 blue: twelve months of aging.

461

462 **Figure 4.**

463 MSA of  $^1\text{H-NMR}$  fingerprinting data of wine samples aging in the four different oak barrel  
464 models. A: PCA score plot from data after one (triangles) and twelve months (circles) of  
465 aging; B: PCA score plot from data after one month of aging; C and D: OPLS-DA score and  
466 loading plots from data after one month of aging. Orange: manufacturer MA; green:  
467 manufacturer MB; sky and dark blues: MC1 and MC2 qualities of manufacturer MC,  
468 respectively; black circles: loadings from signals of aromatic area (10.0 – 5.5 ppm); yellow

17

469 circles: loadings from signals of carbinolic area (5.5 – 3.7 ppm); purple circles: loadings from  
470 signals of aliphatic area (3.6 – 0.5 ppm).

471

472 **Figure 5.**

473 MSA of  $^1\text{H-NMR}$  wine targeted data after one month aging in the four different oak barrel  
474 models. A: PCA score plot (MA, MB, MC1 and MC2 manufacturers in orange, green, sky  
475 and dark blue circles, respectively); B: OPLS-DA score plot (green circles : MA and MB;  
476 blue circles: MC1 and MC2); C: Boxplots of significantly discriminant metabolites (green:  
477 MA and MB; blue: MC1 and MC2). Statistical significance was checked by unpaired t test or  
478 Mann-Whitney's test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

479

480

481 **Table 1**

482 Performance and validation parameters of OPLS-DA models for classification of wine aging  
483 in oak barrels from targeted and untargeted NMR data.

484

Model parameters	Targeted data	Untargeted data			
		Full spectrum	Aromatic	Carbinolic	Aliphatic
No of variables	32	536	128	124	284
R <sup>2</sup> X	0.616	0.627	0.608	0.791	0.557
R <sup>2</sup> Y	0.985	0.995	0.996	0.996	0.995
Q <sup>2</sup>	0.964	0.993	0.992	0.991	0.993
NC <sup>a</sup>	1+2+0	1+1+0	1+1+0	1+2+0	1+1+0
Permutation tests (R <sup>2</sup> ; Q <sup>2</sup> )	0.340; -0.553	0.179; -0.324	0.340; -0.367	0.187; -0.404	0.106; -0.342
CV-ANOVA	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
ROC <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Fisher's probability	3.1×10 <sup>-14</sup>	3.1×10 <sup>-14</sup>	3.1×10 <sup>-14</sup>	3.1×10 <sup>-14</sup>	3.1×10 <sup>-14</sup>
CCR (%) <sup>c</sup>	100%	100%	100%	100%	100%

485 <sup>a</sup> NC: No. of components; <sup>b</sup> ROC: area under the (ROC) curve (AUC); <sup>c</sup> CCR: correct classification rate.

486

487 **Table 2**

488 Performance and validation parameters of OPLS-DA models for classification of wines after  
 489 one month of aging into barrels from different manufacturers.

490

Model parameters	Targeted data	Untargeted data
No of variables	32	536
R <sup>2</sup> X	0.368	0.726
R <sup>2</sup> Y	0.926	0.886
Q <sup>2</sup>	0.883	0.716
NC <sup>a</sup>	1+1+0	1+1+0
Permutation tests (R <sup>2</sup> ; Q <sup>2</sup> )	0.488; -0.587	0.518; -0.501 (MA)
		0.474; -0.521 (MA)
		0.484; -0.409 (MC1)
		0.510; -0.412 (MC2)
CV-ANOVA	< 0.05	< 0.05
ROC <sup>b</sup>	1.0	0.877 (MA)
		0.976 (MB)
		0.998 (MC1)
		0.843 (MC2)
Fisher's probability	3.7×10 <sup>-7</sup>	3.1×10 <sup>-14</sup>
CCR (%) <sup>c</sup>	100%	83% (MA)
		100% (MB)
		100% (MC1)
		83% (MC2)

491 <sup>a</sup> NC: No. of components; <sup>b</sup> ROC: area under the (ROC) curve (AUC); <sup>c</sup> CCR: correct classification rate.  
 492



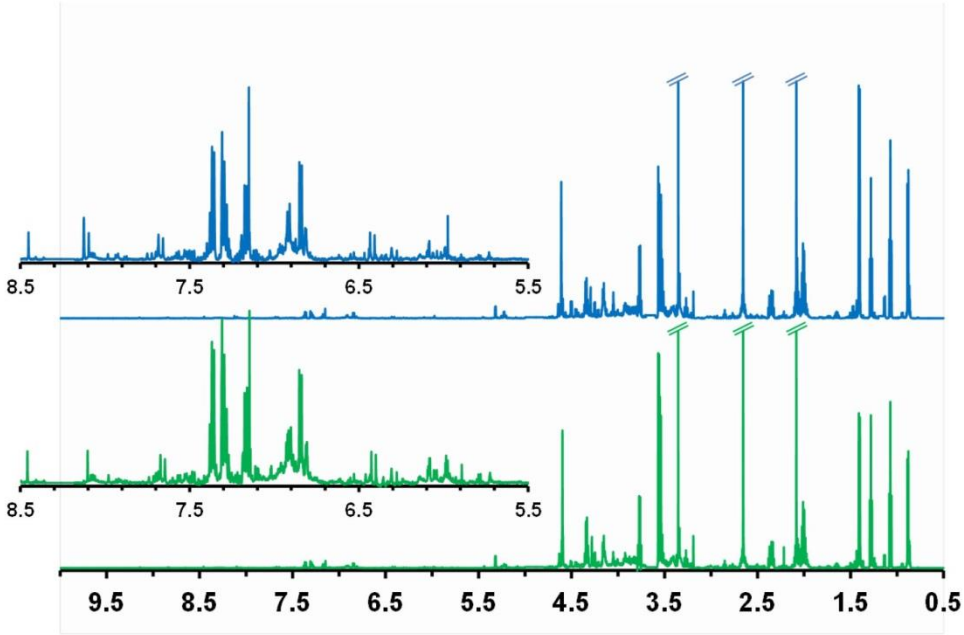


Fig. 1

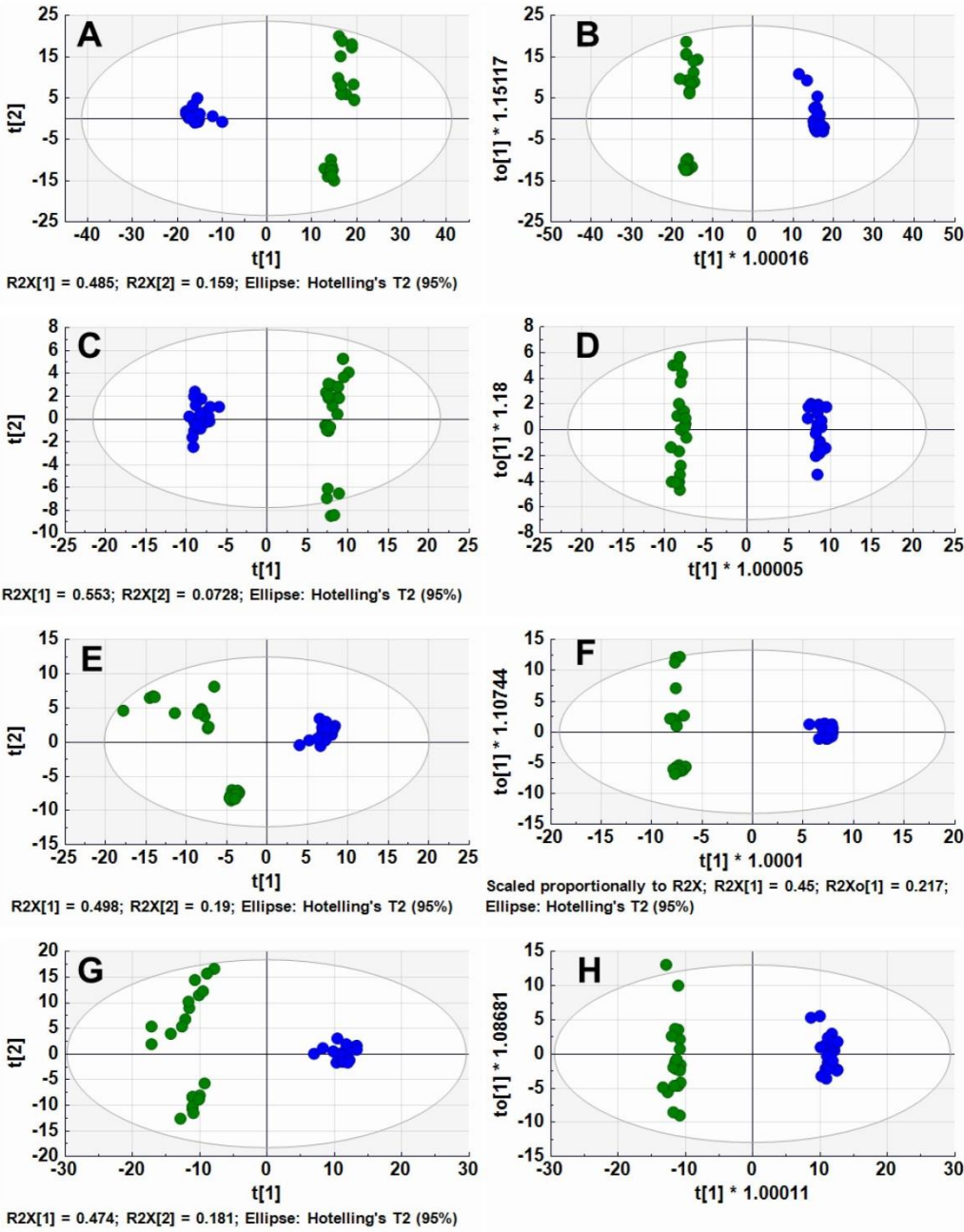


Fig. 2

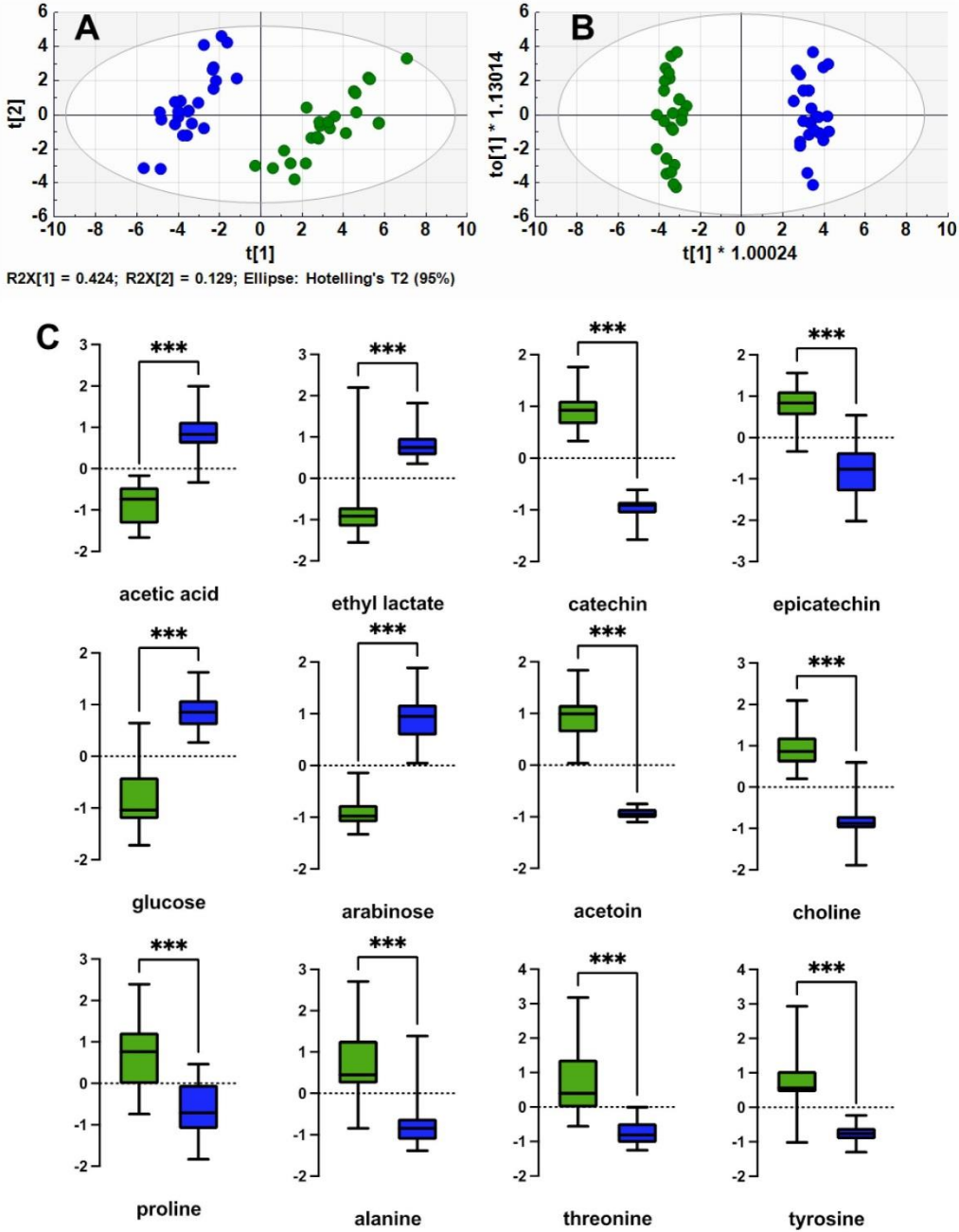


Fig. 3

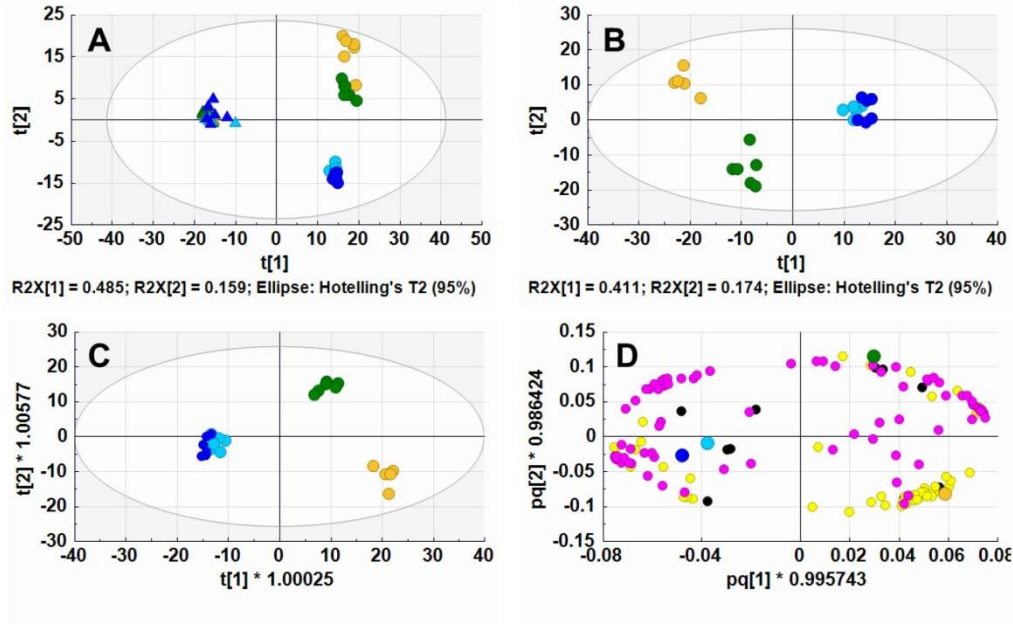


Fig. 4

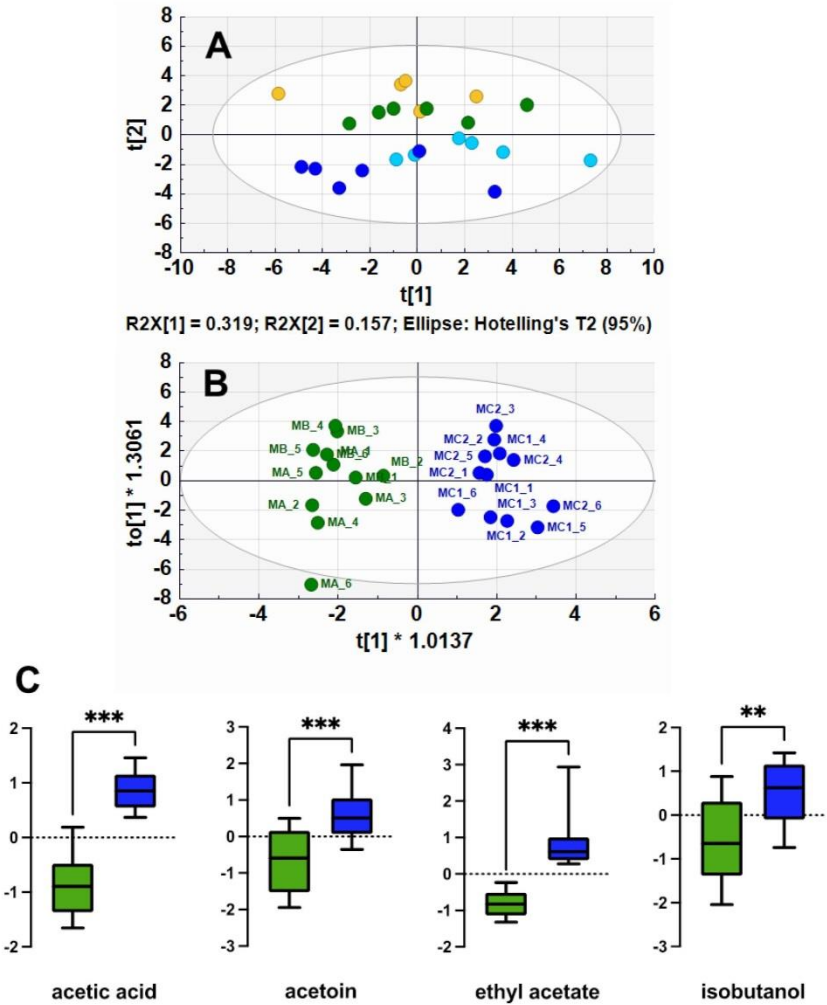


Fig. 5

1 **Red wine evolution during oak barrels aging monitored by <sup>1</sup>H-NMR-based**

2 **metabolomics**

3

4 Inès Le Mao, Gregory Da Costa, Tristan Richard\*

5

6 *Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, UMR OENO, UMR 1366, ISVV, F-33140 Villenave d'Ornon,*

7 *France*

8

9 \* Corresponding author: T. Richard, [tristan.richard@u-bordeaux.fr](mailto:tristan.richard@u-bordeaux.fr)

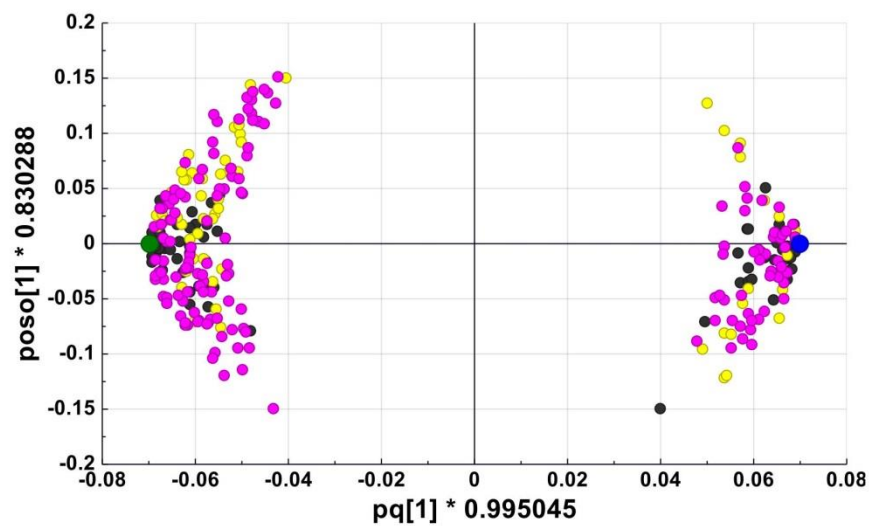
10

11

12 **Figure 1S.**

13 OPLS-DA loadings plot (VIP > 1.0) for one and twelve months aging wine samples. Green  
14 circle: one months of aging; blue circle: twelve months of aging; black circles: signals from  
15 aromatic area (10.0 – 5.5 ppm); yellow circles: signals from carbinolic area (5.5 – 3.7 ppm);  
16 purple circles: signals from aliphatic area (3.6 – 0.5 ppm).

17



18

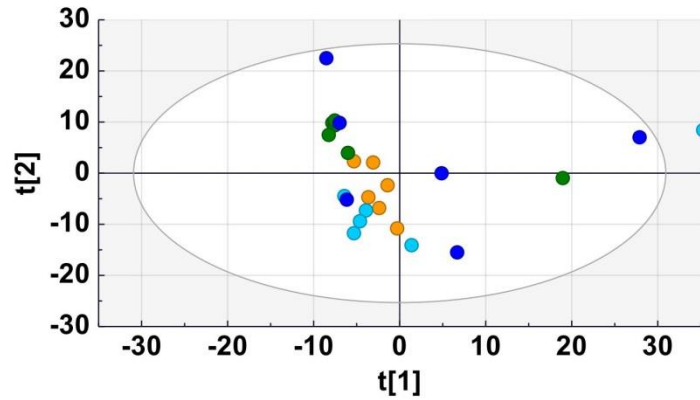
19

20

21 **Figure 2S.**

22 Multivariate analysis of fingerprinting and targeted data extracted from  $^1\text{H-NMR}$  spectra of  
23 wine samples after twelve months of aging in the four different oak barrel models (n = 6,  
24 each). A: PCA score plots from fingerprinting data; B: PCA score plots from targeted data.  
25 Yellow circles: manufacturer MA; green circles: manufacturer MB; sky and dark blue circles:  
26 MC1 and MC2 qualities of manufacturer MC, respectively.

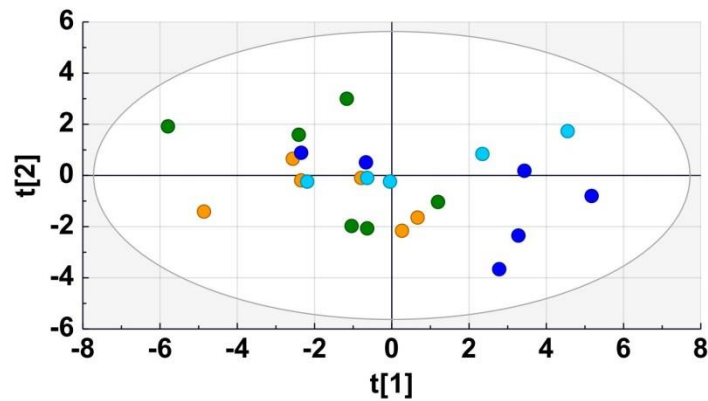
27



$R^2X[1] = 0.248$ ;  $R^2X[2] = 0.166$ ; Ellipse: Hotelling's T2 (95%)

28

29



$R^2X[1] = 0.259$ ;  $R^2X[2] = 0.137$ ; Ellipse: Hotelling's T2 (95%)

30

31



32 **Table 1S.** List of compounds quantified, chemical shifts and coupling constants used for  
 33 compound quantification.

34

Family	Compound	$\delta^1_{\text{H}}$ (multiplicity, <i>J</i> in Hz, assignment)
Alcools and polyols	ethanol	<b>1.18</b> ( <i>t</i> , 7.2, CH <sub>3</sub> )
	isopentanol	<b>1.65</b> ( <i>m</i> , CH)
	myo-inositol	<b>3.27</b> ( <i>t</i> , 9.4, CH)
	methanol	<b>3.35</b> ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> )
	isobutanol	<b>3.37</b> ( <i>d</i> , 6.7, CH <sub>2</sub> )
	phenethyl alcohol	<b>7.33</b> ( <i>m</i> , 5CH)
	2,3-butanediol	<b>1.13</b> ( <i>d</i> , 6.2, 2CH <sub>3</sub> )
	glycerol	<b>3.55</b> ( <i>dd</i> , 11.8, 6.5, CH <sub>2</sub> )
Amino acids	leucine	<b>0.94</b> ( <i>d</i> , 6.2, 2CH <sub>3</sub> )
	isoleucine	<b>0.99</b> ( <i>d</i> , 7.0, CH <sub>3</sub> )
	valine	<b>1.04</b> ( <i>d</i> , 7.3, CH <sub>3</sub> )
	threonine	<b>1.33</b> ( <i>d</i> , 6.7, CH <sub>3</sub> )
	alanine	<b>1.50</b> ( <i>d</i> , 7.2, CH <sub>3</sub> )
	proline	<b>2.00</b> ( <i>m</i> , CH <sub>2</sub> )
	tyrosine	<b>6.88</b> ( <i>m</i> , 8.4, 2CH)
Organic acids	acetic acid	<b>2.08</b> ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> )
	lactic acid	<b>1.41</b> ( <i>d</i> , 7.0, CH <sub>3</sub> )
	galacturonic acid	<b>5.32</b> ( <i>d</i> , 3.8, CH)
	succinic acid	<b>2.66</b> ( <i>s</i> , 2CH <sub>2</sub> )
	shikimic acid	<b>6.81</b> ( <i>dt</i> , CH)
Phenolics	tartaric acid	<b>4.60</b> ( <i>s</i> , 2CH)
	catechin	<b>6.08</b> ( <i>d</i> , 2.0, CH)
	caftaric acid	<b>6.41</b> ( <i>d</i> , 16.0, CH)
	epicatechin	<b>6.09</b> ( <i>d</i> , 2.0, CH)
	gallic acid	<b>7.16</b> ( <i>s</i> , 2CH)
	tyrosol	<b>6.85</b> ( <i>m</i> , 8.4, 2CH)
Sugars	fructose	<b>4.02</b> ( <i>dd</i> , 12.8, 1.0 CH <sub>2</sub> )
	arabinose	<b>4.50</b> ( <i>d</i> , 7.7, CH)
	glucose	<b>5.22</b> ( <i>d</i> , 3.6, CH)
Others	acetoin	<b>1.37</b> ( <i>d</i> , 7.0, CH <sub>3</sub> )
	ethyl lactate	<b>4.21</b> ( <i>q</i> , 7.06, CH)
	ethyl acetate	<b>2.07</b> ( <i>s</i> , CH <sub>3</sub> )
	choline	<b>3.19</b> ( <i>s</i> , 3CH <sub>3</sub> )
	trigonelline	<b>9.15</b> ( <i>s</i> , CH)

35

36 **Table 2S.** List of buckets applied during  $^1\text{H-NMR}$  data pre-processing using NMRProcFlow  
 37 for untargeted analysis.

38

No	Name	$^1\text{H-NMR}$ area		No	Name	$^1\text{H-NMR}$ area		No	Name	$^1\text{H-NMR}$ area	
1	B9_1465	9.081	- 9.212	180	B4_3377	4.331	- 4.344	359	B2_5632	2.558	- 2.568
2	B8_8791	8.847	- 8.911	181	B4_3212	4.311	- 4.331	360	B2_5558	2.554	- 2.558
3	B8_8397	8.833	- 8.847	182	B4_2969	4.282	- 4.311	361	B2_5519	2.550	- 2.554
4	B8_8101	8.788	- 8.833	183	B4_2774	4.273	- 4.282	362	B2_5445	2.539	- 2.550
5	B8_6590	8.653	- 8.665	184	B4_2669	4.261	- 4.273	363	B2_5327	2.527	- 2.539
6	B8_6463	8.640	- 8.653	185	B4_2565	4.252	- 4.261	364	B2_5199	2.513	- 2.527
7	B8_6317	8.624	- 8.640	186	B4_2454	4.239	- 4.252	365	B2_5113	2.510	- 2.513
8	B8_6051	8.587	- 8.624	187	B4_2361	4.233	- 4.239	366	B2_5042	2.499	- 2.510
9	B8_4573	8.450	- 8.465	188	B4_2306	4.228	- 4.233	367	B2_4962	2.493	- 2.499
10	B7_9929	7.972	- 8.014	189	B4_2250	4.222	- 4.228	368	B2_4912	2.489	- 2.493
11	B7_9399	7.934	- 7.945	190	B4_2188	4.216	- 4.222	369	B2_4830	2.477	- 2.489
12	B7_9226	7.915	- 7.930	191	B4_2131	4.211	- 4.216	370	B2_4709	2.465	- 2.477
13	B7_8848	7.875	- 7.894	192	B4_2076	4.205	- 4.211	371	B2_4573	2.453	- 2.462
14	B7_8698	7.864	- 7.875	193	B4_2012	4.198	- 4.205	372	B2_4493	2.445	- 2.453
15	B7_7564	7.746	- 7.767	194	B4_1955	4.193	- 4.198	373	B2_4435	2.442	- 2.445
16	B7_7392	7.733	- 7.746	195	B4_1902	4.187	- 4.193	374	B2_4387	2.436	- 2.442
17	B7_7258	7.719	- 7.733	196	B4_1854	4.184	- 4.187	375	B2_4343	2.433	- 2.436
18	B7_7127	7.706	- 7.719	197	B4_1812	4.179	- 4.184	376	B2_4304	2.428	- 2.433
19	B7_6998	7.693	- 7.706	198	B4_1765	4.174	- 4.179	377	B2_4260	2.424	- 2.428
20	B7_6858	7.678	- 7.693	199	B4_1679	4.162	- 4.174	378	B2_4221	2.420	- 2.424
21	B7_6734	7.669	- 7.678	200	B4_1544	4.147	- 4.162	379	B2_4182	2.416	- 2.420
22	B7_6577	7.652	- 7.664	201	B4_1447	4.142	- 4.147	380	B2_4141	2.412	- 2.416
23	B7_6463	7.641	- 7.652	202	B4_1387	4.135	- 4.142	381	B2_4099	2.408	- 2.412
24	B7_5792	7.575	- 7.583	203	B4_1316	4.128	- 4.135	382	B2_4048	2.402	- 2.408
25	B7_5609	7.552	- 7.569	204	B4_1218	4.116	- 4.128	383	B2_3990	2.396	- 2.402
26	B7_5319	7.525	- 7.539	205	B4_1135	4.111	- 4.116	384	B2_3862	2.379	- 2.393
27	B7_5230	7.521	- 7.525	206	B4_1084	4.105	- 4.111	385	B2_3729	2.367	- 2.379
28	B7_5196	7.518	- 7.521	207	B4_1003	4.096	- 4.105	386	B2_3632	2.360	- 2.367
29	B7_5149	7.512	- 7.518	208	B4_0937	4.092	- 4.096	387	B2_3572	2.355	- 2.360
30	B7_5098	7.507	- 7.512	209	B4_0855	4.079	- 4.092	388	B2_3520	2.349	- 2.355
31	B7_5052	7.503	- 7.507	210	B4_0743	4.069	- 4.079	389	B2_3461	2.343	- 2.349
32	B7_5008	7.499	- 7.503	211	B4_0671	4.065	- 4.069	390	B2_3406	2.338	- 2.343
33	B7_4964	7.494	- 7.499	212	B4_0629	4.061	- 4.065	391	B2_3345	2.331	- 2.338
34	B7_4866	7.480	- 7.494	213	B4_0576	4.054	- 4.061	392	B2_3220	2.313	- 2.331
35	B7_4734	7.467	- 7.480	214	B4_0515	4.049	- 4.054	393	B2_3057	2.302	- 2.309
36	B7_4508	7.441	- 7.460	215	B4_0457	4.043	- 4.049	394	B2_2943	2.293	- 2.296
37	B7_4360	7.430	- 7.441	216	B4_0406	4.038	- 4.043	395	B2_2893	2.286	- 2.293
38	B7_4251	7.420	- 7.430	217	B4_0359	4.033	- 4.038	396	B2_2815	2.277	- 2.286
39	B7_4142	7.409	- 7.420	218	B4_0271	4.021	- 4.033	397	B2_2745	2.272	- 2.277
40	B7_4047	7.401	- 7.409	219	B4_0178	4.015	- 4.021	398	B2_2670	2.262	- 2.272
41	B7_3980	7.395	- 7.401	220	B4_0125	4.010	- 4.015	399	B2_2596	2.257	- 2.262
42	B7_3919	7.388	- 7.395	221	B3_9976	3.985	- 4.010	400	B2_2551	2.253	- 2.257
43	B7_3795	7.374	- 7.385	222	B3_9809	3.977	- 3.985	401	B2_2497	2.246	- 2.253
44	B7_3677	7.361	- 7.374	223	B3_9740	3.971	- 3.977	402	B2_2441	2.242	- 2.246
45	B7_3544	7.347	- 7.361	224	B3_9685	3.966	- 3.971	403	B2_2390	2.236	- 2.242
46	B7_3438	7.340	- 7.347	225	B3_9622	3.959	- 3.966	404	B2_2335	2.231	- 2.236
47	B7_3229	7.318	- 7.328	226	B3_9565	3.954	- 3.959	405	B2_2282	2.225	- 2.231
48	B7_3099	7.302	- 7.318	227	B3_9510	3.948	- 3.954	406	B2_2112	2.200	- 2.223
49	B7_2942	7.286	- 7.302	228	B3_9459	3.944	- 3.948	407	B2_1905	2.186	- 2.195
50	B7_2802	7.274	- 7.286	229	B3_9416	3.939	- 3.944	408	B2_1836	2.181	- 2.186
51	B7_2686	7.263	- 7.274	230	B3_9362	3.933	- 3.939	409	B2_1759	2.173	- 2.178
52	B7_2598	7.256	- 7.263	231	B3_9288	3.927	- 3.930	410	B2_1711	2.169	- 2.173
53	B7_2506	7.245	- 7.256	232	B3_9245	3.922	- 3.927	411	B2_1650	2.161	- 2.169
54	B7_2308	7.223	- 7.239	233	B3_9164	3.911	- 3.922	412	B2_1588	2.156	- 2.161
55	B7_2175	7.212	- 7.223	234	B3_9082	3.905	- 3.911	413	B2_1520	2.148	- 2.156
56	B7_2064	7.201	- 7.212	235	B3_9032	3.901	- 3.905	414	B2_1430	2.138	- 2.148
57	B7_1903	7.186	- 7.195	236	B3_8970	3.893	- 3.901	415	B2_1364	2.135	- 2.138

5

## Chapitre 2 : Utilisation de la RMN pour le suivi des vins

58	B7_1825	7.179	-	7.186	237	B3_8905	3.888	-	3.893	416	B2_1328	2.131	-	2.135
59	B7_1738	7.168	-	7.179	238	B3_8861	3.884	-	3.888	417	B2_1282	2.125	-	2.131
60	B7_1631	7.158	-	7.168	239	B3_8818	3.879	-	3.884	418	B2_1237	2.122	-	2.125
61	B7_1564	7.155	-	7.158	240	B3_8768	3.874	-	3.879	419	B2_1203	2.118	-	2.122
62	B7_1506	7.146	-	7.155	241	B3_8705	3.867	-	3.874	420	B2_1162	2.114	-	2.118
63	B7_1426	7.139	-	7.146	242	B3_8643	3.862	-	3.867	421	B2_1075	2.101	-	2.114
64	B7_1335	7.128	-	7.139	243	B3_8582	3.855	-	3.862	422	B2_0953	2.090	-	2.101
65	B7_1215	7.115	-	7.128	244	B3_8527	3.851	-	3.855	423	B2_0830	2.076	-	2.090
66	B7_1071	7.100	-	7.115	245	B3_8481	3.845	-	3.851	424	B2_0714	2.066	-	2.076
67	B7_0938	7.088	-	7.100	246	B3_8395	3.837	-	3.842	425	B2_0616	2.057	-	2.066
68	B7_0837	7.079	-	7.088	247	B3_8344	3.832	-	3.837	426	B2_0552	2.054	-	2.057
69	B7_0702	7.061	-	7.079	248	B3_8305	3.829	-	3.832	427	B2_0504	2.047	-	2.054
70	B7_0234	7.015	-	7.032	249	B3_8262	3.824	-	3.829	428	B2_0446	2.042	-	2.047
71	B6_9775	6.969	-	6.986	250	B3_8201	3.817	-	3.824	429	B2_0361	2.030	-	2.042
72	B6_9663	6.964	-	6.969	251	B3_8145	3.812	-	3.817	430	B2_0237	2.017	-	2.030
73	B6_9606	6.958	-	6.964	252	B3_8103	3.808	-	3.812	431	B2_0116	2.006	-	2.017
74	B6_9526	6.948	-	6.958	253	B3_8027	3.797	-	3.808	432	B1_9994	1.993	-	2.006
75	B6_9451	6.942	-	6.948	254	B3_5071	3.505	-	3.509	433	B1_9870	1.981	-	1.993
76	B6_9299	6.926	-	6.934	255	B3_5024	3.500	-	3.505	434	B1_9765	1.972	-	1.981
77	B6_9222	6.918	-	6.926	256	B3_4977	3.496	-	3.500	435	B1_9697	1.967	-	1.972
78	B6_9152	6.912	-	6.918	257	B3_4939	3.492	-	3.496	436	B1_9616	1.956	-	1.967
79	B6_9080	6.904	-	6.912	258	B3_4896	3.487	-	3.492	437	B1_9532	1.951	-	1.956
80	B6_8990	6.894	-	6.904	259	B3_4846	3.482	-	3.487	438	B1_9478	1.945	-	1.951
81	B6_8882	6.882	-	6.894	260	B3_4779	3.474	-	3.482	439	B1_9434	1.942	-	1.945
82	B6_8743	6.866	-	6.882	261	B3_4708	3.468	-	3.474	440	B1_9399	1.938	-	1.942
83	B6_8566	6.855	-	6.858	262	B3_4624	3.457	-	3.468	441	B1_9350	1.932	-	1.938
84	B6_8521	6.849	-	6.855	263	B3_4544	3.452	-	3.457	442	B1_9290	1.926	-	1.932
85	B6_8463	6.843	-	6.849	264	B3_4488	3.446	-	3.452	443	B1_9240	1.922	-	1.926
86	B6_8416	6.840	-	6.843	265	B3_4436	3.441	-	3.446	444	B1_9174	1.913	-	1.922
87	B6_8369	6.834	-	6.840	266	B3_4386	3.436	-	3.441	445	B1_9082	1.904	-	1.913
88	B6_8293	6.825	-	6.834	267	B3_4339	3.432	-	3.436	446	B1_8966	1.890	-	1.904
89	B6_8202	6.816	-	6.825	268	B3_4291	3.426	-	3.432	447	B1_8855	1.881	-	1.890
90	B6_8141	6.812	-	6.816	269	B3_4235	3.421	-	3.426	448	B1_8712	1.864	-	1.878
91	B6_8078	6.803	-	6.812	270	B3_4178	3.415	-	3.421	449	B1_8433	1.838	-	1.849
92	B6_7879	6.783	-	6.793	271	B3_4081	3.402	-	3.415	450	B1_8329	1.828	-	1.838
93	B6_7807	6.778	-	6.783	272	B3_3999	3.398	-	3.402	451	B1_8267	1.825	-	1.828
94	B6_6222	6.613	-	6.632	273	B3_3958	3.393	-	3.398	452	B1_8203	1.816	-	1.825
95	B6_5504	6.543	-	6.558	274	B3_3903	3.387	-	3.393	453	B1_8128	1.810	-	1.816
96	B6_5277	6.521	-	6.534	275	B3_3830	3.379	-	3.387	454	B1_8075	1.805	-	1.810
97	B6_4640	6.452	-	6.476	276	B3_3745	3.370	-	3.379	455	B1_8026	1.800	-	1.805
98	B6_4445	6.437	-	6.452	277	B3_3678	3.365	-	3.370	456	B1_7975	1.795	-	1.800
99	B6_4293	6.422	-	6.437	278	B3_3625	3.360	-	3.365	457	B1_7902	1.786	-	1.795
100	B6_4071	6.402	-	6.412	279	B3_3536	3.347	-	3.360	458	B1_7836	1.782	-	1.786
101	B6_3998	6.397	-	6.402	280	B3_3243	3.301	-	3.347	459	B1_7773	1.773	-	1.782
102	B6_3664	6.361	-	6.372	281	B3_2990	3.297	-	3.301	460	B1_7701	1.767	-	1.773
103	B6_3482	6.345	-	6.351	282	B3_2884	3.280	-	3.297	461	B1_7603	1.753	-	1.767
104	B6_3399	6.335	-	6.345	283	B3_2721	3.264	-	3.280	462	B1_7469	1.740	-	1.753
105	B6_3088	6.300	-	6.317	284	B3_2616	3.259	-	3.264	463	B1_7352	1.730	-	1.740
106	B6_2750	6.267	-	6.283	285	B3_2573	3.256	-	3.259	464	B1_7256	1.721	-	1.730
107	B6_1410	6.122	-	6.160	286	B3_2523	3.249	-	3.256	465	B1_7189	1.717	-	1.721
108	B6_0984	6.093	-	6.104	287	B3_2458	3.243	-	3.249	466	B1_7137	1.711	-	1.717
109	B6_0901	6.088	-	6.093	288	B3_2390	3.235	-	3.243	467	B1_7074	1.704	-	1.711
110	B6_0851	6.082	-	6.088	289	B3_2330	3.231	-	3.235	468	B1_7023	1.700	-	1.704
111	B6_0778	6.073	-	6.082	290	B3_2281	3.225	-	3.231	469	B1_6950	1.689	-	1.700
112	B6_0666	6.060	-	6.073	291	B3_2236	3.222	-	3.225	470	B1_6851	1.681	-	1.689
113	B6_0556	6.051	-	6.060	292	B3_2143	3.207	-	3.222	471	B1_6721	1.667	-	1.677
114	B6_0391	6.027	-	6.051	293	B3_1917	3.179	-	3.204	472	B1_6611	1.655	-	1.667
115	B6_0202	6.013	-	6.027	294	B3_1604	3.158	-	3.163	473	B1_6500	1.644	-	1.655
116	B6_0112	6.009	-	6.013	295	B3_1520	3.146	-	3.158	474	B1_6386	1.633	-	1.644
117	B5_9978	5.992	-	6.003	296	B3_1405	3.135	-	3.146	475	B1_6275	1.622	-	1.633
118	B5_9823	5.978	-	5.986	297	B3_1288	3.123	-	3.135	476	B1_6164	1.611	-	1.622
119	B5_9751	5.972	-	5.978	298	B3_1192	3.116	-	3.123	477	B1_5835	1.576	-	1.591
120	B5_9671	5.962	-	5.972	299	B3_1093	3.106	-	3.113	478	B1_5692	1.567	-	1.572
121	B5_9604	5.958	-	5.962	300	B3_0971	3.093	-	3.101	479	B1_5636	1.560	-	1.567

## Chapitre 2 : Utilisation de la RMN pour le suivi des vins

122	B5_9253	5.921	-	5.930	301	B3_0865	3.083	-	3.090	480	B1_5578	1.555	-	1.560
123	B5_8970	5.894	-	5.900	302	B3_0568	3.035	-	3.079	481	B1_5526	1.550	-	1.555
124	B5_8899	5.886	-	5.894	303	B3_0294	3.024	-	3.035	482	B1_5466	1.543	-	1.550
125	B5_8779	5.870	-	5.886	304	B3_0162	3.008	-	3.024	483	B1_5404	1.537	-	1.543
126	B5_7919	5.786	-	5.798	305	B3_0045	3.001	-	3.008	484	B1_5317	1.526	-	1.537
127	B5_7804	5.775	-	5.786	306	B2_9943	2.991	-	2.998	485	B1_5195	1.513	-	1.526
128	B5_7302	5.723	-	5.738	307	B2_9831	2.980	-	2.986	486	B1_5061	1.499	-	1.513
129	B5_4576	5.446	-	5.469	308	B2_9754	2.971	-	2.980	487	B1_4905	1.485	-	1.496
130	B5_4426	5.439	-	5.446	309	B2_9690	2.967	-	2.971	488	B1_4788	1.473	-	1.485
131	B5_4311	5.423	-	5.439	310	B2_9629	2.959	-	2.967	489	B1_4695	1.466	-	1.473
132	B5_4141	5.405	-	5.423	311	B2_9546	2.951	-	2.959	490	B1_4645	1.463	-	1.466
133	B5_3515	5.345	-	5.358	312	B2_9463	2.942	-	2.951	491	B1_4591	1.455	-	1.463
134	B5_3238	5.319	-	5.328	313	B2_9363	2.931	-	2.942	492	B1_4531	1.451	-	1.455
135	B5_3141	5.309	-	5.319	314	B2_9273	2.924	-	2.931	493	B1_4461	1.441	-	1.451
136	B5_2987	5.297	-	5.301	315	B2_9212	2.918	-	2.924	494	B1_4353	1.429	-	1.441
137	B5_2932	5.290	-	5.297	316	B2_9157	2.913	-	2.918	495	B1_4247	1.420	-	1.429
138	B5_2865	5.283	-	5.290	317	B2_9101	2.907	-	2.913	496	B1_4142	1.408	-	1.420
139	B5_2688	5.265	-	5.272	318	B2_9033	2.899	-	2.907	497	B1_4065	1.405	-	1.408
140	B5_2627	5.260	-	5.265	319	B2_8943	2.889	-	2.899	498	B1_4003	1.396	-	1.405
141	B5_2568	5.253	-	5.260	320	B2_8838	2.878	-	2.889	499	B1_3911	1.387	-	1.396
142	B5_2477	5.242	-	5.253	321	B2_8742	2.870	-	2.878	500	B1_3830	1.379	-	1.387
143	B5_2390	5.236	-	5.242	322	B2_8643	2.859	-	2.870	501	B1_3734	1.368	-	1.379
144	B5_2315	5.227	-	5.236	323	B2_8526	2.847	-	2.859	502	B1_3368	1.306	-	1.368
145	B5_2238	5.221	-	5.227	324	B2_8386	2.831	-	2.847	503	B1_1011	1.095	-	1.107
146	B5_2170	5.213	-	5.221	325	B2_8273	2.824	-	2.831	504	B1_0850	1.078	-	1.092
147	B5_2097	5.206	-	5.213	326	B2_8202	2.816	-	2.824	505	B1_0713	1.065	-	1.078
148	B5_2013	5.197	-	5.206	327	B2_8090	2.805	-	2.813	506	B1_0584	1.052	-	1.065
149	B5_1869	5.183	-	5.191	328	B2_8004	2.795	-	2.805	507	B1_0476	1.043	-	1.052
150	B5_1784	5.174	-	5.183	329	B2_7822	2.777	-	2.787	508	B1_0394	1.036	-	1.043
151	B4_5385	4.537	-	4.540	330	B2_7745	2.772	-	2.777	509	B1_0311	1.027	-	1.036
152	B4_5324	4.528	-	4.537	331	B2_7688	2.766	-	2.772	510	B1_0230	1.019	-	1.027
153	B4_5251	4.522	-	4.528	332	B2_7636	2.762	-	2.766	511	B1_0144	1.009	-	1.019
154	B4_5171	4.512	-	4.522	333	B2_7577	2.754	-	2.762	512	B1_0032	0.997	-	1.009
155	B4_5079	4.504	-	4.512	334	B2_7511	2.748	-	2.754	513	B0_9918	0.986	-	0.997
156	B4_5014	4.499	-	4.504	335	B2_7460	2.744	-	2.748	514	B0_9805	0.975	-	0.986
157	B4_4950	4.491	-	4.499	336	B2_7385	2.733	-	2.744	515	B0_9693	0.964	-	0.975
158	B4_4846	4.478	-	4.491	337	B2_7273	2.721	-	2.733	516	B0_9594	0.955	-	0.964
159	B4_4761	4.474	-	4.478	338	B2_7191	2.717	-	2.721	517	B0_9491	0.943	-	0.955
160	B4_4706	4.467	-	4.474	339	B2_7135	2.710	-	2.717	518	B0_9366	0.930	-	0.943
161	B4_4643	4.461	-	4.467	340	B2_7069	2.704	-	2.710	519	B0_9271	0.924	-	0.930
162	B4_4584	4.455	-	4.461	341	B2_6991	2.694	-	2.704	520	B0_9196	0.915	-	0.924
163	B4_4538	4.452	-	4.455	342	B2_6896	2.685	-	2.694	521	B0_9106	0.906	-	0.915
164	B4_4499	4.448	-	4.452	343	B2_6833	2.682	-	2.685	522	B0_9027	0.899	-	0.906
165	B4_4435	4.439	-	4.448	344	B2_6789	2.676	-	2.682	523	B0_8968	0.894	-	0.899
166	B4_4359	4.432	-	4.439	345	B2_6741	2.672	-	2.676	524	B0_8895	0.885	-	0.894
167	B4_4265	4.421	-	4.432	346	B2_6705	2.669	-	2.672	525	B0_8830	0.881	-	0.885
168	B4_4182	4.416	-	4.421	347	B2_6654	2.662	-	2.669	526	B0_8783	0.875	-	0.881
169	B4_4130	4.410	-	4.416	348	B2_6520	2.642	-	2.662	527	B0_8737	0.872	-	0.875
170	B4_4067	4.403	-	4.410	349	B2_6368	2.632	-	2.642	528	B0_8705	0.869	-	0.872
171	B4_4007	4.398	-	4.403	350	B2_6289	2.626	-	2.632	529	B0_8668	0.865	-	0.869
172	B4_3944	4.391	-	4.398	351	B2_6223	2.619	-	2.626	530	B0_8623	0.860	-	0.865
173	B4_3877	4.385	-	4.391	352	B2_6141	2.610	-	2.619	531	B0_8521	0.844	-	0.860
174	B4_3819	4.379	-	4.385	353	B2_6079	2.606	-	2.610	532	B0_8323	0.820	-	0.844
175	B4_3757	4.372	-	4.379	354	B2_6037	2.601	-	2.606	533	B0_7873	0.778	-	0.796
176	B4_3692	4.366	-	4.372	355	B2_5986	2.596	-	2.601	534	B0_7726	0.770	-	0.776
177	B4_3617	4.357	-	4.366	356	B2_5932	2.591	-	2.596	535	B0_7680	0.766	-	0.770
178	B4_3509	4.344	-	4.357	357	B2_5887	2.587	-	2.591	536	B0_7610	0.759	-	0.763
179	B4_3377	4.331	-	4.344	358	B2_5830	2.579	-	2.587					



### III Synthèse des résultats et discussions

Ce chapitre montre les nombreuses possibilités d'utilisation de la RMN  $^1\text{H}$  pour l'étude de l'élaboration du vin. La RMN peut en effet permettre de **déterminer rapidement si le procédé a un impact** sur la composition chimique majoritaire du vin et **d'identifier les composés impactés**. Elle permet ainsi de mieux comprendre et appréhender l'impact des procédés vitivinicoles sur la composition chimique du vin.

A l'échelle du laboratoire, les analyses dans des cuves de nano-vinification ont permis de suivre l'impact de la date de récoltes des baies sur la composition chimique du vin. Les résultats mettent en évidence l'impact de la maturité du raisin sur les activités des micro-organismes. En effet, les composés impliqués dans les différences (acides aminés, acides organiques, sucres, composés phénoliques ainsi que des esters et des alcools) traduisent l'implication ou la favorisation de certaines voies métaboliques en fonction du stade de maturité. Par exemple, la voie de la fermentation glycéro-pyruvique est favorisée dans le cas des raisins récoltés en sur maturité à cause des plus fortes teneurs en sucres qui augmentent le stress osmotique des levures. Cela se traduit par des teneurs plus importantes en glycérol et en produit de dégradation de l'acide pyruvique (2,3 butanediol, acétoïne, etc.). Un autre résultat observé est que le vin issu de raisins récoltés en sous maturité présente des concentrations plus élevées en acide lactique et plus acide shikimique. Ces données tendent à montrer que le raisin devait contenir plus d'acide malique qui a été transformé en acide lactique par les bactéries lactiques, et que l'acide shikimique, n'a pas encore été transformé en composés phénoliques. Ces hypothèses se confirment lorsqu'on observe que les vins issus de raisins récoltés à maturité et en sur-maturité contiennent moins d'acide lactique et d'acide shikimique et plus d'acide gallique. De plus, les vins issus de raisins récoltés en sur-maturité présentent des concentrations plus grandes en glycérol et en acide citrique. L'augmentation de la teneur en glycérol traduit un stress osmotique plus important ayant favorisé la fermentation glycéropyruvique (López de Lerma et al., 2012). L'augmentation de la teneur en d'acide citrique peut être un marqueur de contamination par *Botrytis cinerea* (Cinquanta et al., 2015).

Dans l'étude menées sur l'impact du collage et de l'enzymage sur la composition chimique du vin, les analyses réalisées ont permis de distinguer, pour chacun des procédés, les différents agents utilisés. Concernant l'utilisation d'enzymes, nous nous attendions à obtenir des différences au niveau des compositions chimiques car l'activité pectolytiques des enzymes est connue pour couper les liaisons de polysaccharides. En revanche, les deux enzymes ont

montré des impacts différents notamment au niveau des teneurs en arabinose, acétoïne, isobutanol, acide acétique et leucine. Ces résultats montrent que les enzymes utilisées ne vont pas avoir les mêmes conséquences sur le métabolome du vin ce qui peut avoir une incidence sur les qualités organoleptiques.

Dans le cas du collage, il était moins évident d'observer des différences métabolomiques car ce procédé utilisé pour clarifier les vins est connu pour avoir un impact sur les macromolécules. De plus, malgré le fait que l'utilisation de différentes colles soit perçue olfactivement, peu d'analyses chimiques permettent de mettre en évidence ces différences. Les analyses par RMN ont permis de montrer que les colles ont des effets différents sur la composition chimique et 6 molécules impactées ont été identifiées : la choline, l'alanine, la thréonine, l'alcool phénéthylque, l'isoamyl alcool et la trigonelline. Il serait pertinent de renouveler l'expérience en couplant les résultats avec des analyses sensorielles.

A l'échelle du château, la RMN métabolomique s'est révélée particulièrement intéressante en tant qu'**outil d'analyses des vins pouvant aider les producteurs dans le choix de leurs itinéraires techniques**. En effet, dans le cas des analyses du vieillissement des vins en barriques, il a non seulement été possible d'identifier les molécules impactées par le vieillissement en fût de chêne mais aussi de montrer l'influence des différents tonneliers sur la composition chimique du vin. Les analyses statistiques utilisées ont permis d'identifier 12 composés dont les teneurs ont significativement changé au cours du vieillissement. Le **développement des analyses non ciblées** a permis de montrer que d'autres composés appartenant aux régions phénolique (de 10 à 5,5 ppm), carbonilique (de 5,5 à 3,7 ppm) et aliphatique (de 3,5 à 0,5 ppm) ont été impactés par le vieillissement en barrique.

De nombreux signaux non identifiés, notamment dans la région des composés phénoliques se sont révélés significativement impactés par le vieillissement. Un des challenges à l'avenir est de parvenir à identifier ces composés mais leurs faibles teneurs et leur forte réactivité avec la matrice rend la tâche difficile. Il serait intéressant de modifier le protocole de préparation des échantillons pour pouvoir accéder à ces composés. Récemment, Ocaña *et al.* ont proposé de fractionner les vins à l'aide de colonnes d'extraction en phase solide (Ocaña-Rios *et al.*, 2021). Cette approche pourrait être une solution pour étudier plus spécifiquement les composés phénoliques. Une autre possibilité serait d'optimiser les séquences d'impulsion et de développer les analyses RMN 2D.

Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives. Ils montrent que l'approche par RMN métabolomique peut être transposée à l'échelle d'une propriété pour le suivi des vinifications. La RMN pourrait donc être un outil utile pour le contrôle des vinifications à l'échelle d'une propriété viticole. Ils montrent également qu'il est possible d'assurer un suivi du vieillissement des vins au cours du temps. Enfin, l'approche non-ciblée s'est révélée complémentaire de l'approche ciblée. Cependant un travail de profilage reste à faire pour identifier les autres composés impactés par le vieillissement mais non encore identifiés.

Il serait très intéressant de renouveler l'expérience afin de confirmer d'une part l'hypothèse selon laquelle le vieillissement homogénéise les vins élevés dans des barriques de différents producteurs. Mais également augmenter le nombre de dates de prélèvement pour déterminer à quel moment les échantillons semblent s'homogénéiser et confirmer ces analyses avec des dégustations. Il serait également judicieux de coupler ces analyses avec d'autres techniques d'analyses chimiques telles que la spectrométrie de masse pour identifier de nouveaux marqueurs.

L'ensemble des résultats démontre que la **RMN  $^1\text{H}$  constitue un outil analytique pertinent pour le suivi de l'élaboration du vin**. Un des enjeux futurs sera de développer des approches par RMN pouvant être internalisées dans les laboratoires d'analyses œnologiques ou dans les Châteaux. La métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  offre de nombreuses perspectives d'études pour le suivi de l'élaboration du vin. Les résultats obtenus au cours de cette thèse démontrent l'intérêt de coupler des approches ciblées et non-ciblées afin d'évaluer l'impact des différentes pratiques employées car certains composés non identifiés peuvent être impactés. Le couplage avec des approches par spectrométrie de masse pourraient se révéler pertinentes pour identifier ces métabolites.





## *Conclusions et perspectives*



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Mes travaux ont permis d'explorer le potentiel d'utilisation de la RMN métabolomique au service de l'œnologie. Les résultats montrent qu'à partir d'un millilitre de vin, nous sommes capables d'identifier et de doser 54 métabolites permettant de garantir l'authenticité des vins mais aussi de suivre l'influence de différents procédés sur la composition chimique du vin.

Pour l'authenticité, les analyses des spectres RMN réalisées sur différents vins rouges révèlent une signature chimique des composés majoritaires propre à chaque propriété viticole. Ces résultats confirment le pouvoir de la RMN en tant qu'outil d'authenticité des vins. De plus, l'adaptation de la méthodologie aux vins mousseux montre qu'il est possible de transposer la technique à d'autres matrices comme les vins liquoreux ou les spiritueux (cognacs, armagnacs...).

D'autre part, les analyses réalisées pendant deux ans sur la verticale de 2008 à 2017 du Château Mouton Rothschild ont permis de valider la stabilité des teneurs des composés dosés par RMN. Ces résultats démontrent que les analyses chimiques des vins, dans la perspective d'une utilisation de la base de données, sont valables pendant au moins 2 ans. Il serait nécessaire de poursuivre les analyses dans le temps pour déterminer si les composés dosés seront toujours des marqueurs stables dans plusieurs années. Et le cas échéant, de déterminer une date d'expiration des analyses enregistrées dans la base de données.

Les enjeux futurs sont multiples. Le premier, dans l'objectif de généraliser l'utilisation de RMN pour l'analyses officielle des vins, est de standardiser les protocoles de préparation des échantillons et les analyses par RMN, notamment dans le cadre de l'utilisation de spectromètres opérant à différents champs ou encore provenant de différents fabricants. Cela permettra de limiter les biais liés aux méthodes de préparations, aux paramètres liés aux séquences et de pouvoir créer une base de données collaborative, communes à plusieurs laboratoires.

Le second est d'optimiser l'utilisation des analyses non ciblées dans la perspective d'analyses officielles. Comme cela a été souligné dans une revue parue en 2021, les analyses non-ciblées manquent d'une procédure normalisée et communément acceptée (Solovyev et al., 2021). Bien que cela n'ait pas été évoqué dans ce manuscrit, ces travaux ont été initiés. Les résultats sont satisfaisants lorsqu'un faible nombre d'échantillon est analysé, mais ils le sont moins à mesure que le nombre d'échantillon augmente. Cette approche s'avère être un véritable challenge car les prétraitements utilisés tels que l'alignement des signaux ou la correction de

la ligne de base s'avèrent beaucoup plus difficiles sur une cohorte de spectres et peuvent conduire à des erreurs au moment du découpage des spectres en *buckets*.

Une autre piste à explorer serait le développement de nouvelles approches par RMN 2D, ces séquences permettraient d'aider à l'identification de signaux, notamment dans la région des composés phénoliques mais aussi de récupérer les informations des composés qui se superposent tels que l'acide pyruvique, l'acide syringique, le mannitol et le tréhalose. L'inconvénient de cette technique est qu'il est difficile de réaliser des suppressions de solvants et que les expériences sont généralement longues. Les solutions pourraient être de lyophiliser le vin pour s'affranchir des signaux de l'eau et de l'éthanol pour augmenter le rapport signal sur bruit et le développement récent de séquence RMN 2D UltraRapide (Lhoste et al., 2022). A ce titre, un enjeu majeur est de développer les analyses quantitatives par RMN 2D, cela fait l'objet d'un projet ANR « Analyses quantitatives ultrarapides par RMN » porté par Pr Patrick Giraudeau de l'Université de Nantes.

Que ce soit pour la garantie l'authenticité ou pour le suivi de l'élaboration du vin, un des principaux objectifs est d'optimiser les outils de déconvolution des signaux pour affiner les résultats de quantifications. Des séquences d'impulsion pourraient également être optimisées pour améliorer la détection des signaux, notamment pour la région des composés phénoliques. Ces différents objectifs font l'objet d'un projet ANR « WAP NMR » porté par le Pr Tristan Richard de l'Université de Bordeaux

Mes travaux ont montré que la RMN se révèle être un excellent outil de suivi des différentes étapes de l'élaboration du vin jusqu'à la mise en bouteille. La technique offre de nombreuses possibilités d'applications à la filière viti-vinicole. Les études pourraient débiter dès le vignoble car la composition chimique du raisin, et donc du vin en devenir, dépend de nombreux facteurs biotiques et abiotiques : le cépage, les conditions climatiques et environnementales et l'état sanitaire des baies. On pourrait envisager de réaliser des expériences à partir des baies, puis des moûts jusqu'au vin et suivre différents procédés tels que :

- l'impact de différents travaux viticoles couramment utilisés tels que la taille hivernale, l'ébourgeonnage, le rognage, l'effeuillage, l'éclaircissage etc... qui vont avoir de considérables influences sur les teneurs en métabolites majoritaires. Certains de ces différents travaux viticoles sont indispensables pour produire du raisin de qualité et

peuvent aussi permettre de contrebalancer les aléas climatiques. Dans un contexte de réchauffement climatique, il serait intéressant d'étudier l'impact de différentes pratiques viticoles sur les moûts puis sur les vins.

- Détecter des défauts du vin lié à la présence de microorganismes néfastes. La RMN  $^1\text{H}$  pourrait en effet être un moyen rapide de détecter des contaminations de la vendange par certaines bactéries ou enzymes de pourriture entraînant des concentrations élevées en acides oniques (acide gluconique), acides uroniques (acide glucuronique) et acides cétoniques (acide céto-gluconique). Ou encore, une contamination indésirable de *Botrytis cinerea* peut également engendrer des teneurs importantes en acide citrique en approchant le gramme par litre.
- Il serait également possible de détecter certaines déviations métaboliques provoquées par des bactéries au cours de l'élaboration du vin au chai. En effet, comme cela a été évoqué dans l'état de l'art, certaines souches des bactéries lactiques et acétiques possèdent des métabolismes indésirables et les métabolites impactés sont susceptibles d'être détectés par RMN.

Enfin, un des principaux challenges sera de déterminer comment peut s'insérer la RMN en tant qu'outil d'analyse des vins dans un laboratoire d'analyse de routine. Le coût et la technicité des équipements de RMN restent prohibitifs pour de telles applications. Une solution moins coûteuse et plus facile à mettre en œuvre serait l'utilisation d'appareil de paillasse ne nécessitant pas de liquide cryogénique (hélium et azote). Bien que la sensibilité et la résolution soient plus faibles, les « benchtops » s'avèrent d'excellents instruments pour le contrôle de l'authenticité (Sobolev et al., 2019).



## *Références*





## REFERENCES

- Ali, K., Maltese, F., Fortes, A. M., Pais, M. S., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2011). Pre-analytical method for NMR-based grape metabolic fingerprinting and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 703(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.036>
- Amargianitaki, M., & Spyros, A. (2017). NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0092-x>
- Anastasiadi, M., Zira, A., Magiatis, P., Haroutounian, S. A., Skaltsounis, A. L., & Mikros, E. (2009). <sup>1</sup>H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11067-11074. <https://doi.org/10.1021/jf902137e>
- Antalick, G., Perello, M.-C., & de Revel, G. (2012). Characterization of fruity aroma modifications in red wines during malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12371-12383. <https://doi.org/10.1021/jf303238n>
- Arrizabalaga-Arriazu, M., Gomès, E., Morales, F., Irigoyen, J. J., Pascual, I., & Hilbert, G. (2020). High Temperature and Elevated Carbon Dioxide Modify Berry Composition of Different Clones of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Tempranillo. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.603687>
- Balkir, P., Kemahlioglu, K., & Yucel, U. (2021). Foodomics : A new approach in food quality and safety. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.028>
- Baroň, M., & Fiala, J. (2012). Chasing after minerality, relationship to yeasts nutritional stress and succinic acid production. *Czech Journal of Food Sciences*, 30 (2012)(No. 2), 188-193. <https://doi.org/10.17221/464/2010-CJFS>
- Barrera-García, V. D., Gougeon, R. D., Di Majo, D., De Aguirre, C., Voilley, A., & Chassagne, D. (2007). Different Sorption Behaviors for Wine Polyphenols in Contact with Oak Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 7021-7027. <https://doi.org/10.1021/jf070598v>
- Benbougerra, N., Hornedo-Ortega, R., Garcia, F., El Khawand, T., Saucier, C., & Richard, T. (2021). Stilbenes in grape berries and wine and their potential role as anti-obesity agents : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 362-381. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.060>
- Bernard, S. M., & Habash, D. Z. (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*, 182(3), Article LBNL-2173E. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02823.x>
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5-26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2014). Metabolite Identification in NMR-based Metabolomics. *Current Metabolomics*, 2(3), 163-173.
- Blouin, J. (2000). *Maturation et maturite des raisins* (Feret). <https://www.librairie-gallimard.com/livre/9782902416493-maturation-et-maturite-des-raisins-jacques-blouin/>

- Blouin, J., & Cruège, J. (2003). *Analyse et composition des vins—2e éd. - Comprendre le vin* (Dunod). <https://www.eyrolles.com/Sciences/Livre/analyse-et-composition-des-vins-2e-ed-comprendre-le-vin-np-9782100597284/>
- Blouin, J., & Guimberteau, G. (2000). *Maturation et maturité des raisins*.
- Böhme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., & Ortea, I. (2019). Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *110*, 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.005>
- Bontpart, T., Marlin, T., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Pinasseau, L., Meudec, E., Sommerer, N., Cheynier, V., & Terrier, N. (2016). Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, *67*(11), 3537-3550. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw184>
- Camarasa, C., Grivet, J.-P., & Dequin, S. 2003. (2003). Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, *149*(9), 2669-2678. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26007-0>
- Carbonneau, A., & Torregrosa, L. (2020). *Traité de la vigne, 3e éd. - Physiologie, terroir, culture* (dunod). <https://www.leslibraires.fr/livre/16207685-traite-de-la-vigne-3e-ed-physiologie-terro--laurent-torregrosa-alain-carbonneau-dunod>
- Carr, H. Y., & Purcell, E. M. (1954). *Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments in Physical*. <https://www.abebooks.fr/edition-originale/Effects-Diffusion-Free-Precession-Nuclear-Magnetic/14885134015/bd>
- Carton, Y. (2006). La découverte du Phylloxéra en France : Un sujet de polémique. Les archives parlent (Hemiptera, Chermesidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, *111*(3), 305-316. <https://doi.org/10.3406/bsef.2006.16327>
- Charpentier, C., Aussenac, J., Charpentier, M., Prome, J.-C., Duteurtre, B., & Feuillat, M. (2005). Release of Nucleotides and Nucleosides during Yeast Autolysis : Kinetics and Potential Impact on Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(8), 3000-3007. <https://doi.org/10.1021/jf040334y>
- Chen, J., & Singer, S. (2007). High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy. In *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics* (p. 113-147). <https://doi.org/10.1016/B978-044452841-4/50005-9>
- Chira, K., & Teissedre, P.-L. (2015). Chemical and sensory evaluation of wine matured in oak barrel : Effect of oak species involved and toasting process. *European Food Research and Technology*, *240*(3), 533-547. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2352-3>
- Cinquanta, L., Albanese, D., Curtis, F. de, Malvano, F., Crescitelli, A., & Matteo, M. di. (2015). Rapid assessment of gray mold (*Botrytis cinerea*) infection in grapes with a biosensor system. *American Journal of Enology and Viticulture*, *66*(4), 502-508.
- Claridge, T. D. W. (2016). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Elsevier.
- Claus, H., & Mojsov, K. (2018). Enzymes for Wine Fermentation : Current and Perspective Applications. *Fermentation*, *4*(3), 52. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030052>
- CNIV, & FranceAgriMer. (2016). *Analyses des filières vitivinicoles des principaux producteurs dans le monde*.

- Cobas, C., Seoane, F., Domínguez, S., Sykora, S., & Davies, A. N. (2011). A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through global spectral deconvolution (GSD). *Spectroscopy Europe*, 23(1), 26-30.
- Coelho, E., Domingues, L., Teixeira, J. A., Oliveira, J. M., & Tavares, T. (2019). Understanding wine sorption by oak wood : Modeling of wine uptake and characterization of volatile compounds retention. *Food Research International*, 116, 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.025>
- Coelho, E., Teixeira, J. A., Domingues, L., Tavares, T., & Oliveira, J. M. (2019). Factors affecting extraction of adsorbed wine volatile compounds and wood extractives from used oak wood. *Food Chemistry*, 295, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.093>
- Coetzee, C., & du Toit, W. J. (2015). Sauvignon blanc wine : Contribution of ageing and oxygen on aromatic and non-aromatic compounds and sensory composition - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(3), 347-365.
- Collombet, F. (2020). *Cépages & vins—Ces raisins qui font les bonnes bouteilles—Livre et ebook Cuisine et boisson de François Collombet—Dunod* (Dunod). <https://www.dunod.com/vie-pratique/cepapes-vins-ces-raisins-qui-font-bonnes-bouteilles-0>
- Consonni, R., & Cagliani, L. (2018). The potentiality of NMR based metabolomics in food science and food authentication assessment. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 57. <https://doi.org/10.1002/mrc.4807>
- Corsaro, C., Cicero, N., Mallamace, D., Vasi, S., Naccari, C., Salvo, A., Giofrè, S. V., & Dugo, G. (2016). HR-MAS and NMR towards Foodomics. *Food Research International*, 89, 1085-1094. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.033>
- Cosme, F., Gonçalves, B., Inês, A., Jordão, A., & Vilela, A. (2016). *Grape and Wine Metabolites : Biotechnological Approaches to Improve Wine Quality* (p. 187-224). <https://doi.org/10.5772/64822>
- Costantini, A., Vaudano, E., Pulcini, L., Carafa, T., & Garcia-Moruno, E. (2019). An Overview on Biogenic Amines in Wine. *Beverages*, 5(1), 19. <https://doi.org/10.3390/beverages5010019>
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., & Maquet, A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, 60, 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.041>
- Davaux, F., & Noilet, P. (2012). *Une nouvelle dimension à la thermovinification*. 145 Spécial, 52-55.
- De Pascali, S. A., Coletta, A., Del Coco, L., Basile, T., Gambacorta, G., & Fanizzi, F. P. (2014). Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chemistry*, 161, 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.128>
- del Alamo-Sanza, M., & Nevares, I. (2018). Oak wine barrel as an active vessel : A critical review of past and current knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(16), 2711-2726. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1330250>
- Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of Flash Release and Pectinolytic Enzyme Treatments on Wine Polysaccharide Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6643-6649. <https://doi.org/10.1021/jf071427t>
- Dona, A. C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E. A., Varshavi, D., Veselkov, K., & Everett, J. R. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based

metabonomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 135-153. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.02.005>

El Darra, N., Turk, M. F., Ducasse, M.-A., Grimi, N., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2016). Changes in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments. *Food Chemistry*, 194, 944-950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.059>

Elnaker, N., Daou, M., Ochsenkuehn, M., Amin, S., Yousef, A., & Yousef, L. (2021). A metabolomics approach to evaluate the effect of lyophilization versus oven drying on the chemical composition of plant extracts. *Scientific Reports*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02158-6>

Erasmus, D. J., Cliff, M., & Vuuren, H. J. J. van. (2004). Impact of Yeast Strain on the Production of Acetic Acid, Glycerol, and the Sensory Attributes of Icewine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 371-378.

European Union Intellectual Property Office. (2020). *2020 status report on IPR infringement : Why IP rights are important, IPR infringement and the fight against counterfeiting and piracy*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2814/165063>

Fan, S., Zhong, Q., Fahl-Hassek, C., Pfister, M. K.-H., Horn, B., & Huang, Z. (2018). Classification of Chinese wine varieties using 1H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Food Control*, 88, 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.002>

Ferreira-Lima, N. E., Burin, V. M., & Bordignon-Luiz, M. T. (2013). Characterization of Goethe white wines : Influence of different storage conditions on the wine evolution during bottle aging. *European Food Research and Technology*, 237(4), 509-520. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2019-5>

Forino, M., Gambuti, A., Luciano, P., & Moio, L. (2019). Malvidin-3-O-glucoside Chemical Behavior in the Wine pH Range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(4), 1222-1229. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05895>

Freitas, V. A. P. de, Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., & Mateus, N. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One*, 51(1), Article 1. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.1.1604>

Gallo, V., Intini, N., Mastroilli, P., Latronico, M., Scapicchio, P., Triggiani, M., Bevilacqua, V., Fanizzi, P., Acquotti, D., Airoidi, C., Arnesano, F., Assalg, M., Benevelli, F., Bertelli, D., Cagliani, L. R., Casadei, L., Cesare Marincola, F., Colafemmina, G., Consonni, R., ... Valerio, M. (2015). Performance Assessment in Fingerprinting and Multi Component Quantitative NMR Analyses. *Analytical Chemistry*, 87(13), 6709-6717. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00919>

Gammacurta, M., Lytra, G., Marchal, A., Marchand, S., Christophe Barbe, J., Moine, V., & de Revel, G. (2018). Influence of lactic acid bacteria strains on ester concentrations in red wines: Specific impact on branched hydroxylated compounds. *Food Chemistry*, 239, 252-259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.123>

Gammacurta, M., Marchand, S., Albertin, W., Moine, V., & de Revel, G. (2014). Impact of Yeast Strain on Ester Levels and Fruity Aroma Persistence during Aging of Bordeaux Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(23), 5378-5389. <https://doi.org/10.1021/jf500707e>

- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science & Technology*, 17(8), 438-447. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.01.008>
- Ghanem, C., Taillandier, P., Rizk, M., Rizk, Z., Nehme, N., Souchard, J. P., & El Rayess, Y. (2017). Analysis of the impact of fining agents types, oenological tannins and mannoproteins and their concentrations on the phenolic composition of red wine. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.009>
- Giraudeau, P., Silvestre, V., & Akoka, S. (2015). Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics : A tutorial review. *Metabolomics*, 11(5), 1041-1055. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0794-7>
- Gnoinski, G. B., Close, D. C., Schmidt, S. A., & Kerslake, F. L. (2021). Towards Accelerated Autolysis? Dynamics of Phenolics, Proteins, Amino Acids and Lipids in Response to Novel Treatments and during Ageing of Sparkling Wine. *Beverages*, 7(3), 50. <https://doi.org/10.3390/beverages7030050>
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & Spraul, M. (2013). Targeted and Nontargeted Wine Analysis by 1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters : Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610-5619. <https://doi.org/10.1021/jf400800d>
- Godelmann, R., Kost, C., Patz, C.-D., Ristow, R., & Wachter, H. (2016). Quantitation of compounds in wine using 1H NMR spectroscopy : Description of the method and collaborative study. *Journal of AOAC International*, 99(5), 1295-1304. Scopus. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0318>
- Gonzalez, R., & Morales, P. (2017). Wine secondary aroma : Understanding yeast production of higher alcohols. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1449-1450. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12770>
- González-Neves, G., Favre, G., & Gil, G. (2014). Effect of fining on the colour and pigment composition of young red wines. *Food Chemistry*, 157, 385-392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.062>
- Goodacre, R., Broadhurst, D., Smilde, A. K., Kristal, B. S., Baker, J. D., Beger, R., Bessant, C., Connor, S., Capuani, G., Craig, A., Ebbels, T., Kell, D. B., Manetti, C., Newton, J., Paternostro, G., Somorjai, R., Sjöström, M., Trygg, J., & Wulfert, F. (2007). Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics*, 3(3), 231-241. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0081-3>
- Gougeon, Louis, Gregory Da Costa, Inès Le Mao, Wen Ma, Pierre-Louis Teissedre, François Guyon, et Tristan Richard (2018). « Wine Analysis and Authenticity Using 1H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines ». *Food Analytical Methods*, n° 12: 3425-34. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1310-2>.
- Gougeon, L., da Costa, G., Richard, T., & Guyon, F. (2019a). Wine Authenticity by Quantitative 1H NMR Versus Multitechnique Analysis : A Case Study. *Food Analytical Methods*, 12(4), 956-965. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-01425-z>
- Gougeon, L., da Costa, G., Guyon, F., & Richard, T. (2019b). 1H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food Chemistry*, 301, 125257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125257>

- Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L., & Maggio, R. M. (2018). Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>
- Grinde, M. T., Giskeødegård, G. F., Andreassen, T., Tessem, M.-B., Bathen, T. F., & Moestue, S. A. (2019). Biomarker Discovery Using NMR-Based Metabolomics of Tissue. In G. A. N. Gowda & D. Raftery (Éds.), *NMR-Based Metabolomics: Methods and Protocols* (p. 243-262). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2_15)
- Hatzakis, E. (2019). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 189-220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>
- Henseler, J., Ringle, C. M., & Sinkovics, R. R. (2009). The use of partial least squares path modeling in international marketing. In R. R. Sinkovics & P. N. Ghauri (Éds.), *New Challenges to International Marketing* (Vol. 20, p. 277-319). Emerald Group Publishing Limited. [https://doi.org/10.1108/S1474-7979\(2009\)0000020014](https://doi.org/10.1108/S1474-7979(2009)0000020014)
- Hernández-Orte, P., Cacho, J. F., & Ferreira, V. (2002). Relationship between Varietal Amino Acid Profile of Grapes and Wine Aromatic Composition. Experiments with Model Solutions and Chemometric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2891-2899. <https://doi.org/10.1021/jf011395o>
- Hu, B., Yue, Y., Zhu, Y., Wen, W., Zhang, F., & Hardie, J. W. (2015). Proton Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopic Discrimination of Wines Reflects Genetic Homology of Several Different Grape (*V. vinifera* L.) Cultivars. *PLOS ONE*, 10(12), e0142840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142840>
- IFV. (2014). *Enzymes en œnologie: Fabrication, réglementation, applications*.
- IFV, & VBNA. (2020). *Bon usage des colles et des préparations enzymatiques en vinification biologique*.
- INAO. (2016). *Indication géographique protégée*. <https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQQ/Indication-geographique-protgee>
- Inês, A., & Falco, V. (2018). Lactic Acid Bacteria Contribution to Wine Quality and Safety. In *Generation of Aromas and Flavours*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81168>
- Jimenez-Carvelo, A. M., & Cuadros-Rodríguez, L. (2021). Data mining/machine learning methods in foodomics. *Current Opinion in Food Science*, 37, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.09.008>
- Karamanidou, A., Kallithraka, S., & Hatzidimitriou, E. (2011). Fining of red wines: Effects on their analytical and sensory parameters. *OENO One*, 45(1), 47-60. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2011.45.1.1481>
- Kassara, S., Li, S., Smith, P., Blando, F., & Bindon, K. (2019). Pectolytic enzyme reduces the concentration of colloidal particles in wine due to changes in polysaccharide structure and aggregation properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 546-555. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.043>
- Kuhn, N., Guan, L., Dai, Z. W., Wu, B.-H., Lauvergeat, V., Gomès, E., Li, S.-H., Godoy, F., Arce-Johnson, P., & Delrot, S. (2014). Berry ripening: Recently heard through the grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4543-4559. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert395>

- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma—A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 97-129. <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>
- Lee, J.-E., Hwang, G.-S., Van Den Berg, F., Lee, C.-H., & Hong, Y.-S. (2009). Evidence of vintage effects on grape wines using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic study. *Analytica Chimica Acta*, 648(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.039>
- Lhoste, C., Lorandel, B., Praud, C., Marchand, A., Mishra, R., Dey, A., Bernard, A., Dumez, J.-N., & Giraudeau, P. (2022). Ultrafast 2D NMR for the analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 130-131, 1-44. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2022.01.002>
- Li, S., Bindon, K., Bastian, S. E. P., Jiranek, V., & Wilkinson, K. L. (2017). Use of Winemaking Supplements To Modify the Composition and Sensory Properties of Shiraz Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(7), 1353-1364. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04505>
- Li, S., Tian, Y., Jiang, P., Lin, Y., Liu, X., & Yang, H. (2021). Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1448-1469. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761287>
- Liang, Z., Owens, C. L., Zhong, G.-Y., & Cheng, L. (2011). Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germplasm. *Food Chemistry*, 129(3), 940-950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.050>
- Liu, H.-F., Wu, B.-H., Fan, P.-G., Li, S.-H., & Li, L.-S. (2006). Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(10), 1526-1536. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2541>
- López de Lerma, N., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C., & Peinado, R. A. (2012). Volatile composition of partially fermented wines elaborated from sun dried Pedro Ximénez grapes. *Food Chemistry*, 135(4), 2445-2452. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.058>
- López-Rituerto, E., Cabredo, S., López, M., Avenoza, A., Busto, J. H., & Peregrina, J. M. (2009). A Thorough Study on the Use of Quantitative <sup>1</sup>H NMR in Rioja Red Wine Fermentation Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2112-2118. <https://doi.org/10.1021/jf803245r>
- López-Rituerto, E., Savorani, F., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M., & Engelsen, S. B. (2012). Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using <sup>1</sup>H NMR Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3452-3461. <https://doi.org/10.1021/jf204361d>
- Lukić, K., Ćurko, N., Tomašević, M., & Kovačević Ganić, K. (2020). Phenolic and Aroma Changes of Red and White Wines during Aging Induced by High Hydrostatic Pressure. *Foods*, 9(8), 1034. <https://doi.org/10.3390/foods9081034>
- Ma, T., Wang, J., Wang, H., Zhao, Q., Zhang, F., Ge, Q., Li, C., Gamboa, G. G., Fang, Y., & Sun, X. (2022). Wine aging and artificial simulated wine aging: Technologies, applications, challenges, and perspectives. *Food Research International*, 153, 110953. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.110953>
- Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: A review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov067. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov067>



- Martin, G. J., Guillou, C., Martin, M. L., Cabanis, M. T., Tep, Y., & Aerny, J. (1988). Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(2), 316-322. <https://doi.org/10.1021/jf00080a019>
- Mascellani, A., Hoca, G., Babisz, M., Krska, P., Kloucek, P., & Havlik, J. (2021). <sup>1</sup>H NMR chemometric models for classification of Czech wine type and variety. *Food Chemistry*, 339, 127852. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127852>
- Matviychuk, Y., Haycock, S., Rutan, T., & Holland, D. J. (2021). Quantitative analysis of wine and other fermented beverages with benchtop NMR. *Analytica Chimica Acta*, 1182, 338944. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338944>
- Mielko, K. A., Pudełko-Malik, N., Tarczewska, A., & Młynarz, P. (2021). NMR spectroscopy as a “green analytical method” in metabolomics and proteomics studies. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 22, 100474. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100474>
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F., & Muñoz, R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 117-123. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00391-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00391-4)
- Muhammad, A., & Countryman, A. M. (2019). In Vino ‘No’ Veritas : Impacts of fraud on wine imports in China. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, 63(4), 742-758. <https://doi.org/10.1111/1467-8489.12333>
- Mulas, G., Galaffu, M. G., Pretti, L., Nieddu, G., Mercenaro, L., Tonelli, R., & Anedda, R. (2011). NMR Analysis of Seven Selections of Vermentino Grape Berry : Metabolites Composition and Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 793-802. <https://doi.org/10.1021/jf103285f>
- Navarro, Y., Soengas, R., Iglesias, M. J., & Ortiz, F. L. (2020). Use of NMR for the Analysis and Quantification of the Sugar Composition in Fresh and Store-Bought Fruit Juices. *Journal of Chemical Education*, 97(3), 831-837. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00651>
- Nigam, P. S. (2014). WINES | Production of Special Wines. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Éds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (p. 793-799). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00358-X>
- Nord, L., Vaag, P., & Duus, J. (2004). Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Analytical chemistry*, 76, 4790-4798. <https://doi.org/10.1021/ac0496852>
- Oberholster, A., Carstens, L. M., & du Toit, W. J. (2013). Investigation of the effect of gelatine, egg albumin and cross-flow microfiltration on the phenolic composition of Pinotage wine. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1275-1281. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.128>
- Ocaña-Rios, I., Ruiz-Terán, F., García-Aguilera, M. E., Tovar-Osorio, K., Miguel, E. R. de S., & Esturau-Escofet, N. (2021). Comparison of two sample preparation methods for <sup>1</sup>H-NMR wine profiling : Direct analysis and solid-phase extraction. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 60(2), 69-75. <https://doi.org/10.5073/vitis.2021.60.69-75>
- OIV a Compendium of international methods of analysis: alcoholic strength by volume.-OIV-MA-AS312-01A at <http://www.oiv.int>.
- OIV b Compendium of international methods of analysis: dosage of sugars in wine by HPLC.OIV-MA-AS311-03at <http://www.oiv.int>.

OIV c Compendium of international methods of analysis: volatile Acidity. OIV-MA-AS313–02 at <http://www.oiv.int>.

OIV d Compendium of international methods of analysis: analysis of volatile compounds in wines by gas chromatography. OIV-MAAS315–27 at <http://www.oiv.int>.

OIV e Compendium of international methods of analysis: determination of the principal organic acids of wines and sulphates by capillary electrophoresis. OIV-MA-AS-313-19 at <http://www.oiv.int>.

OIV f Compendium of international methods of analysis: analysis of mineral elements in wines using ICP- AES (inductively coupled plasma / atomic emission spectrometry). OIV-MA-AS311–05 at <http://www.oiv.int>.

OIV g Compendium of international methods of analysis : determination of the deuterium distribution in ethanol derived from fermentation of grape musts, concentrated grape musts, grape sugar (rectified concentrated grape musts) and wines by application of nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR/ RMN-FINS). OIV-MA-AS311–05 at <http://www.oiv.int>.

OIV h Compendium of international methods of analysis: determination by isotope ratio mass spectrometry <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C of wine ethanol or that obtained through the fermentation of must, concentrated musts or grape sugar. OIV-MA-AS312–06 at <http://www.oiv.int>.

OIV i Compendium of international methods of analysis: method for <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O ratio determination of water in wines and must. OIVMA-AS2–12 at <http://www.oiv.int>.

OIV j Compendium of international methods of analysis: method for sulfur dioxide. OIV-MA-AS323-04A at <http://www.oiv.int>.

OIV. (2010). *DEFINITION DU « TERROIR » VITIVINICOLE, RESOLUTION OIV/VITI 333/2010*.

OIV. (2015). *Code international des pratiques oenologiques- Fiche code OIV I.1.3-1*.

OIV. (2020, avril). *OIV FOCUS THE GLOBAL SPARKLING WINE MARKET*. <https://www.oiv.int/js/lib/pdfjs/web/viewer.html?file=/public/medias/7291/oiv-sparkling-focus-2020.pdf>

OIV. (2022). *Note de conjoncture vitivinicole mondiale*.

Palmioli, A., Alberici, D., Ciaramelli, C., & Airoidi, C. (2020). Metabolomic profiling of beers : Combining <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometric approaches to discriminate craft and industrial products. *Food Chemistry*, 327, 127025. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127025>

Pandey, R. M., Rao, M. M., & Singh, R. N. (1974). Studies on the metabolism of amino acids during development, ripening and senescence of ‘Pusa Seedless’ grapes. *Scientia Horticulturae*, 2(4), 383-388. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(74\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(74)90044-2)

Pavloušek, P., & Kumšta, M. (2011). Profiling of primary metabolites in grapes of interspecific grapevine varieties : Sugars and organic acids. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(No. 4), 361-372. <https://doi.org/10.17221/257/2010-CJFS>

Percival, B., Gibson, M., Leenders, J., Wilson, P. B., & Grootveld, M. (2020). *Chapter 1 Univariate and Multivariate Statistical Approaches to the Analysis and Interpretation of NMR-based Metabolomics Datasets of Increasing Complexity*. 1-40. <https://doi.org/10.1039/9781788015882-00001>

- Pereira, G. E., Gaudillere, J.-P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. (2006). Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of Grape Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6765-6775. <https://doi.org/10.1021/jf061013k>
- Pereira, G. E., Gaudillere, J.-P., Van Leeuwen, C., Hilbert, G., Lavialle, O., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. (2005). <sup>1</sup>H NMR and Chemometrics To Characterize Mature Grape Berries in Four Wine-Growing Areas in Bordeaux, France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6382-6389. <https://doi.org/10.1021/jf058058q>
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P. M., & Palop, M. L. (2013). Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2), 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.024>
- Pérez-Prieto, L. J., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Pardo Mínguez, F., & Gómez-Plaza, E. (2002). Maturing Wines in Oak Barrels. Effects of Origin, Volume, and Age of the Barrel on the Wine Volatile Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3272-3276. <https://doi.org/10.1021/jf011505r>
- Petrova, I., Xu, S., externe, L. vers un site, fenêtre, celui-ci s'ouvrira dans une nouvelle, Joesten, W. C., & Ni, S. (2019). Influence of Drying Method on NMR-Based Metabolic Profiling of Human Cell Lines. *Metabolites*, 9(11), 256. <https://doi.org/10.3390/metabo9110256>
- Picariello, L., Rinaldi, A., Martino, F., Petracca, F., Moio, L., & Gambuti, A. (2019). Modification of the organic acid profile of grapes due to climate changes alters the stability of red wine phenolics during controlled oxidation. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 127-133 Pages. <https://doi.org/10.5073/VITIS.2019.58.SPECIAL-ISSUE.127-133>
- Pino, J. A., & Queris, O. (2011). Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chemistry*, 125(4), 1141-1146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.056>
- Ralli, E., Amargianitaki, M., Manolopoulou, E., Misiak, M., Markakis, G., Tachtalidou, S., Kolesnikova, A., Dais, P., & Spyros, A. (2018). NMR Spectroscopy Protocols for Food Metabolomics Applications. In G. A. Theodoridis, H. G. Gika, & I. D. Wilson (Éds.), *Metabolic Profiling: Methods and Protocols* (p. 203-211). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7643-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7643-0_14)
- Ramirez Ramirez, G., Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M., Voilley, A., & Chassagne, D. (2001). Aroma Compound Sorption by Oak Wood in a Model Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3893-3897. <https://doi.org/10.1021/jf001334a>
- Ribéreau-Gayon, J. (2017). *Traité d'oenologie—Tome 1*. <https://www.dunod.com/sciences-techniques/traité-d-oenologie-tome-1-microbiologie-du-vin-vinifications-0>
- Ringnér, M. (2008). What is principal component analysis? *Nature Biotechnology*, 26(3), 303-304. <https://doi.org/10.1038/nbt0308-303>
- Rodrigues, J. E. A., Erny, G. L., Barros, A. S., Esteves, V. I., Brandão, T., Ferreira, A. A., Cabrita, E., & Gil, A. M. (2010). Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. *Analytica Chimica Acta*, 674(2), 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.029>
- Román, T., Nicolini, G., Barp, L., Malacarne, M., Tait, F., & Larcher, R. (2018). Shikimic acid concentration in white wines produced with different processing protocols from fungus-resistant grapes growing in the Alps. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 57(2), 41-46. <https://doi.org/10.5073/vitis.2018.57.41-46>

- Schoenberger, T. (2019). *Guideline for qNMR analysis*.
- Šikuten, I., Štambuk, P., Andabaka, Ž., Tomaz, I., Marković, Z., Stupić, D., Maletić, E., Kontić, J. K., & Preiner, D. (2020). Grapevine as a Rich Source of Polyphenolic Compounds. *Molecules*, 25(23), 5604. <https://doi.org/10.3390/molecules25235604>
- Simmler, C., Napolitano, J. G., McAlpine, J. B., Chen, S.-N., & Pauli, G. F. (2014). Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Current Opinion in Biotechnology*, 25, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.004>
- Sims, C. A., Eastridge, J. S., & Bates, R. P. (1995). Changes in Phenols, Color, and Sensory Characteristics of Muscadine Wines by Pre- and Post-Fermentation Additions of PVPP, Casein, and Gelatin. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 155-158.
- Sobolev, A. P., Thomas, F., Donarski, J., Ingallina, C., Circi, S., Cesare Marincola, F., Capitani, D., & Mannina, L. (2019). Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 347-353. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.035>
- Solovyev, P. A., Fahl-Hassek, C., Riedl, J., Esslinger, S., Bontempo, L., & Camin, F. (2021). NMR spectroscopy in wine authentication: An official control perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 2040-2062. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12700>
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Kim, K. M., Ahn, H.-J., Park, W.-M., Van Den Berg, F., Hong, Y.-S., & Lee, C.-H. (2009). Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using <sup>1</sup>H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1481-1490. <https://doi.org/10.1021/jf803388w>
- Son, H.-S., Kim, K. M., van den Berg, F., Hwang, G.-S., Park, W.-M., Lee, C.-H., & Hong, Y.-S. (2008). <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8007-8016. <https://doi.org/10.1021/jf801424u>
- Sparrow, A. M., Gill, W., Damberg, R. G., & Close, D. C. (2021). Focus on the role of seed tannins and pectolytic enzymes in the color development of Pinot noir wine. *Current Research in Food Science*, 4, 405-413. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.05.007>
- Spyros, A., & Dais, P. (2012). *NMR Spectroscopy in Food Analysis*. <https://doi.org/10.1039/9781849735339>
- Stepanova, E., Landesman, E., Fedorova, T., Yakovleva, K., & Koroleva, O. (2006). Comparison of the efficiency of polygalacturonase and  $\beta$ -glucosidase enzyme preparations in stabilization of cherry plum wine material. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 609-615. <https://doi.org/10.1134/S0003683806060123>
- Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Hoj, P. B., & Van Heeswijck, R. (2000). *Proline and arginine accumulation in developing berries of Vitis vinifera L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type*. AUSTRALIAN SOCIETY OF VITICULTURE AND OENOLOGY. <http://hdl.handle.net/2440/12968>
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012a). Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(1), 3-16. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0330-3>

- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012b). Double-check : Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(1), 3-16. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0330-3>
- Taylor, R. (2013). WineSpectator.
- Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., Rutledge, D. N., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics : The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular BioSystems*, 11(1), 13-19. <https://doi.org/10.1039/c4mb00414k>
- Valdés, A., Álvarez-Rivera, G., Socas-Rodríguez, B., Herrero, M., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2022). Foodomics : Analytical Opportunities and Challenges. *Analytical Chemistry*, 94(1), 366-381. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04678>
- Verdenal, T., Dienes-Nagy, Á., Spangenberg, J. E., Zufferey, V., Spring, J.-L., Viret, O., Marin-Carbonne, J., & Leeuwen, C. van. (2021). Understanding and managing nitrogen nutrition in grapevine : A review. *OENO One*, 55(1), 1-43. <https://doi.org/10.20870/oenone.2021.55.1.3866>
- Vignoli, A., Ghini, V., Meoni, G., Licari, C., Takis, P. G., Tenori, L., Turano, P., & Luchinat, C. (2019). High-Throughput Metabolomics by 1D NMR. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(4), 968-994. <https://doi.org/10.1002/anie.201804736>
- Vincent, É. (2018). Les qualités du lieu dans les délimitations des appellations d'origine. *Crescentis. Revue internationale d'histoire de la vigne et du vin*, 1, Article 1. <http://preo.u-bourgogne.fr/crescentis/index.php?id=296>
- Viridis, C., Sumby, K., Bartowsky, E., & Jiranek, V. (2021). Lactic Acid Bacteria in Wine : Technological Advances and Evaluation of Their Functional Role. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.612118>
- Weljie, A. M., Newton, J., Mercier, P., Carlson, E., & Slupsky, C. M. (2006). Targeted Profiling : Quantitative Analysis of 1H NMR Metabolomics Data. *Analytical Chemistry*, 78(13), 4430-4442. <https://doi.org/10.1021/ac060209g>
- Wishart, D. S. (2019). NMR metabolomics : A look ahead. *Journal of Magnetic Resonance*, 306, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.013>
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., & Sykes, B. D. (1995). 1H, 13C and 15N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(2), 135-140. <https://doi.org/10.1007/BF00211777>
- Yalcin, S. K., & Ozbas, Z. Y. (2008). Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 325-332. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200024>

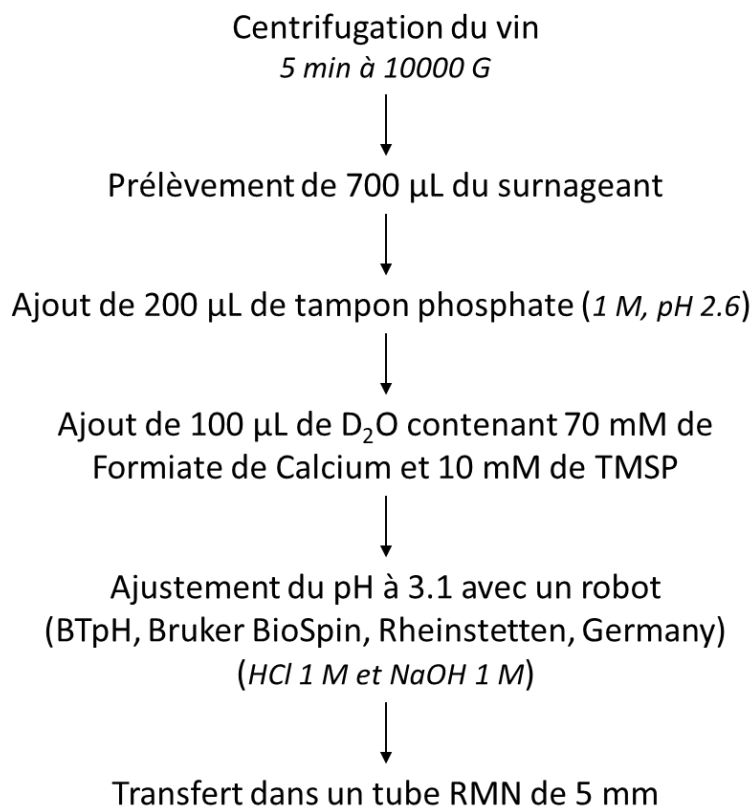
# *Annexes*



## ANNEXES

### Annexe 1 : Protocoles d'analyses des vins

#### Etape 1 : Préparation des échantillons



#### Etape 2 : Acquisition des spectres et traitements post-acquisition

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Avance III (Bruker, Wissembourg, France) fonctionnant à 600,27 MHz, équipé d'une sonde TXI de 5 mm avec des bobines à gradient Z. Les mesures ont été effectuées à 293 K (20°C), en utilisant le logiciel TopSpin® 4.0.8 (Bruker).



Trois séquences d'impulsions magnétiques différentes ont été utilisées : *zg30*, *zgpr* et *noesygpps1d*. La première séquence sert à déterminer le déplacement chimique de l'eau afin de pouvoir le supprimer dans les deux autres séquences. Les principaux paramètres utilisés pour les séquences *zgpr* et *noesygpps1d* sont listés dans le tableau suivant :

	<i>zgpr</i>	<i>noesygpps1d</i>
TD	64 k	64 k
SW (ppm)	16	16
D1 (sec)	5	5
Aq (sec)	3.4	3.4
ns	8	32

Une fois que les spectres sont transformés, la correction de la phase est réalisée manuellement. Les spectres sont ensuite alignés à 0,0 ppm à l'aide du signal du TMSP.

Les spectres sont ensuite traités avec les logiciels MestReNova 14.0.0 (Bruker) pour les analyses ciblées et la version en ligne de NMRProcFlow (<https://nmrprocflow.org/>) pour les analyses non-ciblées.

Pour les **analyses ciblées** réalisées à l'aide du logiciel MestReNova, nous avons utilisé le plugin SMA (Simple Mixture Analysis) afin de créer une librairie des composés identifiés qui sont ensuite détectés automatiquement. Avant de lancer la quantification automatique, la ligne de base est corrigée automatiquement par la fonction « polynomial fit ». L'identification des signaux utilisés pour la quantification est ensuite vérifiée et corrigée par l'opérateur.

Les **analyses non-ciblées** sont effectuées avec NMRProcFlow (Jacob, 2017). Les spectres sont d'abord calibrés à 0,00 ppm à l'aide du TMSP, puis subissent une correction locale de la

ligne de base en sélectionnant les zones en amont et en aval des signaux de l'eau et de l'éthanol. Les signaux sont ensuite finement alignés zones par zone puis le spectre est découpé en *buckets* grâce à la fonction « *ingelligent bucketing* ».

### **Etape 3 : Analyses statistiques des données**

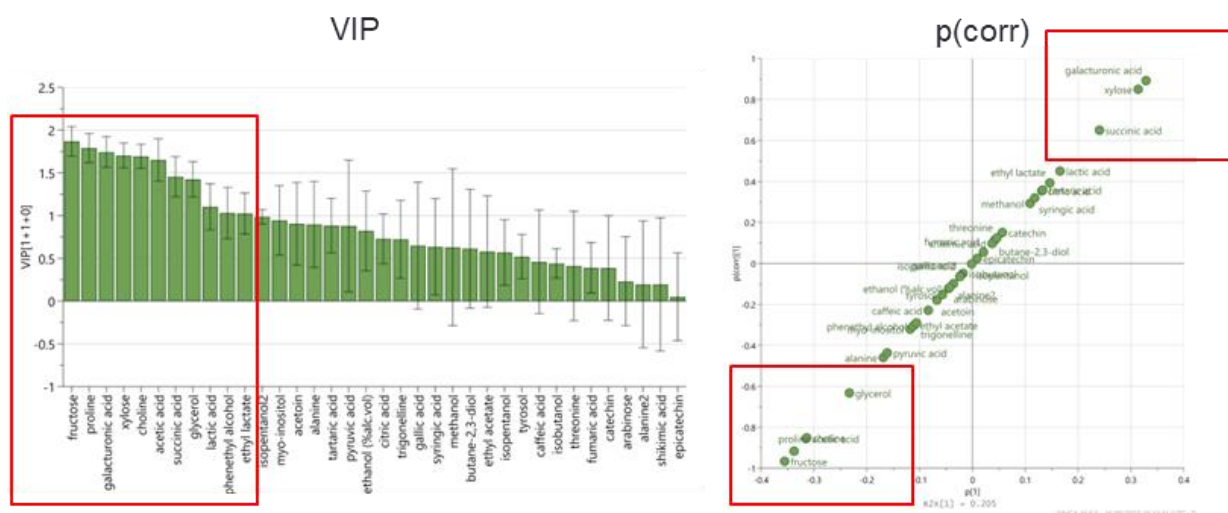
Les données générées sont ensuite traitées statistiquement à l'aide d'analyses statistiques multivariées et univariées pour la confirmation des composés discriminants.

Les **analyses statistiques multivariées** sont réalisées à l'aide du logiciel SIMCA 16.0 (Sartorius, Germany). Les données sont préalablement et automatiquement centrées réduites. L'échelle appliquée par défaut (UV-scale) a été utilisée afin de donner le même poids à toutes les variables.

La première étape consiste à utiliser une analyse en composantes principales (ACP) afin de visualiser la distribution spontanée de l'ensemble des données et d'identifier le cas échant des échantillons aberrants. Une analyse discriminante orthogonale partielle des moindres carrés (OPLS-DA) est ensuite utilisée pour accentuer la séparation entre les groupes d'observations et identifier les potentiels composés discriminants (Alañón et al., 2015 ; Amargianitaki & Spyros, 2017 ; Wheelock & Wheelock, 2013). Les résultats de ces analyses sont représentés sous la forme d'un graphique montrant la distribution des échantillons dans un espace bidimensionnel, ainsi que les composés qui influencent cette distribution. Une ellipse T2 de Hotelling indique la zone de confiance à 95%. La qualité de toutes ces analyses est décrite par un R-carré (R<sup>2</sup>) et un Q-carré (Q<sup>2</sup>) où R<sup>2</sup> représente la qualité de l'ajustement ou la variation expliquée, et Q<sup>2</sup> représente la qualité de la prédiction ou la variation prédite (Lee et al., 2009).

La fiabilité des modèles est d'abord contrôlée par l'analyse de la variance des résidus prédictifs validés par recoupement (CV-ANOVA) et vérifiés par des tests de permutation. La précision des modèles a été estimée sur la base des courbes caractéristiques d'exploitation du récepteur (ROC) et des tableaux de classifications.

Les métabolites potentiellement discriminants sont ensuite identifiés grâce aux valeurs des VIP (*Variable Importance in Projection*) et des coefficients de corrélation (p-(corr)) (Wheelock & Wheelock, 2013). Les métabolites dont les valeurs de VIP et de p(corr) sont supérieures à 1,0 et |0,5|, comme présentés dans la figure ci-dessous, sont considérés comme des métabolites discriminants potentiels.



Enfin, des **analyses statistiques univariées** réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 9.1.0 (GraphPad Software, USA) sont utilisées pour confirmer l'identification des composés discriminant avec une analyse de la variance (ANOVA) ou un test de Student afin de déterminer si les moyennes des teneurs des composés identifiées sont significativement différentes pour les modalités comparées.

## Annexe 2 : Articles de vulgarisation

Dans le cadre de ma thèse j'ai eu l'occasion de participer à la rédaction de deux articles de vulgarisation scientifiques.

Le premier, intitulé « La RMN, un outil pour garantir l'authenticité des vins » a été publié dans Union Girondine des vins de Bordeaux en décembre 2019.

Le second, intitulé « RMN 1H et authentification des vins » a été publié dans Actualité Chimiques en décembre 2022.



# La RMN, un outil pour garantir l'authenticité des vins

*La lutte contre la contrefaçon des vins est un enjeu économique majeur et un problème scientifique complexe à résoudre. Le projet VRAI (Vin-Recherche-Authenticité-Identité) a pour objectif de développer des outils pour répondre à cette problématique. Parmi, les nombreuses approches analytiques développées, la résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil de choix. Elle est aujourd'hui couramment utilisée pour garantir l'authenticité de nombreux produits alimentaires. Voici comment l'analyse de la composition chimique d'un vin par RMN peut renseigner sur son authenticité.*

Si les cas de fraudes dans le monde du vin sont, de nos jours, en constante augmentation, la contrefaçon des vins est une vieille histoire. Bien que certaines techniques de falsification soient connues depuis l'antiquité, c'est au 19<sup>e</sup> siècle, avec la crise du phylloxéra, que les premières fraudes massives sur la fabrication de vins sont apparues. Pour s'en convaincre, il suffit de lire le recueil publié en 1883, « *Ce que l'on boit aujourd'hui quand on croit boire du vin* ». La lutte contre la fraude est également ancienne puisque dès le 14<sup>e</sup> siècle, sont apparus officiellement des courtiers jurés - experts piqueurs de vins destinés à garantir la qualité et l'origine des vins. Ces fraudes ont conduit l'État français à établir une définition légale du vin « *produit exclusif de la fermentation du raisin frais ou du jus de raisin frais* » (loi Griffé du 14 août 1889).

La contrefaçon est estimée, par certains experts, à près de 20 % du commerce international du vin. Si les grands crus sont particulièrement touchés, les petits viticulteurs

ne sont pas épargnés par les contrefaçons. Alors que les faussaires restent assez peu nombreux en France, à l'étranger, ce sont des réseaux entiers qui sévissent, avec parfois des moyens industriels.

De nombreux exemples de fraudes, plus ou moins sophistiqués, ont été rapportés dans la presse. Citons les affaires Rodenstock ou Kurniawan. Dans le premier cas, la polémique a porté sur l'achat, dans les années 80, de fausses bouteilles de Lafite-Rothschild ayant appartenu au président Américain Thomas Jefferson. Cette affaire a éclaté dans les années 2000. L'affaire Rudy Kurniawan, surnommé le « *Dr Conti* » pour sa passion du Romanée-Conti, a été éventée suite à la commercialisation de plus de magnums de Château Lafleur 1947 qu'initialement produits et de bouteilles fictives de Clos Saint Denis, Grand Cru, millésime 1945 à 1971. Ces deux affaires illustrent la difficulté à démontrer les cas de contrefaçon. Il existe de nombreux autres exemples impactant négativement la filière viticole française, premier pays exportateur en valeur (Figure 1) : fausses appellations de Bordeaux, francisation de vins espagnols, etc.

Si les cas de fraudes se sont multipliés au fil des années, les techniques de falsification ont également évolué avec le développement des sciences agronomiques pour devenir de plus en plus sophistiquées. Le développement de méthodes permettant de garantir l'authenticité d'un vin et de prévenir la contrefaçon est donc un enjeu économique

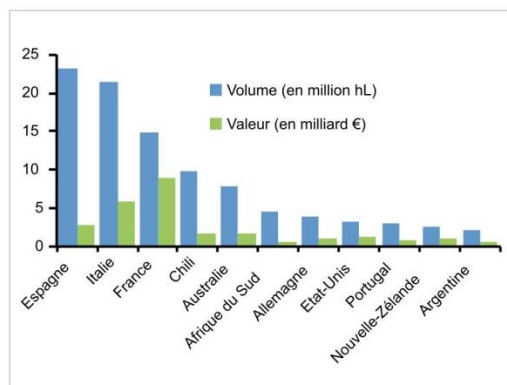


Figure 1 - Exportation des vins en volume et en valeur en 2017 (OIV Statistical Report on World Vitiviniculture, OIV, 2018).



► Inès Le Mao devant le spectromètre RMN.

et un challenge scientifique. Ainsi, différentes approches analytiques ont été développées, allant de la simple analyse organoleptique jusqu'à des techniques analytiques sophistiquées comme l'analyse des rapports isotopiques.

C'est dans ce contexte que la plateforme VRAI (Vin-Recherche-Authenticité-Identité) a vu le jour à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin à Bordeaux (ISVV) en partenariat avec le Conseil interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB). Les travaux réalisés au sein de cette plateforme montrent que la RMN est un outil de choix pour identifier l'origine d'un vin. Celle-ci permet, à l'aide d'un faible volume de vin, de doser une quarantaine de composés majeurs des vins (alcools, sucres, acides organiques, etc.).

## La Résonance Magnétique Nucléaire

La RMN et l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) sont basées sur les propriétés magnétiques des atomes. Certains noyaux atomiques se comportent comme des aimants à l'échelle microscopique. Ces propriétés magnétiques des atomes sont mises à profit pour déterminer la structure des molécules en chimie et biologie.

Depuis les années 90, la méthode de fractionnement isotopique naturel spécifique par RMN (RMN-FINS) est couramment utilisée dans les laboratoires de contrôle pour vérifier

## Technique

l'authenticité ou la naturalité de nombreux produits alimentaires (vins, spiritueux, miels, etc.). Cette méthode est basée sur la mesure du rapport du nombre d'atomes de deux isotopes (atomes ayant le même nombre de protons, carbone 12 et carbone 13, par exemple) d'une molécule donnée (eau, éthanol, etc.). Initialement développée à Nantes par l'équipe de recherche du Pr. Martin, elle est aujourd'hui une méthode officielle de contrôle de l'OIV (Organisation internationale de la vigne et du vin) pour les vins, de l'AOAC International (Association of Official Analytical Chemists) pour de nombreux produits alimentaires et du CEN (Comité européen de normalisation) pour le vinaigre. Le développement de cette méthode est à l'origine de la création de la société Eurofins, un des leaders mondiaux du contrôle analytique des produits alimentaires.

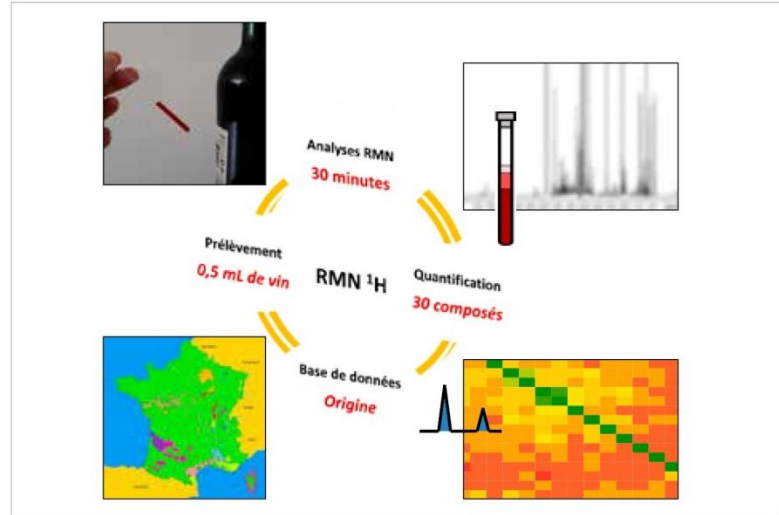


Figure 2 - Protocole de dosage et d'analyse par RMN quantitative du proton.

### Analyse du métabolome du vin par RMN

Depuis une vingtaine d'années, la RMN est utilisée pour déterminer la concentration de petites molécules dans un échantillon biologique. Ainsi, cette technique est devenue une méthode de choix pour analyser le métabolome d'une matrice alimentaire.

Le métabolome du vin est, par définition, l'ensemble des petites molécules qui constituent ce vin. Dans ce cas, il s'agira de doser différents composés ou familles de composés comme les alcools, les sucres, les acides organiques, les composés phénoliques et les acides aminés. La RMN du proton (noyau de l'atome d'hydrogène) permet de doser l'ensemble de ces composés en une seule analyse, à partir du prélèvement d'un échantillon de vin de 0,5 mL et sans traitement préalable (Figure 2).

Pour cela, une série de spectres est réalisée, ces spectres sont constitués de pics appartenant aux différents composés majeurs à doser. Un traitement informatique des données permet de quantifier directement sur le spectre les composés identifiés à partir d'un échantillon de référence. Ces données permettent de construire une carte d'identité analytique du vin qui dépend de son terroir (cépage, millésime, origine géographique, conditions climatiques, pratiques viticoles, etc.). Ces données, ensuite entrées dans une base de données, permettent de remonter à l'origine du vin.

Deux approches peuvent être utilisées pour attester de l'authenticité d'un vin. Une première analyse permet de comparer l'empreinte analytique d'un vin à analyser à l'empreinte originale de ce vin, conservée dans la base de données. Cela fonctionne comme une analyse d'empreinte digitale pour attester

ou déterminer l'identité d'une personne. Une seconde analyse, plus complexe, consiste à construire un modèle des vins d'une région à partir de la base de données. L'empreinte analytique du vin à analyser est ensuite confrontée à ce modèle. Cette seconde approche né-

cessite une base de données très large. Plus la base sera grande plus les résultats seront fiables. Cette dernière est en cours de constitution dans le projet VRAI, avec pour objectif une base de plus de 10 000 vins. Elle permettra de remonter à l'origine du vin analysé.

C'EST ICI  
que tout  
COMMENCE

OPTIMISEZ VOS REPRISSES,  
LA COMPLANTATION  
D'AUTOMNE  
C'EST MAINTENANT !

NOS AUTRES PRODUITS

- > Plants en Pots
- > Traditionnels
- > Grands Plants
- > Plants inoculés trichoderma
- > Sélection Massale

PRESTATAIRE DE SERVICES

- > Financement Agilor
- > Traitement à l'eau chaude
- > Plantation Manuelle
- > Plantation Mécanique au GPS

VIEUX PUIT  
Pépinières viticoles

Réaud - 33860 Reignac de Blaye  
P. : 06 37 50 28 87 - T. : 05 57 32 41 76  
info@pepinieresduvreuxpuit.com

### Authenticité des vins par RMN

La comparaison à l'échantillon de la bouteille authentique est la démarche la plus opportune pour attester de l'authenticité d'un vin. Cette méthode a été développée avec le soutien et la collaboration de la société Baron Philippe de Rothschild. Deux analyses indépendantes sont réalisées et conduisent à l'obtention de deux spectres. Si la fraude est avérée, les deux spectres seront différents soit par la composition (différences détectées au niveau des molécules retrouvées), soit au niveau des teneurs (concentrations des différents composés du vin). Pour permettre la comparaison des données, un outil nommé « pseudo-Z-score » a été développé. Cet outil statistique permet de vérifier si les teneurs sont comparables en tenant compte de l'incertitude de la mesure et de l'évolution naturelle du vin en bouteille. Cette technique a été validée lors de travaux menés en collaboration avec le SCL (Service commun des laboratoires DGDDI et DGCCRF) ou les mêmes échantillons ont été analysés par des méthodes classiques et par analyses RMN. Par rapport aux méthodes classiques, la RMN permet principalement de réduire les volumes nécessaires de vin et la durée de l'analyse. Pour illustrer la méthode, quatre bouteilles de vins suspects, de trois millésimes différents, ont été comparées à des échantillons de vin originaux du Château Mouton-Rothschild. L'analyse des Z-scores montre que les deux échantillons As1 et As2 sont conformes à l'original (échantillon Aa), et que les deux échantillons Bs et Cs sont frauduleux (Figure 4). Ces résultats ont été confirmés par des analyses classiques réalisées par le SCL.

Cependant, lorsqu'il est impossible d'obtenir un échantillon authentique, l'approche par comparaison à une base de données peut être envisagée. En effet, nous avons

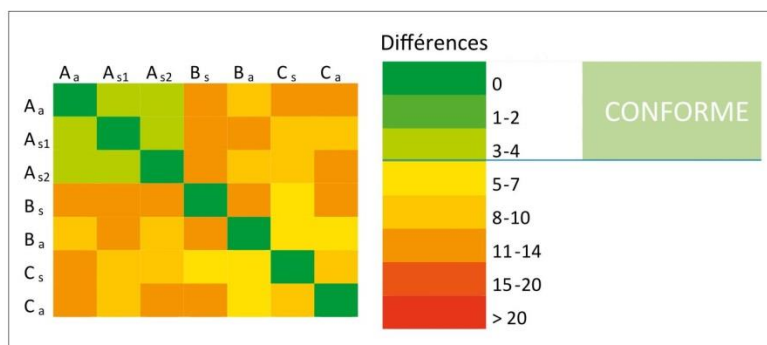


Figure 4 - Comparisons des Z-scores par analyse croisée des échantillons suspects As1 et As2 à l'original Aa, de l'échantillon suspect Bs l'original Ba et de l'échantillon suspect Cs à l'original Ca. Les échantillons en vert sont similaires.

vu que la composition du vin varie en fonction du cépage, du millésime, de l'origine géographique et des pratiques viticoles. Par conséquent, la collection d'un grand nombre d'échantillons conduit à l'élaboration d'un profil pour chaque appellation, région ou cépage. Lorsqu'un échantillon inconnu est confronté à la base de données, nous sommes en mesure de déterminer sa provenance grâce à des analyses statistiques. Une illustration de cette approche est présentée dans la Figure 5. Des vins de Bordeaux et de Bourgogne, issus de dix millésimes différents, sont comparés. La RMN permet de distinguer les vins de Bourgogne des vins de Bordeaux indépendamment du millésime. Nos résultats montrent que la RMN est capable d'identifier des signatures spécifiques à l'échelle d'une région, d'une appellation ou même d'une propriété.

L'utilisation de la RMN, pour la garantie de l'authenticité du vin, présente de nombreux avantages. Les résultats sont obtenus plus rapidement et à partir d'un plus faible volume de vin qu'avec les analyses classiques. Une seule analyse permet d'obtenir l'identification d'une cinquantaine de composés ma-

joritaires du vin. Par ailleurs, une approche non ciblée (analyse globale du spectre) est également développée afin d'obtenir une information supplémentaire, notamment en cas d'ambiguïté. Cette méthode repose sur la construction d'une base de données exhaustive et robuste. Ces travaux réalisés sur la plateforme VRAI permettent d'étoffer les outils disponibles pour répondre à la problématique de la contrefaçon des vins.

> Inès Le Mao<sup>1,2</sup>, Grégory Da Costa<sup>1</sup> et Tristan Richard<sup>1</sup>

1: Université de Bordeaux, Unité de recherche Enologie, EA 4577, USC 1366, Inra, ISVV, F-33883 Villenave d'Ornon.  
2: Société Baron Philippe de Rothschild, 10 Rue de Grassi, 33250 Pauillac.

#### Références bibliographiques

- Gougeon (L), « Application de la métabolomique par spectrométrie RMN 1H à l'authenticité des vins », Thèse de doctorat (Enologie, sous la direction du Pr. T. Richard, Bordeaux, Université de Bordeaux, 2019
- Gougeon (L), Da Costa (G), Richard (T), Guyon (F), Wine authenticity by quantitative 1H NMR versus multitechnique analysis: a case study, Food Analytical Methods, 2019, n°12, 956-965
- Gougeon (L), da Costa (G), Guyon (F), Richard (T), « 1H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines », Food chemistry, 2019, n° 301, 125257

#### Remerciements

Le projet VRAI et les analyses présentées ont été réalisés avec le soutien du Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux (CIVB), de la Région Nouvelle-Aquitaine, de la Société Baron Philippe de Rothschild et de la Fondation de Bordeaux (donateurs : Baron Philippe de Rothschild SA, Château Cheval Blanc, Château Lafite Rothschild, Domaine Clarence Dillon, Château Petrus).

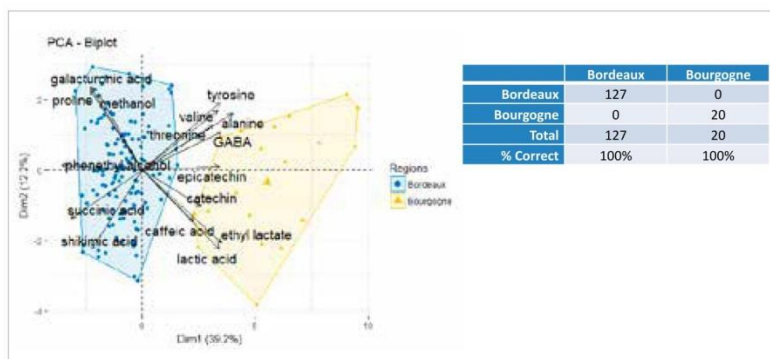


Figure 5 - Comparaison statistique de vins de Bordeaux et de Bourgogne sur 10 millésimes différents à l'aide des données RMN. Les deux régions forment des ensembles distincts. Le tableau présente une validation croisée, tous les vins sont classés correctement.