



HAL
open science

Développement d'une méthode de couplage FFF multi-détection pour la caractérisation de la fraction macromoléculaire impliquée dans l'astringence des vins rouges

Kevin Pascotto

► **To cite this version:**

Kevin Pascotto. Développement d'une méthode de couplage FFF multi-détection pour la caractérisation de la fraction macromoléculaire impliquée dans l'astringence des vins rouges. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2021. Français. NNT : 2021INPT0046 . tel-04170693

HAL Id: tel-04170693

<https://theses.hal.science/tel-04170693v1>

Submitted on 25 Jul 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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

M. KEVIN PASCOTTO

le lundi 12 avril 2021

Titre :

Développement d'une méthode de couplage FFF multi-détection pour la caractérisation de la fraction macromoléculaire impliquée dans l'astringence des vins rouges

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

Directeur(s) de Thèse :

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU

MME VERONIQUE CHEYNIER

Rapporteurs :

Mme GAËTANE LESPES, UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L ADOUR

M. VICTOR DE FREITAS, UNIVERSIDADE DO PORTO PORTUGAL

Membre(s) du jury :

M. CHRISTIAN CHERVIN, TOULOUSE INP, Président

M. CHRISTIAN COELHO, UNIVERSITE DE BOURGOGNE, Membre

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU, EI PURPAN, Membre

Mme VERONIQUE CHEYNIER, INRA MONTPELLIER, Membre

M. OLIVIER GEFFROY, EI PURPAN, Invité

Résumé

Le vin rouge est une matrice complexe contenant des macromolécules telles que les polyphénols et les polysaccharides. Ces macromolécules et leurs interactions exercent un impact sur les propriétés gustatives telle que l'astringence. Les polyphénols des vins comprennent en particulier les tanins condensés ou proanthocyanidines extraits du raisin mais aussi de nombreux dérivés formés au cours de la vinification et du vieillissement des vins. L'astringence qui résulte des interactions des tanins avec les protéines salivaires augmente avec leur concentration et leur masse molaire. Par ailleurs, il a été montré que les polysaccharides (PS) réduisent la perception d'astringence dans les vins, probablement du fait des interactions entre PS et polyphénols.

Classiquement, la structure et la masse molaire moyenne des tannins sont déterminées après dépolymérisation. Cependant ces méthodes sont peu adaptées aux structures de tanins évoluées telles qu'on les retrouve dans le vin et ne donnent pas accès à la distribution des masses molaires. Des techniques de chromatographie d'exclusion stérique ont été développées pour l'analyse de la distribution des masses molaires des polyphénols et des PS mais elles ne permettent pas d'analyser ces composés simultanément ni de détecter leurs complexes.

L'Asymmetrical Flow Field – Flow Fractionation (AsFIFFF) permet de séparer les molécules en fonction de leur rayon hydrodynamique ainsi que les complexes macromoléculaires sans les dégrader. Le couplage avec la détection MALS permet de déterminer le rayon de gyration des molécules et, en association avec un réfractomètre différentiel (dRI) leur masse molaire. Le couplage avec la spectrophotométrie UV-visible permet la détection quantitative des composés phénoliques. Cette technique a déjà été utilisée pour caractériser des composés phénoliques purifiés ou les macromolécules dans la bière et le vin blanc mais elle n'a jamais été appliquée au vin rouge. L'objectif de cette recherche était d'abord de mettre au point les conditions d'analyse pour fractionner les macromolécules et les complexes du vin rouge dans leur état natif et les caractériser à l'aide d'un système de détection multiple (UV-vis -MALS -dRI). Une solution imitant la matrice du vin a été utilisée comme phase mobile pour limiter la dégradation des complexes présents dans le vin rouge.

Nos résultats montrent que la fraction macromoléculaire du vin analysable par AsFIFFF ne représente que quelques pourcents des composants du vin qui contribuent à son absorption dans l'UV. Le profil de séparation obtenu a été divisé en quatre fractions. Grâce à l'injection d'extraits de tanins et de PS dans le système et à l'analyse des fractions de vin collectées, les trois premières ont été attribuées à des tanins, coelués avec des PS de faible masse molaire (F1), à des PS de masse molaire intermédiaire (F2) et à des PS de masse molaire élevée (F3). De plus, la présence de matériau absorbant l'UV dans les fractions F2 et F3 suggère la présence de protéines ou de polyphénols interagissant avec ces polysaccharides et/ou les protéines. En revanche, la dernière fraction (F4) pourrait correspondre à de très gros objets mais n'a pas totalement été identifiée.

Cette méthode a été utilisée pour explorer les relations entre les fractogrammes AsFIFFF-UV-vis -MALS -dRI et les notes d'astringence d'une série de vins qui ont été dégustés par un panel sensoriel. Cette étude a montré que les vins les plus astringents sont caractérisés par de fortes concentrations de polyphénols de haute masse molaire. En revanche, les vins les moins astringents ont montré les plus hautes teneurs en PS dans F2 et F3, confirmant que l'astringence perçue est contrecarrée par le matériel polysaccharidique. Ces résultats ont également montré que la masse molaire des PS est associée à l'assouplissement de l'astringence. En revanche, les variables relatives à F4 ont une contribution négligeable à l'astringence du vin.

Abstract

Red wine is a complex matrix containing macromolecules such as polyphenols and polysaccharides. These macromolecules and their interactions have an impact on taste properties such as astringency. Wine polyphenols include condensed tannins or proanthocyanidins extracted from the grapes but also many derivatives formed during winemaking and aging. Astringency results from tannin interactions with salivary proteins and increases with their concentration and molecular weight. In addition, polysaccharides (PS) have been shown to reduce the perception of astringency in wines, probably due to their interactions with polyphenols.

Classically, the structure and average molecular weight of tannins are determined by HPLC after depolymerization. However, these methods are not appropriate for evolved tannins as found in wine and do not give access to molecular weight distribution. Steric exclusion chromatography techniques have been developed for determination of molecular weight distribution of polyphenols and PS but common protocols allow neither their simultaneous analysis nor detection of their complexes.

The Asymmetrical Flow Field– Flow Fractionation (AsFIFFF) separates molecules according to their hydrodynamic radius as well as macromolecular complexes without degrading them. Its coupling with Multiple Angle Light Scattering (MALS) detection allows determination of the radius of gyration of molecules and, in combination with a differential refractometer (dRI) of their molecular weight. Coupling with UV-visible spectrophotometry allows quantitative detection of phenolic compounds. This technique has already been used to characterize purified phenolic compounds or macromolecules in beer and white wine but has never been applied to red wine. The objective of this research was first to develop the analytical conditions to separate the macromolecules and red wine complexes in their native state and characterize them using a multiple detection system (UV-vis -MALS -dRI). A wine like solution was used as mobile phase to limit the degradation of the complexes present in red wine.

Our results show that the macromolecular fraction of wine analyzed by AsFIFFF represents only a few percent of the wine components that contribute to UV absorption. The AsFIFFF separation profile was divided into four fractions. Owing to the injection of tannin and PS extracts into the system and the analysis of fractions collected after analysis of different wines, the first three were attributed to tannins coeluted with lower molecular weight PS (F1), intermediate molecular weight PS (F2) and higher molecular weight PS (F3). In addition, the presence of UV-absorbing material in F2 and F3 fractions suggests the presence of proteins or of polyphenols interacting with these polysaccharides. The last fraction (F4) likely corresponds to very large objects but has not been characterized.

This method was used to explore the relationships between AsFIFFF-UV-vis -MALS-dRI fractograms and the astringency scores of a series of red wines which were tasted by a sensory panel. This study showed that the most astringent wines are characterized by high concentrations of higher molecular weight polyphenols while the less astringent wines showed the highest PS contents in F2 and F3, confirming that the perceived astringency is counteracted by polysaccharidic material. These results also showed that the higher molecular weight PS are particularly associated with astringency softening. The variables related to F4 had no impact on red wine astringency.

A ma compagne, Céline, ma famille et mes proches.

Pour leur présence, leur soutien.

Avec toute mon affection et ma reconnaissance

Remerciements :

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de nombreuses personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Tout d'abord, je tiens à remercier grandement mon directeur de thèse, Monsieur Frédéric Violleau, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir soutenu, encouragé, pour avoir partagé ses connaissances et pour m'avoir fait évoluer durant ces trois années. Pour toutes ces raisons, je tiens à lui adresser mon respect et ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à exprimer mes plus vifs et particuliers remerciements à ma co-directrice de thèse, Madame Véronique Cheynier, qui fut pour moi un encadrant attentif et disponible malgré ses nombreuses activités. Ses compétences et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup apporté et soutenu. Sa patience, sa gentillesse m'ont beaucoup encouragé. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère et profonde reconnaissance.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements et ma reconnaissance à Monsieur Didier Kleiber, pour m'avoir accompagné dans mes débuts de thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur De Freitas et Madame Lespes, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce manuscrit. Monsieur Chervin Christian et Monsieur Coelho Christian pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens également à remercier Monsieur Olivier Geffroy, pour son accompagnement et ses encouragements tout au long de ce projet, pour sa bienveillance et également pour avoir accepté d'être membre de mon jury de soutenance.

Mes remerciements s'adressent bien évidemment à toute l'équipe du laboratoire d'agrophysiologie de l'École d'Ingénieurs de Purpan. Tout particulièrement à Mireille Gaucher, pour son accompagnement dans mes débuts sur les outils de la FFF. A Guillaume Gotti et Grégory Pasquier, pour m'avoir aidé à réaliser certaines de mes expérimentations et à Cécile Levasseur pour avoir apporté son expertise sur certaines parties de ce travail.

Par ailleurs, je remercie grandement toute l'équipe, Audrey, Marie, Estelle, Julien, Ana, Axel, Sylvain, Sébastien, Valérie, Maëlie, Flor, Robin, Sophie, Marielle, Michaël, Monique, Coralie. Merci pour tous ces bons moments, ces partages et pour votre aide et votre soutien.

J'aimerai aussi adresser mes vifs remerciements à toute l'équipe du Laboratoire Sciences pour l'œnologie – Montpellier. Tout particulièrement à Pascale Williams, Emmanuelle Meudec et Stéphanie Carrillo, pour m'avoir grandement aidé dans certaines de mes expérimentations. Je témoigne également toute ma reconnaissance à Aude Vernhet, Céline Ponçet-Legrand, Thierry Doco, Soline Caillé et Jean-Claude Boulet pour leurs conseils et pour leurs expertises.

J'adresse tout particulièrement mes plus sincères remerciements à Coline Leriche, pour cette fructueuse collaboration. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour son implication, son énergie et sa bonne humeur.

Par ailleurs, je voudrais également remercier certaines personnes du laboratoire SPO, Hélène, Aude.W et Cécile, pour tous ces bons moments passés ensemble.

A mes proches,

Je tiens en premier lieu, à remercier ma compagne, Céline. Je lui dois tout mon respect, ma reconnaissance et mon admiration pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse, pour m'avoir aidé à garder la tête haute dans les moments difficiles.

Pour nous, nos projets, Céline, Merci.

J'adresse également mes remerciements et mon amour à ma mère Nathalie, mon père Thierry, qui m'ont guidé et ont toujours cru en moi, en mes projets.

Mes grands-parents maternels, Nuria et Pierre qui m'ont transmis leur passion pour le vin, pour leur soutien, merci.

A mes amis d'enfance, Elliott, Florian, Paul, Jordan, Olivier, Maxime, Alexis, merci d'avoir été là.

Valorisation des travaux de recherche

Publications scientifiques :

Pascotto, K., Cheynier, V., Williams, P., Geffroy, O., & Violleau, F. (2020). Fractionation and characterization of polyphenolic compounds and macromolecules in red wine by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A*, 1629. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461464>

Pascotto K, Leriche C, Caillé S, Violleau F, Boulet J-C, Geffroy O, Levasseur C and Cheynier V (2021). “Study of the impact of red wine colloidal fraction on astringency by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled with multi-detection”. *Food Chemistry*. (en révision)

Communications orales :

International congress: *20th International Symposium on Field-and Flow-Based Separations 23–27th February 2020 University of Vienna* “Separation of polyphenolic compounds and macromolecules in red wine by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation”, **Kevin PASCOTTO**, Véronique CHEYNIER, Frédéric VIOLLEAU.

1ère journée Recherche et Développement de PURPAN : Ecole d’ingénieurs de Purpan, 05/12/2018 “Développement d’une nouvelle méthode de caractérisation des polyphénols du vin par AsFIFFF” **Kevin PASCOTTO**, Frédéric VIOLLEAU, Véronique CHEYNIER

Journée scientifique du G4F, Paris, France, 18/10/2019 : “Caractérisation des polyphénols et des macromolécules du vin rouge par Fractionnement par couplage flux-force”. **Kevin PASCOTTO**, Frédéric VIOLLEAU, Véronique CHEYNIER

Table des matières

Chapitre I. Etude Bibliographique : Les macromolécules impliquées dans l'astringence des vins rouges et les moyens de les caractériser

1	La composition macromoléculaire des vins rouges.....	5
1.1	Les polyphénols.....	5
1.1.1	Les tanins du raisin (ou proanthocyanidines).....	6
1.1.2	Réactions des polyphénols dans le vin.....	9
1.1.3	Implication des tanins dans l'astringence des vins rouges.....	11
1.2	Les polysaccharides.....	14
1.2.1	Formation des complexes tanins – polysaccharides et des complexes ternaires tanins – polysaccharides – protéine.....	16
2	Les méthodes de caractérisation des macromolécules du vin.....	19
2.1	Caractérisation des polyphénols.....	20
2.1.1	Méthodes spectroscopiques UV-visible.....	20
2.1.2	Analyse des tanins par spectrométrie de masse (MS).....	21
2.1.3	Chromatographie liquide haute performance couplé à l'UV-visible et la spectrométrie de masse	22
2.1.4	La dépolymérisation des tanins et l'analyse de leurs unités constitutives par HPLC....	23
2.1.5	La chromatographie d'exclusion stérique : Etude de la distribution de la taille et de la masse molaire des tanins.....	26
2.1.6	Les techniques de diffusion de la lumière.....	27
2.2	Caractérisation des polysaccharides.....	30
2.3	Caractérisation des assemblages moléculaires.....	31
2.4	Conclusion sur les méthodes d'analyse des tanins et des polysaccharides et des complexes macromoléculaires.....	32
3	Le Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF).....	33
3.1	Principe du fonctionnement des techniques de la FFF.....	34
3.1.1	La Flow-FFF.....	35
3.1.2	Principe de fonctionnement détaillé de l'AsFIFFF.....	38
3.1.3	Théorie.....	39
3.2	Avantages et inconvénients de l'AsFIFFF.....	41
3.2.1	Influence des paramètres intrinsèques du canal.....	42
3.3	Les détecteurs couplés à l'AsFIFFF.....	43
3.3.1	Détermination de la masse molaire et du rayon de gyration par la diffusion statique de la lumière aux angles multiples (MALS).....	43

3.3.2	Détermination du rayon hydrodynamique par la diffusion dynamique de la lumière (DLS)	45
4	Conclusion.....	45

Chapitre II. Matériels et méthodes

1	Produits chimiques et solvants	48
2	Echantillons de vin	48
3	Obtention des fractions purifiées de polysaccharides et de tanins.....	50
3.1	Extraction et caractérisation de la fraction polysaccharidique à partir de vin rouge	50
3.2	Extraction et caractérisation des fractions de tanins à partir de pellicule de pommes	51
4	Analyse par AsFIFFF-UV-MALS-Qels-dRI	51
4.1	Instrumentation.....	51
4.2	Détermination du taux de recouvrement.....	52
4.3	Développement de la méthode AsFIFFF-UV-MALS-Qels-dRI.....	53
4.3.1	Effet du seuil de coupure de la membrane.....	53
4.3.2	Effet du débit sur le fractionnement des échantillons.....	53
4.3.3	Effet de la quantité d'échantillon injectée (V_{inj})	54
4.3.4	Détermination de la masse molaire par MALS/dRI et du R_h par Qels	54
4.3.5	Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode	54
4.3.6	Evaluation de la durée de vie d'une membrane.....	55
4.4	Analyse des fractions purifiées de polysaccharides et de tanins par AsFIFFF.....	55
4.5	Calculs théoriques	56
4.5.1	Détermination du niveau de rétention (R_L).....	56
4.5.2	Détermination du R_h théorique	56
5	Analyse sensorielle.....	58
6	Collecte des fractions de vin par AsFIFFF et préparation des fractions pour l'analyse des tanins et des polysaccharides	59
6.1	Protocole de collecte.....	59
6.2	Méthode d'extraction des tanins contenus dans les fractions de l'AsFIFFF.....	61
6.2.1	Extraction et caractérisation des polysaccharides contenus dans les fractions de l'AsFIFFF du vin.....	63
7	Analyse par spectroscopie UV-visible	63
8	Analyse HPLC-UV-MS.....	64
8.1	Instrumentation.....	64
8.2	Analyse des tanins par phloroglucinolyse	65
9	Analyse SEC-UV	66

9.1	Instrumentation.....	66
9.2	Préparation des échantillons pour l'analyse en SEC-UV	67

Chapitre III. Mise au point et validation d'une méthode de fractionnement des macromolécules du vin rouge par AsFIFFF

1	Recherche des conditions optimales pour l'analyse du vin rouge	69
1.1	Détermination du seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration	69
1.2	Optimisation du débit du flux croisé	73
1.2.1	Pendant l'étape de relaxation.....	73
1.2.2	Pendant l'étape d'élution.....	76
1.3	Effet du volume d'échantillon injecté	81
2	Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode et de la durée de vie d'une membrane	84
2.1	Répétabilité et reproductibilité de la méthode d'analyse.....	84
2.2	Evaluation de la durée de vie de la membrane	88
3	Conclusion.....	90

Chapitre IV. Caractérisation des fractions du vin obtenues après la séparation par AsFIFFF

1	Analyse des fractions purifiées de polysaccharides et de tanins par AsFIFFF-MALS-Qels-dRI .	92
1.1	Analyse de la fraction de polysaccharides extraits de vins rouges par AsFIFFF-MALS-Qels-dRI	92
1.2	Analyse des fractions de tanins par AsFIFFF-MALS-Qels-dRI.....	97
1.3	Mélange de la fraction de polysaccharide avec les fractions de tanins et comparaison avec l'échantillon de vin.....	98
2	Caractérisation des fractions du vin collectées pendant la séparation sur l'AsFIFFF.....	102
2.1	Caractérisation des fractions de l'AsFIFFF du vin de syrah par spectroscopie UV-visible	102
2.2	Caractérisation des tanins extraits des fractions de l'AsFIFFF du vin de syrah par phloroglucinyse suivie d'une analyse par HPLC-UV-MS	104
2.3	Etude de la distribution de la taille des tanins par chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'UV.....	106
2.4	Dosage des polysaccharides	108
3	Conclusion.....	109

Chapitre V. Étude de l'impact de la fraction macromoléculaire du vin rouge caractérisée par AsFIFFF-UV-MALS-dRI sur l'astringence

1	Analyses chimiques.....	113
1.1	Taux de recouvrement et étude spectroscopique.....	113
1.1.1	Taux de recouvrement.....	113
1.1.2	Etude des rapports d'absorbances (A_{230}/A_{280} et A_{280}/A_{520}).....	115
1.2	Description des spectres UV-vis et des fractogrammes.....	117
2	Analyses multivariées des données.....	120
2.1	Sélection de variables.....	120
2.2	Analyse Factorielle Multiple (AFM).....	123
3	Conclusion.....	125

Chapitre VI. Caractérisation des fractions d'AsFIFFF de plusieurs vins avec différents niveaux d'astringence

1	Description des fractogrammes des vins sélectionnés.....	127
2	Caractérisation des fractions de l'AsFIFFF des vins sélectionnés.....	130
2.1	Caractérisation par spectroscopie UV-visible.....	130
2.2	Caractérisation des tanins par HPLC-UV-MS après phloroglucinolyse.....	134
2.2.1	Vins d'origine.....	134
2.2.2	Fractions de l'AsFIFFF.....	135
2.3	Analyse par SEC-UV.....	138
2.3.1	Vins d'origine.....	138
2.3.2	Fractions de l'AsFIFFF.....	139
2.4	Analyse de la composition en polysaccharides.....	142
2.4.1	Vins d'origine.....	142
2.4.2	Fractions de l'AsFIFFF.....	143
3	Conclusion.....	146
	Conclusion Générale.....	148
	Littérature citée.....	152

Liste des Figures

<i>Figure 1. Structure de proanthocyanidines dimère, (B2 et B5, respectivement) liée en C4-C8 (a) et en C4-C6 (b).....</i>	<i>7</i>
<i>Figure 2. Illustration des liaisons de type A et B sur la structure d'un trimère : L'unité du bas est reliée à l'unité intermédiaire en C4-C8 (liaison de type B) et l'unité du haut est reliée à l'unité intermédiaire par une liaison supplémentaire en C2-O-C7 (liaison de type A)</i>	<i>8</i>
<i>Figure 3. Représentation schématique de pectines de baies de raisin (Doco et al. 1995).....</i>	<i>15</i>
<i>Figure 4. Structure du RG-II (Pellerin et al. 1996).....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 5. Mécanismes possibles (i et ii) impliqués dans l'inhibition de l'agrégation des tannins et des protéines par les polysaccharides. (Mateus, Carvalho, Luís, & De Freitas, 2004).....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 6. Réaction hypothétique de la catalyse acide d'un dimère (DP2), en présence d'un agent nucléophile, ici le phloroglucinol (Kennedy and Jones 2001)</i>	<i>23</i>
<i>Figure 7. Représentation du rendement de dépolymérisation en absence (a) et en présence (b) de liaisons non clivables, créées lors de l'oxydation des tanins et des réactions avec d'autres polyphénols présents dans le vin. (Figure inspirée des travaux de Poncet-Legrand et al, 2010)</i>	<i>25</i>
<i>Figure 8. Principe de la chromatographie d'exclusion stérique</i>	<i>26</i>
<i>Figure 9. Principe général de la FFF (Moon, 2019)</i>	<i>35</i>
<i>Figure 10. Schéma du canal de la SyF1FFF (a) et de l'AsF1FFF (b)</i>	<i>36</i>
<i>Figure 11. Diagrammes schématiques montrant la relaxation hydrodynamique dans un canal avec un fritté en entrée (FI-F1FFF) (Park, Paeng, Yoon, Song, & Moon, 2002).....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 12. Mécanisme de séparation de l'AsF1FFF, a : étape de relaxation, b : étape d'élution.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 13. Intensité de la lumière diffusée au cours du temps</i>	<i>44</i>
<i>Figure 14. Validation de la méthode de calcul du R_h théorique.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 15. Résumé du protocole d'extraction des tanins par SPE.....</i>	<i>62</i>

<i>Figure 16. Comparaison des extraits de Fa par rapport à la solution témoin : par spectroscopie UV-visible (a), et par SEC-UV (280nm) (b).....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 17. Effet du seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration, profils d'élution du vin de syrah obtenus avec les détecteurs (a) MALS, (b) UV à 280nm</i>	<i>70</i>
<i>Figure 18. Pourcentage (calculé à partir du signal UV à 280nm) de la fraction retenue au-dessus de la membrane d'ultrafiltration en fonction du seuil de coupure</i>	<i>71</i>
<i>Figure 19. Evolution de l'aire totale du fractogramme dans l'UV en fonction du nombre d'injections pour une membrane de 5 kDa neuve (volume d'injection = 100µL).....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 20. Influence de Q_c sur la séparation des composés du vin rouge pendant l'étape de relaxation.</i>	<i>74</i>
<i>Figure 21. Influence de Q_c sur la séparation des composés du vin rouge lors de l'étape d'élution.</i>	<i>76</i>
<i>Figure 22. Influence de Q_c sur le niveau de rétention (R_L) des composés du vin rouge lors de l'étape d'élution calculé pour chaque condition testée (pour chaque Q_c).....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 23. Comparaison des fractogrammes obtenus avec un flux à décroissance exponentielle (Q_{ce}, noir) et des fractogrammes obtenus avec un flux croisé isoforce (Q_{c4}, rouge)</i>	<i>79</i>
<i>Figure 24. Influence de Q_{ce} sur le niveau de rétention (R_L) des composés du vin rouge lors de l'étape d'élution.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 25. Effet du volume d'injection : Le programme d'élution utilisé est le flux croisé de décroissance exponentielle (Q_{ce}^5).</i>	<i>82</i>
<i>Figure 26. Mesure de la part de matière retenue au-dessus de la membrane (rétentat) versus la part de matière perdue dans le flux croisé (perméat), à 280nm</i>	<i>83</i>
<i>Figure 27. Evaluation visuelle de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode d'élution.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 28. Evaluation de la durée de vie d'une membrane au cours des injections d'un échantillon de vin, (volume d'injection = 400µL).....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 29. Fractogrammes des fractions PS, DP12 et DP40</i>	<i>93</i>
<i>Figure 30. Fractogrammes MALS des PS (a) et des fractions de tanins DP12 et DP40 (b).....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 31. Fractogrammes des mélanges PS + DP12, PS + DP40 et de l'échantillon de vin.....</i>	<i>99</i>

<i>Figure 32. Profil MALS de l'échantillon de vin et distribution du R_h expérimental déterminé par QELS et du R_h théorique déterminé par les équations de l'AsFFFF.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 33. Spectres d'absorbance acquis entre 250 et 600nm des fractions de l'AsFFFF obtenus à partir du vin de syrah.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 34. Comparaison entre les spectres d'absorbance des fractions de l'AsFFFF avant et après extraction des tanins.....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 35. A_{280} des fractions de l'AsFFFF, avant et après l'extraction des tanins par SPE.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 36. Chromatogramme d'exclusion stérique du vin d'origine et des fractions d'AsFFFF (a) et de quelques composés standards (b).....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 37. Chromatogrammes des fractions F1, F2 et F3 (a), teneur en polysaccharides dans le vin d'origine et dans les fractions F1 à F3 (b).....</i>	<i>108</i>
<i>Figure 38. Moyennes des notes d'astringence pour chaque échantillon.....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 39. Principe général de la FFF (Moon, 2019).....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 40. Distribution de la part du perméat, du rétentat et de la somme de ces deux fractions, mesurée sur les 50 échantillons de la série de vin dans l'UV à 230nm (a, b, c) et à 280nm (d, e, f).....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 41. Rapport des absorbances A_{230}/A_{280} (a) et A_{280}/A_{520}.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 42. Box plot : comparaison des A_{230}/A_{280} des vins d'origine avec la fraction rétentat.....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 43. Spectres UV-visible lissés et normalisés du vin entier (a), du perméat (b) et du rétentat (c). Fractogrammes du détecteur UV à 280nm (d) et à 230nm (e), détecteur MALS (angle à 90°) (f), détecteur dRI (g), Log(masse molaire) (h). Chaque profil a été coloré selon les groupes d'astringence : échantillons pour lesquels l'astringence est élevée en rouge, échantillons pour lesquels l'astringence est moyenne en bleu et échantillons pour lesquels l'astringence est faible en vert.....</i>	<i>118</i>
<i>Figure 44. Représentation des variables sélectionnées par CovSel (points rouges) sur les profils moyens des spectres UV-visible (a, b, c) et des fractogrammes AF4 (d, e, f, g, h).....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 45. Projection sur les deux premiers axes de l'analyse factorielle multiple (AFM) des individus (a) et des variables sélectionnées (b).....</i>	<i>123</i>

<i>Figure 46. Fractogrammes des six vins sélectionnés avec détection UV à 280nm (a), MALS (b) et dRI (c),</i>	<i>128</i>
<i>Figure 47. Spectres UV-visible des fractions de l'AsFIFFF des échantillons de vin sélectionnés avant l'étape de dessalage. Fraction F1 (a), fraction F2 (b), fraction F3 (c) et fraction F4 (d)</i>	<i>131</i>
<i>Figure 48. Spectres UV-visible des polyphénols extraient des fractions de l'AsFIFFF. Fraction F1 (a), fraction F2 (b), fraction F3 (c) et fraction F4 (d)</i>	<i>132</i>
<i>Figure 49. A₂₈₀, des fractions de l'AsFIFFF, avant et après l'étape de dessalage. Fraction F1 (a), fraction F2 (b), fraction F3 (c) et fraction F4 (d)</i>	<i>133</i>
<i>Figure 50. Relation entre les masses molaires calculées à partir des données MALS/dRI et des phloroglucinolyse</i>	<i>137</i>
<i>Figure 51. Chromatogrammes d'exclusion stérique des vins d'origines</i>	<i>139</i>
<i>Figure 52. Chromatogrammes d'exclusion stérique des tanins extraits des fractions de l'AsFIFFF, F1(a), F2(b), F3(c) et F4 (d)</i>	<i>140</i>
<i>Figure 53. Dosage des polysaccharides dans les vins d'origine</i>	<i>142</i>
<i>Figure 54. Dosage des polysaccharides dans les fractions de l'AsFIFFF</i>	<i>143</i>

Liste des tableaux

Tableau 1. Structures chimiques des principaux flavan-3-ols du raisin et du vin	6
Tableau 2. Liste des vins utilisés	49
Tableau 3. Concentrations et masse injectées dans le canal de l'AsFIFFF des solutions des fractions purifiées seules et en mélange	55
Tableau 4. Temps de rétention des fractions collectées à partir des différents vins.	60
Tableau 5. Pourcentage de variation par échantillon et par membrane = répétabilité	87
Tableau 6. Pourcentage de variation par échantillon et par membrane = reproductibilité	88
Tableau 7. dn/dc , taux de recouvrement de l'échantillon, temps de rétention (t_r), masse molaire moyenne (M_w) et indice de polydispersité des fractions. ^a taux de recouvrement de l'échantillon calculée à partir du dn/dc , ^b dn/dc moyen (dn/dc de polyphénol et dn/dc et RG-II) ; ^c R_h moyen calculé sur la gamme des temps rétention correspondant aux fractions ; nc = valeurs non calculées	96
Tableau 8. Teneur en polyphénols totaux et résultat de la phloroglucinolyses sur le vin de syrah.	104
Tableau 10. Résumé des variables sélectionnées dans les tableaux X et leurs fractions correspondantes.	121
Tableau 11. Temps de rétention (t_r , en minute), masse molaire moyenne en masse (M_w , en kDa). Rayon hydrodynamique (R_h , en nm) et ratio M_w/R_h des fractions de l'AsFIFFF des vins sélectionnés et de deux standards pullulans.	129
Tableau 12. Teneur en polyphénols totaux et résultat de la phloroglucinolyses sur les vins d'origine.	134
Tableau 13. Teneur en polyphénols totaux et résultat de la phloroglucinolyses sur les fractions de l'AsFIFFF	136
Tableau 14. Taux de récupération (%) calculé par rapport aux teneurs des vins d'origine par famille de PS et par fraction.	144

Liste des abréviations

A230	Absorbance à 230nm
A280	Absorbance à 280nm
A520	Absorbance à 520nm
AG	Arabinogalactan
AGP	Arabinogalactan-protéine
AMF	Analyse Mutil-Factorielle
AOP	Appellation d'Origine Protégée
AsFIFFF	Asymmetrical Flow-Field-Flow Fractionation
BSA	Bovin Serum Albumin
C	Catéchine
CP	Composante principale
CR	Cellulose Régénérée
DAD	Diode Array Detector
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	Diméthylformamide
DP	Degré de polymérisation
DPm	Degré de polymérisation moyen
dRI	differential-refractive index
EAE	Echantillon d'astringence élevée
EAF	Echantillon d'astringence faible
EAM	Echantillon d'astringence moyenne
EC	(Epi)catéchine
ECG	(Epi)catéchine-gallate
EGC	(Epi)gallocatéchine
ESI-Q-MS	Electrospray ionisation - quadripolar - Mass spectrometry
FFF	Field-Flow Fractionation
FID	Flame ion detector
FI-FIFFF	Frit Inlet Flow-Field-Flow Fractionation
GC	Gas chromatography
HPLC	High performance liquid chromatographie
IPT	Indice de polyphénols totaux
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MALS	Multi angle light scattering
MeOH	Methanol
MM	Masse molaire
MP	Mannoprotéine
MS	Mass spectrometry
Mw	Masse molaire moyenne en masse
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
Nuc	Nucléophile
P%	Pourcentage du perméat
PES	Polyethersulphone
PP	Polypropylène
PRAG	Polysaccharide riche en arabinose et en galactose

PRP	Protéine riche en proline
PS	Polysaccharide
PST	Polysaccharide totaux
PTFE	Polytétra-Fluoréthylène
PVP	polyvinylpyrrolidone
Q	Débit
QDA®	Analyse descriptive quantitative
Qels	Quasi elastic light scattering
R%	Pourcentage du rétentat
R_g	Rayon de gyration
RG-II	Rhamnogalacturonane type II
R_h	Rayon hydrodynamique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAXS	Small angle X-ray scattering
SD	Écart type
SEC	Steric exclusion chromatographie
SPE	Solid phase extraction
SyFIFFF	Symmetrical Flow-Field-Flow Fractionation
T-A/A-T	Tanin - Anthocyane / Anthocyane - Tanin
TOF	Time of flight
t_r	Temps de rétention
UI	Unité intermédiaire
UPLC	Ultra performance liquid chromatographie
UT	Unité terminale
UV	Ultra-violet
V_{inj}	Volume d'injection
VO	Vin d'origine

Introduction générale

L'astringence est l'un des principaux attributs sensoriels des vins rouges. Elle est définie comme une sensation de sécheresse et de plissage perçue dans la cavité buccale (Soares et al, 2020). Les composés polyphénoliques et notamment les tanins sont connus pour être impliqués dans l'astringence du vin rouge (Gawel, 1998). Cette perception est généralement attribuée à la capacité des tanins à se complexer avec les protéines salivaires, ce qui entraîne la formation de précipités qui réduisent la lubrification en bouche (Bate-Smith, 1973; Baxter, Lilley, Haslam & Williamson, 1997; McRae & Kennedy 2011).

Les études à ce sujet conviennent que l'astringence perçue augmente avec la masse molaire des tanins (degré de polymérisation; Peleg, Gacon, Schlich & Noble, 1999; Vidal et al, 2003a), leur nombre de substituants galloylés (degré de galloylation) (Vidal et al, 2003a) et leur concentration (Vidal et al, 2004c).

Les polysaccharides constituent un autre groupe important de macromolécules que l'on retrouve dans le vin (Pellerin, Vidal, Williams & Brillouet, 1995). Ils comprennent le rhamnogalacturonane II (RG-II), ainsi que des polysaccharides riches en arabinose et galactose (PRAGs), comme les protéines arabinogalactanes-protéine (AGP), les arabinogalactanes et les arabinanes, provenant des parois cellulaires du raisin (Pellerin et al, 1995) et des mannoprotéines (MPs), provenant des parois cellulaires des levures de fermentation.

Ces composés sont connus pour interagir avec les tanins et pour réduire la perception de l'astringence en solution modèle (Vidal et al, 2004c ; Le Bourvellec & Renard, 2012) et dans le vin rouge (Quijada-Morín, Williams, Rivas-Gonzalo, Doco & Escribano-Bailón, 2014; Boulet et al, 2016). Cela peut être lié à leur capacité à interagir avec les tanins (Riou, Vernhet, Doco, & Moutounet, 2002) et à inhiber la formation d'agrégats de tanins-protéines salivaires (Carvalho et al, 2006) ou à former des complexes solubles tanin-protéine-polysaccharide ternaire (Le Bourvellec & Renard, 2012; Scollary, Pásti, Kállay, Blackman, & Clark, 2012).

Classiquement, la structure et la masse molaire moyenne des tannins sont déterminées après leur dépolymérisation, en présence d'un agent nucléophile. Cependant ces méthodes sont peu adaptées aux structures de tanins évoluées telles qu'on les retrouve dans le vin et ne donnent pas accès à la distribution des masses molaires. Par ailleurs, elles ne permettent pas de prédire efficacement l'astringence. Des techniques de chromatographie d'exclusion stérique ont été développées pour l'analyse de la distribution des masses molaires des polyphénols et des PS mais elles ne permettent pas d'analyser ces composés simultanément ni de détecter leurs complexes, qui pourtant semblent jouer un rôle dans la perception de l'astringence.

Ainsi, le premier objectif de ce travail était de développer une méthode permettant de caractériser la fraction macromoléculaire des vins rouges, dans son ensemble et dans des conditions aussi proches que possible de celle du vin de façon à limiter la dénaturation des complexes macromoléculaire. Pour cela, l'Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AsFIFFF) couplé à un système multi-détection (UV-visible – MALS-Qels – dRI) a été choisi. Les conditions analytiques et les paramètres de flux du système de l'AsFIFFF ont d'abord été optimisés pour fractionner au mieux les macromolécules du vin rouge et les complexes macromoléculaires, sans préparation spécifique de l'échantillon. Ensuite, il s'agissait d'explorer la relation entre les profils des vins obtenus à partir de l'AsFIFFF (fractogramme) et le niveau d'astringence des vins, afin d'améliorer notre compréhension de l'implication de la fraction macromoléculaire dans la perception de l'astringence.

La synthèse de ce travail est articulée en six chapitres :

Le *Chapitre I* synthétise l'étude bibliographique sur les composés phénoliques du vin rouge ainsi que sur les polysaccharides. Les méthodes permettant de les caractériser ainsi que leurs limites y sont également discutées.

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

Le *Chapitre III* décrit la mise au point et la définition des limites de la méthode de séparation des macromolécules du vin rouge par AsFIFFF.

Le *Chapitre IV* porte sur la caractérisation des fractions obtenues après fractionnement du vin par AsFIFFF et la validation de la méthode qui a été développée.

Le *Chapitre V* est dédié à l'étude des liens statistiques entre les fractogrammes obtenus pour un grand échantillonnage de vin et leurs notes d'astringence.

Enfin, le *Chapitre VI* porte sur une caractérisation plus approfondie des fractions de l'AsFIFFF, issues de plusieurs vins sélectionnés pour leurs différences au niveau de l'astringence.

Chapitre I

Etude Bibliographique :

*Les macromolécules impliquées dans l'astringence des vins rouges
et les moyens de les caractériser*

1 La composition macromoléculaire des vins rouges

Cette section fait un état de l'art sur les macromolécules du vin rouge. Ces macromolécules comprennent les polyphénols et plus particulièrement les tanins ainsi que les polysaccharides et les protéines. Les structures des tanins natifs du raisin (ou proanthocyanidines) et de leurs dérivés dans le vin seront présentées ainsi que leur influence sur l'astringence des vins. La composition et la structure des polysaccharides seront également abordées dans cette section. Ensemble, les tanins et les polysaccharides peuvent interagir dans le milieu du vin. La formation de ces complexes et leur impact sur l'astringence seront également discutés.

1.1 Les polyphénols

Les polyphénols sont parmi les principaux contributeurs de la qualité des vins rouges. En effet, cette famille moléculaire comprend notamment les anthocyanes, qui sont les pigments à l'origine de la couleur des vins rouges (Vivar-Quintana, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2002 ; Remy, Fulcrand, Labarbe, Cheynier, & Moutounet, 2000) et les tanins, impliqués dans les caractéristiques gustatives du vin telles que l'astringence (Brossaud, Cheynier, & Noble, 2001; Ferrer-Gallego, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2014). En outre, leurs réactions jouent un rôle majeur dans l'évolution qualitative des vins au cours de leur vieillissement.

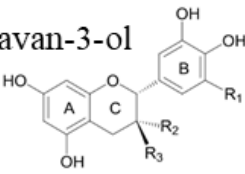
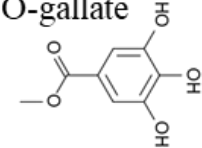
Le terme de tanins classiquement utilisé en œnologie fait référence à la capacité de certains polyphénols à interagir avec les protéines et à les précipiter, initialement mise à profit dans les opérations de tannage des peaux. Les polyphénols ou tanins ont été définis dans les années 60 comme des composés phénoliques d'origine végétale, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da et capables de précipiter les alcaloïdes et les protéines (Swain, 1962). Cette dernière propriété est aussi responsable de la sensation d'astringence, imputée à la précipitation des protéines salivaires par les tanins. Cependant, des travaux plus récents ont montré que des composés phénoliques de masse supérieure à la limite proposée (3000-4000 Da) sont solubles dans les solutions hydroalcooliques comme le vin, capables de précipiter les protéines (Sarni-Manchado, Deleris, Avallone, Cheynier, & Moutounet, 1999; Maury, Sarni-Manchado, Lefebvre, Cheynier, & Moutounet, 2001) et perçus comme astringents

(Vidal et al, 2003a) Les tanins sont classiquement divisés en deux classes : les tanins condensés et les tanins hydrolysables (gallotanins et ellagitanins). Les tanins condensés, seuls tanins présents dans le raisin, sont des constituants majeurs de tous les vins rouges. Par ailleurs, certains produits de réaction des composés phénoliques formés au cours de la vinification peuvent également être considérés comme des tanins et contribuer à l'astringence des vins. En revanche, les tanins hydrolysables extraits du bois de chêne utilisé en tonnellerie ou ajoutés comme oeno-tannins lors de la vinification ne sont présents que dans certains vins et ne seront donc pas décrits dans ce chapitre.

1.1.1 Les tanins du raisin (ou proanthocyanidines)

Les tanins du raisin sont des tanins condensés, aussi appelés proanthocyanidines car ils libèrent des anthocyanidines rouges par chauffage en milieu acide. Il s'agit d'oligomères et polymères formés d'unités de flavan-3-ol. Les unités constitutives majeures des proanthocyanidines du raisin sont la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la (+)-gallocatéchine, la (-)-épigallocatéchine et la (-)-épicatéchine-3-O-gallate Tableau 1

Tableau 1. Structures chimiques des principaux flavan-3-ols du raisin et du vin

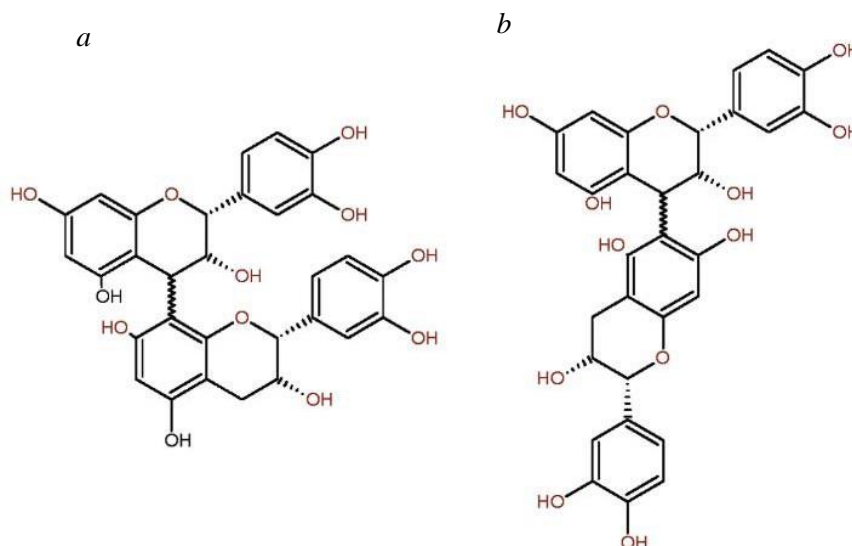
		Flavan-3-ol		
Structure	Dénomination	R1	R2	R3
	(+)-Catéchine	H	H	OH
	(-)-Epicatéchine	H	OH	H
	(+)-Gallocatéchine	OH	H	OH
	(-)-Epigallocatéchine	OH	OH	H
	(-)-Epicatéchine-3-O-gallate	H	O-gallate	H

La (+)-catéchine se différencie de la (-)-épicatéchine par la configuration du carbone asymétrique en position C3, 3S et 3R respectivement tandis que la (-)-épigallocatechine se distingue de la (-)-épicatéchine par la présence d'un hydroxyle supplémentaire sur le noyau B. Par ailleurs, l'acylation du groupement hydroxyle en position C3 du cycle C de la (-)-épicatéchine par l'acide gallique, forme la (-)-épicatéchine-3-O-gallate (Tableau 1).

Classiquement, on distingue les prodelphinidines (constituées d'unités (epi)gallocatechine) et les procyanidines (constituées d'unités (epi)catéchine) qui libèrent respectivement de la delphinidine et de la cyanidine par chauffage en milieu acide, mais ces différentes unités peuvent être mélangées dans une même chaîne de proanthocyanidine.

Les unités constitutives des proanthocyanidines de raisin sont liées par des liaisons covalentes en C4-C8 (Figure 1a) et, dans une moindre proportion, C4-C6 (Figure 1b) constituant des proanthocyanidines de type B, de longueur variable, linéaires ou branchées selon la position des liaisons interflavaniques (Haslam, 1980).

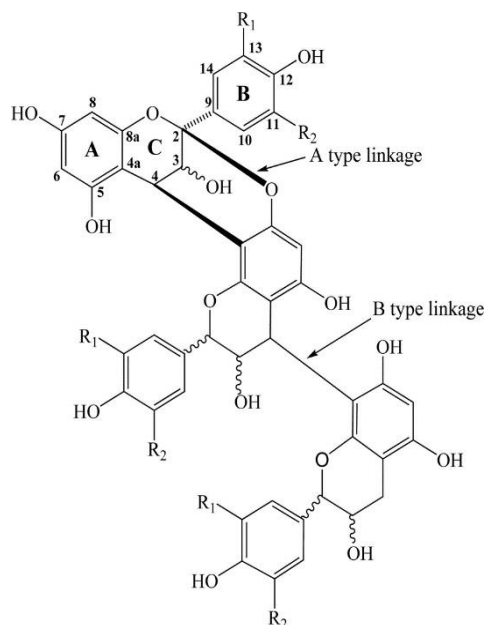
Figure 1. Structure de proanthocyanidines dimère, (B2 et B5, respectivement) liée en C4-C8 (a) et en C4-C6 (b)



Des proanthocyanidines de type A qui ont une liaison éther supplémentaire (C2-O-C7 ou C2-O-C5) entre deux unités adjacentes (Figure 2) ont également été signalées dans le raisin (De Gaulejac et al. 2001). Ces liaisons pourraient également se former par une réaction d'oxydation intramoléculaire

(Mouls & Fulcrand, 2012). Les tanins condensés peuvent être classifiés selon le nombre d'unités flavanols qu'ils contiennent (degré de polymérisation ou DP). Généralement on distingue classiquement les oligomères (de 2 à 10 unités flavanols) et les polymères (au-delà de 10 unités flavanols). Les structures des dimères et celles de quelques trimères ont été décrites dans la littérature (Czochanska, Foo, & Porter 1979; Da Silva et al. 1991; Fulcrand et al. 1999). Concernant les tanins condensés de taille moléculaire plus importante. Les données obtenues par spectrométrie de masse indiquent que les différentes unités constitutives s'enchaînent de façon aléatoire (Fulcrand et al. 1999). Par ailleurs, des données obtenues par diffusion des Rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) ont montré que ces chaînes étaient globalement linéaires (Zanchi et al, 2009).

Figure 2. Illustration des liaisons de type A et B sur la structure d'un trimère : L'unité du bas est reliée à l'unité intermédiaire en C4-C8 (liaison de type B) et l'unité du haut est reliée à l'unité intermédiaire par une liaison supplémentaire en C2-O-C7 (liaison de type A)



La structure des proanthocyanidines varie selon leur origine dans la grappe de raisin. La (-)-épicatchine-3-O-gallate est retrouvée en quantité plus importante dans les proanthocyanidines de pépins de raisin, qui ne contiennent pas d'unités (+)-gallocatéchine et (-)-épigallocatéchine (Prieur, Rigaud, Cheynier, & Moutounet, 1994) Ces dernières sont rencontrées dans les proanthocyanidines des

pellicules (Souquet, Cheynier, Brossaud, & Moutounet, 1996), des pulpes (Mané et al, 2007) et des rafles (Souquet, Labarbe, Le Guernevé, Cheynier, & Moutounet, 2000) où elles sont généralement présentes en concentrations inférieures à celle de la (-)-épicatechine quoique ces proportions varient fortement entre les cépages (Pinasseau et al., 2017). Par ailleurs, les tanins de pellicule sont de plus haut poids moléculaire, avec des degrés de polymérisation moyens de l'ordre de 30 dans les pellicules et de 10 dans les pépins ou les rafles.

1.1.2 Réactions des polyphénols dans le vin

Les tanins condensés sont des molécules très instables qui évoluent au cours de la vinification et de la conservation des vins pour donner divers types de dérivés. Ainsi, en milieu acide, et en particulier au pH du vin, les tanins subissent des réactions de clivage et de recombinaison conduisant à des tanins de longueur de chaîne différente (Haslam, 1980; Hemingway et McGraw, 1983; Vidal et al. 2002). De plus, les flavan-3-ols peuvent être impliqués dans des réactions d'oxydation, conduisant à la formation de nouvelles liaisons inter-moléculaires, avec une augmentation de la taille des tanins, ou intra-moléculaires menant à des structures plus compactes (Mouls & Fulcrand, 2012). Ils peuvent également réagir avec d'autres composés du vin tels que les aldéhydes, notamment l'acétaldéhyde (Saucier et al. 1997; Es-Safi et al. 1999a; Fulcrand et al, 1996), l'acide glyoxalique (Fulcrand, Cheynier, Oszmianski, & Moutounet, 1997) ou encore le furfural (Es-Safi, Cheynier, & Moutounet 2000). Ces mécanismes de condensation avec les aldéhydes, favorisés par l'oxydation, entraînent dans un premier temps une augmentation de la taille des tanins. Cependant, les nouvelles liaisons formées (e.g. méthylméthine dans le cas de la condensation avec l'acétaldéhyde) sont labiles, de sorte que les polymères, par des réactions de clivage et d'addition ou de cyclisation, sont progressivement convertis en composés plus stables (pyranoanthocyanes, sels de xanthylum) (Vallverdú-Queralt et al, 2017). Ainsi, l'évolution des tanins au cours du vieillissement du vin est un processus dynamique conduisant à une diversité structurale croissante et pas uniquement à l'apparition de polymères plus grands (Vidal et al. 2002; Cheynier et al, 2006; Vallverdú-Queralt et al. 2017).

Les anthocyanes extraites de la pellicule des raisins lors de la vinification sont également capables de réagir avec les tanins condensés (ou avec des tanins déjà évolués), pour donner des pigments

polymériques. Les anthocyanes sont en grande partie responsables de la couleur rouge-violet des jeunes vins rouges. Cependant, un déclin progressif de la concentration en anthocyanes est observé pendant la maturation du vin (Nagel & Wulf 1979). Malgré cela, la couleur du vin rouge persiste, bien qu'elle évolue sur des teintes rouges-brunes, puis orangées-tuilées pour les vins très âgés (Somers, 1971). Cela indique que de nouveaux pigments sont formés par la réaction des anthocyanes avec d'autres constituants du vin (Somers, 1971). La formation de ces pigments « évolués » dans le vin rouge a largement été étudiée (Somers, 1971; Nagel & Bishop, 1984; Liao, Cai, & Haslam, 1992; Hayasaka & Kennedy, 2003; K. Bindon, Kassara, Hayasaka, Schulkin, & Smith, 2014; de Freitas & Mateus 2011; Remy et al. 2000; Salas et al. 2003). De nombreuses structures de pigments dérivés ont été caractérisées, notamment des adduits tanins-anthocyanes (T-A) et anthocyanes-tanins (A-T) (Somers, 1971; Ribéreau-Gayon 1982; Remy et al. 2000; Salas et al. 2003) des produits de condensation avec les aldéhydes tels que l'acétaldéhyde (flavanol-méthylméthine-anthocyane (Bakker & Timberlake 1997; Es-Safi et al. 1999b) et polymères d'anthocyanes liés par des ponts méthylméthine (Atanasova, Fulcrand, Le Guernevé, Cheynier, & Moutounet, 2002), des polymères d'anthocyanes (Vidal et al. 2004a; Oliveira et al. 2013, 2014) pyranoanthocyanes (De Freitas & Mateus 2011) et des structures plus complexes telles que les dimères de pyranoanthocyanes et les portisines (Oliveira, Mateus, & De Freitas 2017). Pour ces différents pigments, comme pour les proanthocyanidines et leurs dérivés, les identifications structurales sont limitées aux produits de masse molaire relativement faible (dimères, trimères) (Willemse, Stander, Vestner, Tredoux, & de Villiers, 2015). Toutefois, des molécules de plus haute masse ont été détectées dans ces différentes familles. Ainsi, Hayaska et Kennedy (2003) ont détecté des adduits T-A et A-T de type A comprenant une anthocyane et jusqu'à 8 unités (épi)catéchine ainsi que des masses correspondant à la substitution d'une ou plusieurs unités (épi)catéchine par une (epi)gallocatéchine. (Asenstorfer, Hayasaka, & Jones, 2001) ont isolé des pyranoanthocyanes substituées par des procyanidines oligomères jusqu'à DP4, à partir de marc et de vin. Des polymères d'épicatéchine et de malvidine-3-glucoside comprenant jusqu'à 9 unités liées entre elles par des ponts méthylméthine ont été obtenus en solution modèle (Vallverdú-Queralt et al, 2017).

1.1.3 Implication des tanins dans l'astringence des vins rouges

Comme mentionné plus haut, les interactions avec les protéines sont une caractéristique des tanins et ont été largement étudiées (Haslam 1981; Le Bourvellec & Renard 2012). Ces phénomènes impliquent dans un premier temps la formation de complexes solubles qui ensuite s'agrègent et deviennent insolubles. Ils contribuent entre autre à la formation de précipités (Charlton et al, 2002), et de troubles (Siebert, Carrasco, & Lynn, 1996) mais sont aussi mis à profit pour éliminer les tanins présents en excès par les techniques de collage protéique (Ricardo-da-Silva et al, 1991). Ces phénomènes d'interactions entre les tanins et les protéines sont en grande partie responsables de la sensation d'astringence.

L'astringence est définie comme une sensation de sécheresse et granulosité/rugosité perçue dans la cavité buccale. Il est largement reconnu de nos jours que l'astringence émane d'une sensation tactile (Green, 1993) due à des interactions non-covalentes entre les tanins et les protéines salivaires, conduisant à une réduction de la lubrification de la cavité buccale (Bate-Smith, 1973; Luck et al. 1994; Baxter et al. 1997). Les interactions ont notamment lieu entre les tanins et une certaine famille de protéines salivaires, dite protéines riches en proline (PRPs), qui présentent la caractéristique d'avoir une forme ouverte et non globulaire (Mehansho et al, 1982). Elles mettent en jeu des mécanismes d'interaction hydrophobe entre les noyaux phénoliques et les structures planes des protéines telles que les noyaux proline, stabilisés par des liaisons hydrogène avec les liaisons peptidiques adjacentes (Murray et al. 1994; Pascal et al. 2009). Plus récemment l'implication d'autres protéines salivaires dans les interactions avec les tanins et la perception de l'astringence a été mise en évidence, notamment les stathérines (Soares et al., 2016), le peptide P-B, également riche en proline et qui présente des similarités structurales avec les stathérines (Soares et al., 2016) ou les mucines (Brandão et al. 2017a) qui sont des constituants majeurs du mucus qui tapisse l'épithélium buccal et contribuent à la viscosité de la salive (Strous & Dekker 1992). La sensation d'astringence augmente avec la concentration des tanins (Vidal et al. 2004c). En outre, certaines caractéristiques clés accentuent la capacité des tanins à s'associer avec les protéines salivaires et augmentent donc leur degré d'astringence. Ainsi, l'affinité des tanins pour les protéines dépend du nombre de noyaux phénoliques et notamment o-diphénol qui sont les principaux sites d'interaction (Haslam 1974; Haslam, Lilley, & Butler 1988) la présence de plusieurs sites permettant l'établissement

de ponts entre les protéines et avec d'autres polyphénols (Baxter et al. 1997). La formation de complexes tanins-protéines solubles (Sarni-Manchado & Cheynier 2002; Baxter et al. 1997) et insolubles (Ricardo-da-Silva et al. 1991; De Freitas & Mateus, 2001; Maury et al. 2001; Charlton et al. 2002) augmente avec le poids moléculaire (DPm) et le degré de galloylation des tanins, de même que leur astringence (Arnold, Noble, & Singleton, 1980; Robichaud & Noble, 1990; Vidal et al, 2003a). Ces propriétés pourraient être liées à une augmentation de la solubilité (Poncet-Legrand et al. 2003; Pianet et al. 2008) qui favoriserait l'établissement d'interactions avec les protéines. Les prodelphinidines (constituées d'unités (epi)gallocatéchine) présentent aussi une plus forte affinité pour les protéines que les procyanidines (constituées d'unités (epi)catéchine) (Hagerman, 1989) et l'épigallocatéchine gallate interagit plus fortement avec une PRP salivaire que l'épicatéchine gallate (Schwarz & Hofmann 2008; Canon et al. 2010). Très peu d'informations sont disponibles sur les interactions des tanins dérivés avec les protéines. Cependant il a été démontré que les dimères issus de l'oxydation de la catéchine interagissent avec les protéines comme les procyanidines dimères (Guyot et al. 1996) et que les flavanols avec des ponts méthylemethine sont aussi astringents que les procyanidines de même taille (Vidal et al. 2004c). Les anthocyanes (Ferrer-Gallego et al, 2015) et les pyranoanthocyanes (pyranomalvidin-3-glucoside (vitisin B), pyranomalvidin-3-glucoside-catechol, et la pyranomalvidin-3-glucoside-epicatechin) (García-Estévez et al, 2017) interagissent aussi avec les protéines salivaires. La présence d'une unité flavanol dans la structure des pyranoanthocyanes augmente leur affinité pour les protéines (García-Estévez et al, 2017) tandis que la sensation d'astringence diminue avec l'incorporation d'anthocyanes dans la structure des tanins (McRae et al. 2013; Watrelot, Heymann, & Waterhouse 2020). Des fractions d'anthocyanes n'ont pas été perçues comme astringentes (Vidal et al. 2004b), à la différence d'une fraction contenant des trimères d'anthocyanes (Sáenz-Navajas et al, 2017). Cependant, dans une autre étude, une corrélation entre les teneurs en anthocyanes et l'astringence a été mise en évidence (Guerreiro, Teixeira, De Freitas, Sales, & Sutherland, 2017).

L'astringence est aussi connue pour être un terme générique pouvant être décliné en plusieurs sous-descripteurs (Gawel, Iland, & Vidal, 2001). Il a été rapporté que la perception des caractères "asséchant", "craeux", "adhésif" et "plissé" augmentait avec le DP des tanins (Vidal et al. 2003a). Ces mêmes

auteurs rapportent que le degré de galloylation des tanins favorise la sensation « rugosité » de « grossièreté » et « d'assèchement » tandis que la présence d'unités d'épigallocatechine tend à diminuer la perception de « grossièreté » (Vidal, et al. 2003a).

Des travaux récents rapportent une dimension de cinétique des interactions entre la mucine et les tanins en lien avec la perception d'astringence (Gombau et al, 2019). Ils montrent que la cinétique d'association des tanins avec les protéines constituant la mucine est rapide, tandis que la cinétique de dissociation est beaucoup plus longue. Ce comportement pourrait expliquer pourquoi l'astringence des tanins se fait sentir rapidement et persiste longtemps. De plus, ces mêmes auteurs ont observé que la cinétique d'association pouvait dépendre du type de tanin. En effet, ils ont montré que les ellagitanins s'associent beaucoup plus rapidement par rapport aux tanins condensés, ce qui suggère que la sensation d'astringence devrait être ressentie beaucoup plus rapidement avec ce type de tanins.

Par ailleurs, des modèles de cavité buccale, mettant en œuvre des cellules de la langue et de la muqueuse buccale et des constituants de la salive et de la pellicule mucoale ont été développés (Soares et al, 2020). Ils ont permis de montrer que les flavanols et en particulier les flavanols galloylés interagissent fortement avec les protéines salivaires tandis que l'extrait de polyphénols de vin riche en anthocyanes interagit préférentiellement avec les cellules orales. Ces comportements différents pourraient être en relation avec les sous-descripteurs « tanins rudes » et « tanins souples » proposés dans la littérature pour les flavanols et les pigments anthocyaniques.

Par-delà la structure des tanins, les interactions tanins-protéines peuvent être influencées par la matrice dans laquelle se trouvent les tanins. Hagerman et Butler ont été les premiers à suggérer que le pH pouvait affecter l'interaction protéine-tanin (Hagerman & Butler, 1978). Plus tard, il a été souligné que la plus faible solubilité des agrégats tanin-BSA (donc la plus forte interaction) est observée dans une fenêtre de pH = 3.5 - 4 (Naczek, Oickle, Pink, & Shahidi, 1996), donc au pH du vin.

La teneur en éthanol dans le vin a également une influence sur les interactions entre tanins et protéines salivaires. En général, la présence d'éthanol à de faibles concentrations (entre 4 et 12 %) diminue l'interaction entre les tanins et les PRPs (Serafini, Maiani, & Ferro-Luzzi 1997) et les mucines (Brandão

et al, 2017a). Une étude a montré que l'agrégation d'une PRP glycosylée (protéine salivaire) avec l'épigallocatechine-3-O-gallate est diminuée par l'ajout de 12 % d'éthanol (Pascal, Poncet-Legendre, Cabane, & Vernhet, 2008). En revanche, d'autres auteurs ont observé que l'astringence et les interactions tanins-protéines salivaires était exacerbées à des proportions d'éthanol rencontrées dans le vin (~13 %) (Obreque-Slifer, Peña-Neira, & López-Solís 2010).

Les polyphénols à eux seuls ne reflètent pas l'ensemble des macromolécules pouvant influencer l'astringence du vin. En effet, les polysaccharides (PS) qui représentent également une des principales familles des composés macromoléculaires du vin impactent l'agrégation des tanins (Riou et al, 2002) inhibent la précipitation des complexes tanins- protéines (Luck et al. 1994; Maury, Sarni-manchado, et al. 2016) et limitent la perception de l'astringence des tanins (Vidal et al, 2004c; Quijada-Morín et al. 2014; Boulet et al. 2016). C'est pourquoi la section qui suit est dédiée à leur description.

1.2 Les polysaccharides

Les PS des vins sont issus des pectines qui sont les constituants de la paroi cellulaire des raisins (Figure 3) et des parois des levures de vinification, *Saccharomyces cerevisiae*.

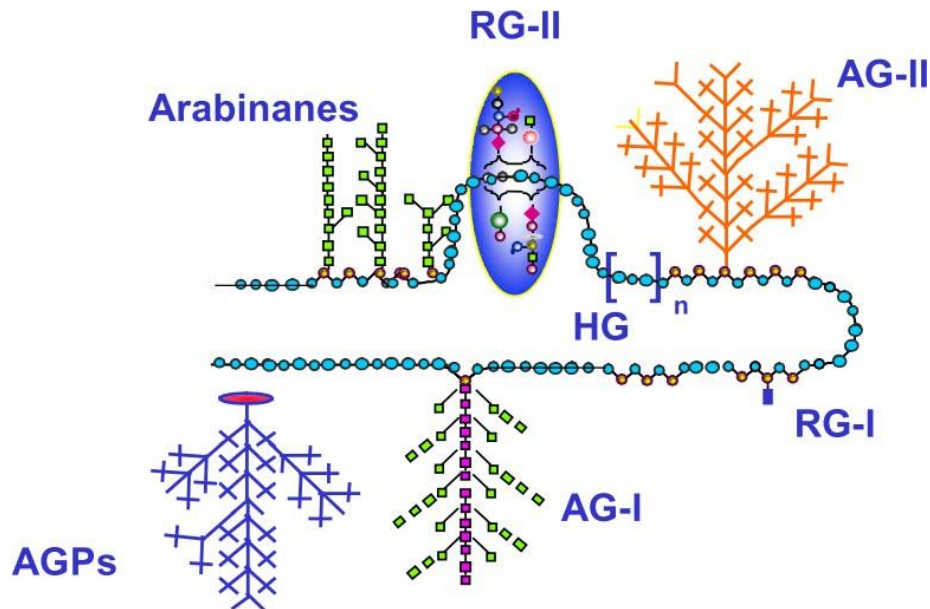
L'extraction des pectines dans le mout de raisin a lieu au moment du foulage de la vendange et du pressurage pour les vins blancs et rosés et se poursuit pendant la macération pour les vins rouges. Durant ces phases, les pectines se retrouvent en contact avec les pectinases qui sont des enzymes de dégradation qui interviennent dans l'extraction des PS retrouvés dans le vin.

Les teneurs et structures des polysaccharides libérés au cours de ces opérations dépendent du procédé de vinification et en particulier de la durée de macération. Elles peuvent aussi être modifiées par des traitements par des enzymes pectolytiques exogènes (Ayestarán, Guadalupe, & León, 2004; Doco, Williams, & Cheynier, 2007; Ducasse, Williams, Meudec, Cheynier, & Doco, 2010; Guadalupe & Ayestarán, 2007); ou sous l'action de la microflore (Guadalupe & Ayestarán, 2007).

Les principaux représentants de ces PS dans le vin sont les polysaccharides riches en arabinose et en galactose (PRAGs), comprenant les arabinogalactane protéines (AGPs), les arabinogalactanes (AG) et

les arabinanes, ainsi que le rhamnogalacturonane II (RG-II), (Pellerin, Vidal, Williams, & Brillouet, 1995; Vidal et al. 2003b; Carvalho et al, 2006).

Figure 3. Représentation schématique de pectines de baies de raisin (Doco et al. 1995)



Les pectines ne sont pas les seuls précurseurs des PS retrouvés dans le vin. Les levures de vinification, *Saccharomyces cerevisiae* contribuent également à l'enrichissement en PS du milieu. Les composés qu'elles relarguent sont appelés mannoprotéines (MPs). Ce relargage intervient durant la fermentation alcoolique, au moment de l'autolyse des levures. Ces polymères sont présents dans le vin à des concentrations allant de 100 à 300mg.L⁻¹ (Doco et al. 1999; Apolinar-Valiente et al. 2013) et leur concentration dépend du processus de vinification.

Des recherches menées sur la caractérisation des MPs extraites du vin blanc ont montré qu'il existe une très large distribution de masses molaires, dénombrant plusieurs populations. Il a été constaté que les MPs de masse moléculaire supérieure sont principalement composées de mannose et contiennent 10,3 % de protéines tandis que les MPs de masse moléculaire plus faible sont constituées de 87,5 % de mannose et de quelques autres résidus et d'une teneur en protéines de 2,5 % (Gonçalves, Heyraud, De Pinho, & Rinaudo, 2002).

1.2.1 Formation des complexes tanins – polysaccharides et des complexes ternaires tanins – polysaccharides – protéine

Dans le vin, les polysaccharides se retrouvent au contact des polyphénols. Ensemble, ils constituent la fraction macromoléculaire du vin rouge à laquelle nous nous intéressons et qui comprend également des protéines.

La structure de ces dernières n'a pas été décrite dans le détail. Néanmoins, il a été montré qu'elles sont présentes en quantité non négligeable dans le vin ($\sim 100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) et que les produits de finition (i.e. : collage protéique) peuvent y contribuer (Maury, Sarni-Manchado, & Cheynier, 2019).

Les polyphénols forment des complexes supramoléculaires avec les PS et les protéines qui les entourent. Ces phénomènes de complexation peuvent être à l'origine d'une atténuation de sensation d'astringence en bouche. C'est pour cela qu'il est important de comprendre comment ces complexes sont formés et comment il est possible de les caractériser.

Les mécanismes d'associations tanins-PS reposent, comme les interactions entre tanins et protéines, sur des phénomènes impliquant des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes (McManus et al. 1985; Tang, Covington, & Hancock 2003; Watrelot et al. 2013). Les études réalisées en solution modèle montrent que les polysaccharides, comme les protéines, interagissent préférentiellement avec les tanins de haute masse molaire (i.e. de haut DPM). (Watrelot et al. 2013).

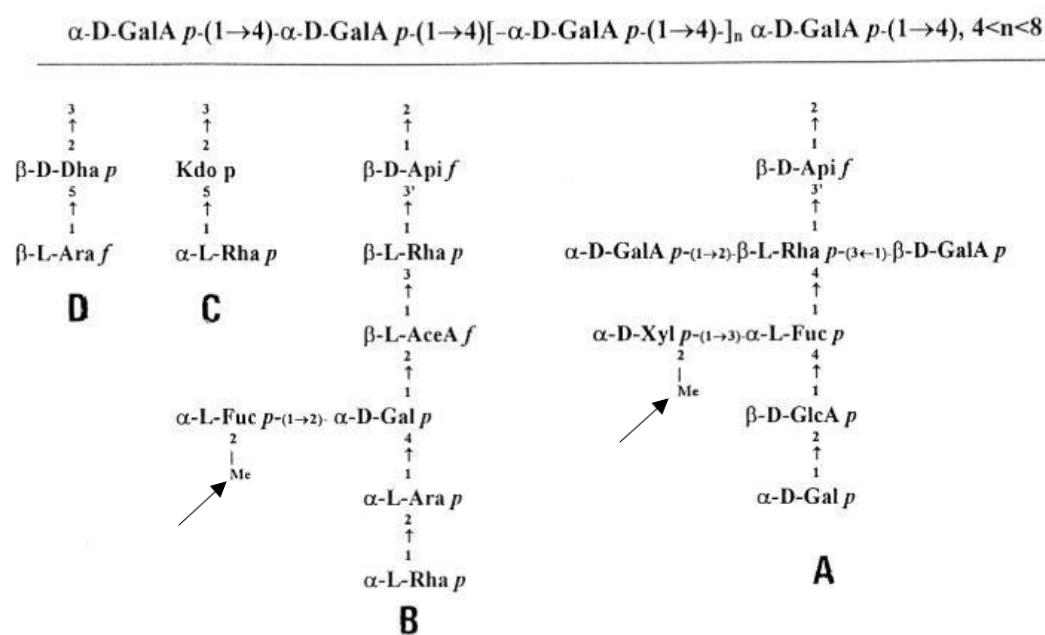
Le comportement colloïdal d'une fraction de tanins de pépin de raisin en présence de PS extraits à partir de vin rouge a été étudié par diffusion de la lumière (Riou et al, 2002). Les tanins seuls en solution ont tendance à s'agréger pour former de larges particules (Poncet-Légrand et al, 2010; Riou et al, 2002). L'ajout de PS n'empêche pas l'auto-agrégation des tanins mais influence l'évolution de la taille des particules (Riou et al, 2002).

Il a été observé que le RG-II-monomère n'avait pas d'impact sur l'agrégation des tanins. En revanche, le dimère (ajouté à des concentrations retrouvées dans le vin) a pour effet d'augmenter le diamètre apparent moyen des particules (Riou et al, 2002). Ce comportement semble être propre au RG-II-dimère et pourrait être en lien avec sa structure. En effet, le RG-II-monomère présente une zone hydrophobe qui

est due à la position particulière de ses quatre groupes méthyle (Figure 4), (Mazeau & Pérez 1998). Par conséquent, le RG-II-dimère présente deux zones hydrophobes. Cela suggère que la taille des particules augmente rapidement grâce à la formation de liaisons entre ces deux zones spécifiques et les agrégats de tanin (Riou et al, 2002).

Par ailleurs, les glycoprotéines dérivées des levures et des pectines (MPs, AGPs) inhibent fortement l'agrégation des tanins (Riou et al, 2002). Plus particulièrement, les glycoprotéines de faible à moyenne masse molaire stabilisent les agrégats de tanins, tandis que les molécules de haute masse molaire n'ont aucun effet sur la taille des particules (Riou et al, 2002).

Figure 4. Structure du RG-II (Pellerin et al. 1996)

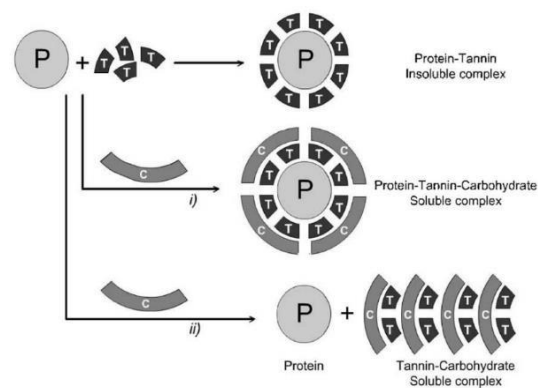


Certains facteurs environnementaux peuvent influencer les interactions entre les polyphénols et les polysaccharides. La force ionique du milieu (concentration en sel) augmente légèrement le taux de combinaison tanins-PS (Le Bourvellec, Le Quere, & Renard, 2007) tandis que la formation de complexes polyphénols-PS ((-)-epigallocatechine gallate - β -glucane) est diminuée par l'ajout d'éthanol dans le milieu qui diminue la polarité du solvant (Gao et al, 2012), ce qui souligne l'importance des interactions hydrophobes dans la formation de ces complexes. En revanche, la modification du pH (2 à

7) n'a aucun effet sur les associations entre des tanins de pomme et les PS, ce qui suggère que les interactions ioniques ou électrostatiques ont une faible contribution à ce type d'interactions (Renard et al. 2001; Le Bourvellec, Guyot, & Renard 2004). Néanmoins, les travaux cités ci-dessus ont été réalisés sur des complexes reconstitués à partir de fractions de tanins et de PS purifiées et ces interactions n'ont encore jamais directement observées dans le vin. Comme cela a été mentionné plus haut, les tanins présentent une forte affinité pour les protéines (Haslam, 1980) et, dans le vin, comme dans la cavité buccale lors de l'ingestion de tanins, la présence de ces deux espèces conduit à la formation de complexes insolubles. La présence de polysaccharides inhibe la formation de ces précipités (Mateus et al. 2004; Le Bourvellec et al. 2012; Soares, Mateus, & De Freitas 2012; Watrelot, Schulz, & Kennedy 2017). En effet, il a été démontré en solution modèle que la présence en solution de pectines limite la formation d'agrégats insolubles BSA-tanins (Mateus et al. 2004; Soares, Mateus, & De Freitas 2012) et la précipitation des tanins par les protéines de collage (Maury et al. 2016). Deux mécanismes d'interaction impliquant les tanins, les PS ainsi que les protéines ont été proposés (Figure 5), (Mateus et al, 2004) :

- (i) Un mécanisme dans lequel les PS entrent en compétition avec les protéines en se liant aux tanins.
- (ii) La formation d'un complexe ternaire protéines-tannin-PS, ce qui a pour effet d'augmenter la solubilité du complexe en milieu aqueux.

Figure 5. Mécanismes possibles (i et ii) impliqués dans l'inhibition de l'agrégation des tanins et des protéines par les polysaccharides. (Mateus, Carvalho, Luís, & De Freitas, 2004).



P : protéine, T : tanin, C : polysaccharides

L'impact des PS sur les interactions tanins-protéines peut impliquer les deux mécanismes proposés (ternaires ou compétitifs, Figure 5), selon la nature de chacune des entités (Brandão et al. 2017b; Manjón et al. 2020). En particulier, il a été rapporté que dans le cas des interactions entre tanins et peptide P-B, les AGPs et le RG-II semblent agir par un mécanisme ternaire, dans lequel ils entourent le complexe tanin-protéine, augmentant sa solubilité.

En revanche, pour les protéines acides riches en proline (aPRPs), des interactions via les deux mécanismes ont été observées, selon la nature des tanins (tanins condensés ou hydrolysables) et du polysaccharide impliqué (Brandão, et al. 2017b). Néanmoins, les tanins qui ont été utilisés dans cette étude se limitent à de faibles DP (dimère de type B) (Brandão et al. 2017b). Or, il a été observé que la capacité des PS dérivés des pectines à limiter les interactions protéine-tanins diminue lorsque des tannins ayant une structure complexe sont impliqués (Mateus et al, 2004). Les mêmes auteurs rapportent que le RG-II est le polysaccharide le plus efficace pour empêcher la précipitation des aPRPs quel que soit le type de tanin. Ces observations à l'échelle moléculaire sont en accord avec les résultats des études sensorielles montrant que le RG-II diminue de manière significative les notes associées à l'astringence et particulièrement les sous-qualités dites grossière, crayeuse et plissée tandis que les AGPs et les MPs exercent un effet moindre sur cet attribut (Vidal et al. 2004c). Les deux types de mécanismes ont également été observés avec les MPs et cela est dépendant de la taille et des caractéristiques structurales des MPs (Manjón et al, 2020).

2 Les méthodes de caractérisation des macromolécules du vin

Les notions qui ont été discutées jusqu'à maintenant traitaient de la composition macromoléculaire des et de leur implication dans l'astringence perçue dans les vins. Les phénomènes d'interactions entre ces macromolécules ont également été décrits. La présente section porte sur les méthodes permettant de caractériser et de quantifier ces constituants macromoléculaires du vin ainsi que les complexes qui s'y forment. Les avantages et les limites de ces méthodes sont également discutés.

2.1 *Caractérisation des polyphénols*

Plusieurs types de méthodes existent pour caractériser et quantifier les composés phénoliques, tanins condensés (proanthocyanidines), pigments et tanins dérivés. Parmi elles, des méthodes globales basées sur l'absorbance des polyphénols dans l'UV-visible sont utilisées depuis longtemps pour quantifier les polyphénols en solution et dans les vins.

2.1.1 *Méthodes spectroscopiques UV-visible*

L'absorbance à 280 nm, indice de polyphénols totaux ou IPT (Flanzy & Poux, 1958) et est toujours d'actualité. Néanmoins, l'absorbance à 280 nm n'est pas optimale pour quantifier spécifiquement les tanins puisque d'autres composés du vin absorbent à cette longueur d'onde (Kramling & Singleton, 1969). En particulier, les anthocyanes contribuent fortement à la valeur de l'absorbance à 280nm. Cependant, ces molécules ainsi que les pigments polymériques peuvent être quantifiés spécifiquement à 520nm, en solution acide (HCl, pH = 1) afin de s'assurer que toutes les anthocyanes sont présentes uniquement sous leur forme cation flavylum qui absorbe à cette longueur d'onde.

Un dosage spécifique des pigments polymériques par spectroscopie à 520nm, a aussi été proposé. Cette méthode consiste à ajouter du SO₂ pour décolorer les anthocyanes libres, la couleur restante étant provoquée par les pigments résistants à la décoloration par le SO₂ (Somers & Evans 1977). Cependant, cette propriété n'est pas spécifique des pigments polymériques, certains polymères comme les adduits tanins-anthocyanes étant décolorés par les sulfites (Salas, Guernevé, Fulcrand, Poncet-Legrand, & Cheynier, 2004) tandis que certains pigments de faible masse molaire comme les pyranoanthocyanes sont résistants (Bakker & Timberlake 1997; Sarni-Manchado et al. 1996).

Plus récemment l'absorbance à 230nm a été proposée pour évaluer plus spécifiquement la teneur en tanins (Boulet et al. 2016; Boulet, Ducasse, & Cheynier 2017). Il a été démontré que l'absorbance des différents composés phénoliques (flavan-3-ols, anthocyanes), à 230 nm est plus homogène qu'à 280nm. Ainsi, dans les vins rouges, l'absorbance à cette longueur d'onde est principalement due aux tanins en

raison de leur concentration élevée dans les vins rouges, quoique les anthocyanes et les acides phénoliques y contribuent également (Boulet et al, 2017).

D'autres méthodes, basées sur le dosage des tanins précipités par la gélatine (Glories, 1984), la sérum albumine bovine (BSA) (Harbertson, Kennedy, & Adams, 2002), l'ovalbumine (Llaudy et al, 2004) ou la méthylcellulose (MC) (Sarneckis et al, 2006), par mesure de l'absorbance à 280nm ou de l'absorbance à 510 nm après addition de chlorure ferrique ont été proposées. Ces méthodes permettent d'évaluer spécifiquement la quantité de tanins capables de précipiter en présence de protéine, contenus dans le vin. Ces méthodes présentent l'avantage d'être rapides et peu coûteuses. Néanmoins elles ne donnent pas d'information sur la structure ni sur la masse molaire ou la distribution des polyphénols.

2.1.2 Analyse des tanins par spectrométrie de masse (MS)

Des méthodes reposant sur l'analyse par spectrométrie de masse ont été développées. Elles permettent de détecter des espèces ionisées (généralement formées par ajout ou perte d'un proton dans la source de l'appareil), de les séparer (dans l'analyseur) sur la base de leur rapport masse sur charge (m/z) et de les identifier. Ainsi des proanthocyanidines allant jusqu'à des DP17 dans la pomme (Guyot, Doco, Souquet, Moutounet, & Drilleau, 1997) ou DP22 dans le litchi (Le Roux, Doco, Sarni-Manchado, Lozano, & Cheynier, 1998) ont pu être détectées par spectrométrie de masse avec une source d'électronébulisation et un analyseur quadripolaire (ESI-Q-MS), (Fulcrand et al, 2008). Les proanthocyanidines peuvent également être analysées à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) et un analyseur à temps de vol (TOF, time of flight). Cependant, en ESI-TOF comme en MALDI-TOF, la sensibilité décroît avec la masse molaire, en particulier dans les échantillons contenant des molécules de masses très différentes, ce qui conduit à une sous-estimation des mDP calculés à partir de ces données (Mané et al, 2007; Taylor, Barofsky, Kennedy, & Deinzer, 2003). La mise en œuvre d'un fractionnement préalable permet d'améliorer la détection des polymères (Mouls, Mazauric, Sommerer, Fulcrand, & Mazerolles, 2011; Taylor et al, 2003) et d'obtenir une image plus fidèle de leur distribution en masse (Mouls et al, 2014). Une autre approche reposant sur l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des complexes formés entre une protéine, la sérum albumine bovine (BSA), et des

fractions de tanins a également été développée (Mané et al, 2007). Elle permet d'obtenir des valeurs de DPm cohérentes avec les résultats des méthodes de dépolymérisation, décrites plus loin.

2.1.3 Chromatographie liquide haute performance couplé à l'UV-visible et la spectrométrie de masse

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une méthode de séparation polyvalente couramment utilisée en couplage avec la spectrophotométrie UV-visible et /ou la spectrométrie de masse pour l'analyse des composés phénoliques. Les composés phénoliques peuvent être quantifiés à partir de l'aire des pics détectés dans l'UV ou le visible et les différentes familles de composés phénoliques peuvent être distinguées sur la base de leurs spectres UV-visible caractéristiques. La spectrométrie de masse (MS) permettant de détecter les ions moléculaires et d'en déterminer la masse, est un outil très performant pour étudier les structures des polyphénols (Abian, 1999; Fulcrand et al, 1997; Niessen & Tinke, 1995). Des informations structurales complémentaires peuvent être obtenues grâce aux techniques de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS et MSn) qui permettent d'obtenir des ions fils par fragmentations successives des ions moléculaires.

Les monomères de flavan-3-ol et petits oligomères peuvent être séparés facilement sur colonne de phase inverse (C18). Cependant, l'élution ne se fait pas par ordre croissant du DP et les polymères sont mal séparés.

D'autres méthodes de séparation HPLC par ordre de DP croissant ont été proposées en phase normale sur colonne de silice (Rigaud, Perez-Illarbe, Da Silva, & Cheynier, 1991) ou HILIC (Kelm, 2006). Cependant, leur efficacité pour les polyphénols de hauts poids moléculaires est difficile à évaluer car ces molécules sont mal détectées en MS, du fait de leur polydispersité, des coélutions et des compétitions dans la source de l'appareil MS, de la formation d'ions avec différents états de charge et de la faible intensité de chacun (Fulcrand et al. 2008; Mouls et al. 2014).

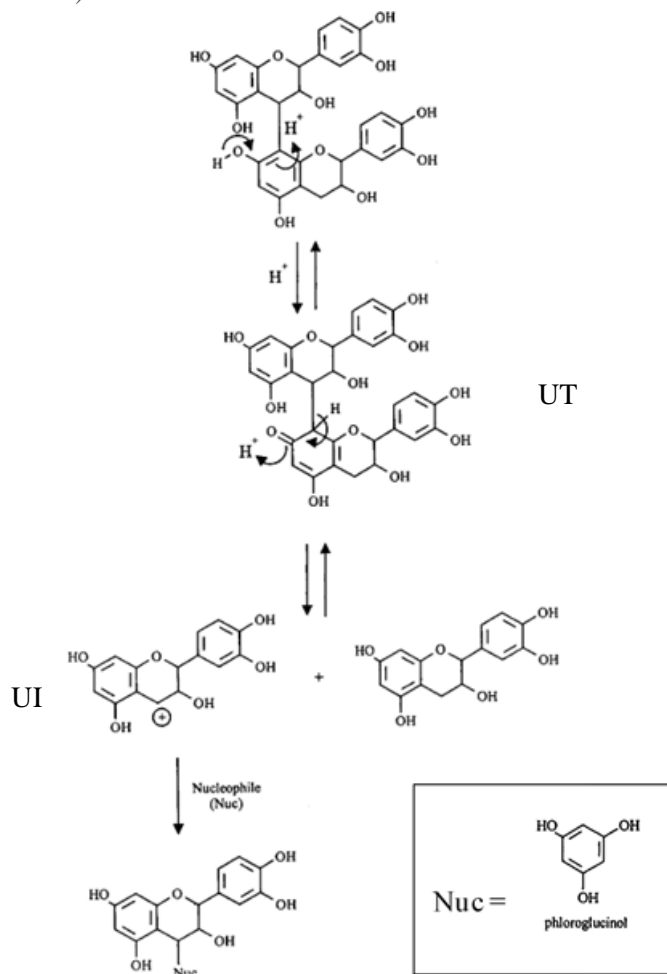
Une alternative est de dépolymériser les proanthocyanidines en présence d'un agent nucléophile (comme décrit ci-dessous) et d'analyser les produits formés par HPLC-UV-MS pour déterminer des caractéristiques moyennes des polymères.

2.1.4 La dépolymérisation des tanins et l'analyse de leurs unités constitutives par HPLC

Les méthodes de dépolymérisation telles que la tiolyse et la phloroglucinolyse permettent de cliver les proanthocyanidines et d'analyser leurs unités constitutives par HPLC couplée à un détecteur UV-visible et/ou à un spectromètre de masse (MS).

En effet, lorsque les proanthocyanidines se trouvent en milieu chaud et acide, les liaisons interflavaniques (C4-C8, C4-C6) sont coupées en libérant les unités terminales (UT) dans leur forme native et les unités intermédiaires (UI) de flavan-3-ols sous la forme d'un carbocation au niveau du carbone C4. Ce carbocation est alors piégé par un agent nucléophile (Nuc) tel que le benzyl mercaptan

Figure 6. Réaction hypothétique de la catalyse acide d'un dimère (DP2), en présence d'un agent nucléophile, ici le phloroglucinol (Kennedy & Jones, 2001).



Ici, Les produits de la réaction sont une UT = C (ou EC) et une UI = C-Nuc (ou EC-Nuc)

aussi appelé tholuene- α -thiol (Thompson et al. 1972; Rigaud et al. 1991) ou le phloroglucinol (Kennedy & Jones, 2001), pour générer un adduit (Figure 6).

Grâce aux coefficients d'absorption molaires spécifiques de chaque produit libéré au cours de la réaction et à la séparation par HPLC des UT et des adduits formés avec l'agent nucléophile (UI), les concentrations des différentes unités constitutives des tanins peuvent être déterminées.

Les UT libérées par la réaction de dépolymérisation des proanthocyanidines du raisin sont : la (+)-catéchine (C), la (-)-épicatéchine (EC), la (-)-épicatéchine 3-gallate (ECG), la (-)-épigallocatechine (EgC) et la (+)-gallocatechine (GC) tandis que les UI, libérées sous forme d'adduit sont : la (+)-catéchine-Nuc (C-Nuc), la (-)-épicatéchine-Nuc (EC-Nuc), la (-)-épigallocatechine-Nu (EgC-Nuc) et la (-)-épicatéchine 3-gallate)-Nuc (EcG-Nuc).

Le degré de polymérisation moyen (DPM) peut être calculé en divisant la concentration molaire de l'ensemble des unités (UT + UI) par celle des UT (eq 1)

$$DPM = \frac{UT + UI}{UT}$$

Le calcul du pourcentage d'unités (epi)galocatechine (EgC%) est basé sur la quantité molaire d'EgC incorporée dans les structures de tanins, selon l'équation 2 (eq 2)

$$EgC\% = \frac{UT_{EgC} + UI_{EgC}}{UT + UI}$$

De la même façon, le calcul du pourcentage de galloylation (G%) est basé sur la quantité molaire d'EcG (eq 3) :

$$G\% = \frac{UT_{EcG} + UI_{EcG}}{UT + UI}$$

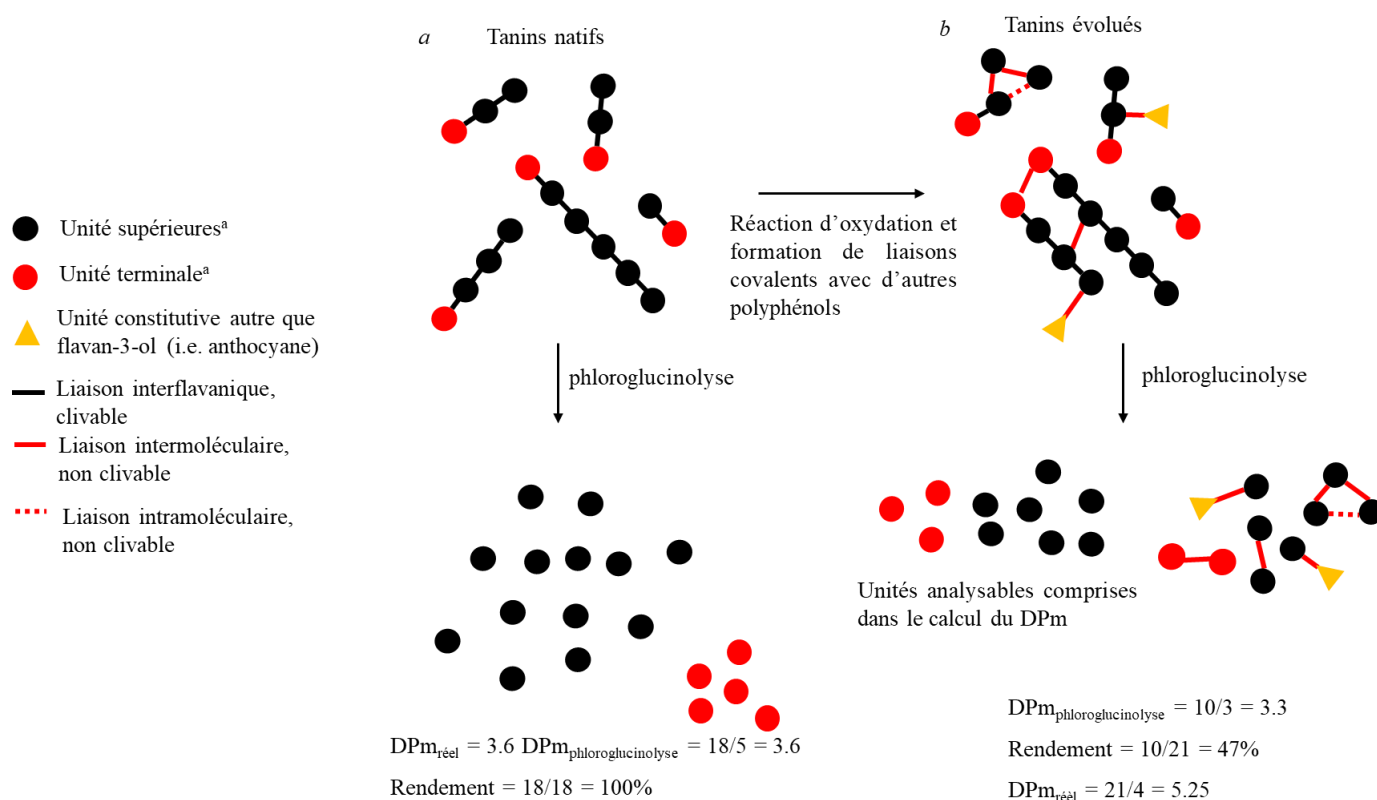
Cette méthode a permis de faire avancer considérablement les connaissances au sujet de la structure des tanins. Néanmoins, l'estimation du DPM n'est valable que pour les tanins natifs (proanthocyanidine). En effet, les DPM calculés après phloroglucinolyse dans les vins (6,4 pour Fulcrand et al, 1996 ; 8,3

pour Hayasaka & Kennedy 2003) ne sont pas en accord avec les longueurs de chaînes maximales détectées en MS (7 et 9, respectivement).

Cela s'explique par le fait que les tanins dérivés contiennent des unités différentes des tanins natifs (Poncet-Legrand et al, 2010; Remy et al, 2000; Salas et al., 2003) qui ne sont pas analysées et donc pas prises en compte dans le calcul du DPm (Figure 7).

De plus, les méthodes de caractérisation par HPLC après dépolymérisation ne permettent pas d'accéder à la polydispersité d'un échantillon ni de déterminer la distribution de la masse molaire ou de la taille des tanins. Cette information peut être obtenue par chromatographie d'exclusion stérique (comme décrit ci-dessous).

Figure 7. Représentation du rendement de dépolymérisation en absence (a) et en présence (b) de liaisons non clivables, créées lors de l'oxydation des tanins et des réactions avec d'autres polyphénols présents dans le vin. (Figure inspirée des travaux de Poncet-Legrand et al, 2010).



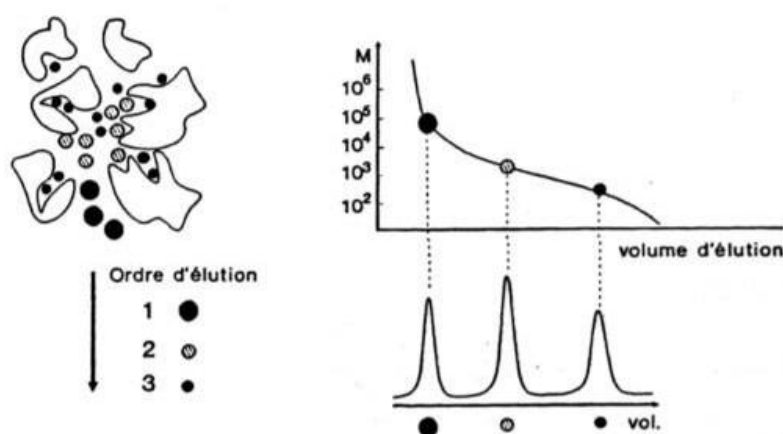
^aUnités terminales et intermédiaires = flavan-3-ol répertoriés dans le Tableau 1.

Dans cet exemple, le rendement de dépolymérisation est de 100% pour les tanins natifs et n'est que de 47% pour les tanins évolués. Par ailleurs, il est intéressant de noter que si les liaisons non clivables se forment au niveau des unités terminales en grande proportion, par rapport à celles qui se forment au niveau des unités intermédiaires, il est possible que cela conduise à une surestimation du DPm.

2.1.5 La chromatographie d'exclusion stérique : Etude de la distribution de la taille et de la masse molaire des tanins

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est utilisée depuis les années 60 comme technique chromatographique pour l'analyse des polymères. Ce type de chromatographie aussi appelée perméation de gel ou tamisage moléculaire, permet la séparation des molécules en fonction de leur taille. Les petites molécules pénètrent plus profondément dans les pores de la phase stationnaire et sont donc éluées plus tardivement que les grosses, qui sont exclues (Figure 8).

Figure 8. Principe de la chromatographie d'exclusion stérique



Cette technique est couramment utilisée pour accéder à des informations sur la distribution de la masse molaire d'un échantillon. Plusieurs méthodes destinées à analyser les tanins par SEC couplée à un détecteur UV-visible ont été développées. Les premières s'appuyaient sur la dérivatisation des tanins avant analyse afin d'éliminer l'interaction entre les groupes fonctionnels phénoliques et la phase de la colonne (Williams & Porter 1983). Cependant, il s'est avéré que le rendement de la réaction de dérivatisation des tanins n'était pas toujours égal à 100% et qu'elle était souvent accompagnée de la formation de produits de réaction secondaires de constitution inconnue (Bae, Foo, & Karchesy, 1994). Plus tard, l'emploi du N, N-diméthylformamide (DMF) dans le cadre de l'analyse des tanins par SEC a permis de supprimer l'étape de dérivatisation. Cette phase mobile diminue drastiquement l'adsorption du tanin sur la phase stationnaire et rend possible la séparation en fonction du poids moléculaire (Bae, Foo, & Karchesy 1994; Kennedy & Taylor 2003). Cependant, ces conditions ne permettent pas de

conserver les complexes macromoléculaires (tanins-tanins, ou tanins-PS, ou tanins-protéine-PS). Des standards de polystyrènes ont longtemps été utilisés pour calibrer les colonnes et estimer la masse molaire moyenne en masse (M_w) et/ou le rayon hydrodynamique (R_h) des tanins. Or, les standards de polystyrènes présentent des structures bien différentes de celles des tanins, engendrant un biais dans l'estimation de la M_w ou du R_h « réel » des tanins.

Pour pallier ce problème, Kennedy et Taylor ont étudié la relation entre le DPm évalué après dépolymérisation et la M_w déterminée par SEC-UV et mis au point une méthode de calibration de la colonne utilisant des tanins purifiés obtenus à partir de différentes matières végétales (pellicule et péricarpe de raisin et houblon). Les résultats de cette étude ont montré une forte corrélation ($R^2 = 0,984$) entre le temps de rétention et la masse molaire déduite du DPm des fractions purifiées (Kennedy & Taylor 2003).

Toutefois, ils observent que les tanins de pépins sont élués plus tôt que ce qui est attendu par rapport à leur DP. Puisque les rendements de dépolymérisation sont bons, il a été suggéré que cette divergence était dû à une conformation plus étendue des tanins de pépins, du fait de leur niveau de galloylation supérieur (Kennedy & Taylor 2003). Cependant, cette méthode n'est valable que pour l'analyse de tanins natifs. En effet, l'élution hydrodynamique est également influencée par la conformation moléculaire (i.e. chaîne linéaire ou ramifiée) (Vernhet et al. 2011), ce qui peut entraîner une mauvaise estimation de la masse molaire dans le cas des tanins évolués/oxydés.

2.1.6 Les techniques de diffusion de la lumière

Comme cela a été discuté dans les sections précédentes, une des difficultés majeures dans la caractérisation des tanins et de leur distribution de taille est liée à leur oxydation ainsi qu'à toutes les réactions entraînant la complexification de leur structure. De plus, la SEC ne permet pas d'étudier les polyphénols dans un milieu proche de celui du vin. Par conséquent, il n'est pas possible d'étudier le comportement des tanins (ni des complexes macromoléculaires, comme dit plus haut).

Plusieurs méthodes alternatives à la dépolymérisation et à la SEC-UV, basées sur la diffusion de rayonnement (e.g. diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), diffusion dynamique de la lumière (DLS) et diffusion de la lumière statique multi-angles (MALS)) ont été proposées pour caractériser la

structure et la conformation des tanins natifs et oxydés ainsi que leur comportement en solution (i.e. agrégation) (Poncet-Legrand et al. 2003; Zanchi et al. 2009; Poncet-Legrand et al. 2010; Vernhet et al. 2011).

De façon générale, le rayon des tanins augmente avec le DPM des tanins natifs (Zanchi et al. 2009; Poncet-Legrand et al. 2010; Vernhet et al. 2011). Par ailleurs, ces tanins possèdent globalement une forme allongée. En revanche, les tanins oxydés sont plus compacts que les tanins natifs, à cause de la formation des liaisons intramoléculaires générées par l'oxydation (Zanchi et al. 2009; Poncet-Legrand et al. 2010).

Certains auteurs (Zanchi et al, 2009) ont rapporté, grâce aux données acquises par SAXS, que le taux de branchement des tanins natifs était dépendant de leur longueur (observations réalisées sur tannins issus de pellicule de pomme). Plus précisément, les oligomères (DP2 à DP7) ne sont quasiment pas branchés (ou à des taux extrêmement faibles). En revanche, les polymères (DP28 à DP150) peuvent contenir un taux de branchement d'environ 6%.

Par ailleurs, les travaux de Poncet-Legrand et al rapportent que l'oxydation générée sur des temps courts a pour effet d'engendrer principalement des réactions intermoléculaires de type « end to end » conduisant à un allongement des polymères. En revanche, sur des longs temps d'oxydation, les polymères ont tendance à se ramifier. Ainsi une augmentation relativement faible de la longueur a été relevée mais avec une forte augmentation du degré de polymérisation (Poncet-Legrand et al, 2010). Ces réactions dépendent aussi de la concentration ; les réactions intermoléculaires sont favorisées par les fortes concentrations tandis que les réactions intramoléculaires sont prédominantes en milieu dilué.

Par ailleurs, les polyphénols sont impliqués dans plusieurs phénomènes colloïdaux qui impactent la stabilité, la clarification et le goût du vin. (Poncet-Legrand et al. 2003; Zanchi et al. 2007; Pianet et al. 2008). L'auto-agrégation des tanins en solution est impactée par plusieurs facteurs tels que la teneur en alcool, la force ionique de la solution, ou encore la concentration et la structure des polyphénols (Poncet-Legrand et al. 2003; Zanchi et al. 2007; Pianet et al. 2008; Zanchi et al. 2009).

Le phénomène d'auto-association des polyphénols a été étudié par DLS dans des milieux modèles simulant le vin (Baxter et al. 1997; Poncet-Legrand et al. 2003). Des différences dans le comportement d'agrégation des flavan-3-ol monomères ont été observées (Baxter et al. 1997; Poncet-Legrand et al. 2003). Dans cette dernière étude, la diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été utilisée pour mesurer le rayon hydrodynamique des colloïdes formés par l'auto-agrégation des polyphénols en solution. La formation d'objets allant jusqu'à 150 nm a été observée dans une solution d'épicatéchine-3-O-gallate à une concentration de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans un milieu proche de celui du vin (milieu hydroalcoolique à 12% et pH = 3.4). En revanche, aucune forme d'agrégation n'a été détectée dans les solutions de catéchine, d'épicatéchine et d'épigallocatechine. Par conséquent, il a été suggéré que le cycle aromatique trihydroxylé apporté par l'acide gallique favorisait l'auto-association des flavanols. En revanche, le % G ne semble pas influencer l'auto-agrégation des tanins (Poncet-Legrand et al. 2003).

De plus, il a été observé que le DPm des proanthocyanidines a un effet complexe sur l'agrégation. Le degré d'auto-association augmente en premier lieu avec le DPm pour les polymères de masse molaire relativement faible puis diminue pour les tanins de masse molaire plus élevée, suggérant que les tanins les plus volumineux adoptent une conformation en solution qui améliore leur solubilité (Poncet-Legrand et al, 2003).

Parmi les paramètres qui jouent un rôle crucial dans les phénomènes colloïdaux figurent les propriétés du solvant comme la teneur en éthanol et la force ionique. Dans le vin, ces deux paramètres peuvent varier en fonction du cépage, des conditions de culture, ainsi que des procédés utilisés pour l'élaboration du vin.

La solubilité des tanins augmente nettement avec la teneur en éthanol dans le milieu (Pianet et al. 2008; Zanchi et al. 2009; Poncet-Legrand et al. 2010). Il a été montré par des mesures réalisées par DLS (Poncet-Legrand et al, 2003), SAXS (Zanchi et al, 2007) et par RMN (Pianet et al, 2008), que le diamètre des agrégats de tanins augmente lorsque la teneur en éthanol diminue.

A cela s'ajoute l'effet de la force ionique, qui vient contrebalancer l'effet solvatant de l'éthanol. La teneur en sel dans le milieu provoque une diminution de la solubilité et favorise l'agrégation des tanins

(Poncet-Legrand et al. 2003; Zanchi et al. 2007; Pianet et al. 2008). En effet, les interactions hydrophobes entre les résidus non polaires augmentent avec l'ajout de sel, (effet « salting-out », (Robinson & Jencks, 1965)). Cet effet peut, par exemple, diminuer les concentrations micellaires critiques des agents de surface (Miyagishi, Okada, & Asakawa, 2001).

2.2 *Caractérisation des polysaccharides*

Comme pour les polyphénols, différentes méthodes existent pour étudier les polysaccharides dans le moût de raisin et dans les vins. Pour déterminer leur teneur, toutes les méthodes proposées commencent par une étape de séparation de la fraction des PS du reste des constituants du vin avant de procéder à leur analyse. Cette extraction peut être réalisée soit par précipitation directe par un ajout massif d'éthanol suivie d'un passage au froid, soit par concentration-préparation, dialyse ou ultrafiltration ou encore par purification par SEC, à l'échelle préparative.

La teneur en PS peut alors être estimée par des techniques colorimétriques pour la quantification des polysaccharides totaux, par séparation par SEC couplé à un détecteur d'indice de réfraction différentiel (SEC-dRI) ou par la quantification des monosaccharides constitutifs, comme cela est décrit ci-dessous.

La quantification globale des PS du vin est généralement réalisée par colorimétrie, après avoir fait précipiter les colloïdes totaux du vin à l'aide d'éthanol (Segarra, Lao, López-Tamames, & De La Torre-Boronat, 1995). Cependant, ces méthodes ne donnent pas accès à la distribution de la masse molaire.

Une autre alternative pour évaluer la teneur en PS consiste à mesurer la surface des pics obtenus par SEC-dRI (Dubourdieu et al, 1986; López-Barajas et al, 1998; Palomero et al. 2007, 2009). Contrairement aux polyphénols, la séparation des PS par SEC est généralement réalisée à l'aide d'un tampon salin. Par conséquent, les assemblages macromoléculaires avec les polyphénols ne peuvent pas être analysés, car les polyphénols s'adsorbent sur la phase dans ces conditions.

En plus de la quantité relative de PS, déterminée grâce au dRI, cette méthode donne accès à la distribution de la taille et de la masse molaire des PS. Cela permet d'évaluer la quantité relative de chaque fraction obtenue par la séparation, tandis que les méthodes colorimétriques donnent uniquement

une information sur la quantité globale. Néanmoins, l'estimation de la masse molaire est généralement réalisée à l'aide d'une gamme de standards (i.e. pullulans), ce qui n'est toujours représentatif de la distribution réelle de la masse molaire de l'échantillon. L'ajout d'un détecteur de diffusion de la lumière aux angles multiples (MALS) au système (SEC-MALS-dRI) est une solution possible pour évaluer plus justement la distribution de la masse molaire absolue, sans avoir recours à la calibration de la colonne avec des standards (Gonçalves et al, 2002), (ce principe sera expliqué plus tard, dans la *section 3.3.1*).

Cependant, les couplages SEC-dRI ou SEC-MALS-dRI ne permettent pas de déterminer la concentration des différentes familles de polysaccharides (i.e. RG-II, PRAGs et MPs), car les PRAGs et les MPs présentent des gammes de masse molaire très larges et qui se recouvrent et ne sont donc pas séparés en SEC. Pour obtenir des informations sur les teneurs de ces familles de PS, la composition monosaccharidique est analysée, après une hydrolyse des PS et une dérivatisation des monosaccharides par l'acétate d'alditol (Quijada-Morín et al, 2014), suivie d'une analyse des composés dérivés par chromatographie en phase gazeuse (GC), généralement couplé à un détecteur d'ionisation par flamme (FID). Le calcul des concentrations de PS du vin prend en compte la composition des monosaccharides caractéristiques des familles connues de polysaccharides du vin, c'est-à-dire les MPs, les PRAGs et le RG-II, (Vidal et al. 2001) ainsi que du rendement d'hydrolyse (Doco et al., 1999). Tous les résidus de mannose sont attribués aux MPs. Les PRAG et principalement les protéines arabinogalactanes, les arabinogalactanes et les arabinanes, sont estimés à partir de la somme des résidus de galactose et d'arabinose, tandis que la concentration en RG-II est calculée à partir de la concentration en sucres rares de 2-O-méthyl-fucose et 2-O-méthyl-xylose, que seul le RG-II contient dans sa structure.

2.3 Caractérisation des assemblages moléculaires

La caractérisation des complexes résultant des interactions entre PS et polyphénols ou polyphénols – polyphénols présente un réel défi. D'une part, parce que les deux matériaux (polyphénols et PS) sont très polydisperses et variés en termes de structure. D'autre part, car leur étude nécessite l'utilisation d'instruments non invasifs afin de ne pas dégrader ces complexes macromoléculaires.

Les techniques telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS), (Riou et al. 2002; Bindon et al. 2016; Li et al. 2019) ou l'analyse par nano-traçage (NTA), (Bindon et al. 2016; Li et al. 2019) se sont révélées efficaces pour étudier les interactions tanins – PS. Ces techniques permettent de mesurer le rayon hydrodynamique des particules et permettent également de travailler dans un milieu proche de celui du vin. Ainsi, le risque de démanteler les agrégats est limité.

2.4 Conclusion sur les méthodes d'analyse des tanins et des polysaccharides et des complexes macromoléculaires

En résumé, les méthodes spectrophotométriques renseignent sur la teneur globale en composés phénoliques, de même que les dosages colorimétriques renseignent sur la teneur en PS totaux (PST). Cependant, ces méthodes ne donnent pas d'information sur la structure ni sur la distribution de la masse molaire. La structure des tanins natifs peut être étudiée par HPLC-MS après dépolymérisation. Cette méthode est applicable pour évaluer des quantités de proanthocyanidines (d'unités de flavan-3-ols libérées) mais elle peut conduire à des évaluations erronées des DP moyens, notamment lorsqu'il s'agit des tanins du vin (tanins évolués).

La distribution de masse molaire des tanins peut être obtenue par SEC couplée à la détection UV-visible., Cependant, l'élution hydrodynamique est également affectée par la forme moléculaire (par exemple, linéaire ou ramifiée) conduisant potentiellement à une mauvaise estimation de la masse molaire. En outre, ces conditions ne permettent ni l'analyse des polysaccharides qui ne sont pas détectés par spectrophotométrie UV ni celle des complexes macromoléculaires qui sont perturbés dans la phase mobile utilisée. D'autres procédures HPSEC ont été développées pour l'analyse des polysaccharides à l'aide d'un détecteur dRI et d'un tampon salin comme phase mobile (Doco, Quellec, Moutounet, & Pellerin, 1999) mais ces conditions ne permettent pas l'analyse des tanins car ils s'adsorbent sur la phase stationnaire. Les méthodes basées sur la diffusion de la lumière sont des alternatives intéressantes pour étudier les assemblages moléculaires entre PS et tanins. En effet ces méthodes présentent l'avantage de maîtriser le milieu dans lequel se trouvent les molécules d'intérêt. Ainsi, il est possible d'étudier le comportement des tanins et des PS dans un milieu proche de celui du vin. Toutefois, la limite de ces méthodes réside dans le fait qu'il n'y a pas de séparation préalable des mélanges. Or, cela peut constituer

une contrainte, notamment lorsque les solutions sont très polydisperses. A notre connaissance, aucune méthode séparative n'est actuellement disponible pour l'analyse des polysaccharides, des polyphénols et de leurs complexes. De plus, la littérature citée à propos des assemblages moléculaires porte uniquement sur des solutions modèles imitant le vin, réalisées à partir de fractions de tanins et de PS purifiées. Par conséquent, l'influence de la structure des tanins évolués du vin sur ce type d'interaction n'est pas clairement connue.

L'Asymmetrical Flow - Field Flow Fractionation (AsFIFFF) est une méthode efficace pour séparer les biopolymères qui a fait l'objet de recherches très actives au cours des dernières années (Nilsson, 2013). Cette méthode (qui sera discutée en détail dans la section 3) permet de séparer les molécules en fonction de leur rayon hydrodynamique. En outre, l'absence de phase stationnaire et les conditions de basse pression permettent de séparer les complexes macromoléculaires sans les dégrader (Runyon et al, 2014). L'AsFIFFF couplée en ligne avec la détection MALS permet de définir le rayon de gyration (R_g ou r_{rms}) de chaque fraction éluée pour les molécules de plus de 10nm. Avec la détection simultanée d'un dRI, le MALS permet de déterminer directement la masse molaire, sans étalonnage à l'aide de standard. En outre, le couplage AsFIFFF avec un spectromètre UV-visible permet la détection de molécules avec des chromophores tels que les composés phénoliques (Vernhet et al, 2011).

Le couplage AsFIFFF – MALS – UV – dRI a récemment été utilisé pour caractériser les substances polymériques dans la bière (Krebs et al, 2017) et le vin blanc (Coelho et al, 2017) sans apporter de préparation spécifique à l'échantillon, mais à notre connaissance, cette technique n'a jamais été utilisée pour analyser les macromolécules du vin rouge.

3 Le Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF)

La technique de Fractionnement par couplage Flux-Force (Field Flow-Fractionation, ou FFF) a été inventée par Calvin Giddings dans les années 1960. La commercialisation de la FFF a débuté dans les années 1990 et c'est au cours des 30 dernières années qu'elle est devenue une technique particulièrement utilisée pour la séparation des macromolécules et nanoparticules (Wahlund 2013; Nilsson 2013). Cette technique est extrêmement polyvalente. Elle convient à la séparation et à la caractérisation des molécules

et des particules pour une large gamme de taille allant de moins de 1nm à des diamètres de particules de quelque μm .

Plusieurs sous-techniques de la FFF existent, avec pour principale différence la nature du champ de force appliqué :

- Gradient de température (Thermal FFF)
- Force centrifuge (Sedimental FFF)
- Champ électrique (Electrical FFF)
- Champ magnétique (Mg FFF)
- Flux croisé (Flow FFF)

La section qui suit porte sur les principes généraux de la FFF. Ensuite, nous nous intéresserons à la Flow-FFF et plus particulièrement à l'AsFFFF.

L'influence des flux et du diamètre des particules sur leur temps de rétention seront abordés à travers ces aspects théoriques. Par ailleurs, certains paramètres modulables du canal tel que la membrane d'ultrafiltration seront également discutés.

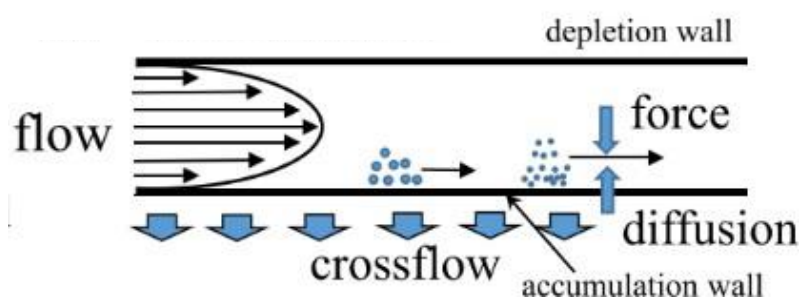
3.1 Principe du fonctionnement des techniques de la FFF

Toutes les sous-techniques de FFF reposent sur le même principe (Figure 39). La phase mobile s'écoule en régime laminaire à l'intérieur d'un canal dont l'épaisseur (w) est assez fine (quelques centaines de μm). Cet écoulement laminaire implique que la vitesse est maximale au centre du canal et nulle au niveau des parois. Perpendiculairement à cet écoulement, un champ de force est appliqué. Cette force peut être de plusieurs natures (flux d'éluant, centrifuge, champ thermique ou encore électrique) et permet un positionnement des analytes dans les différents vecteurs vitesses du flux d'écoulement, sur la base de critères physico-chimiques tels que la taille, la densité, ou encore la charge, selon la nature de la force appliquée.

Une fois que l'échantillon a été injecté à l'intérieur du canal, la première étape de la séparation est l'application du champ de force qui permet le déplacement des analytes vers la paroi d'accumulation. La vitesse de déplacement des analytes est déterminée par la force d'interaction champ de force-analyte

et cette vitesse se met en équilibre avec le pouvoir de diffusion des analytes, qui est d'autant plus grand que l'analyte est petit. Ainsi, les particules les plus petites seront positionnées plus haut par rapport au profil de vitesse que les particules les plus grosses (qui seront plus proches de la paroi d'accumulation). Une fois que l'équilibre a été atteint, le flux d'écoulement est créé le long du canal. Le vecteur vitesse de ce flux étant plus faible près des parois, les analytes à proximité de celles-ci se déplaceront plus lentement. Leur temps de rétention sera alors plus important. Ce principe de base permet la séparation des molécules ou des objets. Cette technique est une très bonne alternative à la SEC lorsqu'il s'agit de séparer des protéines ou bien des polymères de tailles très importantes, ou des structures agrégées comme les micelles. En effet, ces objets ne sont pas accessibles par la SEC car leur taille moléculaire ne leur permet pas de pénétrer les pores de la phase stationnaire (Giddings, 1982).

Figure 9. Principe général de la FFF (Moon, 2019)



3.1.1 La Flow-FFF

3.1.1.1 Anatomie du canal de la FlFFF Symétrique (SyFlFFF) et de la FlFFF Asymétrique (AsFlFFF)

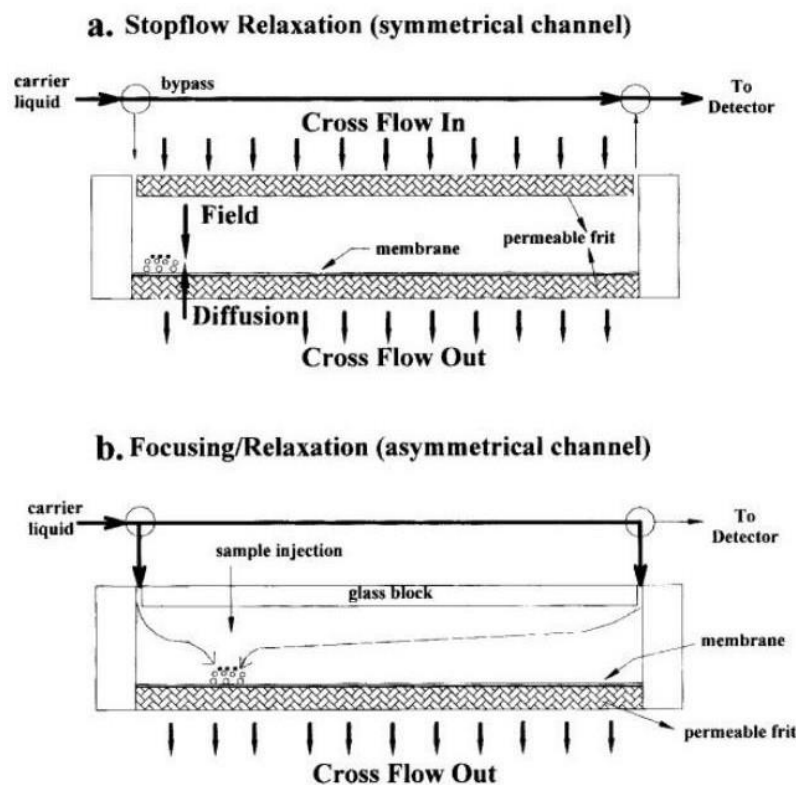
La Flow-FFF comprend deux sous-techniques : la Symmetrical – Flow – FFF (SyFlFFF, ou SF4) et l'Assymetrical – Flow – FFF (AsFlFFF ou AF4). Cette dernière a largement été développée par Karl-Gustav Walhund et représente la sous-technique FFF la plus répandue.

Pour ces deux types de Flow-FFF, le flux d'écoulement (aussi appelé flux détecteur ou flux tangentiel (Q_{out}) ainsi que le champ de force (également appelé flux croisé : Q_c) sont sous forme liquide, et créés à partir de la phase mobile utilisée.

La paroi d'accumulation inférieure est constituée d'une membrane, dont le seuil de coupure et le matériau peuvent être modulés selon le type d'analyte. La méthode de SyFIFFF possède un fritté de céramique sur les blocs inférieur et supérieur du canal, par lesquels le flux croisé est évacué (Figure 10a). Dans le cas de l'AsFIFFF, le fritté supérieur a été remplacé par un bloc imperméable (Wahlund & Giddings 1987). Par conséquent, le flux croisé est généré par aspiration à travers le fritté du bloc inférieur (Figure 10b).

L'AsFIFFF connaît un intérêt croissant pour la caractérisation des macromolécules et des particules colloïdales dans les matrices alimentaires (Nilsson, 2013). En effet, les macromolécules contenues dans les matrices agro-alimentaires présentent souvent une polydispersité importante et ont tendance à former des structures agrégées. Or, l'AsFIFFF se présente comme un outil performant pour caractériser la taille et/ou la forme de ces particules dans leur intégrité.

Figure 10. Schéma du canal de la SyFIFFF (a) et de l'AsFIFFF (b)



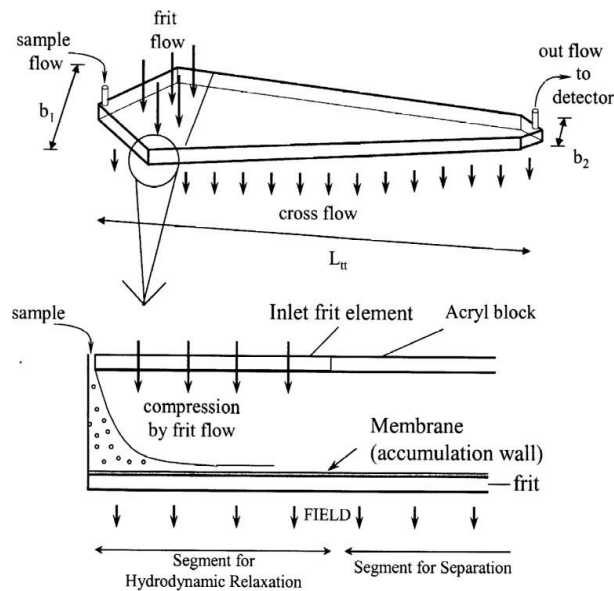
L'efficacité de l'AsFIFFF pour la caractérisation des macromolécules issues de matrices agro-alimentaire a été démontrée pour les protéines (Litzén & Wahlund 1989), les polysaccharides (Wahlund;

Litzén 1989), pour la caractérisation des tanins natifs et oxydés (Vernhet et al. 2011) et des protéines du vin blanc (Coelho et al, 2017).

D'autres auteurs ont utilisé l'AsFIFFF couplée à un système de multi-détection (AsFIFFF-UV-MALS-dRI), pour étudier les colloïdes présents dans les boissons alcoolisées telles que la bière (Krebs et al, 2017, 2019), sans apporter de préparation particulière à l'échantillon (i.e : purification, extraction).

3.1.1.2 Le cas particulier du canal Frit-inlet (FI-FIFFF)

Figure 11. Diagrammes schématiques montrant la relaxation hydrodynamique dans un canal avec un fritté en entrée (FI-FIFFF) (Park, Paeng, Yoon, Song, & Moon, 2002)



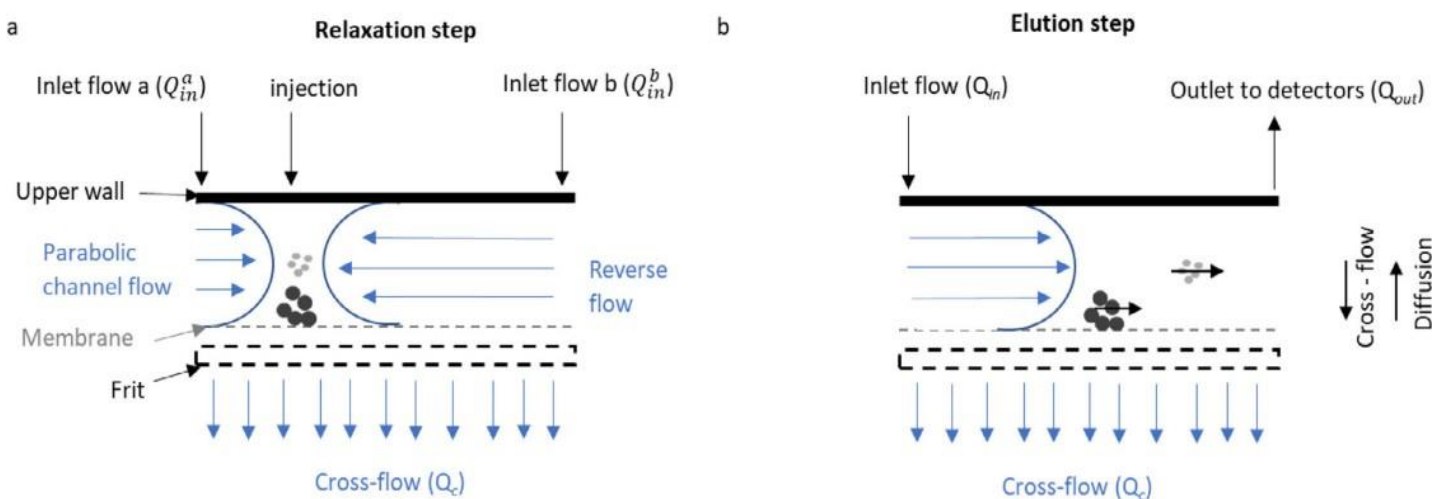
Le Frit-inlet FIFFF (ou FI-FIFFF) est un outil dérivé de l'AsFIFFF. Il a été développé pour permettre d'analyser des protéines ou agrégats très sensibles aux flux et principalement à l'étape de focus, afin de limiter la formation d'artéfacts. Le FI-FIFFF se comporte comme l'AsFIFFF classique, à la différence qu'un fritté de quelques centimètres de longueur est positionné juste après le port d'injection du canal. Ce fritté a pour rôle d'émettre un flux qui va permettre de la relaxation hydrodynamique. Autrement dit l'étape de focus et d'équilibrage des forces entre les analytes et le champ de force se déroule en continu ne nécessitant plus deux étapes, comme cela est le cas pour l'AsFIFFF (Figure 11).

3.1.2 Principe de fonctionnement détaillé de l'AsFIFFF

Le principe de séparation de l'AsFIFFF se décompose en deux étapes :

Premièrement, l'étape de relaxation (Figure 12a) : un champ de force permet de créer un gradient de concentration de l'échantillon depuis la membrane d'ultrafiltration qui constitue le support d'éluion. La diffusion des analytes travaille contre ce champ de force (mouvement brownien). Or, le pouvoir de diffusion des molécules dépendant de leur taille et la distance moyenne entre les objets et la membrane en dépend. Concrètement, les molécules de petite taille se retrouvent plus en hauteur que les grosses molécules, par rapport à la membrane.

Figure 12. Mécanisme de séparation de l'AsFIFFF, a : étape de relaxation, b : étape d'éluion



Deuxièmement, l'étape d'éluion (Figure 12b) : un flux tangentiel à la membrane s'écoulant en régime laminaire est créé le long du canal, perpendiculairement au champ de force : le flux croisé. La forme parabolique du profil de vitesse du flux tangentiel permet de traduire la différence de hauteur des analytes vis-à-vis de la paroi d'accumulation, en différence de vitesse de transport le long du canal. En d'autres termes, les composants les plus éloignés de la paroi d'accumulation (les plus petites molécules) sont transportés plus rapidement en aval du canal que ceux qui en sont proches (les plus grosses molécules), voyant un positionnement dans des flux de vitesse moins élevés. Ce processus permet donc une séparation des composés par ordre de taille croissante.

3.1.3 Théorie

Les fondements théoriques de la Flow-FFF ont été établis en 1976-1978 (Giddings, Yang, & Myers 1976; Giddings 1978). Cette procédure a déjà bien été décrite dans la littérature (Wahlund, 2013) et un bref résumé de la théorie de la Flow-FFF est proposé ici.

Cette théorie est basée sur les lois classiques de la physique, telles que le mouvement Brownien, la diffusion translationnelle, les écoulements laminaires, coefficient et forces de frottement et trainée induite par le transport du fluide. Les équations énoncées ci-dessous sont valables pour la SyFIFFF et l'AsFIFFF.

3.1.3.1 Paramètres de rétention et temps de rétention (R_L et t_r)

Le paramètre de rétention R_L est défini comme la vitesse moyenne d'un analyte par rapport à la vitesse moyenne du flux de transport. Ce qui revient à exprimer ce paramètre par un rapport de temps, puisque la distance parcourue est la même pour le flux à t_0 que pour l'analyte à t_r (longueur du canal). (eq. 4)

$$R_L = \frac{t_r}{t_0} \approx \frac{1}{6\lambda}$$

où t_r est le temps de rétention, soit le temps nécessaire à l'analyte pour traverser le canal. Le t_0 peut s'exprimer de la façon suivante pour un canal de forme trapézoïdale, utilisé pour l'AsFIFFF (eq.5)

$$t_0 = \frac{V_0}{Q_c} \ln \left(1 + \frac{Q_c}{Q_{out}} \left(1 - \frac{w(b_0 z' - \frac{b_0 - b_L}{2L} z'^2 - y)}{V_0} \right) \right)$$

où Q_{out} est le débit du flux d'écoulement allant vers les détecteurs, w la hauteur du canal et V_0 le volume du canal. Les termes b_0 , b_L , L , z' , et y sont les largeurs du trapèze aux extrémités côté entrée et sortie, respectivement, la longueur du canal, et la distance entre l'extrémité de l'entrée du canal jusqu'au point de focus (là où l'échantillon est concentré) (Litzén & Wahlund 1991).

Le rapport R_L peut être estimé approximativement par 6λ comme suit : (eq. 5 et 6)

$$l = \frac{D}{U} \text{ et } \lambda = \frac{l}{w}$$

où l représente longueur du profil de distribution de concentration, D , le coefficient de diffusion de l'analyte et w , la hauteur du canal.

Donc (eq. 7)

$$\lambda = \frac{D}{Uw}$$

D'où : (eq. 8 et 9)

$$R_L = \frac{1}{6} \frac{Uw}{D} = \frac{t_r}{t_0} \text{ et } t_r = \frac{Uwt_0}{6D}$$

Il possible d'exprimer U (vitesse du flux croisé) en débit (Q_c), une grandeur connue : (eq. 10)

$$U = \frac{Q_c w}{V_0}$$

Par conséquent, le temps de rétention d'un analyte s'exprime comme suit : (eq. 11)

$$t_r = \frac{t_0 Q_c w^2}{6D V_0}$$

or, $Q_{out} = \frac{V_0}{t_0}$ d'où : (eq.12)

$$t_r = \frac{w^2 Q_c}{6D Q_{out}}$$

Par conséquent, la rétention dépend uniquement de la hauteur de canal, du rapport des flux, et du coefficient de diffusion (D). Cette relation met bien en évidence que si Q_c augmente et que les autres paramètres restent constants, alors, le t_r augmente. Par ailleurs, le coefficient de diffusion qui apparaît dans l'équation 12, peut permettre de remonter au R_h des particules, à partir des données expérimentales (t_r des composés du fractogramme), en remplaçant D dans l'équation 12 par la relation de Stoke-Einstein : (eq. 13)

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h}$$

où, η représente la viscosité, k représente la constante de Boltzmann et T , la température et d_h le diamètre hydrodynamique (soit le deux fois la valeur du R_h).

En combinant les équations 12 et 13, on obtient : (eq.14)

$$t_r = \frac{w^2 \pi \eta R_h Q_c}{k T Q_{out}}$$

Le R_h peut alors être obtenu de la façon suivante : (eq.15)

$$R_h = R_L \frac{k T V_0}{\pi \eta w^2 Q_c}$$

3.2 Avantages et inconvénients de l'AsFIFFF

Un des premiers avantages de l'AsFIFFF est la large gamme de séparation (de 1nm à quelques μm) et de concentration, ce qui élimine le besoin d'avoir plusieurs colonnes SEC et évite également le risque d'exclusion des plus gros composés. Par ailleurs, elle permet un grand choix de phases mobiles pour les expérimentations et il est également aisé de changer de solvant, avec un équilibrage rapide du milieu. Comparé à la SEC, la dégradation des analytes par cisaillement ou les phénomènes d'interaction avec le système, sont réduites du fait de l'absence de phase stationnaire et des conditions de séparation à basse pression (pression < 30bars).

Néanmoins, des interactions attractives ou répulsives peuvent se produire avec la membrane, d'autant plus que la majorité des composés de l'échantillon sont concentrés à la surface de la membrane (Kassalainen 2012). Bien que l'on connaisse l'épaisseur de l'entretoise (spacer) qui définit la hauteur du canal (w), l'épaisseur effective du canal sera en réalité plus faible. Cela s'explique par la compressibilité de la membrane d'ultrafiltration. Ce phénomène dépend donc du caractère compressible de la membrane utilisée (i.e. matériau, seuil de coupure) et du taux d'interaction membrane – analyte. La membrane constitue donc un point faible de la technique AsFIFFF, rendant la définition de l'épaisseur du canal approximative, ce qui impacte l'estimation du R_h théorique. Un autre inconvénient est la forte dilution de l'échantillon lors de la migration dans le canal jusqu'au détecteur (Wahlund, 2013).

3.2.1 Influence des paramètres intrinsèques du canal

3.2.1.1 La géométrie du canal

Le canal d'AsFFFF comporte une géométrie bien spécifique qui définit la surface et le volume dans lesquels se déroule la séparation. Ces paramètres sont définis par la longueur, la largeur/forme ainsi que la hauteur du canal.

La hauteur du canal (w) figure parmi les paramètres ayant le plus d'impact sur la performance de séparation (Wahlund 2013; Gigault et al. 2014). Il a été démontré que la vitesse de séparation et la résolution pouvaient être améliorées en diminuant la hauteur du canal de 500 à 130 μ m (Wahlund & Litzén 1989; Litzén et al. 1993).

3.2.1.2 La membrane d'ultrafiltration

Comme cela a été mentionné plus haut, des interactions entre la membrane et les analytes peuvent avoir lieu (Kassalainen 2012; Bendixen et al. 2014). Ces interactions sont la principale cause de la perte par adsorption de l'échantillon pendant la séparation (Wahlund 2013; Gigault et al. 2014).

Un moyen rapide et efficace d'évaluer ces pertes est de comparer la quantité d'échantillon récupéré avec et sans flux croisé et de déterminer le taux de récupération de l'analyte (Gigault et al, 2014). Un faible taux de récupération peut indiquer une adsorption importante de l'analyte sur la membrane, ou que l'échantillon contient une part non négligeable de molécules dont la taille est inférieure au seuil de coupure de la membrane. Par conséquent, le choix du matériau de la membrane parmi les disponibilités commerciales (i.e. : cellulose régénérée, CR, polyvinylpyrrolidone, PVP ou polyéthersulfone, PES, Polypropylène, PP) et du seuil de coupure, doit être effectué en fonction des composés et de la matrice que l'on souhaite investiguer. Concernant le comportement de la matrice vin vis-à-vis des membranes, des auteurs rapportent qu'il existe une relation directe entre la polarité des membranes de filtration et la quantité de polyphénols et de PS adsorbés (Vernhet et al. 1997). Leurs résultats montrent que les PS adsorbés sont principalement des AGPs et des MPs et que leur taux d'adsorption diminue à mesure

que la polarité de la membrane augmente. En revanche l'adsorption maximale des tanins s'est produite sur la membrane la plus polaire.

Par ailleurs, il a été observé que les polyphénols et les polysaccharides sont très peu adsorbés par des membranes en polypropylène (PP) à l'inverse des membranes en PES (Cartalade & Vernhet, 2006). Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle les agrégats de polyphénols et de polysaccharides présents dans le vin rouge contribuent fortement à l'encrassement par adsorption, et que l'interaction entre les polyphénols et la surface de la membrane en est la principale force motrice. Par conséquent, l'utilisation de membranes PES pour l'étude des colloïdes du vin rouge par AsFIFFF, ne semble pas être adéquate.

3.3 Les détecteurs couplés à l'AsFIFFF

Les détecteurs les plus couramment utilisés en couplage avec l'AsFIFFF (mais aussi avec la plupart des sous-techniques de FFF) sont l'UV, le dRI, le MALS et aussi parfois la DLS, qui peut être positionnée sur un des angles du MALS. Dans ce cas, on parle de Quasi elastic scattering (Qels). Ces détecteurs sont souvent montés en série à la sortie du canal de l'AsFIFFF. Cette section porte plus spécifiquement sur les détecteurs MALS - Qels et sur la détermination de la masse molaire des composés ainsi que du rayon de gyration (R_g) et du rayon hydrodynamique (R_h).

3.3.1 Détermination de la masse molaire et du rayon de gyration par la diffusion statique de la lumière aux angles multiples (MALS)

La quantité de lumière diffusée par une solution contenant des macromolécules dépend, entre autres, de la concentration des macromolécules, de l'angle de la lumière incidente, de l'angle de diffusion, de la masse molaire et de la taille des macromolécules (Strutt 1910; Einstein 1910). L'équation fondamentale reliant ces paramètres peut s'écrire de la façon suivante (eq. 16) :

$$\frac{R_\theta}{Kc} = MMP(\theta)$$

où R_θ est le rapport de Rayleigh, qui est proportionnel à la quantité de lumière diffusée à l'angle θ , c la concentration qui peut être donnée pour chaque fraction éluée par le dRI ou l'UV, MM , la masse molaire,

et $P(\theta)$ une fonction de diffusion des particules. K est une constante optique (affectée, entre autres, par la longueur d'onde de la lumière entrante et l'indice de réfraction du solvant) et s'écrit ainsi : (eq. 17)

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda_0^4 N_a}$$

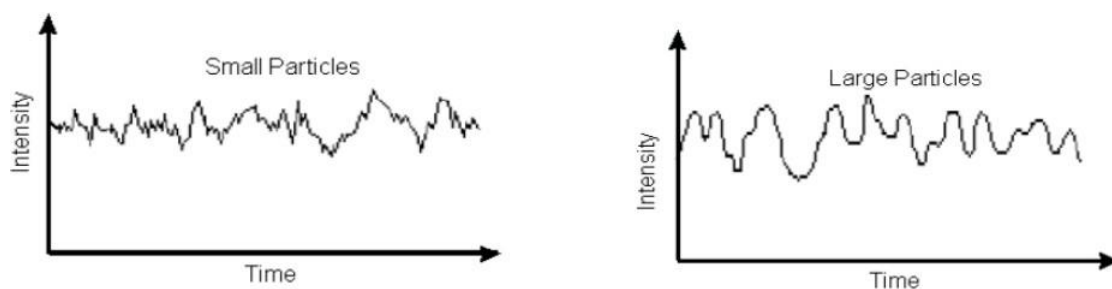
Où, n_0 est l'indice de réfraction du solvant, dn/dc est l'incrément différentiel de l'indice de réfraction entre le solvant et l'analyte. Ce dernier est propre à un type de molécule (e.g. protéine) pour un solvant donné. λ_0 est la longueur d'onde du laser incident et N_a le nombre d'Avogadro.

Théoriquement, la masse molaire peut être obtenue en mesurant l'intensité de la lumière diffusée à l'angle 0 du rayon incident, puisqu'à $\theta = 0$, $R = KMMc$, comme l'indique l'équation 16. Cependant, il est impossible de mesurer ce paramètre expérimentalement. Le principe du MALS repose donc sur la mesure de la lumière diffusée aux angles >0 afin d'estimer par extrapolation l'intensité de lumière diffusée à l'angle 0. Cette extrapolation est effectuée via le graphe de Debye qui peut être construit selon trois méthodes : Debye, Zimm et Berry. Par exemple, le graphique de Debye selon le formalisme de Zimm peut être obtenu avec la relation suivante : (eq. 18)

$$\frac{Kc}{R\theta} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \frac{1}{MM} (R_g)^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Cette relation permet donc de déduire la masse molaire à partir de l'ordonnée à l'origine (grâce à l'extrapolation à partir des angles >0), puis de déduire R_g à partir de la pente. Par ailleurs, elle est valable pour un milieu dilué (ce qui est souvent le cas en chromatographie).

Figure 13. Intensité de la lumière diffusée au cours du temps



3.3.2 Détermination du rayon hydrodynamique par la diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS, permet de mesurer les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée au cours du temps (Figure 13). Ces fluctuations sont mesurées à un seul angle, généralement 173°, afin de limiter les phénomènes de diffusion liés aux très gros objets, qui peuvent masquer la présence de population d'objets plus petits (Maret, 1997). Ces fluctuations sont liées au mouvement brownien des analytes et sont dépendante du milieu (viscosité du solvant, température et taille des objets). La mesure permet d'obtenir la fonction d'autocorrélation associée à la vitesse de diffusion de l'objet, donc à sa taille. Le corrélogramme peut ensuite être analysé par un grand nombre de méthodes qui ne seront pas détaillées ici (Pecora, 2013).

4 Conclusion

En somme, ce chapitre d'étude bibliographique a permis de mettre en perspective que le vin rouge est le résultat d'un mélange hautement complexe, dont les deux principales familles macromoléculaires sont les tanins et les polysaccharides. Ces macromolécules et leurs interactions exercent un impact sur les propriétés gustatives telle que l'astringence, un des principaux attributs sensoriels des vins rouges.

Il a été vu que l'astringence des vins était en lien avec la concentration et la masse molaire des polyphénols. Or, les difficultés liées à la caractérisation des composés polyphénoliques de hauts poids moléculaires, tel que les tanins dérivés et les pigments polymérisés du vin rouge, ne permettent pas d'établir un lien clair entre la masse molaire et la structure de ces composés et leur impact sur l'astringence. Par ailleurs, les polysaccharides sont également acteurs de la sensation d'astringence en bouche. Leur présence tend à adoucir l'astringence des vins, par le biais d'interactions avec les tanins. Ainsi, prendre en compte l'implication de ces polysaccharides est essentiel pour appréhender l'astringence des vins. Les méthodes qui ont été discutées dans ce chapitre sont limitées lorsqu'il s'agit de caractériser l'ensemble de cette fraction macromoléculaire et les complexes, dans les vins rouges.

L'AsFIFFF avait un bon potentiel pour fractionner ces macromolécules. Comme cela a été discuté plus haut, les travaux de Krebs et al, ont montré que l'AsFIFFF couplé à un système de multi-détection était

une technique prometteuse pour séparer et caractériser la fraction colloïdale de la bière, sans qu'il soit nécessaire d'apporter de préparation spécifique aux échantillons (Krebs, Becker & Gastl 2017; Krebs et al. 2019). Des vins blancs de Chardonnay ont également été analysés par AsFIFFF couplée à l'UV-visible et au dRI, sans préparation des échantillons. Il a été conclu que l'AsFIFFF permettait de fractionner la matière colloïdale des vins blancs (Coelho et al, 2017).

Cependant, à ce jour, aucune donnée n'est disponible dans la littérature quant à l'analyse du vin rouge par AsFIFFF. Par conséquent, un des premiers objectifs sera d'évaluer l'impact des différents paramètres de l'AsFIFFF (e.g. géométrie du canal et débit des flux), afin de déterminer les conditions optimales pour l'analyse des vins rouges.

Chapitre II

Matériels et méthodes

1 Produits chimiques et solvants

L'eau ultra pure a été obtenue à partir d'un système Merck MilliQ integral 15. L'éthanol, l'acide formique, l'acide acétique, l'HCl et le méthanol ont été achetés chez Carlo Erba (France) et présentaient une pureté analytique (99,9%, grade HPLC). Le diméthylformamide (DMF) et l'acétonitrile ont été fournis par VWR et présentaient également une pureté analytique (99,9%, grade HPLC).

L'azide de sodium et le nitrate de sodium ont été achetés chez Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) et ont une pureté de 99,5%. Le sulfate de potassium (K_2SO_4) a été acheté chez Merck (Darmstadt, Germany, pureté de 99%). Le phloroglucinol, l'acide ascorbique, le chlorure de Lithium, le formiate d'ammonium et chlorure de Sodium ont été fournis par SigmaAldrich et présentaient également une pureté de 99,9%

Le sérumalbumine bovine (BSA) a été fournie en solution prête à l'emploi, concentrée à $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ par Thermo Scientific (USA). Les pullulans standards ont également été fournis par Thermo Scientific et avaient une pureté de 99,9%. Leur M_w était de 198 et 397kDa (P200 et P400). Les standards de flavan-3-ol : (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (-)-épicatéchine-3-O-gallate, la (-)-épigallocatechine et les procyanidines dimères A2 et B2 ont été achetés auprès de Extrasynthèse. Les fractions de procyanidines DP6, DP12 et DP40 ont été extraites à partir de pellicule de pomme, comme décrit dans la *section 3.2*.

2 Echantillons de vin

Le vin utilisé pour le développement de la méthode a été vinifié à l'échelle pilote (300L) à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan (Toulouse, France) à partir de Syrah, vendangée en 2018. Trois autres vins rouges du commerce (vin a, vin b et vin c, millésime 2018) ont été utilisés pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode. Quatre autres vins rouges commerciaux ont été utilisés comme source pour en extraire la fraction polysaccharidique (échantillons non répertoriés). Une série de 54 vins rouges issus de six appellations d'origine protégée (AOP) de la région du Languedoc, France (Corbières-Boutenac, la Clape, Faugères, Minervois-Terrasses de l'Argent Double, Languedoc-Montpeyroux et Pic-Saint-Loup) a été utilisée pour étudier les liens entre les fractogrammes de l'AsFIFFF et leur note

d'astringence. Ces échantillons ont été fournis par Coline Leriche qui les a collectés et utilisés dans le cadre de sa thèse, portant sur l'étude de la typicité sensorielle de ces AOP (Leriche et al, 2020). Ces vins ont été produits en 2016. La plupart des échantillons étaient des vins d'assemblage, principalement à base de Grenache, Syrah et Carignan, vendus entre 5 et 20 euros. Les vins de l'AOP Corbières-Boutenac ont été vieillies en fût. Les vins ont été codés de n°1 à n°54 (Leriche et al, 2020). Ces vins, ainsi que les expérimentations dans lesquelles ils sont impliqués, ont été répertoriés dans le Tableau 2

Tableau 2. Liste des vins utilisés

<i>nom échantillon</i>	<i>AOP</i>	<i>Millésime</i>	<i>expérimentation</i>	<i>Chapitre</i>
vin de syrah	-	2018	développement et validation de la méthode AsFIFFF	III/IV
a, b, c	Languedoc	2018	analyse de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode AsFIFFF	III
vins n°1 - 10	Corbières-Boutenac			
vins n°11 - 19	La Clape			
vins n°20 - 29	Faugère			
vins n°30 - 37	Minervois-Terrasses de l'Argent Double	2016	analyse des liens entre les fractogrammes et l'astringence des vins	V
vins n°38 - 45	Languedoc-Montpeyrroux			
vins n°46 - 54	Pic-Saint-Loup			

Plusieurs prises d'essais ont été réalisées dès l'ouverture de la bouteille. Cinq prises d'essais de 1mL des vins répertoriés dans le tableau 2 ont été réparties individuellement pour les différentes analyses. Une autre prise d'essai de 20mL destinée à la collecte de fractions (qui sera décrite plus loin) a été réalisée à partir du vin de syrah et des vins n°16, 25, 37, 40, 43 et 52. Ces prises d'essais ont été mises à sec sous vide avec un évaporateur Genevac EZ-2 plus à 8 mbars/40°C et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour limiter l'évolution de l'échantillon.

3 Obtention des fractions purifiées de polysaccharides et de tanins

3.1 Extraction et caractérisation de la fraction polysaccharidique à partir de vin rouge

La fraction PS a été isolée à partir de quatre vins rouges commerciaux, à l'aide d'une méthode qui a déjà été décrite auparavant (Quijada-Morín et al, 2014) et qui peut être brièvement résumée ici. Un volume de 5ml de vin a été déposé sur une phase de polyamide ; ainsi, les polyphénols du vin ont été adsorbés et les polysaccharides ont été élués en utilisant le NaCl 1M comme phase mobile. L'éluat a été concentré 2,5 fois sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

L'échantillon concentré a été injecté sur une colonne Superdex 30 Hiload 16/60 semi-préparative, avec une hauteur de 600mm et un diamètre de 26mm (GE Healthcare Bioscience, Uppsala, Suède). Un tampon de formiate d'ammonium à 30 mM (pH ajusté à 5 par l'acide formique) a été utilisé comme phase mobile. La détection a été assurée par indice de réfraction différentiel (dIR, Erma), avec une cellule thermostatée à 40°C.

Cette procédure a été effectuée deux fois sur chacun des quatre vins. Les premiers extraits de polysaccharides des quatre vins ont été mélangés pour obtenir une fraction de PS en quantité suffisante. Cette fraction a été lyophilisée et stockée sous forme de poudre à -80 °C jusqu'à l'analyse AsFIFFF-UV-MALS-Qels-dRI. Les seconds extraits ont été analysés pour déterminer leur composition en polysaccharides qui a été estimée à partir de la concentration des résidus glycosyles individuels, déterminée par GC-FID après hydrolyse, réduction et acétylation. La quantité totale de PS de la fraction mélangée destinée à être analysée par AsFIFFF-UV-MALS-Qels-dRI, a été estimée à partir des concentrations de son réplica qui a été analysé par GC-FID. La quantité totale de PS était de 8,3 mg (3,1 ; 2,6 et 2,6 mg de RG-II, PRAGs et MPs, respectivement).

3.2 *Extraction et caractérisation des fractions de tanins à partir de pellicule de pommes*

Les fractions de tanin ont été préparées à partir d'une poudre lyophilisée issues de tissus corticaux de pommes (variétés : *Malus domestica*, *Kermerrien* et *Avrolles*), comme cela a été décrit auparavant (WatreLOT et al, 2013). Succinctement, chaque poudre a d'abord été extraite à l'aide de MeOH acidifié (acide acétique à 1%) pour éliminer les composés phénoliques de plus faible masse molaire. Ensuite, un solvant acétone/eau/acide acétique 60:39:1 (v/v/v) a été utilisé pour obtenir les fractions contenant des tanins de masse molaire plus élevée. Après l'élimination du solvant organique par évaporation rotative sous vide et l'élimination de la chlorophylle et des lipides résiduels par extraction à l'hexane, la phase aqueuse a été percolée sur une phase Relite en colonne. Les sucres résiduels et les polysaccharides ont été élués à l'aide d'eau acidifiée (acide acétique à 1 %) et la matière phénolique a été élue à l'aide de MeOH acidifié (acide acétique à 1 %). Un fractionnement supplémentaire a été effectué par chromatographie sur colonne de Fractogel, en utilisant successivement du MeOH acidifié (1% d'acide acétique) et de l'acétone/eau/acide acétique 60:39:1 (v/v/v). Les fractions acétoniques contenant les tanins de plus haute masse molaire des pommes *Kermerrien* ou *Avrolles* ont été lyophilisées et maintenues à -80 °C jusqu'à l'analyse. Ces extraits ont été caractérisés par HPLC après clivage acido-catalysé de la liaison interflavanique en présence de phloroglucinol, comme décrit antérieurement (WatreLOT et al, 2013). Les DPm des fractions taniques de *Kermerrien* et d'*Avrolles* ont été calculés respectivement à 11,8 (rendement de la phloroglucinolyse : 66,7 %) et 41,7 (rendement de la phloroglucinolyse : 63,6 %). Ces fractions de tanin ont été appelées respectivement DP12 et DP40.

4 *Analyse par AsFIFFF-UV-MALS-Qels-dRI*

4.1 *Instrumentation*

Un système HPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 comprenant un dégazeur, une pompe isocratique et échantillonneur automatique a été utilisé pour injecter les échantillons et pour le transport de la phase mobile à travers le système. Le système HPLC a été couplé à l'Eclipse AF4 (Wyatt Technology, Europe, Allemagne). Ce système régule les flux dans le canal de séparation (canal format long, Wyatt

Technology Europe, Allemagne). La hauteur du canal a été fixée à 350µm et ses dimensions L, b₀ et b_L étaient respectivement de 23,5 ; 2,1 et 0,6cm.

Un système de multidétection constitué d'un détecteur UV-visible à barrette de diode UVD340 (DAD), un détecteur MALS-Qels Dawn Heleos II et un dRI Optilab T-Rex (Wyatt Technology) a été couplé à la sortie du canal. Le détecteur DAD a été réglé sur $\lambda = 280$ et 230nm, la lampe MALS-Qels sur $\lambda = 663,8$ nm et la lampe dRI à $\lambda = 658$ nm avec cellule thermostatée à 25 °C. Le logiciel Chromeleon 6.8 a été utilisé pour contrôler les flux de l'injecteur automatique, de la pompe et de l'Eclipse.

L'acquisition des données MALS-Qels et dRI a été réalisée par le logiciel Astra 6.1, tandis que les données UV, ont été acquise par le logiciel pilote Chromeleon 6.8. Les performances du système pour la séparation et la détermination de la masse molaire ont été vérifiées avec une solution de BSA (préparée à une concentration de 2mg/ml dans une solution de NaCl à 0,9% (m/v) (Nilsson, 2013). La phase mobile utilisée était composée de 88% d'eau (v/v), 12 % d'éthanol (v/v). De l'acide formique a été ajouté pour ajuster le pH à 3,5 et un sel de potassium (K₂SO₄) a également été incorporé à hauteur de 1g.L⁻¹ (K⁺ équivalent). De plus, 0,02% d'azide de sodium (w/v) ont été ajouté pour inhiber le développement des bactéries au sein du système. Enfin, cette solution a été filtrée à 0.1µm avec un filtre PTFE (Merk). Pour l'analyse des vins en AsFIFFF, le vin séché a été dissous dans 1mL d'un vin synthétique composé d'eau/éthanol (88:12, v/v) ajouté à 0,05% (v/v) d'acide formique pur pour ajuster le pH à 3,5.

4.2 Détermination du taux de recouvrement

Le taux de recouvrement sur l'AsFIFFF a été calculé à partir du détecteur UV à $\lambda = 280$ nm, comme le pourcentage de la matière récupérée après la séparation en utilisant l'équation suivante (eq. 19) :

$$\frac{A_1}{A_0} \cdot 100$$

Où A₁ est la surface calculée à partir de la surface du signal UV à 280nm post séparation, et A₀ la surface du signal obtenu sans appliquer de flux croisé.

4.3 Développement de la méthode AsFlFFF-UV-MALS-Qels-dRI

4.3.1 Effet du seuil de coupure de la membrane

L'effet du seuil de coupure a été évalué sur trois membranes en cellulose régénérée (Consensus, Allemagne) dont le seuil de coupure était de 1, 5 et 10kDa. Le volume de vin injecté était de 50 μ L. Dans le cadre de cet essai, la programmation du débit des flux au cours du temps a été définie de façon arbitraire. L'étape de relaxation a été appliquée pendant 6 min (de 2 à 8 min), durant lesquelles le flux est divisé en deux flux opposés, l'un provenant de Q_{in}^a et l'autre de Q_{in}^b (Figure 11, Chapitre I). La proportion de Q_{in}^a et de Q_{in}^b a été réglée de manière à ce que le point focus se situe à ~15 % de la hauteur du canal à partir du port d'injection. Le flux croisé (Q_c) a été appliqué à 3 mL.min⁻¹. Ensuite, l'étape d'élution a été programmée de 8 à 20 min. Au cours de cette étape, le débit de sortie vers les détecteurs (Q_{out}) a été fixé à 1 mL.min⁻¹ et Q_c a été maintenu constant à 3 mL.min⁻¹ pendant 5 min (8 à 13 min). Ensuite, un gradient linéaire a été appliqué pendant 1 min (de 13 à 14 min) pour réduire Q_c à 0.2 mL.min⁻¹. Enfin, Q_c a été maintenu à 0,2 mL.min⁻¹ pendant 3 min (14 à 17 min), avant d'être complètement arrêté pour les 3 min restantes.

4.3.2 Effet du débit sur le fractionnement des échantillons

4.3.2.1 Etape de relaxation

Le programme du débit des flux a été basé sur les paramètres décrits ci-dessus. Le flux croisé (Q_c) a été appliqué à des débits différents : $Q_{c1} = 1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{c2} = 2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{c3} = 3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et $Q_{c4} = 4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.3.2.2 Etape d'élution

La durée de l'étape d'élution a été prolongée de 5 à 30 minutes (de 8 à 38 minutes) par rapport au programme décrit au-dessus. Dans le cadre de cet essai, deux profils différents du Q_c ont été évalués. Le premier présente un Q_c constant entre 8 et 23 min, à différents Q_c : $Q_{c1} = 1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{c2} = 1,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{c3} = 2,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et $Q_{c4} = 3,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Après cette étape, un gradient de 3min a été appliqué de 23 à 26 min pour réduire Q_c à 0,2 mL.min⁻¹.

Ensuite, Q_c a été maintenu constant pendant 8 min (26 à 34) et a été interrompu pendant 5min (34 à 38min). Pour le deuxième profil, Q_c a été programmé pour décroître de manière exponentielle selon l'équation suivante (eq. 20) :

$$Q_c(t) = Q_c^{end} + (Q_c^{start} - Q_c^{end})e^{\frac{t}{n}}$$

L'étape d'éluion a été commencée à $Q_c(0) = 3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, pour ensuite décroître exponentiellement au fil du temps pour atteindre $0.04\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sur une durée de 25 min. Ce programme a été nommé Q_{ce} . Il a été testé avec plusieurs facteur de décroissance de la pente, avec $n = 5, 8$ et 12 , nommés $Q_{ce}^5, Q_{ce}^8, Q_{ce}^{12}$, respectivement.

4.3.3 Effet de la quantité d'échantillon injectée (V_{inj})

Des volumes croissants de vin ($V_{inj} = 50, 100, 200$ et $400\mu\text{L}$) ont été injectés dans le canal pour évaluer l'effet de la quantité d'échantillon injectée sur le profil du fractogramme et sur les valeurs de la masse molaire. Pour cette expérimentation, le programme Q_{ce}^5 a été utilisé.

4.3.4 Détermination de la masse molaire par MALS/dRI et du R_h par Qels

Le calcul de la masse molaire a été effectué à l'aide du logiciel Astra selon le formalisme de Zimm (eq. 18, *Chapitre I*). La valeur de dn/dc utilisée pour calculer la masse molaire de la fraction contenant des polyphénols (F1) est de $0,247$ (Vernhet et al. 2011). Celle utilisée pour les fractions contenant plutôt des polysaccharides (F2, F3) est de $0,146$ (Redgwell, Schmitt, Beaulieu, & Curti, 2005). Le R_h a été déterminé à l'aide du détecteur Qels, monté sur l'angle $n^\circ 12$ (99°) du détecteur MALS.

4.3.5 Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode

Trois vins commerciaux (vin a, b et c) ont été analysés avec trois membranes CR-5kDa (membrane 1, 2 et 3) issues du même fournisseur (Consensus, Allemagne). L'analyse de chaque vin a été répétée quatre fois pour chaque membrane. Dans le cadre de cet essai, le programme Q_{ce}^5 a été utilisé et le volume d'injection était de $400\mu\text{L}$.

La répétabilité des profils UV, MALS et dRI, a été estimée pour une membrane et un échantillon de vin donné, en calculant l'écart-type (ramené en %) de la surface des fractogrammes. La reproductibilité a été estimée en calculant l'écart-type de la surface des fractogrammes d'un échantillon donné et pour toutes membranes confondues. Par ailleurs, la répétabilité et la reproductibilité des temps de rétentions des différentes fractions ont été appréciés visuellement.

4.3.6 Evaluation de la durée de vie d'une membrane

100 injections successives ($V_{inj} = 400\mu\text{L}$) avec le vin de Syrah ont été réalisées sur une membrane RC-5kDa neuve. Dans le cadre de cet essai, le programme Q_e^5 a été utilisé. La surface des fractogrammes UV, la pression du canal ainsi que le Q_c ont été mesurés pour chaque injection. Les valeurs de la pression du canal et de Q_c ont été relevées à la deuxième minute après le démarrage de l'étape d'élution.

4.4 Analyse des fractions purifiées de polysaccharides et de tanins par AsFlFFF

Les fractions de PS et de tanins décrites au-dessus ont été solubilisées dans un vin synthétique composé de 88% d'eau (v/v), 12% d'éthanol (v/v) acidifié avec 0,05% d'acide formique (v/v) pour ajuster le pH à 3,5. Chaque fraction a été analysée séparément puis, en mélange. Les concentrations et les volumes injectés sont indiqués dans le Tableau 3.

Tableau 3. Concentrations et masse injectées dans le canal de l'AsFlFFF des solutions des fractions purifiées seules et en mélange

	concentration des solutions (mg.mL ⁻¹)		Volume injecté (μL)	Masse injectée (μg)	
	Tanin	PS		Tanins	PS
PS	8.3		50	413	
DP12	8		50	400	
DP40	6		50	300	
Mix DP12+PS	4.90	1.55	50	245	77.5
Mix DP40 + PS	4.10	1.55	50	205	77.5

4.5 Calculs théoriques

4.5.1 Détermination du niveau de rétention (R_L)

Le R_L a été déterminé à partir des données expérimentales en utilisant la relation suivante (eq. 4) :

$$R_L = \frac{t_r}{t_0}$$

Où t_r représente le temps de rétention des analytes et t_0 le temps nécessaire à l'éluant pour traverser le canal, soit le temps pour qu'un volume de canal soit élué.

Le t_0 peut être obtenu pour un débit flux croisé constant avec la relation suivante (eq. 5) :

$$t_0 = \frac{V_0}{Q_c} \ln \left(1 + \frac{Q_c}{Q_{out}} \left(1 - \frac{w(b_0 z' - \frac{b_0 - b_L}{2L} z'^2 - y)}{V_0} \right) \right)$$

Où V_0 représente le volume du canal et y correspond à la distance prise entre l'extrémité triangulaire du canal, côté point d'injection et la ligne de focus. Pour déterminer le t_0 avec le programme Q_{ce}^5 , l'évolution du Q_c au cours du temps a été prise en compte. Pour cela, les équations 20 et 22 ont été combinées, pour donner l'équation 21 :

$$V = \frac{t}{Q_c^{end} + (Q_c^{start} - Q_c^{end})e^{\frac{t}{5}}} \ln \left(+ \frac{Q_c^{end} + (Q_c^{start} - Q_c^{end})e^{\frac{t}{5}}}{Q_{out}} \left(- \frac{w(b_0 z' - \frac{b_0 - b_L}{2L} z'^2 - y)}{V_0} \right) \right)$$

A partir de l'expression 23, la valeur de V a été graphiquement déterminée pour $V = V_0$ et t a été considérée comme égale à t_0 , quand $V = V_0$, soit le temps nécessaire à l'éluant pour traverser un volume de canal.

4.5.2 Détermination du R_h théorique

Le R_h théorique a été déterminé en fonction du débit du flux croisé (Q_c) à partir de l'équation suivante (eq. 15) :

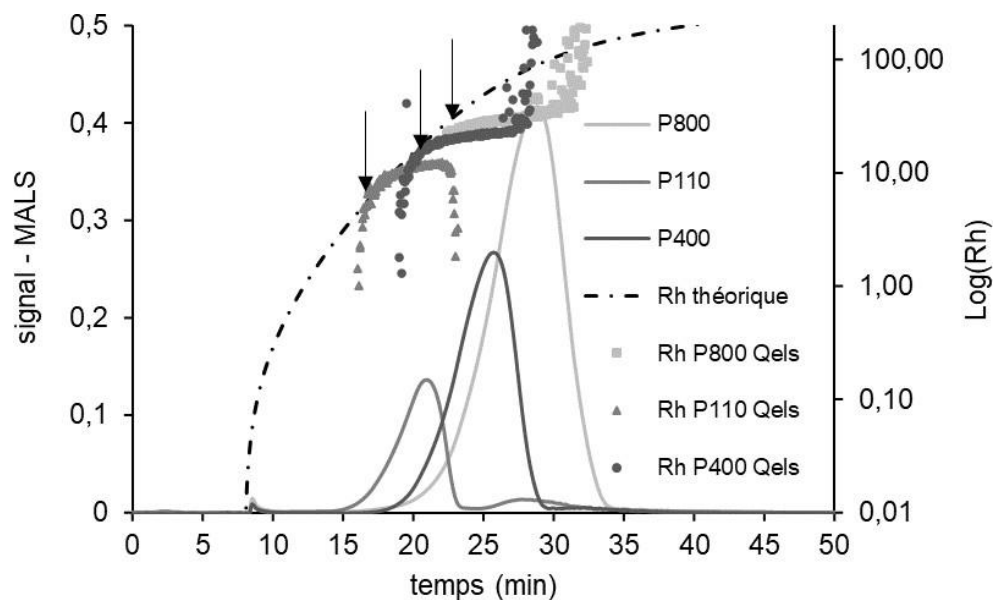
$$R_h = R_L \frac{kTV_0}{\pi\eta w^2 Q_c(t)}$$

Où k représente la constante de Boltzmann, T la température au sein du canal (298°K), et η la viscosité du solvant. Cependant, le paramètre η n'est pas connu pour la phase mobile utilisée. Par conséquent, il a été déterminé expérimentalement en mesurant le R_h et le coefficient de diffusion (D) par DLS de deux pullulans standards de 200 et 400kDa (P200 et P400) et déduisant η comme suit (eq. 22).

$$\eta = \frac{kT}{6\pi R_h D}$$

Les Pullulans ont été mis en solution à 4mg.mL⁻¹ dans la phase mobile utilisée pour les analyses en AsFIFFF. Les données DLS ont été obtenues sur un appareil NanoStar Dynapro (Wyatt Technologie). La mesure a été répétée 10 fois par échantillons et les valeurs moyennes de R_h et de D ont été utilisées pour le calcul de η . Les valeurs de η obtenues à partir de l'équation 24 pour les deux pullulans (P200 et P400) étaient strictement identiques (8,945.10⁻⁴ kg.m⁻¹.s⁻¹).

Figure 14. Validation de la méthode de calcul du R_h théorique



Calcul du R_h théorique réalisé à partir de l'équation n°15

Les points expérimentaux du R_h fournis par le Qels, pour trois pullulans élués avec le programme Q_{ce}^5 ont été comparés avec les valeurs du R_h prédites par la théorie de l'AsFIFFF (eq. 15, Figure 14). Les

trois standards pullulans utilisés sont monodisperses, par conséquent le R_h est ~constant à travers toute la largeur du pic. Le R_h théorique est en bon accord avec les points expérimentaux en début d'élution de chaque pic. Par conséquent la méthode de calcul a été considérée comme valide.

5 Analyse sensorielle

Les vins ont été évalués à l'aide d'une analyse quantitative descriptive (Pierre et Sidel 2004) QDA®, en 2019, par un panel entraîné du Plateau d'analyse sensorielle de l'UMR SPO, INRAE (Montpellier, France), dans le cadre de la thèse de Coline Leriche. Le panel était composé de 18 juges sans rapport avec l'industrie du vin (sexe: 12 femmes, 6 hommes; âge moyen: 55 ans; ancienneté dans le panel: 5 ans en moyenne - 3 mois minimum - 13 ans maximum), sélectionnés sur la base de leurs performances sensorielles et de leur capacité à communiquer en groupe (Nicod, 1998; Depledt, 2009). Après trois sessions de génération de vocabulaire sur les 54 vins, le jury a examiné 16 descripteurs indépendants et discriminants, dont l'astringence (Depledt, 2009). Les juges ont été formés au cours d'une séance d'une heure sur la perception de l'astringence. Un extrait de tanin de pépins de raisin et de rafles a été ajouté à l'échantillon de vin comme standard pour l'évaluation de l'astringence. Une série de concentrations a été présentée au jury : 0 – 0,6 et 0,8 g/L, et les juges ont été invités à classer ces échantillons en fonction de l'intensité de l'astringence. Comme dernière étape de formation, une méthode de type feedback a été utilisée afin de vérifier si le jury était suffisamment performant pour caractériser efficacement les vins (Findlay et al, 2006). Ce test permet aux juges de comparer leurs notes avec celles de l'ensemble du panel et donc de repérer et corriger d'éventuels désaccords. Pour la note, les vins ont été présentés en monadique selon un carré latin de Williams (Macfie, Bratchell, Greenhoff, & Vallis, 1989) et identifiés par des codes à trois chiffres. Ils ont été servis dans des verres noirs, à température ambiante avec une coupelle en plastique sur les verres pour garder les arômes. Les juges ont évalué les vins dans des cabines de dégustation standard et évalué l'intensité de chaque descripteur sur des échelles linéaires, de faible correspondant à l'absence de perception à haute correspondant à une perception très intense, pour chaque vin. Les juges ont été invités à se rincer la bouche avec une solution de pectine (1g/L) puis avec de l'eau entre chaque échantillon afin de limiter l'effet de rémanence de l'astringence des vins rouges

(Colonna, Adams, 2004). Six sessions ont été consacrées à la notation; une session pour chaque AOP. À la fin, la répétabilité du panel a été testée indépendamment, en utilisant deux vins de chaque AOP, avec une répétition, dans la même session. Des intensités d'astringence ont alors été extraites des données de QDA®.

6 Collecte des fractions de vin par AsFIFFF et préparation des fractions pour l'analyse des tanins et des polysaccharides

6.1 Protocole de collecte

Les fractions du vin de Syrah et celles de six vins sélectionnés à partir de la série des vins du Languedoc (n°16, 25, 37, 40, 43 et 52) ont été collectées pendant la séparation par AsFIFFF en utilisant le programme d'élution Q_{ce} . Les fractions ont été récupérées à la sortie du canal à l'aide d'un collecteur Thermo Scientific Dionex AFC-3000 Fraction Collector. Les temps de rétention des pics ont préalablement été repérés en réalisant 3-4 injections sur le système AsFIFFF-UV-MALS/Qels-dRI. Ensuite, tous les détecteurs, sauf l'UV ont été court-circuités et le collecteur de fraction a directement été branché à la sortie de l'UV. Les temps de collecte de chaque fraction ont été adaptés pour chaque échantillons, mais peuvent approximativement être considéré entre 2 – 5min, 5 – 8min, 8 – 15min et entre 15 – 30min, pour les fractions F1, F2, F3 et F4, respectivement. Les temps de rétentions exactes sont répertoriés dans le Tableau 4.

Afin d'obtenir suffisamment de matière dans les fractions pour les différentes analyses prévues, l'échantillon de vin a été injecté dans le canal 32 fois, successivement, avec $V_{inj} = 400\mu\text{L}$. Pour chaque injection, les quatre fractions fraîchement collectées, ont été séchées sous vide avec un évaporateur rotatif (Genevac EZ-2 plus à 8 mbars/40°C). Une fois à sec, les mêmes contenants des fractions ont été réutilisés pour la collecte suivante, de façon à cumuler la matière.

Au total, l'équivalent de 12,8mL de vin a été injecté sur l'AsFIFFF et collecté. 2,4mL ont été utilisés pour l'analyse des fractions en HPLC-UV-MS. Le même volume a été utilisé pour réaliser les phloroglucinolyses qui ont été suivies d'une analyse par HPLC-UV-MS et pour l'analyse en HPSEC-

UV et 5,6mL ont été utilisés pour l'analyse des polysaccharides. Ensuite, les fractions ont été lyophilisées et conservées à -80°C avant d'être analysées.

Tableau 4. Temps de rétention des fractions collectées à partir des différents vins.

<i>n° vin</i>	<i>fractions</i>	<i>t_r^a</i>
16	F1	2.0 - 4.5
	F2	4.5 - 8.0
	F3	8.0 - 13.0
	F4	18.0 - 27.5
43	F1	2.4 - 5.0
	F2	5.0 - 8.5
	F3	8.5 - 16.0
	F4	18.0 - 43.0
25	F1	2.0 - 5.0
	F2	5.0 - 8.5
	F3	8.5 - 18.0
	F4	18.0 - 23.4
52	F1	2.0 - 4.5
	F2	4.5 - 8.0
	F3	8.0 - 13.0
	F4	18.0 - 26.7
37	F1	2.0 - 5.5
	F2	5.5 - 9.0
	F3	9.0 - 15.0
	F4	16.0 - 22.5
40	F1	2.0 - 5.0
	F2	5.0 - 8.5
	F3	8.5 - 15.0
	F4	16.0 - 27.0
syrah	F1	2.0 - 4.5
	F2	4.5 - 8.0
	F3	8.0 - 12.0
	F4	12.0 - 26.5

^aTemps de rétention (t_r) pris en compte à partir du $t_{starter}$ de la

6.2 Méthode d'extraction des tanins contenus dans les fractions de l'AsFIFFF

Les sels contenus dans la phase mobile utilisée pour l'AsFIFFF se sont accumulés lors de la collecte des fractions du vin et ont formé après la lyophilisation, un mélange homogène avec les composés d'intérêts. Les tanins contenus dans les fractions ont été séparés des sels et des PS, par extraction en phase solide (SPE). Des essais préliminaires ont été réalisés sur une fraction artificielle (*Fa*), imitant les fractions du vin issus de l'AsFIFFF pour valider l'efficacité de la méthode d'extraction, avant de l'appliquer aux véritables fractions de l'AsFIFFF. Le résumé du protocole est illustré sur la Figure 15. Une pesée de 384mg de K_2SO_4 a été mélangée avec 6mg de tanins purifiés, issus de pépin de raisin disponible en grande quantité (tanin commercial TANIN VR GRAPE® – Laffort). Le mélange a été dissout dans 12mL d'acide acétique à 2% de sorte que $[tanins] = 0,50mg.mL^{-1}$ et $[K_2SO_4] = 32mg.mL^{-1}$.

La solution fraîchement préparée a été divisé en six portions de 2mL. Ces portions ont toutes été dessalées, comme cela décrit dans le paragraphe ci-dessous. Les sels de chacune d'entre elles ont été récupérés pour effectuer un bilan massique et évaluer la quantité de sel éliminé. Ensuite, trois de ces portions ont été utilisées pour réaliser les bilans matières dans l'UV et les trois autres ont été analysées en SEC-UV, pour évaluer le taux de récupération en sortie de colonne. Ce protocole est résumé dans la Figure 15.

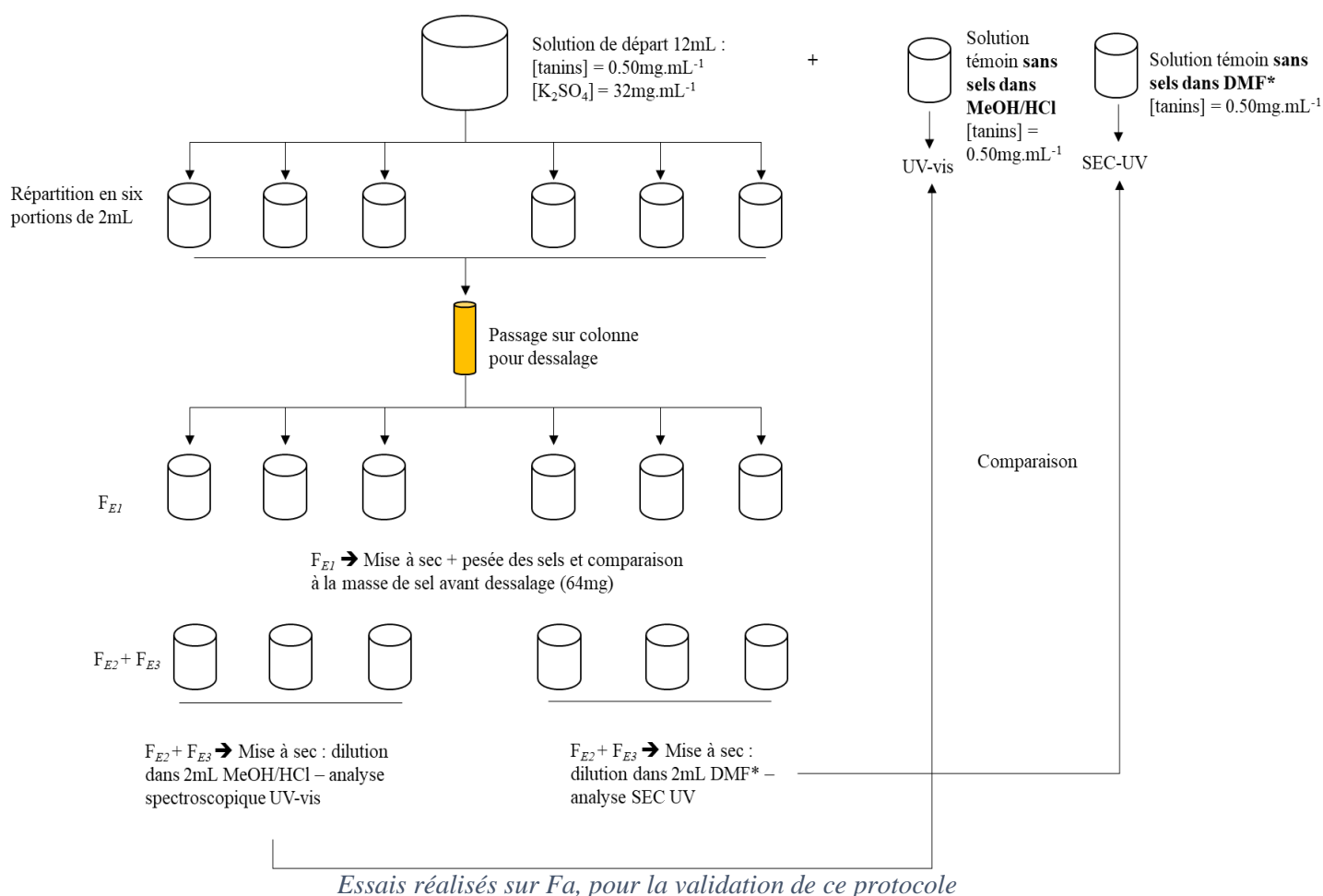
La phase était constituée de billes de Rélite (SP411) et était conservée dans du méthanol. Le volume de cette phase a été mis dans une colonne de verre à hauteur de 4mL. La phase a d'abord été conditionnées par un rinçage (trois volumes de colonne) avec de l'acide acétique à 2% (v/v) (E1) et l'élution de *Fa* a été effectuée par gravité. 2mL de *Fa* ont été déposés sur la colonne et le fractionnement s'est déroulé en trois étapes. Dans un premier temps, les sels ont été éliminés avec E1 pour donner la fraction F_{E1} et piéger les tanins sur la phase. Dans un second temps, les tanins ont été élués avec du méthanol acidifié avec de l'acide acétique à 2%, (v/v), (E2), donnant la fraction F_{E2} .

Dans un troisième temps, un solvant acétone/eau (60/40, v/v) (E3) a été utilisé pour éluer les derniers tanins (fraction F_{E3}). Les volumes de E1, E2 et E3 étaient de 12mL (3 volumes de colonne). Les essais ont été répétés trois fois en utilisant la même colonne qui a été rincée entre chaque fractionnement de

Fa avec trois volumes de *E2* et trois volumes de *E3*, puis reconditionnées avec trois volumes de *E1* avant le prochain fractionnement.

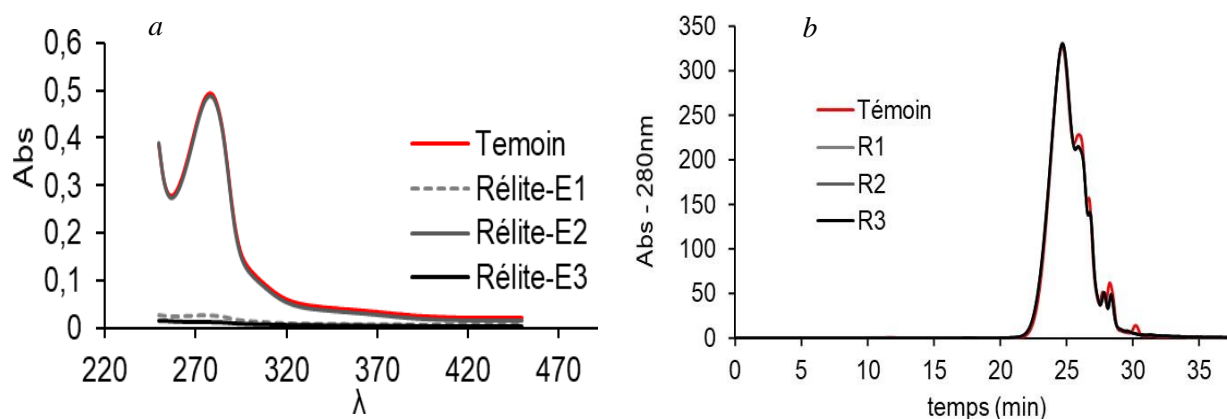
Les fractions F_{E1} ont été séchées à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide (Genevac EZ-2 plus à 8 mbars/60°C) puis pesée afin d'évaluer le pourcentage de sel récupéré, par rapport à la masse initiale de sel contenue dans la fraction *Fa*. Les essais ont montré que 85% ($SD = 1,5\%$) des sels ont été éliminés dans F_{E1} . Ensuite, les fractions F_{E2} et F_{E3} ont été rassemblées, mises à sec pour éliminer le solvant. Trois réplicats ont été dissous dans 2 mL (volume de départ) de *E2*. Cette solution a ensuite été diluée à 1/10^{ème} pour réaliser son spectre d'absorbance entre 250 – 450nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu 1800 (cf. *section 7*) et a été comparée à une solution témoin pour évaluer visuellement la quantité de tanin récupéré après extraction à toutes les longueurs d'onde du spectre (Figure 16a). Les pertes ont été quantifiées à 280nm. Ce calcul montre que 99,5% ($SD = 0,5$) des tanins ont été récupérés dans F_{E2} et

Figure 15. Résumé du protocole d'extraction des tanins par SPE



F_{E3}. Les trois autres réplicats ont été dissous dans 2 mL de Diméthylformamide (DMF) et analysés par SEC-UV (cf. *section 9*). Les profils chromatographiques étaient très répétables (Figure 16b) et le taux de récupération en sortie de colonne (méthode d'évaluation décrite *section 9.2*) était de 92% (*SD* = 1,8).

Figure 16. Comparaison des extraits de Fa par rapport à la solution témoin : par spectroscopie UV-visible (a), et par SEC-UV (280nm) (b)



6.2.1 Extraction et caractérisation des polysaccharides contenus dans les fractions de l'AsFIFFF du vin

Comme pour les tanins, les polysaccharides contenus dans les fractions de l'AsFIFFF du vin ont été isolés des sels et des tanins sur une colonne Superdex® Peptide FPLC®, (Pharmacia, Biotech). L'éluant et le système de détection et la méthode de caractérisation qui ont été utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans la *section 3.1*.

7 Analyse par spectroscopie UV-visible

Les échantillons de vin ont été injectés à hauteur de 400µL dans le système de l'AsFIFFF. La fraction du perméat a été récupérée à la sortie du flux croisé pendant l'étape de relaxation, à l'aide d'un collecteur de fractions AFC – 3000 (Thermo Scientific). La fraction du rétentat a également été récupérée dans son intégralité au cours de l'étape d'éluion à la sortie du canal de l'AsFIFFF à l'aide d'un collecteur de fractions, Frac920 positionné après le détecteur dRI de l'AsFIFFF. Les fractions de perméat et de rétentat ont été séchées à l'aide d'un évaporateur rotatif Génévac EZ-2^{plus}, sous une pression réduite à 8 mbars à

40°C, puis ont été lyophilisées. Ensuite, les poudres obtenues à partir du perméat et du rétentat ont été solubilisées dans 50 et 2mL respectivement, tandis que le vin d'origine a été dilué 200 fois dans de l'HCl (1%). Les solutions obtenues ont été distribuées dans 96 puits (plaque-UV, Life-sciences Corning) et les puits ont été remplis à hauteur de 170µL des solutions obtenues. L'absorbance a été mesurée dans l'UV-visible entre 230 et 600nm (1nm d'intervalle) à l'aide d'un spectrophotomètre Nanoquant Infinite® 200 Pro (Tecan, Suisse).

Les valeurs de d'absorbance à $\lambda = 280\text{nm}$ (A_{280}) et à $\lambda = 230\text{nm}$ (A_{230}) ont été extraits des spectres des fractions du rétentat et du perméat et des spectres des vins d'origine. Le pourcentage de A_{280} et A_{230} des fractions de rétentat et de perméat ont été calculés à partir des valeurs d'absorption des vins d'origine, représentant 100 % de l'échantillon. Ainsi, le pourcentage de récupération du matériel absorbant dans l'UV a été estimé pour chaque analyse à 280 et 230nm.

Les fractions des vins collectées pendant la séparation de l'AsFIFFF (cf. *section 6.1*), ont également été analysées par spectroscopie UV-visible, avant et après avoir en avoir extrait les tanins par SPE (cf. *section 6.2*). Avant l'extraction SPE, les fractions ont été diluées dans 2mL d'une solution d'HCl à 1% et dans du MeOH/HCl (99/1, v/v) pour les fractions après extraction des tanins. Les mesures ont été réalisées sous 1cm de trajet, hormis pour les fractions F1 des échantillons n°25, 52, 37 et 40 pour lesquelles le trajet optique était de 1mm. L'absorbance a été acquise entre 250 et 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu-1800. Les valeurs d'absorbance des fractions F1 des échantillons n°25, 52, 37 et 40 ont été multipliées par 10 pour effectuer des comparaisons avec les autres. La valeur de A_{280} a été extraite des spectres acquis à partir des fractions et des spectres acquis à partir des tanins extraits de ces fractions par SPE, afin de mesurer les pertes engendrées par cette manœuvre.

8 Analyse HPLC-UV-MS

8.1 Instrumentation

Un système HPLC Vanquish (Thermo Scientific) comprenant un dégazer sous vide, un injecteur automatique, une pompe quaternaire, un chauffe-colonnes et un détecteur à barrette de diodes (DAD), ainsi qu'un spectromètre de masse haute résolution, Exploris 480, munie d'un électrospray et d'un

analyseur type Orbitrap (Thermo Scientific). Le système était équipé d'une colonne UPLC (ultra performance liquid chromatography) Acquity, (phase : C18, dimension de colonne : 100 x 1mm, granulométrie : 1,7 μ m). Les solvants utilisés étaient de l'eau/acide formique (99:1 v/v), (Solvant A) et de l'acétonitrile/acide formique (99:1, v/v), (Solvant B).

La méthode d'éluion a été commencée avec un plateau de 99% de A, pendant 1.5min. Ensuite un gradient a été programmé jusqu'à 4,5min pour atteindre 90/10 (A/B) et ce ratio a été maintenue jusqu'à 8min. Un second gradient a été programmé entre 8 et 13min pour atteindre un ratio de 80/20 (A/B). Un troisième gradient est compris entre 13 et 16min (60/40, A/B) et a été terminé par un quatrième gradient entre 16 et 18min (1/99, A/B). Le débit du flux était de 0,22 mL.min⁻¹ et le volume d'injection des échantillons était de 1 μ L. La plage d'acquisition UV était comprise entre 190-650nm, mais seulement la longueur d'onde à 280nm a été regardée. La température du tube de transfert du spectromètre de masse était de 280°C et la température du vaporiseur était de 300°C. Les voltages en positif et négatif étaient de 3500 et 2500 Voltes, respectivement.

8.2 *Analyse des tanins par phloroglucinolyse*

Les tanins ont été quantifiés après une dépolymérisation acido-catalysée en présence du phloroglucinol, comme cela a déjà été décrit (Kennedy & Jones, 2001). Brièvement, un volume de 600 μ L pour les vins d'origine et de 50 μ L pour les fractions de l'AsFIFFF, d'un mélange réactionnel (50g.L⁻¹ de phloroglucinol et 10g.L⁻¹ d'acide ascorbique dans du méthanol contenant 0,2 N d'HCl) a été ajouté au culot de vin séché. Le mélange a été agité dans un vortex et incubé à 50°C pendant 20 minutes. La réaction a été arrêtée en passant l'échantillon sous l'eau froide et en y ajoutant un volume équivalent à celui du mélange réactionnel, de formate d'ammonium (200mM). Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 3650g pendant 10 min avant d'être injectés dans l'HPLC-UV-MS.

Les produits de réaction obtenus après la phloroglucinolyse, les monomères de flavan-3-ol et les adduits phloroglucinol, ont été identifiés sur la base de leur temps de rétention, leur spectre UV et leur spectre MS. Le DPM, le pourcentage d'unité galloylées (%G) et le pourcentage d'épigallocatechine (%EgC) a été estimé à partir des courbes d'étalonnage (280nm) de la catéchine, (épi)catéchine, épicatechine-3-O-

gallate et de l'épigallocatechine, pour les unités terminales et pour les adduits formés avec le phloroglucinol, car les facteurs de réponse sont les mêmes (Kennedy & Jones, 2001). La concentration en proanthocyanidines a été estimée en mg.L^{-1} équivalent catéchine en prenant en compte uniquement les surfaces des pics du chromatogramme, correspondant aux unités terminales de flavan-3-ol et aux adduits formés avec le phloroglucinol (unités intermédiaires). Cette concentration a été comparée à la teneur en polyphénols totaux (en mg.L^{-1} , équivalent catéchine), mesuré par spectrophotométrie (A_{280}). La conversion de l' A_{280} en concentration a été réalisée en utilisant le facteur d'absorbance de la catéchine à 280 nm qui est de 0,012, pour 1mg.L^{-1} de catéchine dans du méthanol/HCL (99:1, v/v), (Boulet et al, 2017). La part des tanins non dépolymérisables a été estimée (en mg.L^{-1} , équivalent catéchine) en mesurant la surface du chromatogramme entre 12,5 et 17,0 min et a été comparée à la teneur en polyphénols totaux (A_{280}). Le taux de récupération en sortie de colonne a été estimé en mesurant la surface totale des chromatogrammes (convertie en mg.L^{-1} , équivalent catéchine) et a été comparée à la teneur en polyphénols totaux (A_{280}).

9 Analyse SEC-UV

9.1 Instrumentation

Un système Agilent 1260 HPLC comprenant un dégazeur sous vide, un injecteur automatique, une pompe isocratique, un chauffe-colonnes et un détecteur à barrette de diodes (DAD), équipé de 3 colonnes PLgel (Phenomenex), composées de polystyrène-divinylbenzène hautement réticulé connectées en série : Colonne 1 : granulométrie de $5\mu\text{m}$ et d'une taille des pores de 3.10^3\AA . Colonne 2 : granulométrie de $5\mu\text{m}$ et taille des pores de 7.10^4\AA et Colonne 3 : granulométrie de $5\mu\text{m}$ et taille des pores de 10^7\AA . Ces trois colonnes étaient protégées par une colonne de garde ($50 \times 7,8\text{ mm}$, $5\mu\text{m}$). La phase mobile utilisée était composée de diméthylformamide (DMF), 1% v/v acide acétique glacial, 5% v/v d'eau, et 0,15 M de chlorure de lithium. Le débit de la phase mobile a été fixé à 1 mL.min^{-1} et la température de la colonne à $60\text{ }^\circ\text{C}$. Le logiciel OpenLab a été utilisé pour l'acquisition des données UV. Les colonnes ont été calibrées en utilisant des standards commerciaux (catéchine, procyanidines dimère

B2 et A2) ainsi que des fractions de tanin de différents DPm : DP6 et DP40 qui ont précédemment été purifiés (cf : *section 3.2*).

9.2 Préparation des échantillons pour l'analyse en SEC-UV

Les échantillons ont été dissous dans l'éluant décrit au-dessus, homogénéisé (ultrasons et vortex), puis centrifugé à 3000 g pendant 5 min. Les vins d'origine (prise d'essai séchée de 1 mL) ont été repris dans 1mL, tandis que les tanins extraits des fractions (contenant chacune l'équivalent de 2,4mL de vin, cf. *section 6.1*) ont été dissous dans 250 μ L. Les vins d'origine ont été injectés dans le système, à hauteur de 50 μ L, et les solutions de tanins issus des fractions ont été injectées à hauteur de 100 μ L.

Le taux de récupération en sortie de colonne a été évalué en mesurant le rapport de l'aire du chromatogramme sur l'aire de l'échantillon obtenue sans les colonnes chromatographiques, pour un volume d'injection de 5 μ L.

Chapitre III

**Mise au point et validation d'une méthode de fractionnement des
macromolécules du vin rouge par AsFIFFF**

Introduction

Ce chapitre porte sur la mise au point d'une méthode de fractionnement efficace des macromolécules du vin rouge. Le vin qui a été utilisé pour développer cette méthode est un vin de syrah (millésime 2018) vinifié par l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan.

La phase mobile qui a été utilisée est un mélange eau/éthanol ramené au pH du vin (comme décrit dans le *Chapitre II, section 4.1*). L'objectif était de pouvoir analyser la fraction macromoléculaire du vin dans des conditions proches de leur milieu d'origine, de façon à limiter la déstructuration des agrégats formés dans le vin. Le seuil de coupure de la membrane, l'optimisation du flux croisé et la quantité d'échantillon injectée dans le canal sont les trois principaux paramètres qui ont été examinés. Par la suite, la répétabilité, la reproductibilité de la méthode et la durée de vie de la membrane ont également été évaluées, afin de déterminer quelles sont les limites de la méthode.

1 Recherche des conditions optimales pour l'analyse du vin rouge

1.1 Détermination du seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration

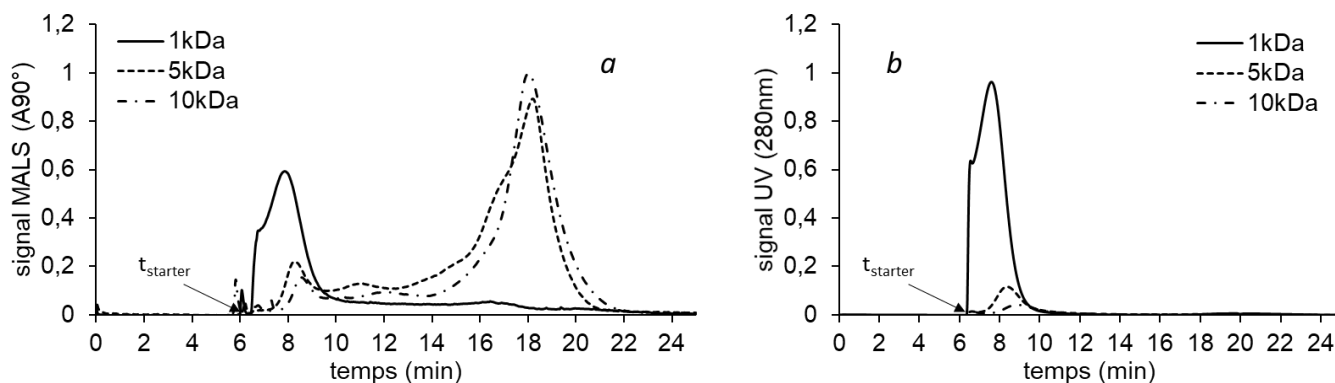
Cette section porte spécifiquement sur le seuil de coupure de la membrane d'ultra filtration de l'AsFIFFF. Cette étape d'optimisation de la méthode est cruciale car elle permettra de définir la proportion de la fraction macromoléculaire du vin sur laquelle nous travaillerons. Les deux principaux matériaux disponibles sur le marché sont le Polyethersulphone (PES) et la cellulose régénérée (RC). Or, une étude rapporte que des membranes composées de PES et de PVP ont une affinité importante pour les polyphénols (Cartalade & Vernhet, 2006). Par conséquent, il a été supposé que ce matériau pouvait provoquer des phénomènes de colmatage, ce qui n'est pas souhaitable dans le cadre de l'analyse par AsFIFFF car le colmatage risque de compromettre le fonctionnement des flux et donc altérer la séparation. Aucune donnée n'a été trouvée sur les phénomènes d'affinité entre les polyphénols et les membranes constituées uniquement de PES, ni avec les membranes constituées de RC. Cependant, des essais préliminaires nous ont permis de conclure que les membranes PES n'étaient pas adaptées à l'analyse du vin par AsFIFFF (résultats non présentés ici). En effet, des phénomènes de colmatage

importants, susceptibles d'occasionner des épisodes de surpression de la machine ont été observés. Par conséquent, les essais ont uniquement été menés sur des membranes en RC à différents seuils de coupure : 1, 5 et 10kDa.

Dans le vin, les polysaccharides et les composés phénoliques sont présents dans une large gamme de taille dont certains, notamment parmi les composés phénoliques, sont plus petits que les seuils de coupure des membranes présentes sur le marché. Par conséquent on s'attend à ce qu'une partie de la matière passe au travers de la membrane sous l'action du flux croisé et se retrouve dans le perméat. L'objectif était donc de déterminer quel est le seuil de coupure optimal. Ce dernier doit permettre de retenir suffisamment de matière pour qu'elle soit visible par les détecteurs.

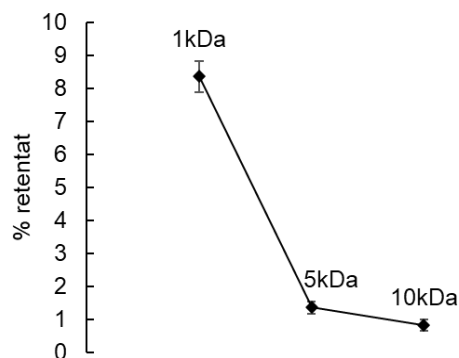
Les fractogrammes obtenus pour les différents seuils de coupure avec le détecteur de diffusion de lumière multi-angle (MALS) à 90° et par mesure de l'absorbance à 280nm (UV) sont comparés dans la Figure 17. Les fractogrammes obtenus avec la membrane de 1kDa, montrent un pic important dans l'UV élué entre 6 et 10 min, c'est-à-dire au début de l'étape d'élution (t_{starter}). La forte absorbance de ce pic dans l'UV indique qu'il s'agit d'une population essentiellement constituée de polyphénols. Or, l'abondance de ce pic diminue fortement avec les membranes de 5 et 10kDa. Cette observation se vérifie au niveau du pourcentage de la matière retenue au-dessus de la membrane (rétentat, Figure 18), qui est de 8.5% pour la membrane de 1kDa et de 1,5 et 0,8% pour les membranes de 5 et 10kDa respectivement.

Figure 17. Effet du seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration, profils d'élution du vin de syrah obtenus avec les détecteurs (a) MALS, (b) UV à 280nm



Ces faibles pourcentages de récupération montrent qu'une grande partie du matériel absorbant dans l'UV a été éliminée dans le flux croisé et/ou adsorbée sur la membrane, quel que soit le seuil de coupure. Il peut d'ores et déjà être supposé que la fraction éliminée est constituée de composés phénoliques monomères et de petits oligomères. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'intensité du premier pic dans l'UV diminue beaucoup plus entre les membranes de 1 et 5kDa qu'entre 5 et 10kDa. Donc la perte de matière est largement plus importante entre 1 et 5kDa. Cela indique que la proportion de tanins dont la masse molaire est supérieure à 5kDa ne représente qu'une très faible quantité.

Figure 18. Pourcentage (calculé à partir du signal UV à 280nm) de la fraction retenue au-dessus de la membrane d'ultrafiltration en fonction du seuil de coupure



(% de récupération évalué selon la méthode décrite dans le Chapitre II, section 4.2)

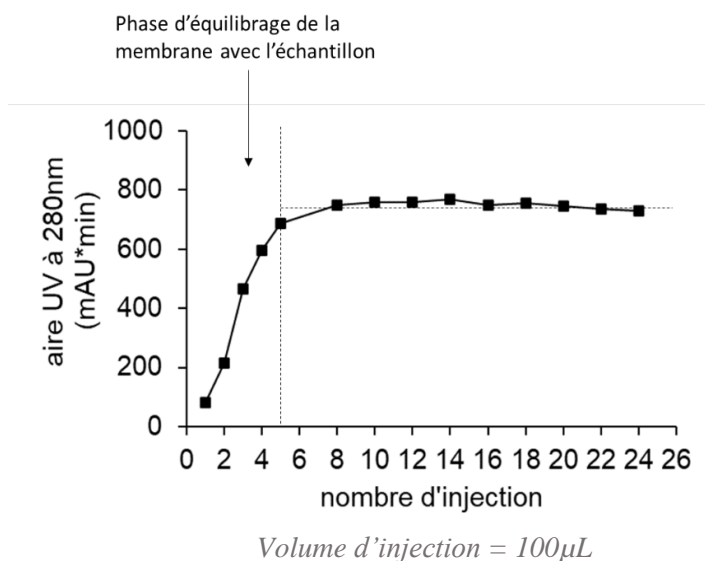
Cette masse molaire de 5kDa correspond environ à un tanin de DP17. Or, des études montrent que les tanins correspondant à cette masse molaire sont également retrouvés dans les vins rouges, dans des proportions comparables à celles-ci (Vernhet et al. 2020), Même si les méthodes de dépolymérisation utilisées ne permettent pas d'analyser correctement les tanins dérivés, les travaux de Maury et al montrent également la présence de tanins de hauts DP (dont la masse molaire pourrait correspondre aux tanins retenus sur les membranes de 5 ou 10 kDa), précipités sélectivement par les protéines de collage, qui ne représentent qu'une faible proportion des tanins du vin (Maury et al., 2001; Maury, Sarni-Manchado, Lefebvre, Cheynier, & Moutounet, 2003). Par ailleurs, il a été montré que les concentrations

des polyphénols précipités sélectivement par la BSA étaient fortement corrélées à l'astringence (Boulet et al, 2016). Cela suggère que la fraction de polyphénols retenus sur les membranes de 5 et 10kDa pourraient correspondre à cette fraction de tanins astringents.

Néanmoins, la comparaison entre le seuil de coupure de la membrane et la masse molaire dépend aussi de la forme des molécules. Elle n'est valable que pour des objets de forme sphérique, or il a été vu que les tanins possédaient plutôt une forme allongée (Zanchi et al, 2009). Par conséquent, ces molécules de formes plus allongées peuvent se faufiler (en long) dans les pores ou au contraire ne pas passer (rester en travers).

Par ailleurs, une autre population de molécules de taille plus importante est visible sur les fractogrammes MALS, entre 10 et 22min (Figure 17a). Cette population est uniquement observée avec les membranes de 5 et 10kDa, mais n'apparaît pas avec la membrane de 1kDa. Les profils UV montrent que cette population n'absorbe pas (ou peu) dans l'UV (Figure 17b) et qu'il ne s'agit donc pas de tanins, mais plutôt de macromolécules de nature polysaccharidique. Ce résultat indique que les polysaccharides ont tendance à s'absorber sur la membrane de 1kDa. Par conséquent, la membrane de 5kDa a été sélectionnée pour la suite des expérimentations, car elle permet à la fois d'analyser la fraction de

Figure 19. Evolution de l'aire totale du fractogramme dans l'UV en fonction du nombre d'injections pour une membrane de 5kDa neuve (volume d'injection = 100 μ L)



molécules « non phénoliques » et permet de retenir davantage de tanins par rapport à la membrane de 10kDa.

Par ailleurs, une nette coloration rougeâtre de la membrane est visible au bout de quelques injections. Cette coloration qui apparaît de façon progressive s'accompagne d'une évolution du fractogramme. Ce phénomène d'encrassement des membranes a déjà été observé auparavant en conditions expérimentales. (Kassalainen, Galina & Williams 2012; Wahlund 2013; Gigault et al. 2014). Cela indique qu'une fraction de l'échantillon reste sur la membrane après la séparation. Lorsque la membrane est retirée du canal, il est clairement visible qu'une zone la plus colorée se trouve autour du point d'injection/de focalisation.

Il est probable que ce dépôt se soit produit pendant l'étape de relaxation/focalisation, lorsque les composants de l'échantillon sont amenés et concentrés sur la membrane au point de focalisation. Néanmoins, cela ne semble pas avoir altéré la qualité de la séparation, ni même la hauteur du pic et la répétabilité du temps de rétention, sauf pour les premières injections d'échantillon sur une membrane neuve. Par conséquent, il est impératif que la membrane soit "conditionnée" par les premières injections avant d'interpréter les fractogrammes. La Figure 19 illustre l'évolution de l'aire totale du fractogramme UV (280nm) en fonction du nombre d'injections pour une membrane neuve de 5kDa. Il a été observé que 5 injections de 100 μ L, soit 500 μ L, étaient nécessaires pour équilibrer la membrane, c'est-à-dire saturer la surface de contact membrane-échantillon avec les composés qui s'adsorbent, avant d'atteindre des conditions opératoires, où les profils sont répétables (mesure basée sur l'aire UV des fractogrammes, Figure 19).

1.2 Optimisation du débit du flux croisé

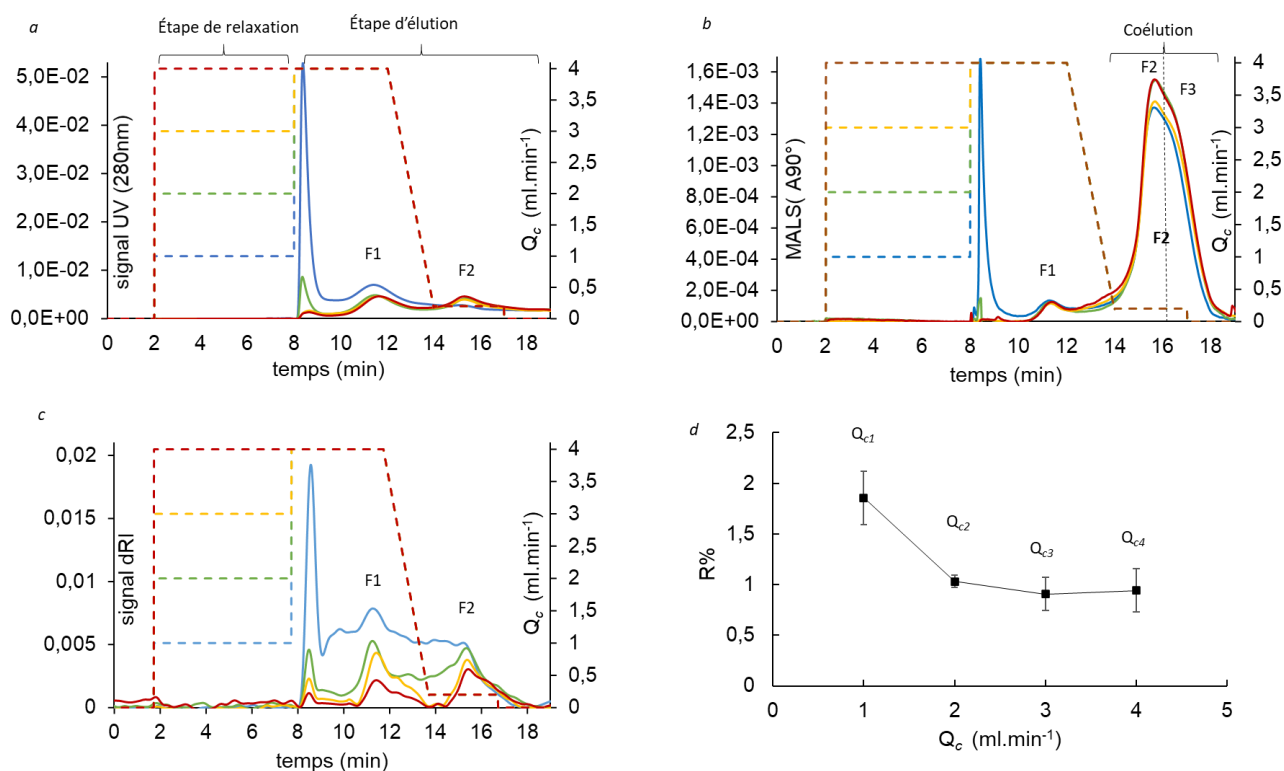
Cette section porte sur l'optimisation du flux croisé durant les étapes de relaxation et d'élution. L'objectif est d'améliorer le profil de séparation obtenu sur la membrane de 5kDa

1.2.1 Pendant l'étape de relaxation

Le débit (Q_c) pendant l'étape de relaxation a été le premier paramètre de flux optimisé. Les fractogrammes et le taux de recouvrement des échantillons (R%) obtenus pour plusieurs Q_c sont comparés sur la Figure 20. Un grand pic élué entre 8 et 9 minutes, c'est-à-dire au début de l'étape d'éluion (t_{starter}), a été détecté dans l'UV, par MALS et par indice de réfraction différentielle (dRI) à Q_{c1} (Figure 20a, b et c).

Deux autres fractions sont également visibles sur les profils UV, MALS et dRI. Parmi ces fractions, la première (F1) a été éluée plus tôt (entre 10 et 14 min) sous un fort débit de flux croisé ($4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), ce qui suggère que cette fraction contient des molécules de taille relativement petite. La deuxième fraction (F2) contient des molécules beaucoup plus grandes par rapport à F1 car elle a été éluée sous un débit de flux croisé de $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Cette observation indique que la fraction retenue sur la membrane contient

Figure 20. Influence de Q_c sur la séparation des composés du vin rouge pendant l'étape de relaxation.



Lignes pleines : fractogrammes UV du vin à $\lambda = 280 \text{ nm}$ (a), fractogrammes MALS à l'angle $A90^\circ$ (b) et fractogrammes dRI (c). Lignes pointillées bleues : $Q_{c1} = 1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; lignes pointillées vertes : $Q_{c2} = 2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; pointillés jaunes : $Q_{c3} = 3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; pointillés rouges : $Q_{c4} = 4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Taux de recouvrement (R%) calculé à partir du signal UV (c.f. Chapitre II, section 4.2) à chaque Q_c (d). Volume d'injection de l'échantillon = $50 \mu\text{L}$. Taux de récupération évalué selon la méthode décrite dans le Chapitre II, section 4.2

des objets de tailles très différentes. En outre, le fractogramme MALS montre la présence de deux populations dans **F2** qui sont subdivisées en les sous-fractions F2 et F3 (Figure 20b).

Comme cela a été discuté plus haut (*section 1.2*), la grande majorité du matériel absorbant dans l'UV (acides phénoliques, composés phénoliques monomériques ou oligomériques) est plus petite que le seuil de coupure de la membrane. Par conséquent, l'un des principaux objectifs de l'optimisation de l'étape de relaxation est d'éliminer cette fraction de molécules de faible masse molaire et de ne conserver que les macromolécules et les complexes, qui constituent la fraction qui nous intéresse.

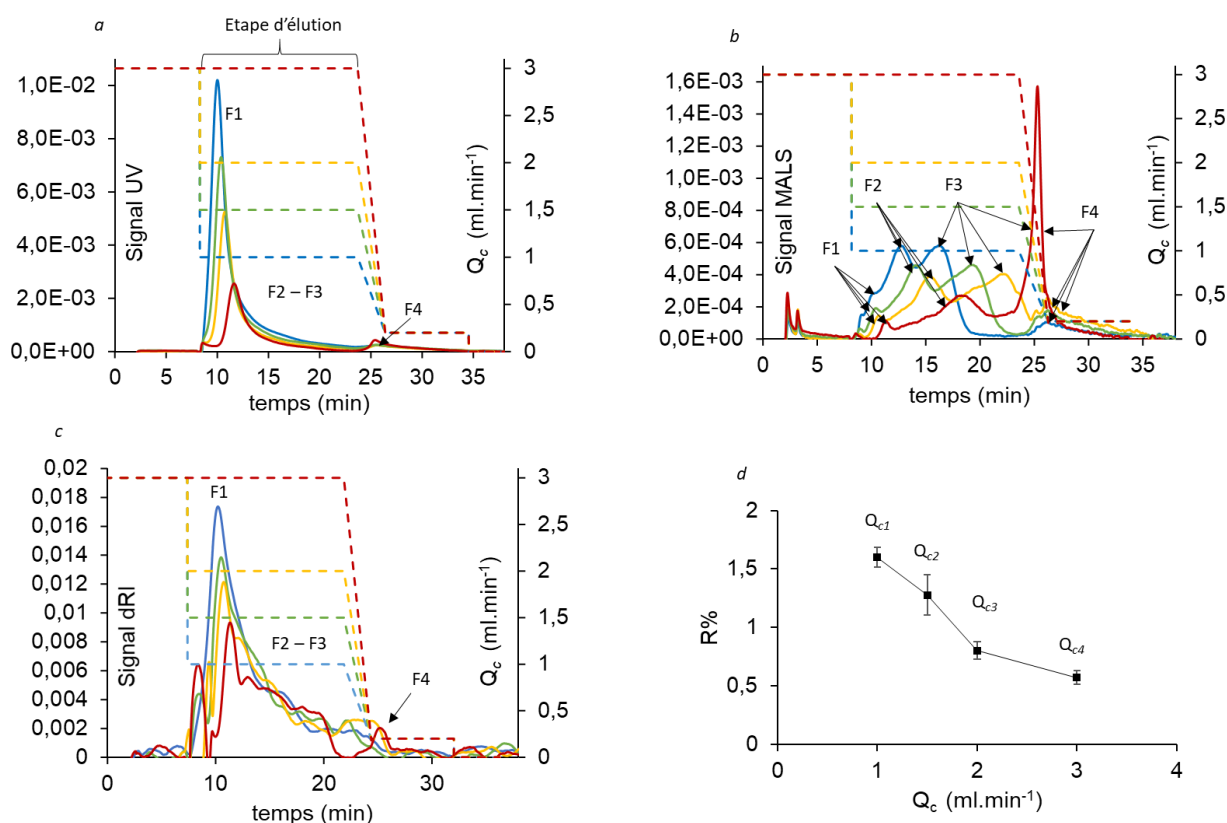
De plus, ce paramétrage est essentiel car ne pas éliminer ces petites molécules en totalité risquerait d'engendrer des profils non répétables. La Figure 20d montre que le recouvrement de l'échantillon diminue entre Q_{c1} et Q_{c2} , et demeure constant de Q_{c2} à Q_{c4} .

Par ailleurs, l'augmentation du flux croisé de Q_{c1} à Q_{c2} a permis de réduire fortement le pic élué entre 8 et 9 min sur les signaux UV et dRI, et l'a éliminé sur le signal de diffusion de la lumière (Figure 20a, b et c). Une diminution supplémentaire du pic entre 8 et 9 min sur les fractogrammes UV et dRI a été observée à partir de Q_{c3} , puis une stabilisation à Q_{c4} . Ceci suggère qu'un Q_c fixé à $3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ est suffisant pour éliminer l'intégralité des molécules dont la taille est inférieure au seuil de coupure de la membrane.

1.2.2 Pendant l'étape d'élution

Comme cela a été vu précédemment, la fraction **F2** semble contenir deux sous-fractions (Figure 20b). Le premier palier du débit du flux croisé pendant l'étape d'élution a été optimisé de façon à séparer les sous-fractions coéluees. Plusieurs débits de flux croisé ont été testés, ils sont compris entre 1 et 3 ml.min⁻¹ et ont été suivi d'une décroissance linéaire, puis d'un second palier à 0,2 mL⁻¹, qui est resté inchangé (Figure 21). Les fractogrammes obtenus avec les nouvelles conditions de flux croisés, laissent apparaître un plus grand nombre de population par rapport aux conditions précédentes. Ces populations sont notamment visibles sur les fractogrammes du MALS (Figure 21b). Ces nouvelles populations ont été divisées en quatre fractions, nommées dans leur ordre d'élution (F1, F2, F3 et F4, Figure 21).

Figure 21. Influence de Q_c sur la séparation des composés du vin rouge lors de l'étape d'élution.



$Q_{out} = 1 \text{ ml.min}^{-1}$. Lignes pleines : profils UV du vin à $\lambda = 280 \text{ nm}$ (a), profils de diffusion de la lumière à 90° (b) et signal dRI (c). Lignes pointillées bleues : $Q_{c1} = 1 \text{ ml.min}^{-1}$; lignes pointillées vertes : $Q_{c2} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$; pointillés jaunes : $Q_{c3} = 2 \text{ ml.min}^{-1}$; pointillés rouges : $Q_{c4} = 3 \text{ ml.min}^{-1}$. Récupération de l'échantillon (%) calculée à partir du signal UV (c.f. Chapitre II, section 4.2) à chaque Q_c . (d). Chargement de l'échantillon = $50 \mu\text{L}$.

Les profils UV (Figure 21a) montrent un pic élué précocement (F1), suivi d'une traînée qui décroît avec le temps d'élué. Les profils dRI et MALS (Figure 21b, c) sont plus complexes, avec plusieurs populations éluées plus tardivement. Par ailleurs, une diminution de l'intensité du signal en fonction de la force du flux croisé est visible sur les fractogrammes UV et dRI (Figure 21a, c). De plus, cette diminution du signal s'accompagne d'une baisse du taux de recouvrement de l'échantillon de 1,5 % à Q_{c1} à environ 0,5 % à Q_{c4} , (Figure 21d). Considérant que les composés de petite masse molaire ont été éliminés pendant l'étape de relaxation, ce résultat suggère que la force du flux croisé favorise l'adsorption des analytes sur la membrane.

Les fractogrammes UV, MALS et dRI montrent aussi que le temps de rétention de F1 augmente avec Q_c , comme le prévoit la théorie de l'AsFIFFF. Par ailleurs, la comparaison des fractogrammes MALS montre que le fait de diminuer la force du flux croisé en dessous de $Q_c = 2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, permet aux fractions F2 et F3 d'être éluées sous un flux croisé constant, entre 10 et 23min et d'avoir une plus grande résolution de F4 (Figure 21b).

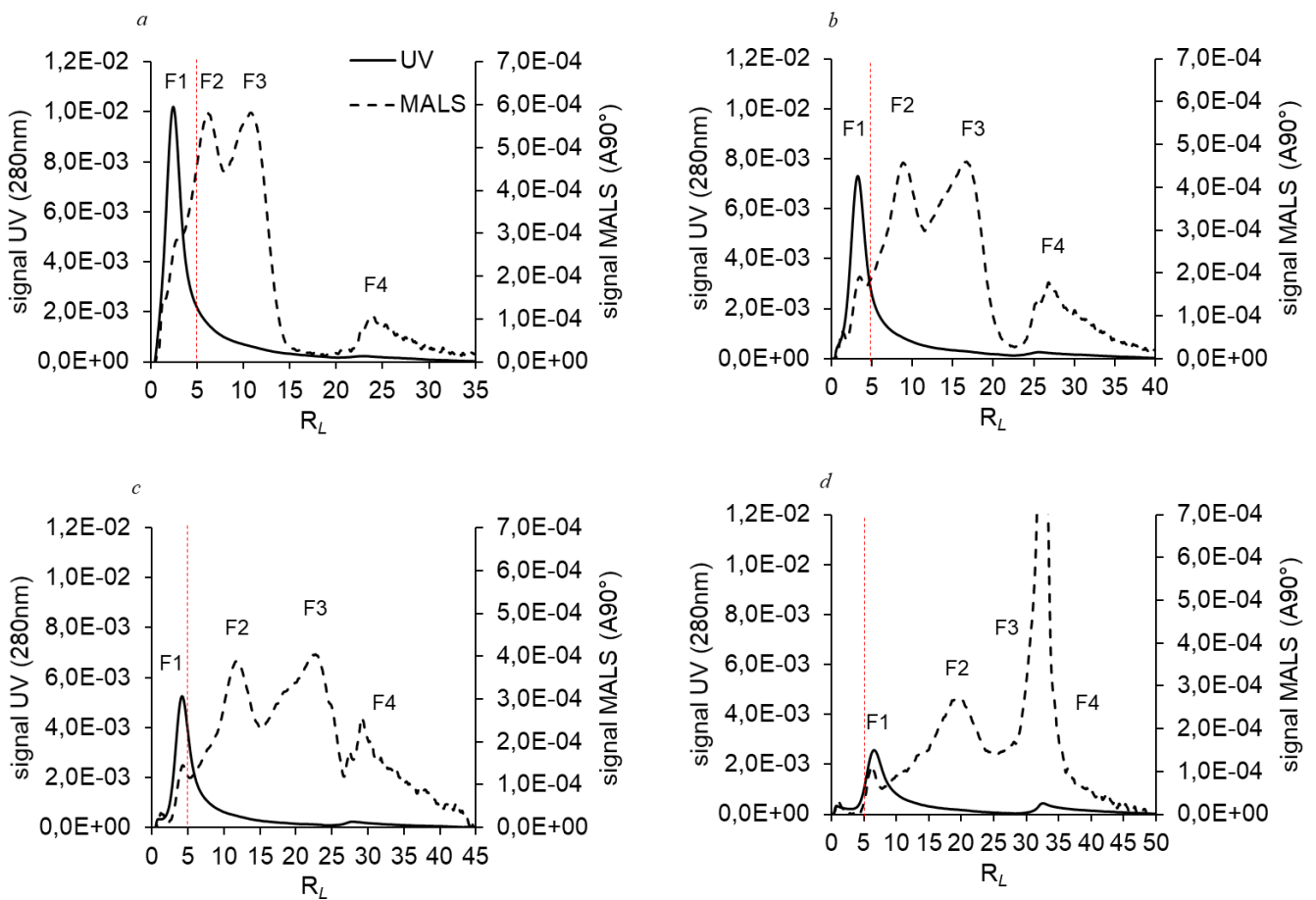
De plus, il peut être observé que l'intensité de F4 augmente fortement à Q_{c4} (Figure 21b). Cette fraction est bien séparée de F3 pour Q_{c1} , Q_{c2} et Q_{c3} (Figure 21b). Elle est partiellement coéluee avec F3 à Q_{c3} puis devient beaucoup plus abondante à Q_{c4} (Figure 21b). Au vu de cette observation, il a été supposé qu'un transfert de matière de F3 à F4 se produit lorsque la force du flux croisé est trop élevée, causant une coélution entre F3 et F4.

Par ailleurs, un niveau de rétention (R_L) optimal a été recherché à travers le paramétrage du flux croisé pendant l'étape d'élué. Ce niveau de rétention doit être suffisant pour les plus petites molécules ($R_L \geq 5$) afin d'avoir une résolution suffisante (Wahlund, 2013). En revanche, R_L ne doit pas être trop élevé non plus ($R_L > 40$), pour éviter un élargissement de pic trop important, ce qui se traduit par une dilution importante des fractions.

Les fractogrammes UV et MALS ont également été tracés en fonction du R_L pour chacune des conditions testées (pour chaque Q_c , Figure 22). Ces graphiques montrent que F1 a été élué à un $R_L < 5$ pour Q_{c1} , Q_{c2} et Q_{c3} (Figure 22a, b et c) et à un $R_L > 5$ pour Q_{c4} (Figure 22d). Cela indique que la force du flux

croisé doit être suffisamment élevée (au moins $3\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) pour que F1 ait un R_L acceptable ($R_L \geq 5$), (Wahlund, 2013). Cependant, un débit de flux croisé trop élevé n'a pas permis de séparer les composés les plus volumineux, causant une coélution entre F3 et F4. De plus, les forts débits provoquent des pertes relativement importantes de matière, par adsorption sur la membrane. En revanche, un débit de flux croisé trop bas, ne permet pas d'éluer F1 à un R_L suffisamment élevé.

Figure 22. Influence de Q_c sur le niveau de rétention (R_L) des composés du vin rouge lors de l'étape d'élution calculé pour chaque condition testée (pour chaque Q_c)

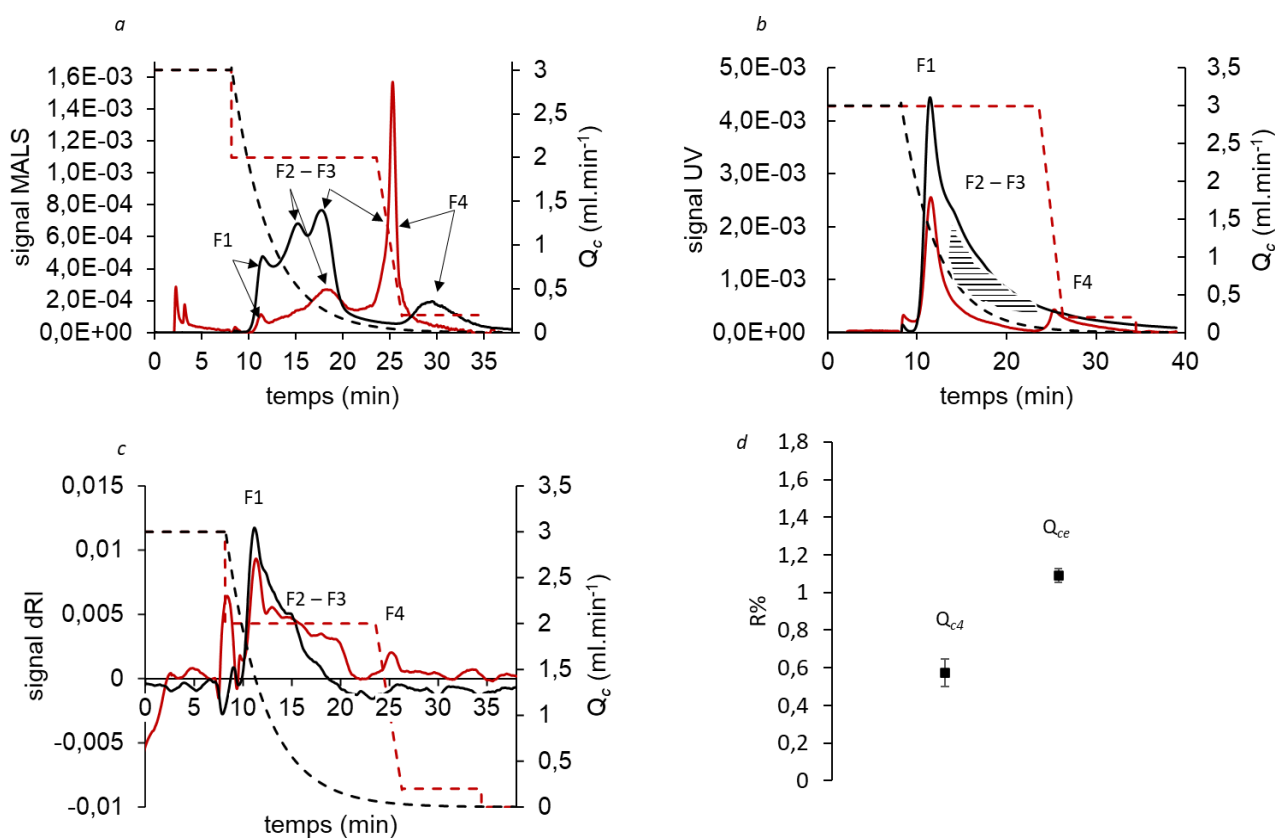


$Q_{out} = 1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Lignes pleines : profils UV du vin à $\lambda = 280\text{ nm}$. Lignes en pointillés : profils MALS à l'angle 90° . $Q_{c1} = 1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (a) ; $Q_{c2} = 1,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (b) ; $Q_{c3} = 2\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (c) ; et $Q_{c4} = 3\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (d).

Cette expérimentation a montré qu'il est difficile d'obtenir une bonne séparation des macromolécules de vin en utilisant des programmes tels que ceux qui ont été utilisés ici, en raison de la présence d'une large gamme de tailles de molécules.

Par ailleurs, il a été montré que l'application d'un programme de débit du flux croisé à décroissance exponentielle était efficace pour séparer des composés avec une large gamme de masse molaire dans des échantillons complexes (Leeman, Wahlund, & Wittgren, 2006). Par conséquent, cela a été testé sur l'échantillon de vin et comparé ici au programme isoforce, Q_{c4} (Figure 23). Les fractogrammes MALS montrent que la séparation de F3 et de F4 a bien été effectuée avec le programme Q_{ce}^5 comparé au programme Q_{c4} , où ces deux fractions sont coéluées (Figure 23a). Par ailleurs, le fractogramme UV obtenu à partir de Q_{ce}^5 a mis en évidence un signal plus élevé entre 12 et 25 min par rapport à Q_{c4} (zone hachurée sur la Figure 23b). Enfin, le recouvrement de l'échantillon est plus élevé avec le programme Q_{ce}^5 qu'avec Q_{c4} (Figure 23d), ce qui indique que Q_{ce}^5 a permis de conserver plus de matière absorbante dans l'UV. Ces observations suggèrent que le signal UV au niveau des fractions F2 et F3 détectées sur

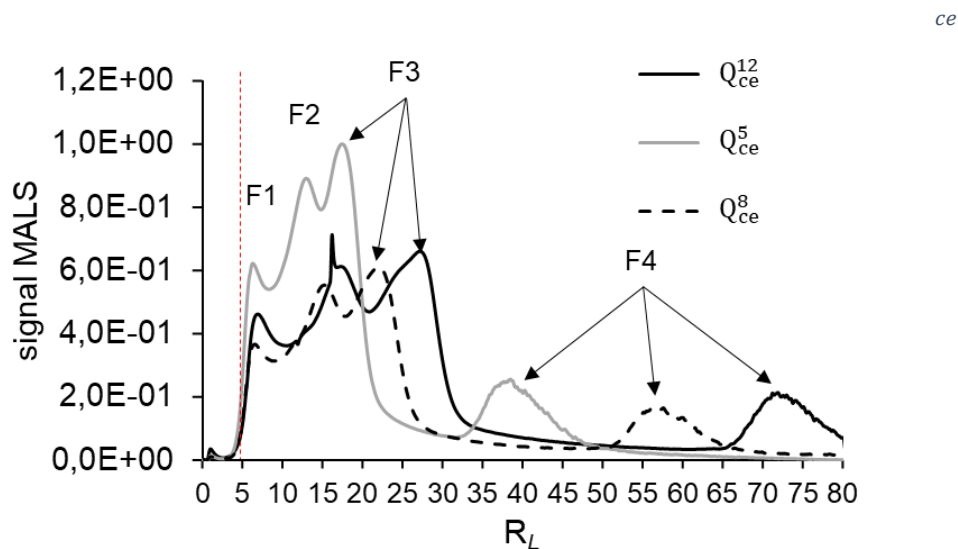
Figure 23. Comparaison des fractogrammes obtenus avec un flux à décroissance exponentielle (Q_{ce} , noir) et des fractogrammes obtenus avec un flux croisé isoforce (Q_{c4} , rouge).



$Q_{out} = 1 \text{ ml.min}^{-1}$. Lignes pleines : Profils UV du vin à $\lambda = 280 \text{ nm}$ (b), profils de diffusion de la lumière à 90° (a) et profils dRI (c). Lignes en pointillés : Q_c . Taux de recouvrement de l'échantillon (%) calculé à partir du signal UV, c.f. Chapitre II, section 4.2 (d). Volume d'injection = $50 \mu\text{L}$.

le MALS pourrait correspondre à des complexes entre les composés phénoliques et d'autres macromolécules présentes dans le vin rouge telles que les polysaccharides ou les protéines, ou à des tanins de très haute masses molaire. Le taux de recouvrement étant moins important pour le programme Q_{ce} , ceci suggère qu'un débit constant de flux croisé pendant l'étape d'élution favorise l'adsorption des composés phénoliques sur la membrane d'AsFIFFF comparé au gradient de décroissance exponentielle et perturbe ce qui pourrait correspondre aux complexes macromoléculaires.

Figure 24. Influence de Q_{ce} sur le niveau de rétention (R_L) des composés du vin rouge lors de l'étape d'élution.



Fractogrammes MALS, $Q_{out} = 1 \text{ ml.min}^{-1}$. Ligne gris clair : facteur de décroissance = 5 (Q_{ce}^5) ; ligne en pointillée : facteur de décroissance = 8 (Q_{ce}^8) ; ligne en noir : facteur de décroissance = 12 (Q_{ce}^{12})

Par ailleurs, le R_L et la qualité de séparation ont été évalués pour plusieurs programmes Q_{ce} (Figure 24). Ces différents programmes se différencient par la vitesse de décroissance de la fonction exponentielle où Q_{ce}^5 présente la décroissance la plus rapide (programme qui a été comparé au-dessus, Figure 24), Q_{ce}^8 présente une décroissance intermédiaire et Q_{ce}^{12} présente la décroissance la plus lente. La confrontation des fractogrammes avec le R_L montre que les programmes Q_{ce} ont permis d'éluer F1 à un R_L équivalent au programme Q_{ce} et que la vitesse de décroissance n'a pas eu d'impact sur le R_L de cette fraction. En revanche, il a été observé que les fractions éluées plus tardivement étaient plus impactées par le facteur

de décroissance du Q_c . Ce phénomène est notamment visible sur F4 qui a été éluée à des R_L très importants pour les programmes ayant les décroissances de débit les plus lentes (i.e : pour la fraction F4 : $R_L = 40, 60$ et 75 pour Q_{ce}^5 , Q_{ce}^8 et Q_{ce}^{12} , respectivement, Figure 24). F4 ainsi que les fractions éluées plus tôt sont déjà suffisamment résolues avec le programme Q_{ce}^5 . Par conséquent, il n'est pas nécessaire de ralentir d'avantage la décroissance du flux, au risque de favoriser l'adsorption des composés phénoliques sur la membrane ou d'introduire un facteur de dilution plus important pour les fractions les plus tardives.

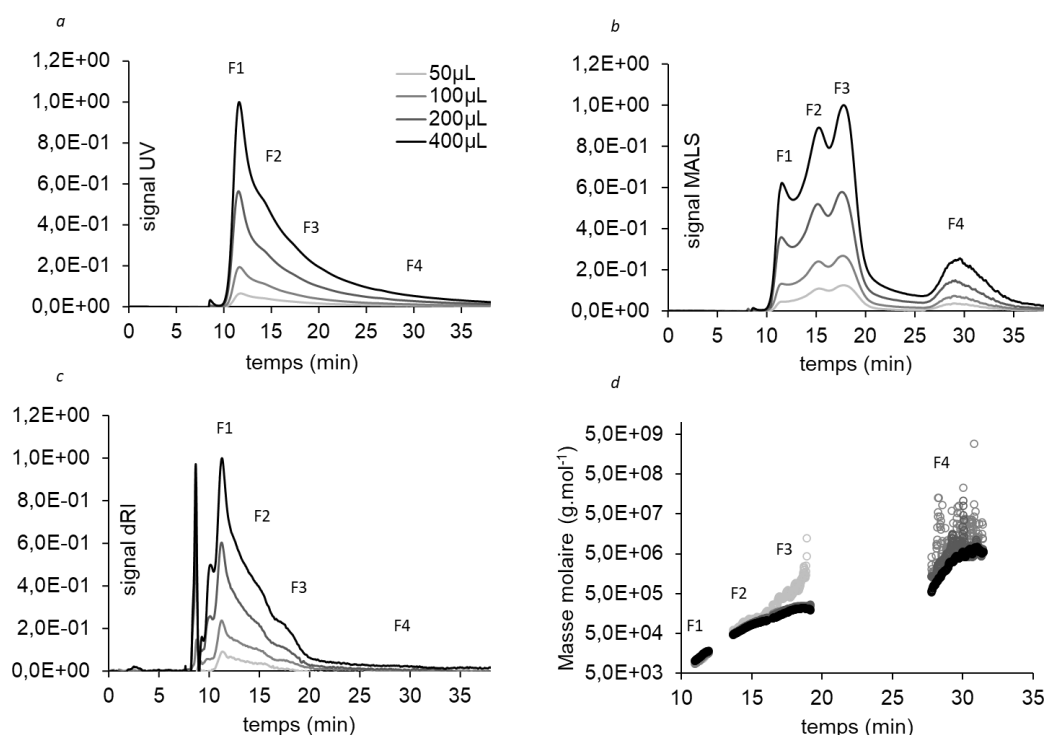
En résumé, le flux croisé avec décroissance exponentielle Q_{ce}^5 s'est avéré efficace pour fractionner les macromolécules du vin rouge et a permis de conserver plus de matériel phénolique que le programme isoforce.

1.3 Effet du volume d'échantillon injecté

Plusieurs volumes d'échantillons (V_{inj}) de vin (50, 100, 200 et 400 μ L) ont été injectés dans le canal d'AsFIFFF pour évaluer l'impact de ce paramètre sur les fractogrammes UV, MALS et dRI ainsi que sur le calcul de la masse molaire. Les fractogrammes obtenus pour chaque volume d'injection et pour chaque détecteur sont exposés sur la Figure 25. Le temps de rétention de chaque fraction n'a pas été affecté par le volume injecté et la surface des pics est proportionnelle au volume injecté (Figure 25). Par ailleurs, les fractogrammes dRI mettent en évidence deux pics suspects élués en amont de F1 (Figure 25c). Le premier de ces pics (le plus grand et le plus intense) est apparu un peu plus tôt que $t_{starter}$ pour $V_{inj} = 400\mu$ L tandis que le second apparaît légèrement avant F1 pour un V_{inj} allant de 100 μ L à 400 μ L. Ces signaux peuvent correspondre à la formation d'artefacts en lien avec l'injection de l'échantillon. En effet, aucun signal correspondant à ces pics n'a été détecté sur les fractogrammes UV ou MALS (Figure 25a et b). En outre, l'apparition d'artefacts sur l'AsFIFFF a été signalée et attribuée à différentes causes : surcharge d'échantillon (Caldwell, Brimhall, Gao, & Giddings, 1988), perturbation de la pression du canal (Kanzer et al, 2010), agrégation colloïdale ou désorption de composés accumulés sur la membrane du canal (Lyvén, Hassellöv, Turner, Haraldsson, & Andersson, 2003).

Cependant, les formes des pics suggèrent qu'ils ne sont pas dus à une surcharge, car ce phénomène est connu pour causer une dissymétrie du pic (Caldwell et al, 1988). En outre, un volume d'éluant a été injecté avant chaque injection de vin pour faire le blanc et aucune pollution n'a été remarquée sur le blanc (données non exposées). Cela indique que ces pics supplémentaires ne proviennent pas de la libération de composés accumulés sur la membrane. Par conséquent, ils sont probablement dus à une perturbation de la pression du canal liée à la charge de l'échantillon. Par ailleurs, la masse molaire a été calculée pour chaque fraction à l'aide des signaux MALS et dRI. Notons que la réponse de chaque détecteur doit être suffisamment élevée pour donner une bonne mesure de la masse molaire. Ainsi, le signal dRI correspondant à F4 est très proche de la ligne de base, quelle que soit la valeur de V_{inj} (Figure 25c et d) de sorte que la masse molaire calculée pour cette fraction est entachée d'une grande incertitude. La distribution de masse molaire est constante de 50 à 400 μL pour F1, et de 100 à 400 μL pour F2 et F3. Toutefois, le signal dRI est insuffisant pour permettre un calcul précis de la masse molaire entre 16 et 20 min, à 50 μL , ce qui pourrait expliquer le décrochage des valeurs de masse molaire calculées pour

Figure 25. Effet du volume d'injection : Le programme d'éluion utilisé est le flux croisé de décroissance exponentielle (Q_{ce}^5).

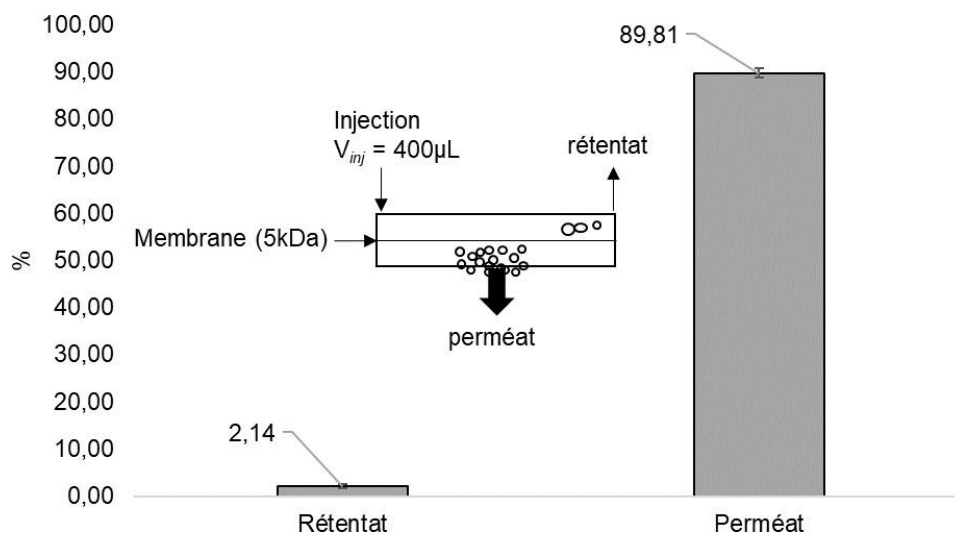


Profil UV à $\lambda = 280 \text{ nm}$ (a), profils de diffusion de la lumière à 90° (b), profils dRI (c), distribution de la masse molaire (d) - le dn/dc utilisé pour calculer la masse molaire était de 0,247 (Vernhet et al, 2011) pour F1 et de 0,146 (Redgwell et al. 2005) pour F2, F3 et F4.

F3 ($> 1106 \text{ g.mol}^{-1}$, Figure 25d). En fait, ce résultat indique que $100 \mu\text{L}$ est le volume minimum pour obtenir un calcul satisfaisant de la masse molaire pour F1, F2 et F3.

L'optimisation des paramètres discutés jusqu'à présent a permis de conclure que la membrane de 5kDa était la plus à même de retenir et d'analyser la fraction macromoléculaire qui nous intéresse. Il est nécessaire d'équilibrer cette membrane avec au moins $500 \mu\text{L}$ de vin pour atteindre des conditions opératoires optimales. Par ailleurs, il a été vu que le programme Q_{ce}^5 (que l'on nommera plus simplement Q_{ce} à partir de maintenant) était le plus adapté pour séparer cette fraction macromoléculaire, tout en conservant le maximum de matière absorbant dans l'UV. De plus, il a également été vu que le volume de vin injecté dans le canal devait être suffisant ($>100 \mu\text{L}$) pour obtenir une mesure correcte de la masse molaire par MALS/dRI.

Figure 26. Mesure de la part de matière retenue au-dessus de la membrane (rétentat) versus la part de matière perdue dans le flux croisé (perméat), à 280nm .



Les conditions qui viennent d'être résumées seront conservées pour la suite des travaux. Un bilan matière complet (évaluation de ce qu'on garde au-dessus de la membrane : rétentat et de ce qui passe à travers de la membrane : perméat) a été réalisé dans l'UV à 280nm (Figure 26) pour ces conditions retenues. Comme cela était attendu, le perméat représente la grande majorité de la matière de l'échantillon absorbant dans l'UV ($\sim 90\%$) et le rétentat (comme vu plus haut), ne représente que

quelques pourcents (~2%). Il en a été déduit que ~8% de l'échantillon était adsorbé sur la membrane (ou dans le système HPLC).

La section qui va suivre vise à évaluer la répétabilité et la reproductibilité de cette méthode, afin d'en déterminer les limites. L'objectif pour la suite est d'analyser un grand nombre d'échantillons de vin. Par conséquent, il est important de connaître quelques points clés pour s'assurer de la qualité de l'analyse.

Ils'agira alors de répondre aux questions suivantes :

- Quel volume maximal de vin une membrane est-elle capable de recevoir, tout en donnant des résultats répétables ?
- Les fractogrammes sont-ils identiques d'une membrane à une autre, si les deux membranes présentent les mêmes caractéristiques (matériau, seuil de coupure) ?

2 Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode et de la durée de vie d'une membrane

2.1 Répétabilité et reproductibilité de la méthode d'analyse

Premièrement, il est important de rappeler ce qui distingue ces deux notions de répétabilité et de reproductibilité :

La répétabilité est la qualité d'une mesure qui donne le même résultat si on la répète dans des conditions identiques et dans un court intervalle de temps (*Larousse*).

La reproductibilité, quant à elle, est définie par la qualité d'une mesure qui donne les mêmes résultats si on la répète dans des conditions différentes et à des époques différentes (*Larousse*).

Par ailleurs, une des principales sources de variabilité d'une mesure réalisée à partir de données fournies par l'AsFIFFF-multidétection est la membrane d'ultrafiltration (Kassalainen & Williams, 2012; Gigault et al. 2014; Wahlund 2013). En effet, il a été vu que la membrane pouvait engendrer des phénomènes d'absorptions de l'analyte (Kassalainen & Williams, 2012, Gigault et al. 2014; Wahlund 2013). De plus, il a déjà été rapporté que des membranes données pour avoir les mêmes caractéristiques, par

différents fournisseurs par exemple, pouvaient présenter des différences relativement importantes, notamment au niveau du seuil de coupure (Kassalainen & Williams, 2012).

Pour la plupart des cas pratiques, les composés présents dans les mélanges séparés par AsFIFFF présentent des tailles largement supérieures au seuil de coupure de la membrane. Par conséquent, cette variabilité n'a que peu d'impact. En revanche, dans le cadre de ce travail, l'AsFIFFF est non seulement utilisée pour analyser les colloïdes du vin rouge, mais aussi comme une méthode préparative de l'échantillon, à travers laquelle l'échantillon est filtré pour ne retenir que la fraction macromoléculaire. Par conséquent, les variations du seuil de coupure d'une membrane à l'autre peuvent poser un problème au niveau de la reproductibilité de l'analyse.

La répétabilité et reproductibilité de la méthode de séparation ont été évaluées sur trois membranes en CR avec un seuil de coupure de 5kDa, issues du même fournisseur, pour trois vins commerciaux différents, injectés à hauteur de 400µL.

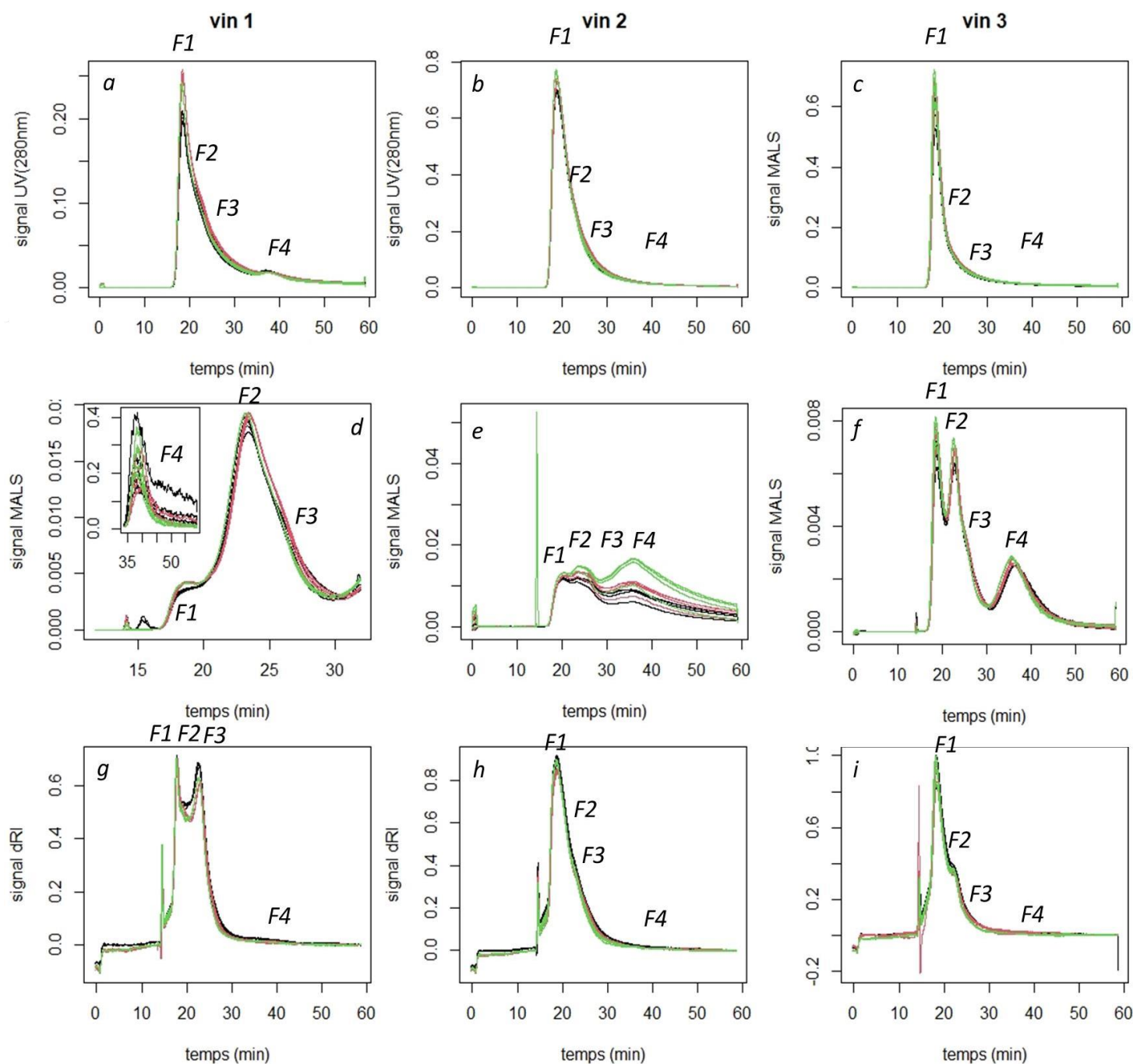
Cette évaluation porte sur deux critères :

- Calcul du pourcentage de variation de l'aire totale des fractogrammes, UV, MALS et dRI (Tableau 5, Tableau 6).
- Analyse visuelle des fractogrammes (Figure 27).

(Les vins qui ont été évalués dans cette expérimentation sont les premiers vins différents du vin de syrah qui a été utilisé jusqu'ici pour mettre au point la méthode de séparation. La première observation qu'on peut faire est que ces vins ont donné des profils différents. Ces différences ont été observées au niveau de l'intensité des pics et de leur résolution, notamment pour les fractions F2/F3. Toutefois, les fractogrammes obtenus à partir de ces différents vins montrent que les fractions qui ont été définies sur le vin de syrah peuvent être retrouvées. Cela suggère que les vins possèdent un « profil type » pour ces conditions d'analyse sur l'AsFIFFF-multidétection et qu'il est possible de relier ces différences

d'intensité des fractions à différents paramètres expérimentaux tels que l'astringence (cela sera discuté plus tard, dans le Chapitre V)).

Figure 27. Evaluation visuelle de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode d'éluion.



Fractogrammes UV à 280nm (a, b, c) ; fractogrammes MALS pour l'angle 90° (d, e, f) ; fractogrammes dRI (g, h, i). Les couleurs verte, noire et rose représentent les fractogrammes obtenus pour les membranes n°1, 2 et 3 respectivement (quatre répétitions de l'analyse/membrane)

La répétabilité est donnée ici pour une membrane (Tableau 5). Les aires des fractogrammes UV et dRI varient assez peu, hormis pour le vin 3 qui présente les taux de variation les plus élevés (entre 5,0 et 7,0% et entre 3,0 et 5,6%, selon la membrane, dans l'UV et pour le dRI respectivement), (Tableau 5). En revanche, des variations plus importantes ont été observées pour les fractogrammes MALS, notamment pour les vins a et b. Les fractogrammes reportés sur la Figure 27 montrent que cette variabilité est en lien avec F4 (Figure 27d et e). L'intensité du signal augmente avec la taille des objets, par conséquent, la perte de quelques µg de très gros objets tels que ceux qui sont retrouvés dans F4 (interaction avec la membrane par exemple), provoque des variabilités importantes du signal. Cependant, les signaux des détecteurs quantitatifs comme le dRI et l'UV, ne sont pas affectés par cette variabilité, car les pertes sont négligeables.

Ces résultats montrent que la répétabilité de la méthode d'analyse est dépendante de l'échantillon mais aussi des fractions observées. En effet, les fractions F1, F2 et F3 sont globalement répétables, tandis que la fraction F4 montre de fortes variations pour les vins a et b, mais pas pour le vin c (Tableau 5).

Tableau 5. Pourcentage de variation par échantillon et par membrane = répétabilité

<i>modalité</i>	<i>échantillon</i>	<i>% variation UV</i>	<i>% variation MALS</i>	<i>% variation dRI</i>
membrane 1	vin a	2.3	23.8	2.0
	vin b	2.7	7.4	3.5
	vin c	7.3	3.6	5.6
membrane 2	vin a	1.9	15.0	1.0
	vin b	2.6	6.9	3.4
	vin c	5.1	3.2	3.2
membrane 3	vin a	1.6	7.1	1.0
	vin b	2.2	16.5	3.3
	vin c	6.7	2.2	4.7

La reproductibilité est donnée pour un même échantillon qui a été analysé sur les trois membranes (Tableau 6). Les variations des aires UV et dRI pour un échantillon donné, sont légèrement plus élevées que les aires de ce même échantillon injecté sur une même membrane. Par exemple, on observe que le vin 1 présente des taux de variation pour les fractogrammes UV de 2,3 ; 1,9 et 1,6% pour les membranes 1, 2 et 3 respectivement (Tableau 5). Or, le taux de variation de ce même échantillon pour les trois

Tableau 6. Pourcentage de variation par échantillon et par membrane = reproductibilité

<i>échantillon</i>	<i>% variabilité UV</i>	<i>% variabilité MALS</i>	<i>% variabilité dRI</i>
vin a	5.7	16.7	5.3
vin b	3.0	21.5	3.4
vin c	7.5	3.4	5.1

membranes confondues est de 5,7 (Tableau 6). Cela indique que les fractogrammes sont répétables pour une membrane donnée. En revanche, la reproductibilité entre deux membranes est plus aléatoire. En effet, les membranes utilisées sont obtenues à partir de feuilles plus grandes, elle mêmes issus de rouleaux industriels et il est commun que les membranes d'ultrafiltration ne soient pas parfaitement homogènes au niveau du seuil de coupure.

Par conséquent, dans le cas où l'on souhaite réaliser des analyses sur un grand nombre d'échantillons de vin, il sera préférable de le faire sur la même membrane. Cela implique donc de connaître quel est le volume maximum qu'une membrane puisse recevoir, tout en restant dans un domaine de répétabilité acceptable.

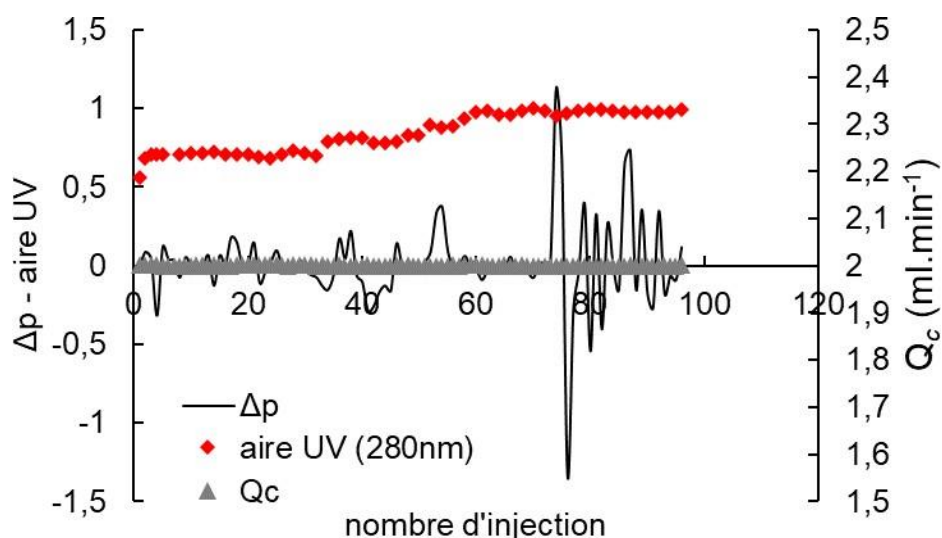
2.2 *Evaluation de la durée de vie de la membrane*

Pour finaliser le développement de la méthode de séparation, la durée de vie d'une membrane (CR, 5kDa) a été évaluée pour définir le volume de vin qui peut être passé avec une seule membrane. Cette information peut avoir de l'intérêt, car elle permet d'optimiser la consommation des membranes pour l'analyse de routine. Pour ce faire, un échantillon de vin a été injecté 100 fois à un volume 400 μ L.

La Figure 28 montre l'évolution de l'aire totale du fractogramme UV, de la pression au sein du canal, et du débit du flux croisé. L'évolution de l'aire UV des fractogrammes montre que le conditionnement de la membrane a été atteint au bout de seulement deux injections, contre cinq plus haut (Figure 28), car ici, le volume d'injection est quatre fois plus important (100 μ L dans le premier cas, contre 400 μ L ici). Par ailleurs, l'aire des fractogrammes est régulière jusqu'à la 32^{ème} injection. Par la suite, l'aire augmente jusqu'à la 60^{ème} injection, avant de se stabiliser de nouveau jusqu'à la 100^{ème} injection (Figure 28). Cela indique que l'encrassement de la membrane est stable entre la 2^{ème} et la 32^{ème} injection. Au-delà, il se

forme une couche à la surface de la membrane. Par conséquent, davantage de matière est retenue. Par ailleurs, la pression du canal est relativement stable jusqu'à la 74^{ème} injection et connaît par la suite des variations plus importantes. En revanche, le débit du flux croisé est resté stable jusqu'à la 100^{ème} injection.

Figure 28. Evaluation de la durée de vie d'une membrane au cours des injections d'un échantillon de vin, (volume d'injection = 400 μ L).



Ces résultats indiquent que la pression se régule pour conserver un débit stable et donc que l'encrassement de la membrane commence à impacter le fonctionnement de l'appareil. Par conséquent, le changement de la membrane doit être réalisé autour de 70 – 80 injections, soit entre 28 et 32ml de vin, afin de limiter l'usure du matériel et pour conserver des résultats fiables.

Néanmoins, il est important de prendre en compte que cet essai a été réalisé à partir d'un seul échantillon de vin et une seule membrane. Or, la diversité de la composition des vins ou de la taille moyenne des pores de la membrane peut probablement entraîner des variations de la fenêtre de travail définie ici, car la vitesse d'encrassement est dépendante de la teneur en polyphénols ou en polysaccharides.

3 Conclusion

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant montrent que, pour les conditions qui ont été retenues, la fraction retenue au-dessus de la membrane de l'AsFIFFF ne représente que quelques pourcents des composants du vin contribuant à son absorption dans l'UV. Cette fraction est fortement polydisperse et une méthode de séparation efficace a été développée pour fractionner les macromolécules qu'elle renferme. Le fractogramme du vin a finalement été divisé en quatre fractions (F1 – F4) et il a été vu que ces profils étaient répétables pour une membrane donnée et jusqu'à ~30 mL de vin injecté. La suite de ce travail consiste à identifier les composants qui constituent ces différentes fractions puis à les caractériser.

Chapitre IV

Caractérisation des fractions du vin obtenues après la séparation par AsFIFFF

Introduction

Ce chapitre porte sur la caractérisation des fractions obtenues après analyse du vin de syrah utilisé pour la mise au point de la méthode par AsFIFFF avec le programme optimisé (Q_{ce}). Dans un premier temps, une fraction de polysaccharides extraits à partir de vin rouge, ainsi que deux fractions de tanins issus de pellicule de pomme (DP40 et DP12) ont été analysées par AsFIFFF-UV-MALS-Qels-dRI en utilisant le programme Q_{ce} . L'objectif de cette expérimentation était de comparer les temps d'élution de ces fractions purifiées (i.e. temps de rétention, M_w et R_h), injectées séparément ou en mélange, avec ceux de l'échantillon de vin, qui a été analysé dans les mêmes conditions.

Par la suite, les fractions du vin de référence (F1, F2, F3 et F4) ont été collectées à la sortie du canal pendant la séparation par AsFIFFF comme cela est décrit dans le *Chapitre II, section 6.1*. Les tanins contenus dans ces fractions ont été caractérisés par phloroglucinolyse suivie d'une analyse par HPLC-UV-MS et une analyse par SEC-UV. Les polysaccharides contenus dans ces fractions ont aussi été caractérisés.

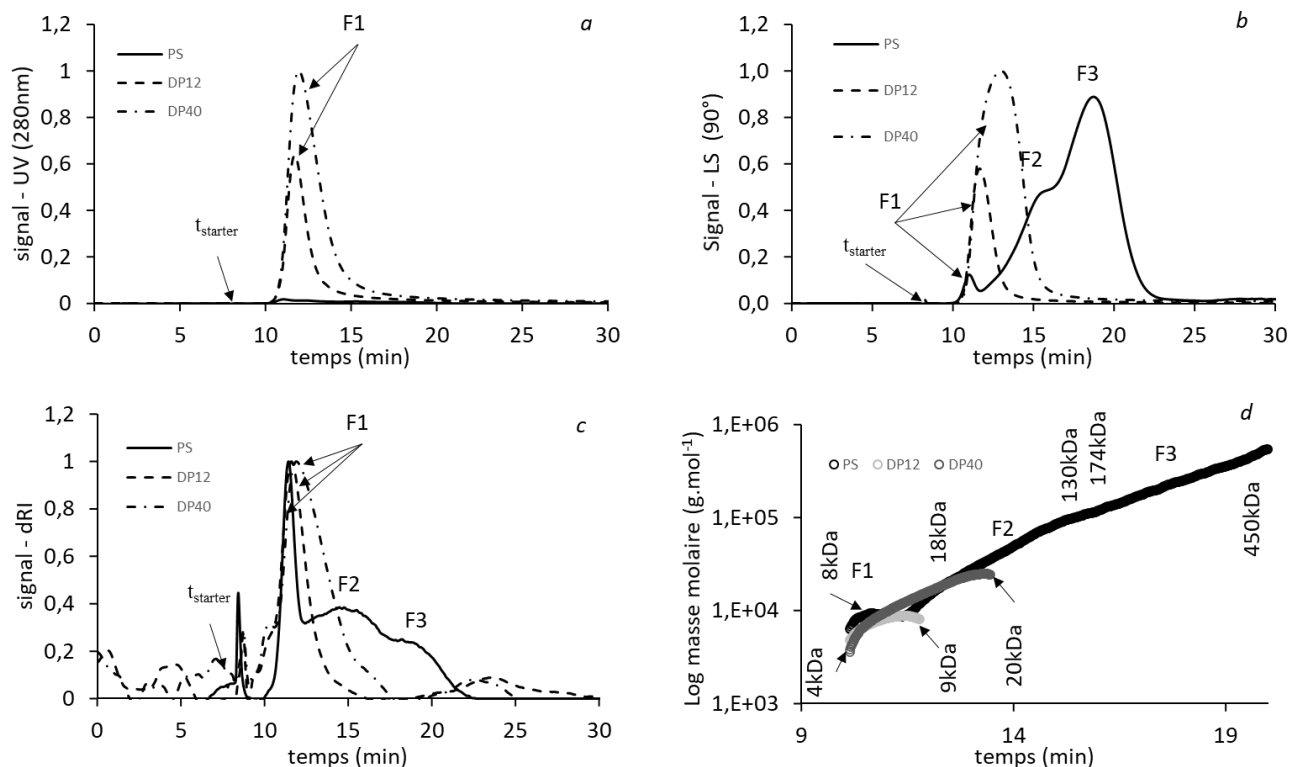
1 Analyse des fractions purifiées de polysaccharides et de tanins par AsFIFFF-MALS-Qels-dRI

1.1 Analyse de la fraction de polysaccharides extraits de vins rouges par AsFIFFF-MALS-Qels-dRI

La Figure 29 montre les fractogrammes MALS, dRI et UV des PS purifiés (en traits pleins), ainsi que la distribution de leur masse molaire (en noir). Les signaux MALS et dRI sont bien visibles, tandis que le signal UV est très faible en raison de la très faible absorbance des polysaccharides dans l'UV. Trois fractions (F1, F2 et F3) ont été observées sur ce fractogramme (Figure 29). Leur masse molaire augmente avec le temps de rétention, conformément à la théorie de l'AsFIFFF (Figure 24). Ces fractions peuvent correspondre à la distribution de masses molaires décrites pour les PS des vins rouges (Doco, Quellec, Moutounet, & Pellerin, 1999; Guadalupe & Ayestarán, 2007; Ducasse et al, 2010), montrant trois populations distinctes : 1) des mannoprotéines de haute masse molaire (F3), 2) des polysaccharides de

masse molaire intermédiaire correspondant à un mélange de PRAGs et de MPs (F2) et 3) des polysaccharides de masse molaire plus faible correspondant principalement au RG-II, avec quelques PRAGs et MPs de plus faible masse molaire (F1).

Figure 29. Fractogrammes des fractions PS, DP12 et DP40



UV à $\lambda = 280 \text{ nm}$ (a), MALS à 90° (b), dRI (c) et distribution de la masse moléculaire (d), calculés avec $dn/dc = 0,165 \text{ ml.mg}^{-1}$ pour F1 des PS (Doco et al, 1993), et $0,146 \text{ ml.mg}^{-1}$ (Redgwell et al, 2005) pour F2 et F3 des PS et masses molaires des tanins calculés avec $dn/dc = 0,247$ (Vernhet et al, 2011)

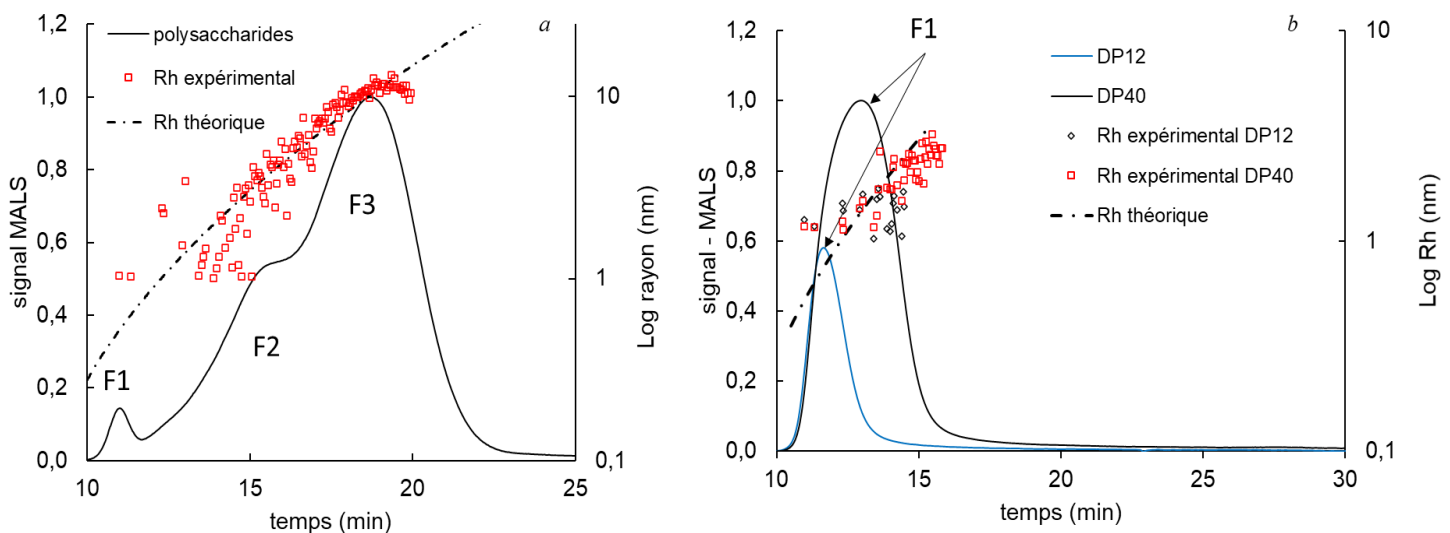
La masse molaire moyenne en masse (M_w) de F1 est de 8kDa et est monodisperse ($M_n/M_w = 1,003 \pm 0,6\%$), (Tableau 7). La M_w du monomère RG-II a été déterminée à 5,3kDa par diffusion de la lumière aux petits angles (SALS) (Doco & Brillouet, 1993) et à 4,7kDa par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Pellerin et al, 1996). En outre, le dimère de RG-II a été trouvé dans le vin (Vidal et al. 2003b). La M_w déterminée pour F1 à partir de la fraction PS correspond à celle du dimère RG-II.

Les masses molaires calculées pour F2 et F3 se trouvent dans des gammes allant de 18 à 130kDa et de 174 à 450kDa, respectivement (Figure 29d) avec des valeurs moyennes à 62 et 278kDa, respectivement (Tableau 7). Ces valeurs sont conformes à celles qui ont été rapportées précédemment pour les PRAGs

et les MPs du vin rouge, allant respectivement de 50 à 190kDa et de 50 à 530kDa (Vidal et al, 2003b; Gonçalves, Heyraud, De Pinho, & Rinaudo, 2002). Cela suggère que F2 contient un mélange de PRAGs et de MPs et que F3 est principalement composée de MPs.

Toutefois, sur la base d'une comparaison de masse molaire, il est difficile d'attribuer précisément les PRAGs et les MPs à chaque fraction de l'AsFIFFF, en raison des très larges distributions de masse molaire de ces polysaccharides. De plus, le taux de recouvrement observé pour cette fraction de PS n'est que de 55% (Tableau 7). Par conséquent, l'interprétation de ces résultats doit être considérée avec précaution. Le rayon hydrodynamique (R_h) de la fraction de PS a été mesuré par QELS (R_h^{exp}), (cf. *Chapitre II, section 4.3.4*) et a été calculé à partir des équations de la théorie de l'AsFIFFF ($R_h^{théo}$), tel que cela est décrit dans le *Chapitre II, section 4.5.2* (Figure 30a). Le R_h^{exp} au niveau de F3 (17 - 20min), a été mesuré entre 6,1nm et 13,2nm (Figure 30a) et la moyenne de cette mesure prise sur la largeur de la fraction est de 9,5nm (Tableau 7). La distribution des points de mesures est peu dispersée et le $R_h^{théo}$ semble être en bon accord avec le R_h^{exp} (9,8nm en moyenne, Tableau 7, Figure 30a).

Figure 30. Fractogrammes MALS des PS (a) et des fractions de tanins DP12 et DP40 (b).



Le R_h a été déterminé par QELS et théoriquement avec l'équation 15.

Concernant la fraction F2, le R_h^{exp} est compris entre ~1,0 et 4,5nm et mesure 1,8nm en moyenne (Tableau 7, Figure 30a). La dispersion des points de mesure est plus importante à ce niveau et cette dispersion augmente à mesure que le temps de rétention diminue (Figure 30a). Cela peut s'expliquer par la présence du bruit présent dans le signal Qels (profil non exposé). Le $R_h^{théo}$ pris au niveau de F2 est compris entre 1,4 et 4,4nm et mesure en moyenne 2,6nm (Tableau 7, Figure 30a).

Le R_h^{exp} et le $R_h^{théo}$ sont concordants pour le plus haut temps de rétention de la fraction F2 (16min) tandis que pour le temps de rétention le plus bas (13min), le $R_h^{théo}$ est plus élevé. Cette disparité peut aussi s'expliquer par le fait que le signal du Qels est très bruité aux faibles temps de rétention. Le R_h de la fraction F1 (entre 10,5 et 11,5min) n'a pas pu être déterminé expérimentalement.

Cela s'explique par le fait que les composés de la fraction F1 possèdent un rayon plus petit que la limite basse de détection du Qels (~1nm). Cependant, le $R_h^{théo}$ moyen pour cette fraction est de 0,49nm. Ce R_h est raisonnablement en accord avec celui du RG-II (Pérez, Rodríguez-Carvajal, & Doco 2003). Cela suggère que le $R_h^{théo}$ peut être utilisé pour estimer la taille des composés élués aux très faibles temps de rétention ($t_r < 12$ min) dont le R_h est en dessous de la limite de détection du Qels.

Le R_g , a également été mesuré uniquement pour la fraction F3 (résultats non exposé). Il est compris entre 9,5 et 18 nm. En revanche, le R_g des fractions éluées plus tôt n'est pas mesurable car à la limite inférieure de la détermination du R_g avec le détecteur MALS (~10nm). En somme, ces résultats montrent que les PS des vins contiennent une gamme de masse molaire très étendue (de 8 à >450kDa), ce qui confirme ce qui a déjà été rapporté (Doco, Quellec, Moutounet, & Pellerin, 1999; Guadalupe & Ayestarán, 2007; Ducasse et al, 2010).

Tableau 7. dn/dc , taux de recouvrement de l'échantillon, temps de rétention (t_r), masse molaire moyenne (M_w) et indice de polydispersité des fractions. ^ataux de recouvrement de l'échantillon calculée à partir du dn/dc , ^b dn/dc moyen (dn/dc de polyphénol et dn/dc et RG-II) ; ^c R_h moyen calculé sur la gamme des temps de rétention correspondant aux fractions ; nc = valeurs non calculées

échantillon	fraction	dn/dc	taux de recouvrement par fraction (%) ^a	Taux de recouvrement total (%)	gamme t_r (min)	M_w (kDa)	Polydispersité	Rh expérimental ^c	Rh théorique ^c
							(M_w/M_n)	(nm)	(nm)
PS	F1	0.165	14	55.6	10.5 - 11.5	7.9 ($\pm 0.5\%$)	1.003 ($\pm 0.6\%$)	nc	0.49
	F2	0.146	29.7		13 - 16	65 ($\pm 0.1\%$)	1.29 ($\pm 0.2\%$)	1.8 ($\pm 2.1\%$)	2.1
	F3		11.9		17 - 20	281.5 ($\pm 0.1\%$)	1.121 ($\pm 0.14\%$)	9.5 ($\pm 1.0\%$)	9.8
DP12	F1	0.247	23	23	10.5 - 12.8	6.9 ($\pm 1.7\%$)	1.072 ($\pm 2\%$)	nc	0.71
DP40	F1		56.2	56.2	10.5 - 14	13.5 ($\pm 0.2\%$)	1.30 ($\pm 0.4\%$)	1.8 ($\pm 1.3\%$)	1.16
PS+DP12	F1	0.206 ^b	22	43	10.5 - 13	7.3 ($\pm 0.6\%$)	1.069 ($\pm 0.8\%$)	nc	0.71
	F2	0.146	15		13.5 - 16	34.7 ($\pm 2.8\%$)	1.205 ($\pm 0.9\%$)		2.1
	F3		6		17 - 21	178.7 ($\pm 1.5\%$)	1.059 ($\pm 0.4\%$)		8.75
PS+DP40	F1	0.206 ^b	45	65.5	10.6 - 14	12.2 ($\pm 0.5\%$)	1.34 ($\pm 1.2\%$)	nc	0.16
	F2	0.146	12		14 - 16.5	47.1 ($\pm 0.8\%$)	1.073 ($\pm 1.1\%$)		3.2
	F3		8.5		17 - 21	138 ($\pm 0.2\%$)	1.08 ($\pm 1.1\%$)		8.9
Vin	F1	0.206 ^b	nc	nc	10.5 - 12	19 ($\pm 0.9\%$)	1.04 ($\pm 1.3\%$)	nc	0.51
	F2	0.146			13 - 16	63.7 ($\pm 0.4\%$)	1.15 ($\pm 0.6\%$)	1.9 ($\pm 2.3\%$)	2.1
	F3				16.5 - 19.5	168.6 ($\pm 0.1\%$)	1.043 ($\pm 0.2\%$)	4.3 ($\pm 1.9\%$)	8.4
	F4	nc			26.7 - 33	nc	nc	210 ($\pm 1.1\%$)	115.0

^ataux de recouvrement de l'échantillon calculée à partir du signal dRI

^b dn/dc moyen (dn/dc de polyphénol et dn/dc du RG-II) ;

^c R_h moyen calculé sur la gamme des temps de rétention correspondant aux fractions ;

nc = valeurs non calculées

Le R_h est compris dans une gamme de taille allant de 0,3 à 13,2nm. Par ailleurs, le $R_h^{théo}$ est en bon accord avec le R_h^{exp} et a permis d'estimer la taille des composés trop petits pour être détectés par QELS. Enfin, le R_g a pu être déterminé uniquement pour les composés les plus volumineux (c'est-à-dire les composés de la fraction F3). Ces résultats indiquent qu'il semble difficile de caractériser le rayon de ces molécules avec les détecteurs MALS-QELS, notamment pour les plus petites d'entre elles.

1.2 Analyse des fractions de tanins par AsFIFFF-MALS-Qels-dRI

Les fractogrammes UV, MALS et dRI obtenus après injection des fractions de tanins ont montré un seul pic confirmant la pureté de ces fractions (Figure 29a, b et c). DP12 a été élué entre 10,5 et 12,0 minutes. Sa M_w a été calculée à 6,9kDa et était relativement monodisperse ($M_n/M_w = 1,072$). DP40 a été élué entre 10,5 et 14,0 minutes et sa M_w était de 13,5kDa et est polydisperse ($M_n/M_w = 1,3$, Tableau 7). Puisque les tanins de pomme sont constitués d'unités de catéchine et d'épicatéchine (masse molaire = 290Da), une masse molaire de 3,4k Da et 11,5kDa, peut être estimée respectivement pour DP12 et DP40.

Les résultats de l'AsFIFFF affichés dans le Tableau 7 montrent que la M_w de la fraction F1 obtenue pour DP12 est considérablement plus élevée que sa valeur théorique (6,9 vs 3,4kDa). Cet écart peut être dû à la sous-estimation de la valeur de mDP calculée par phloroglucinolyse car le rendement n'est que d'environ 60%, ce qui suggère la présence de tanins dérivés dont certaines unités ne sont pas prises en compte par cette analyse. Toutefois, le taux de recouvrement plus faible du DP12 à la sortie du canal (23 % contre 56 % pour le DP40, Tableau 7) indique qu'une grande partie de l'échantillon a été éliminée à travers la membrane (ou a été adsorbée dans le système) de sorte que seuls ses plus gros constituants ont été détectés. Cela expliquerait également pourquoi cet échantillon semble relativement monodisperse par rapport au DP40. En revanche, la masse molaire de F1 de DP40 n'est que légèrement supérieure à sa masse molaire théorique (13,5 contre 11,5kDa), ce qui indique que les espèces de masse molaire plus faible perdues à travers la membrane ne représentaient qu'une faible proportion de DP40.

Le R_h expérimental et théorique des deux fractions de tanins est exposé sur la Figure 30b et dans le Tableau 7. Le $R_h^{\text{théo}}$ moyen de la fraction DP12 est de 0,71nm (Tableau 7). Il est donc d'une taille inférieure au seuil de détection du Qels, comme pour la fraction F1 des PS (Figure 30a, b). Cela explique pourquoi les points de mesures sont très dispersés et peu nombreux pour cette fraction (Figure 30b).

Le R_h^{exp} de la fraction DP40 est compris entre 1 et 2,65nm et mesure 1,8nm en moyenne entre 10,5 et 15 min (Figure 30b, Tableau 7). Le $R_h^{\text{théo}}$ relevé aux mêmes temps de rétentions est compris entre 0,55 et 2,9nm et mesure 1,16nm en moyenne (Figure 30b, Tableau 7). La partie de la fraction DP40 éluée avant 12 min, est inférieure à 1nm, donc non mesurable par Qels. Ces résultats suggèrent que le R_h^{exp} est

suresstimé, puisque le R_h^{exp} ne prend pas en compte les objets de taille inférieure à 1nm. Par conséquent, le R_h moyen pris sur la largeur du pic est plus élevé avec le R_h^{exp} .

Toutefois, le calcul théorique du R_h ne permet pas de rendre compte de la distribution de taille réelle de l'échantillon. En effet, les données d'entrée permettant de le calculer prennent uniquement en compte les paramètres intrinsèques au canal (w), le débit des flux (Q_c), la viscosité de l'éluant (η) et le temps de rétention, mais ne tiennent pas compte de la distribution de la taille de l'échantillon. Ainsi, on fait l'hypothèse que l'échantillon est polydispersé, ce qui ne rend pas toujours compte de la réalité.

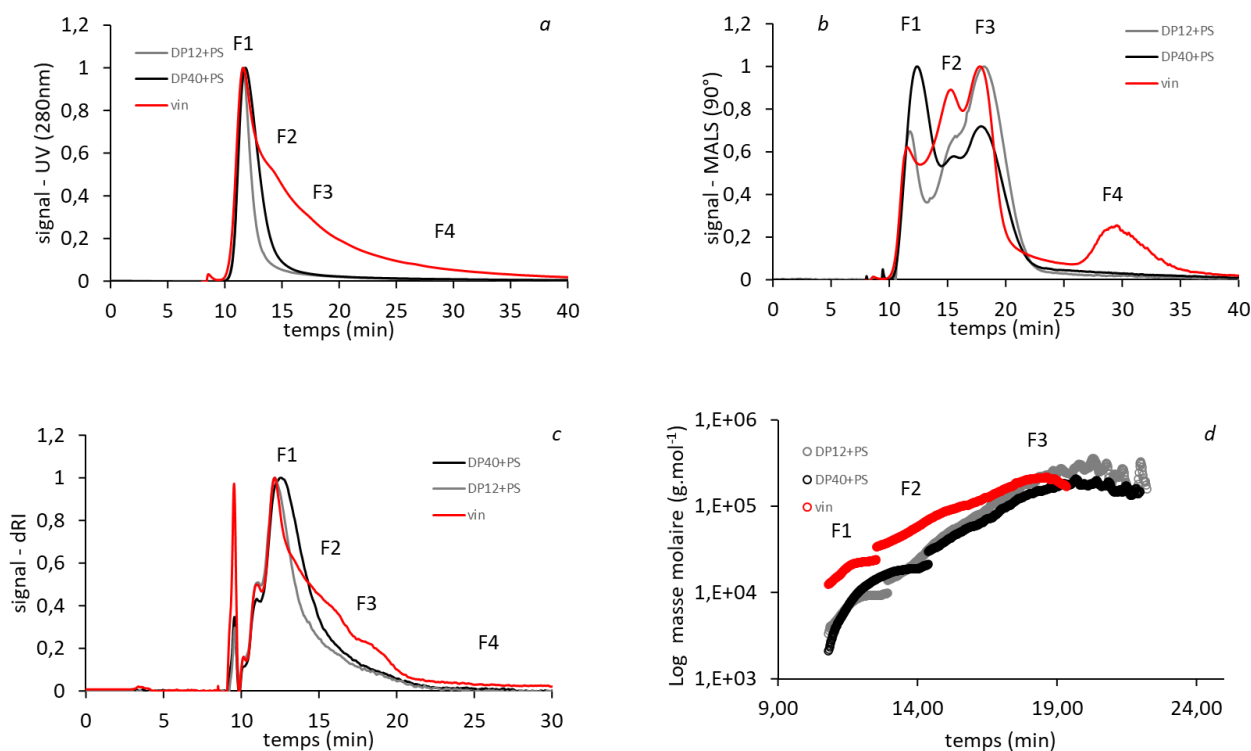
1.3 Mélange de la fraction de polysaccharide avec les fractions de tanins et comparaison avec l'échantillon de vin

Les mélanges de la fraction de PS avec, soit DP12, soit DP40 ont également été analysés avec le programme Q_{ce} . Trois fractions ont été déterminées sur les fractogrammes MALS et dRI obtenus à partir de ces mélanges (Figure 31b, c). La première absorbe spécifiquement à 280 nm et a été éluée au même temps de rétention que F1 pour les fractions de DP12, DP40 et PS (pour laquelle F1 correspond à RG-II), indiquant que les tanins et le RG-II sont coélus dans la fraction F1. Le rapport surface dRI/surface UV est plus élevé pour F1 pour le mélange PS+DP12 et PS+DP40 que pour les fractions de DP12 et DP40, soutenant l'hypothèse de la présence de RG-II dans la fraction F1 de l'échantillon de vin. Les fractions F2 et F3 observées sur les fractogrammes MALS des mélanges présentent des profils caractéristiques et des temps de rétention similaires à ceux de F2 et F3 pour la fraction de PS, attribués aux PRAGs et aux MPs (Figure 31b).

Les M_w calculées pour F1 à partir de PS+DP12 et PS+DP40 sont en bon accord avec la M_w des tanins isolés et la légère variation observée est due à la présence du RG-II (Tableau 7). Toutefois, les M_w de F2 et de F3 de chaque mélange sont inférieures à la M_w de F2 et F3 de la fraction PS (Figure 31d, Tableau 7) et ces écarts ne sont pas encore totalement compris.

Comme cela a été vu dans le chapitre précédent (*chapitre III*), le fractogramme de l'échantillon de vin a été divisé en quatre fractions distinctes (F1, F2, F3 et F4) selon les fractogrammes MALS, UV et dRI (Figure 31a, b, c). Le fractogramme de l'échantillon de vin montre des similitudes avec le mélange de fractions de polysaccharides et tanins. Premièrement, F1 montre une absorbance élevée dans l'UV et est éluée au même temps de rétention que F1 des fractions DP12 et DP40 (Figure 31a, Tableau 7). De même, F2 et F3 détectées sur les fractogrammes de la diffusion de la lumière et dRI du vin sont éluées dans une plage de temps de rétention comprise dans celle de F2 et F3 de la fraction PS, attribuée aux PRAGs et aux MPs.

Figure 31. Fractogrammes des mélanges PS + DP12, PS + DP40 et de l'échantillon de vin



fractogrammes UV à $\lambda = 280\text{nm}$ (a), fractogrammes MALS à 90° (b) fractogramme dRI (c) et distribution de masse molaire (d), calculée avec $dn/dc = 0,206 \text{ ml.mg}^{-1}$ pour F1 pour les mélanges de PS + DP12, PS + DP40 et échantillon de vin (Tableau 1.IV), et $dn/dc = 0,146 \text{ ml.mg}^{-1}$ (Redgwell et al, 2005) pour F2 et F3

Cependant, F2 et F3 ont été caractérisées par une forte absorption dans l'UV pour l'échantillon de vin, ce qui n'a pas été observé sur les fractogrammes des mélanges de tanins et de polysaccharides. La présence de matériaux absorbant dans l'UV pourrait refléter la présence de protéines ou de polyphénols de masse molaire plus élevée ou en interaction avec d'autres macromolécules du vin. Aucun composé

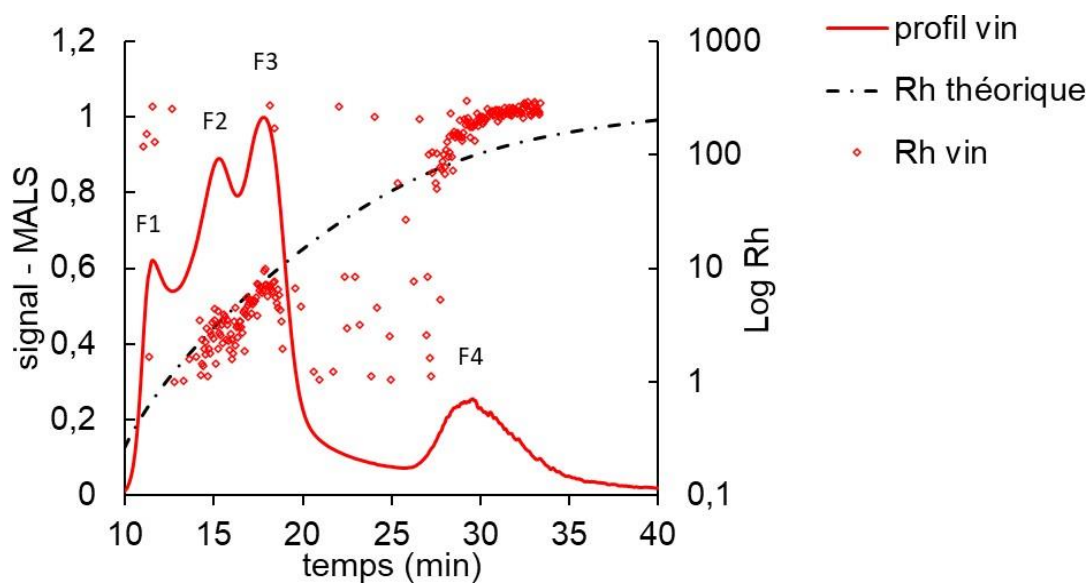
de grande masse molaire absorbant dans l'UV n'a été observé lors du mélange de la fraction PS avec DP12 ou DP40, ce qui suggère que ces matériaux ne correspondent pas à des complexes polysaccharides-polyphénols, mais plutôt à des complexes protéines-polyphénols ou complexes ternaires solubles polyphénols/polysaccharides/protéines comme cela a été proposé précédemment (Le Bourvellec & Renard, 2012; Scollary, Pásti, Kállay, Blackman, & Clark, 2012; Soares, Mateus, & De Freitas, 2007). La formation de tels complexes peut expliquer pourquoi les polysaccharides réduisent l'astringence des tanins (Boulet et al, 2016; Quijada-Morín, Williams, Rivas-Gonzalo, Doco, & Escribano-Bailón, 2014) ainsi que les précipitations des tanins par les protéines utilisées pour le collage des vins (Maury, Sarni-Manchado, Poinssaut, Cheynier, & Moutounet, 2016).

Par ailleurs, la fraction F4 n'est visible que sur le fractogramme de diffusion de la lumière de l'échantillon de vin (Figure 31b) et est absente dans ceux des mélanges. Cette fraction est éluée très tard, avec un débit de flux croisé proche de 0 mL.min⁻¹, ce qui indique qu'elle correspond à de très gros objets. Enfin, il a été observé que les M_w de F1 et de F2 sont plus élevées dans l'échantillon de vin que dans les mélanges (Figure 31d, Tableau 7), bien que leurs temps de rétention soient dans la même gamme que ceux des fractions correspondantes, attribuées aux tanins et RG-II, et aux PRAGs et MPs dans les mélanges. Cette augmentation de M_w peut s'expliquer par la complexité des tanins contenus dans l'échantillon de vin par rapport aux tanins du parenchyme de pomme utilisés dans les solutions modèles. Par conséquent, le dn/dc utilisé (Tableau 7) est peut-être inapproprié pour caractériser la masse molaire des tanins du vin.

La distribution du R_h^{exp} de l'échantillon de vin est exposée sur la Figure 32. Malheureusement, la distribution du R_h^{exp} des mélanges de PS+DP12 et PS+DP40 n'a pas pu être mesurée à cause de la trop forte dilution des solutions. Comme pour les fractions F1 des PS, DP12 et DP40, le R_h^{exp} mesuré entre 10,5 et 12,0 min, n'est pas valide. Il a été estimé entre 0,4 et 0,9 nm par le $R_h^{théo}$ et a une valeur de 0,51 nm en moyenne (Figure 32, Tableau 7). Le R_h^{exp} moyen calculé sur la largeur du pic de la fraction F2 est de 1,9nm, ce qui est légèrement moins élevé que le $R_h^{théo}$ moyen, calculé pour la même gamme de temps de rétention (Tableau 7). Concernant la fraction F3, on constate que le R_h^{exp} moyen est nettement

plus petit que celui de la fraction PS (4,3 et 9,5, respectivement, Tableau 7). Cette différence est due au fait que la fraction F3 dans l'échantillon de vin a été éluée plus tôt par rapport à la fraction F3 dans l'échantillon de PS qui contient donc des composés plus gros. Toutefois, le $R_h^{théo}$ de cette fraction est également plus élevé que le R_h^{exp} (8,4nm, Tableau 7), alors qu'il était en accord avec la fraction F3 dans la fraction PS. Enfin, le R_h^{exp} moyen au niveau de la fraction F4 est de 210nm, tandis que le $R_h^{théo}$ est de 115nm (Tableau 7). Cet écart est également bien visible au niveau de la distribution des R_h^{exp} et $R_h^{théo}$ sur la Figure 32, mais n'a pas encore été expliqué.

Figure 32. Profil MALS de l'échantillon de vin et distribution du R_h expérimental déterminé par QELS et du R_h théorique déterminé par les équations de l'AsFIFFF

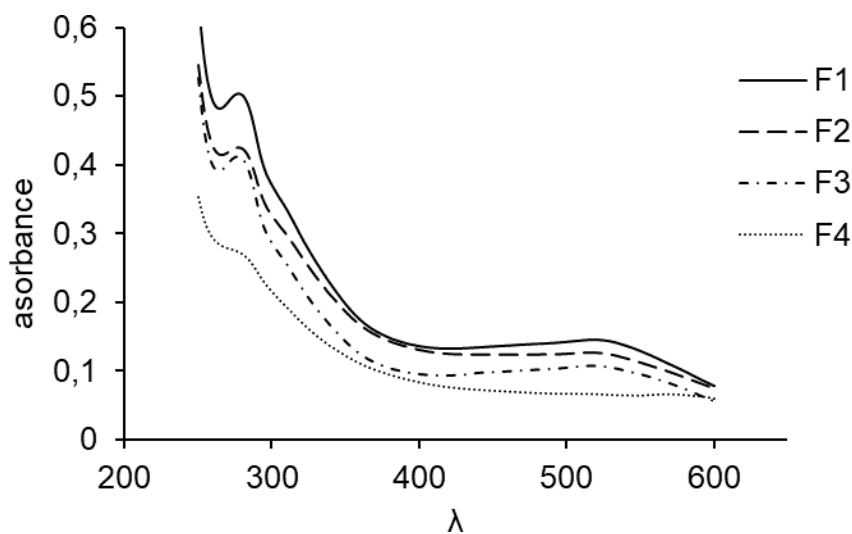


2 Caractérisation des fractions du vin collectées pendant la séparation sur l'AsFIFFF

2.1 Caractérisation des fractions de l'AsFIFFF du vin de syrah par spectroscopie UV-visible

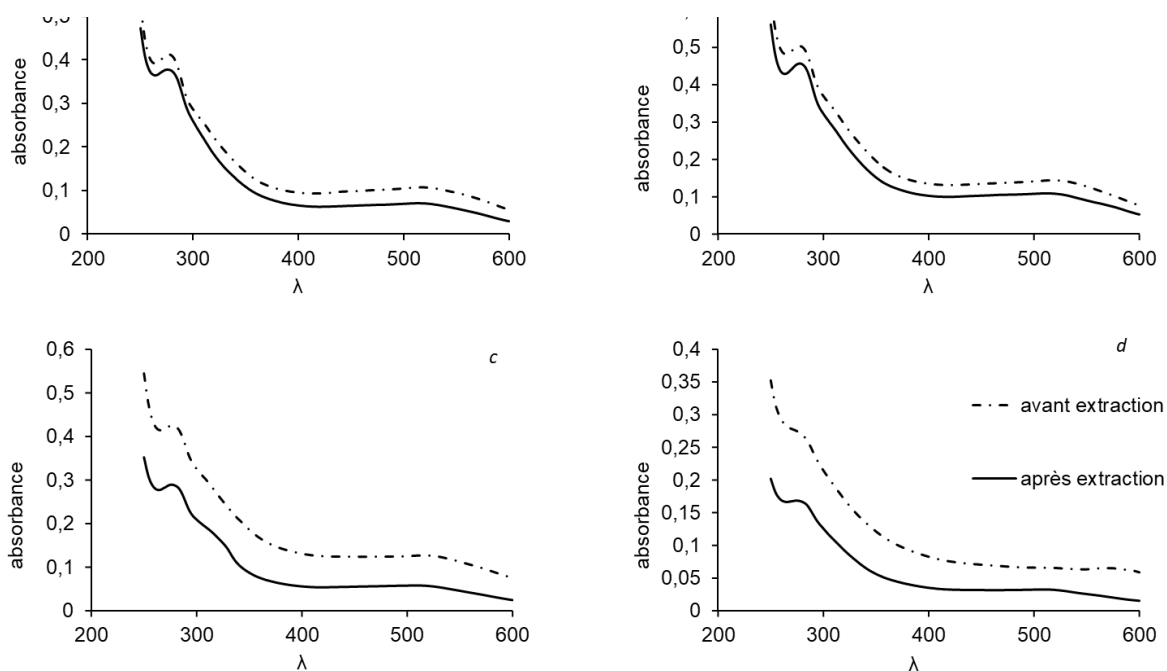
Les spectres UV-visible des fractions de l'AsFIFFF obtenues avec le vin de syrah, sont exposés dans la Figure 33. La fraction F1 absorbe plus que la fraction F2 et F3 absorbe plus que F4 dans l'UV (A_{280}), (Figure 33). Les intensités d'absorbances à 280nm, mesurées par spectrophotométrie, sont en accord avec les surfaces du fractogramme UV allouées à chaque fraction. Cela a été vérifié en comparant la part (en %) de la surface sous les pics de chaque fraction sur le fractogramme UV du vin de syrah, avec la part de l'absorbance de chaque fraction à 280nm des spectres de la Figure 33 (résultats non exposés). L'absorbance de ces fractions à 520 nm est bien visible (Figure 33), notamment pour les fractions F1, F2 et F3. Cette observation suggère que des pigments polymériques sont également présents dans ces fractions.

Figure 33. Spectres d'absorbance acquis entre 250 et 600nm des fractions de l'AsFIFFF obtenus à partir du vin de syrah



Les spectres d'absorbance des fractions de l'AsFIFFF ont été comparés avec les spectres des tanins extraits de ces fractions (Figure 34). Des pertes sont constatées après l'élimination des sels par SPE, alors que les rendements obtenus avec la fraction *Fa* étaient très satisfaisants (cf. *Chapitre II*, 6.2).

Figure 34. Comparaison entre les spectres d'absorbance des fractions de l'AsFIFFF avant et après extraction des tanins (cf. *Chapitre II*, section 7)

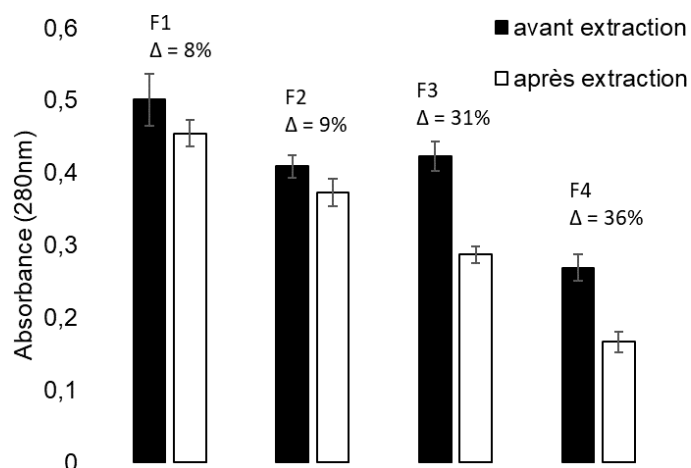


Ces pertes sont observées sur toutes les longueurs d'onde des spectres (Figure 34) et ont été quantifiées à partir de l'absorbance à 280 nm (Figure 35). Les fractions F1 et F2 présentent des baisses d'absorbance de 8 et 9% respectivement, tandis qu'elles sont largement plus importantes pour les fractions F3 et F4 (31 et 36%, respectivement, Figure 35). Ces pertes s'expliquent par le fait que la composition des fractions de l'AsFIFFF est différente de celle de l'extrait utilisé pour valider la méthode d'extraction. D'une part, les tanins des fractions du vin ne sont pas de la même nature que ceux contenus dans *Fa* (cf. *Chapitre II*, 6.2) et il est possible que des phénomènes d'adsorption irréversibles se soient produits pour les tanins du vin.

D'autre part, les fractions de vins contiennent d'autres macromolécules et notamment des polysaccharides qui interagissent avec les tanins et peuvent impacter leur comportement sur la phase.

Ainsi, les tanins ont pu être élués dans la phase aqueuse parce qu'ils étaient associés à des PS (ce qui serait cohérent avec les pertes plus importantes dans F3 et F4). Par ailleurs, il se pourrait que la phase de SPE ait été saturée, mais cette hypothèse est peu probable car les pertes touchent surtout les fractions les moins concentrées.

Figure 35. A_{280} des fractions de l'AsFIFFF, avant et après l'extraction des tanins par SPE (cf. Chapitre II, section 7)



2.2 Caractérisation des tanins extraits des fractions de l'AsFIFFF du vin de syrah par phloroglucinyse suivie d'une analyse par HPLC-UV-MS

Le vin d'origine, ainsi que les quatre fractions ont été analysées par HPLC-UV-MS, après dépolymérisation des tanins en présence de phloroglucinol.

Tableau 8. Teneur en polyphénols totaux et résultat de la phloroglucinyse sur le vin de syrah.

échantillon	concentration polyphénols totaux (mg.L^{-1}) ^a	concentration en proanthocyanidine (mg.L^{-1}) ^b	% récupéré en sortie de colonne ^c	%proanthocyanidine ^c	% de la surface en fin de chromatogramme ^c	DPm	%G	%EgC
Vin d'origine	3667	123	89	3	34	2	4	4
F1	35	1	70	2	36	6	7	39
F2	16	<1	91	3	82	7	3	48
F3	15	<1	98	2	78	7	6	23
F4	7	<1	60	1	37	6	5	58

^aconcentration en mg.L^{-1} équivalent catéchine déterminé par spectrophotométrie (A_{280})

^bdéterminé par HPLC après phloroglucinyse en mg.L^{-1} équivalent catéchine,

^ccalculé par rapport à la A_{280}

(cf. Chapitre II, section 8.2)

L'objectif de cette expérimentation était de déterminer la structure des tanins contenus dans les fractions de l'AsFIFFF et de comparer les données obtenues avec le vin d'origine.

La concentration en tanins du vin d'origine (ou plutôt la concentration en unités flavan-3-ol libérées par phloroglucinyse) est de 122 mg.L⁻¹ (Tableau 8), ce qui indique que ce vin est très pauvre en proanthocyanidines. Un pic large et non résolu est retrouvé en fin de chromatogramme (résultats non exposés) et sa surface représente une part importante (~35%) de l'absorbance mesurée par spectrophotométrie à 280 nm (A₂₈₀) (Tableau 8). Dans un extrait de tanins de pomme ou de pépin de raisin par exemple, ce pic correspond aux polymères de flavan-3-ols (proanthocyanidines), qui sont mal séparés en HPLC. Après avoir effectué la dépolymérisation des proanthocyanidines, ce pic diminue (voire disparaît, si la réaction est totale) et les proanthocyanidines se retrouvent sous forme d'adduits de flavan-3-ol – Nuc et de flavan-3-ols libres analysables (comme cela est décrit dans le *Chapitre I, 2.1.4*). La proportion résiduelle de ce pic qui contient des fragments de tanins non dépolymérisés et les adduits phloroglucinol correspondants reflète la part de tanins dérivés non analysables, quoique certains de ces fragments puissent aussi être élués plus tôt. Par ailleurs, dans le vin, d'autres types de molécules (non phénoliques) absorbant dans l'UV (à 280 nm) peuvent contribuer à l'intensité de ce pic (e.g. protéines).

Le DPM du vin de syrah a été évalué à 1,8 et les %G et %EgC à 3,5 et 4,4%, respectivement. Cependant, au vu de la faible proportion de tanins dépolymérisés, ces valeurs sont considérées comme peu pertinentes.

Les concentrations en polyphénols totaux récupérées dans les fractions F1 – F4 de l'AsFIFFF, sont respectivement de 35, 16, 15 et 7 mg.L⁻¹ de vin, en équivalent catéchine (Tableau 8). La concentration en proanthocyanidines déterminée par phloroglucinyse est d'environ 1mg.L⁻¹ (équivalent catéchine) pour la fraction F1 et est inférieure à 1mg.L⁻¹ pour les fractions F2 – F4 (Tableau 8). Les unités de proanthocyanidines libérées par la phloroglucinyse ne représentent que ~2 à 3% de la concentration en polyphénols totaux et 1% pour F4 (Tableau 8) tandis que le pic en fin de chromatogramme représente environ 35% par rapport à l'A₂₈₀ des fractions F1 et F4 et environ 80%, pour les deux fractions intermédiaires F2/F3 (Tableau 8). Les taux de récupération en sortie de colonne pour les fractions F1 et F4 sont de 70 et 60%, respectivement (Tableau 8), ce qui suggère que des pertes ont été occasionnées

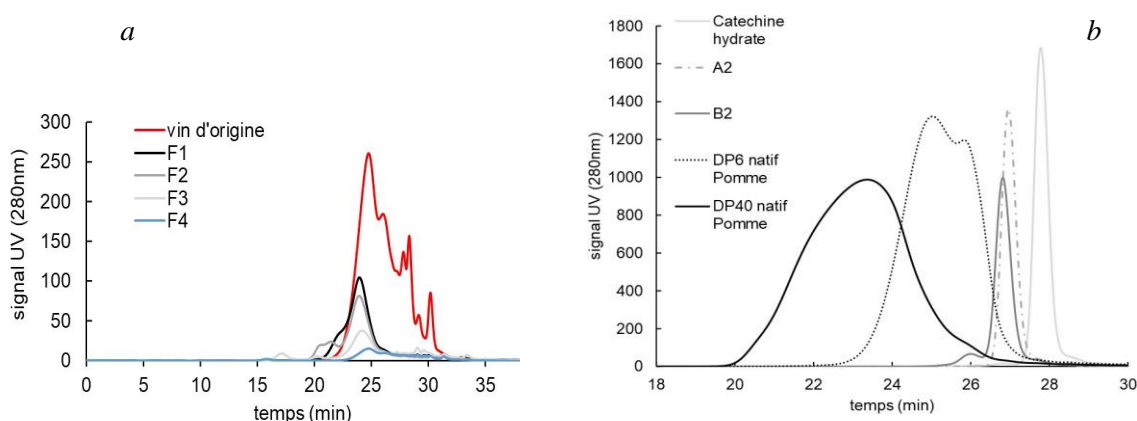
pendant la réalisation des phloroglucinolyses (perte par précipitation, centrifugation des échantillons) ou par adsorption sur la colonne chromatographique. Cela est moins le cas pour les fractions F2/F3, pour lesquelles les taux de récupération sont supérieurs à 90% (Tableau 8). Les pertes observées dans certaines fractions et pas dans d'autres pourraient aussi suggérer qu'il existe des différences structurales entre les tanins issus des différentes fractions de l'AsFIFFF. Cependant, ces résultats doivent être considérés avec prudence à cause de l'absence de répétition.

Le DPM du vin d'origine est de 2, ce qui est inférieur à ceux des fractions (compris entre 6 et 7, Tableau 8). Cependant, au vu du faible taux de réaction (et là aussi, de l'absence de répétition des analyses), les valeurs du DPM, du %G et du %EgC des tanins contenus dans les fractions ne sont probablement pas représentatives de leur structure. En revanche, les données relatives à la part du pic en fin de chromatogramme et du taux de récupération en sortie de colonne peuvent amener des informations intéressantes. Ainsi, l'importance du pic élué en fin de chromatogramme suggère que les tanins récupérés dans les fractions de l'AsFIFFF possèdent des structures plus complexes (avec davantage de liaisons résistantes à la dépolymérisation).

2.3 Etude de la distribution de la taille des tanins par chromatographie d'exclusion stérique couplé à l'UV

La Figure 36a montre les profils chromatographiques d'exclusion stérique dans l'UV à 280 nm du vin d'origine et des fractions d'AsFIFFF. La Figure 36b montre les profils et les temps de rétention de trois polyphénols standards (la catéchine et deux proanthocyanidines dimères, A2 et B2) et de deux fractions

Figure 36. Chromatogramme d'exclusion stérique du vin d'origine et des fractions d'AsFIFFF (a) et de quelques composés standards (b)



de tanins purifiés avec deux DPm différents (DP6 et DP40). Ces composés ont été utilisés comme repères pour interpréter les chromatogrammes du vin et des fractions de l'AsFIFFF.

La comparaison entre les chromatogrammes du vin d'origine et des fractions permet de constater que la quasi-intégralité des petits polyphénols, correspondant aux monomères et aux procyanidines dimères (entre 27 - 32min, Figure 36b), ont été éliminés à travers la membrane d'ultrafiltration, durant la séparation par AsFIFFF. Par ailleurs, le pic le plus intense pour les fractions F1 et F2 possède un temps de rétention (relevé au sommet du pic) de 24,2 min (Figure 36a), ce qui correspond à de plus gros polymères (Figure 36b). Pour les fractions F3 et F4, ce pic possède un temps de rétention un peu plus tardif, 24,7 et 24,9 min, respectivement (Figure 36a).

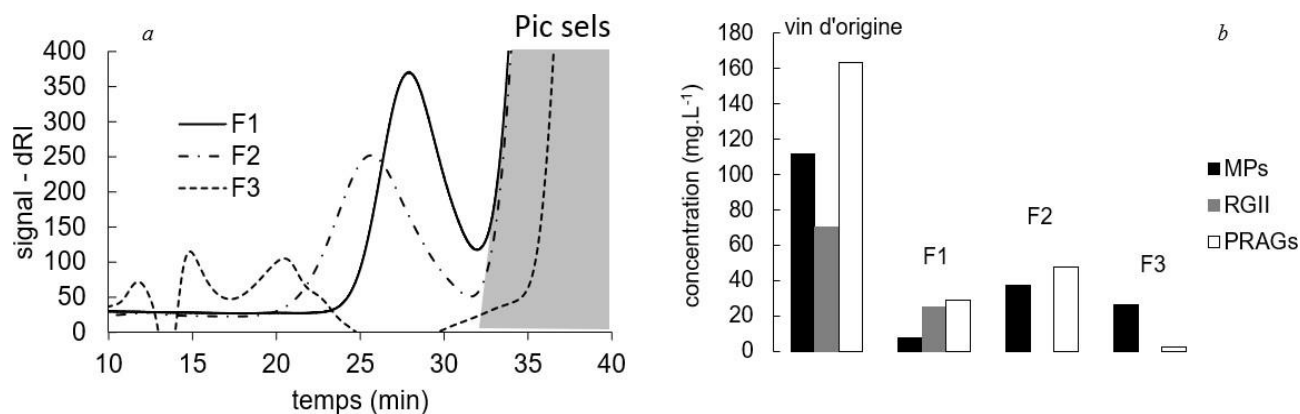
Ce résultat suggère que les tailles moyennes des composés phénoliques élués dans ce pic, sont similaires dans les fractions F1 et F2 et sont légèrement inférieures pour les fractions F3 et F4. Or, ces fractions ont été collectées à des temps de rétention croissants au cours de la séparation sur l'AsFIFFF ce qui implique qu'à l'origine, elles renferment des objets de taille croissante. Par conséquent, ce résultat pourrait confirmer l'hypothèse de la présence de polyphénols interagissant avec d'autres macromolécules du vin dans les fractions F2, F3 et F4.

Par ailleurs, des populations de grande taille sont visibles entre 21,5 et 23,0 min, 20,0 et 22,5 min et entre 16,8 et 17,8 min, sur les chromatogrammes des fractions F1, F2 et F3 respectivement, alors que ces populations ne sont pas visibles sur le chromatogramme du vin d'origine (Figure 36a) où elles ne sont probablement pas présentes en concentration suffisante. Les temps de rétention observés pour les fractions F1 et F2 sont comparables aux polymères de plus hautes masses molaires, contenues dans DP40 (entre 20 et 22min, Figure 36b).

2.4 Dosage des polysaccharides

La Figure 37a montre les profils obtenus en chromatographie d'exclusion stérique avec les fractions F1, F2 et F3. La zone grisée correspond au pic de sel initialement contenu dans les fractions. Ces sels ont été éliminés en collectant uniquement les pics élués avant les sels pour effectuer la quantification des différentes populations de PS contenues dans chaque fraction. Les populations de PS ont été éluées entre 24 et 32 min, 20 et 31 min et entre 14 et 25 min pour les fractions F1, F2 et F3 respectivement (Figure 37a). En revanche, la quantité de PS dans la fraction F4 n'était pas suffisante pour réaliser l'analyse. Les temps de rétention relevés pour les différentes fractions montrent que F1 contient les composés de plus petite taille, tandis que F2 et F3 contiennent respectivement des composés de taille intermédiaire et de grande taille (Figure 37a). Ce résultat confirme que les PS ont bien été séparés en fonction de leur taille sur l'AsFIFFF.

Figure 37. Chromatogrammes des fractions F1, F2 et F3 (a), teneur en polysaccharides dans le vin d'origine et dans les fractions F1 à F3 (b)



Par ailleurs, le dosage des différentes familles de PS (RG-II, PRAGs et MPs, Figure 37b), montre que F1 est la seule fraction à contenir du RG-II. La présence de PRAGs a été détectée dans les fractions F1 et F2 et en très faible quantité dans F3. A l'inverse, les MPs sont principalement retrouvées dans les fractions F2 et F3, mais peu dans F1 (Figure 37b).

Ces résultats confirment les hypothèses émises précédemment (*section 1*) à propos de la composition en PS des fractions du vin obtenues après séparation par AsFIFFF. Enfin, il a été observé que la teneur

totale en PS, toutes fractions confondues, représentait ~50% en quantité, par rapport au vin d'origine. Ces pertes ont pu être occasionnées durant la séparation sur l'AsFIFFF ou durant l'extraction des PS depuis les fractions de l'AsFIFFF. Dans ce cas aussi, l'absence de répétition de l'analyse ne permet pas de conclure précisément sur le taux de recouvrement des PS lors du fractionnement par AsFIFFF.

3 Conclusion

Dans le *Chapitre IV*, une méthode de fractionnement par AsFIFFF a été mise point pour séparer les macromolécules du vin rouge et le fractogramme obtenu avec cette méthode (Q_{ce}) a été divisé en quatre fractions. Le travail présenté dans ce chapitre a permis de caractériser ces fractions. La fraction F1 contient la plus haute concentration en polyphénols. Ces polyphénols possèdent des masses molaires relativement élevées pour ces polymères et sont coélués avec des PS de faible masse molaire. Parmi ces PS figurent des PRAGs, des MPs ainsi que le RG-II qui a uniquement été retrouvé dans cette fraction. La fraction F2 contient des PS de masses molaires intermédiaires appartenant principalement à la famille des PRAGs tandis que des MPs de masse molaire plus élevés sont retrouvés dans F3. Par ailleurs, les analyses par SEC-UV ont montré la présence de matériaux absorbant les UV dans les fractions F2, F3 (et F4), correspondant à la fois à des molécules de haute masse et à des polyphénols plus petits interagissant avec des polysaccharides. La dernière fraction (F4) pourrait indiquer la présence de très gros objets dans le vin mais elle n'est que partiellement caractérisée. Les analyses par HPLC-UV-MS après phloroglucinolyse de cette fraction, montrent la présence d'unités constitutives des tanins et d'autres unités provenant des tanins dérivés. En revanche, les quantités récupérées de cette fraction n'étaient pas suffisantes pour déterminer les teneurs en PS. La présence de protéine dans chacune de ces fractions a également été supposée, mais n'a pas été étudiée dans le cadre de ce travail.

En outre, les résultats ont montré que l'AsFIFFF-UV-MALS/Qels-dRI est un système efficace pour caractériser la masse molaire des fractions purifiées de tanins et de PS. Cependant, il a été observé que la masse molaire de la fraction F1 du vin était plus élevée par rapport à celle des tanins et des PS purifiés. Ces écarts s'expliquent par la complexité des tanins contenus dans le vin par rapport aux tanins issus de

la pomme utilisés dans les solutions modèles, et par la complexation potentielle des tanins avec des polysaccharides et/ou des protéines dans le vin.

Le R_h a également été déterminé pour les fractions purifiées et pour l'échantillon de vin. Les R_h théoriques et expérimentaux étaient en bon accord pour les fractions F2 et F3. Cependant, il a été vu que le R_h théorique était sous-estimé pour la fraction F4. Le R_h de la fraction F1 n'a pas pu être déterminé expérimentalement, car les composés qu'elle contient ont des tailles inférieures à limite de détection du Qels.

Par ailleurs, la méthode d'extraction des composés d'intérêt depuis les fractions de l'AsFIFFF qui a été utilisée a causé des pertes de matière dans l'UV, notamment sur les fractions F3 et F4.

Les tentatives de caractérisation de la structure des polyphénols par phloroglucinyse et par HPLC-UV-MS se sont avérées peu concluantes. Toutefois, les rendements de la réaction de dépolymérisation (qui sont très faibles) montrent que les structures de ces polyphénols sont complexes et évoluées.

En somme, ces travaux ont montré que l'approche du système de l'AsFIFFF-multi-détection qui a été développée ouvre la voie à la caractérisation de la fraction macromoléculaire des vins rouges et à des études visant à relier sa composition à des caractéristiques sensorielles.

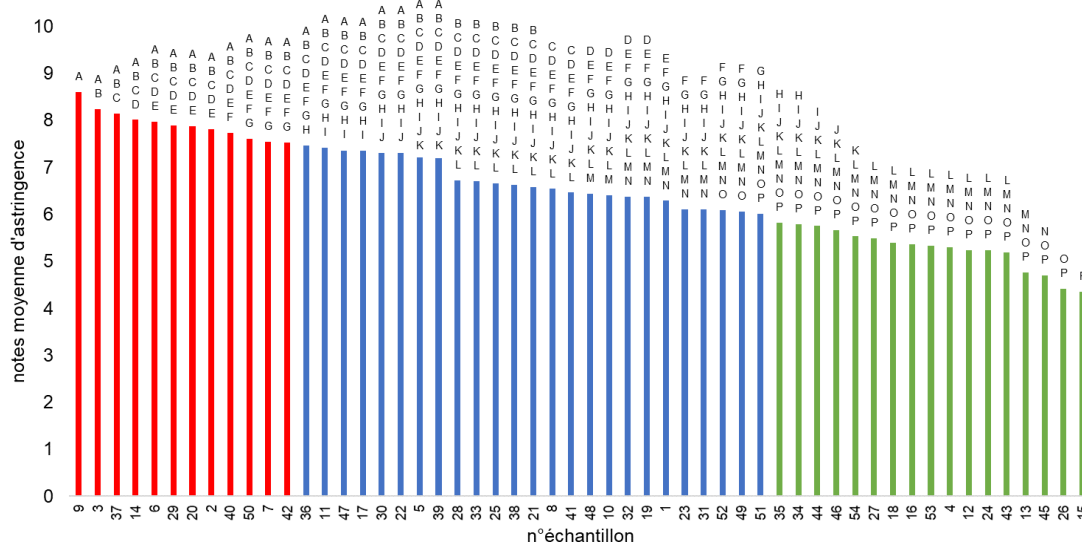
Chapitre V

**Étude de l'impact de la fraction macromoléculaire du vin rouge
caractérisée par AsFIFFF-UV-MALS-dRI sur l'astringence**

Introduction :

L'objet de ce chapitre est d'étudier le lien entre les profils AsFIFFF des vins rouges et leur astringence. Pour ce travail, nous nous sommes appuyés sur le dispositif expérimental mis en place dans le cadre de la thèse de Coline Leriche, portant sur l'étude de la typicité sensorielle de six AOP du Languedoc. Dans cette étude, le niveau d'astringence d'un grand nombre de vins rouges issus du Languedoc (54 vins), a été évalué par un jury entraîné. Nous avons pu disposer de ces vins et les analyser par AsFIFFF-UV-MALS-dRI et par spectroscopie UV-visible. Une approche chimiométrique a été employée pour relier caractéristiques analytiques des vins et notes d'astringence. Le jeu de données analytiques a été construit en sélectionnant les trois variables les plus pertinentes pour prédire la note d'astringence des vins, à partir de chaque tableau de données (c'est-à-dire les fractogrammes UV, dRI, MALS, masse molaire et les spectres UV-visible). Ensuite, une analyse factorielle multiple (AFM) a été réalisée sur ce jeu de données et sur celui de l'analyse sensorielle.

Figure 38. Moyennes des notes d'astringence pour chaque échantillon.



Les différents exposants indiquent des différences significatives entre les échantillons. Les échantillons correspondant aux notes d'astringence élevées, moyennes et faibles sont représentés respectivement en rouge, bleu et vert.

Les notes d'astringence des 54 vins ont été extraites des résultats obtenus à l'issue d'une analyse descriptive quantitative (*QDA*®) effectuée par un jury expert (cf. *Chapitre II, section 5*). Le traitement ANOVA a mis en évidence des différences significatives entre les échantillons pour ce descripteur (p -value $<0,001$). Un test de différence (Fisher, LSD, $\alpha=5\%$) a permis de discriminer trois groupes (Figure 38) : deux groupes extrêmes comprenant les échantillons présentant les scores les plus élevés et les plus faibles ont été constitués en regroupant les vins non significativement différents les uns des autres et significativement différents de ceux de l'autre groupe. Ainsi les vins ayant un score moyen d'astringence inférieur à 6,00 et supérieur à 7,50 constituent respectivement les « Échantillons d'astringence faible » (ou EAF) et les « Échantillons d'astringence élevée » (ou EAE). Les échantillons n'appartenant à aucun de ces groupes ayant un score compris entre 6,00 et 7,50 ont été rassemblés dans un troisième groupe « Échantillons d'astringence moyenne » (ou EAM).

1 Analyses chimiques

Les 54 vins ont été analysés par spectrophotométrie UV-visible (cf. *Chapitre II, section 7*) et injectés dans le système AsFIFFF- UV-MALS-dRI avec le programme Q_{ce} . Le perméat et le rétentat ont été collectés et leurs spectres UV-visible enregistrés afin de déterminer les taux de recouvrement des composés absorbant dans l'UV à 280 nm et 230 nm. Quatre vins (n°12, 13, 21 et 48) ont été éliminés de l'échantillonnage car leurs fractogrammes étaient trop bruités.

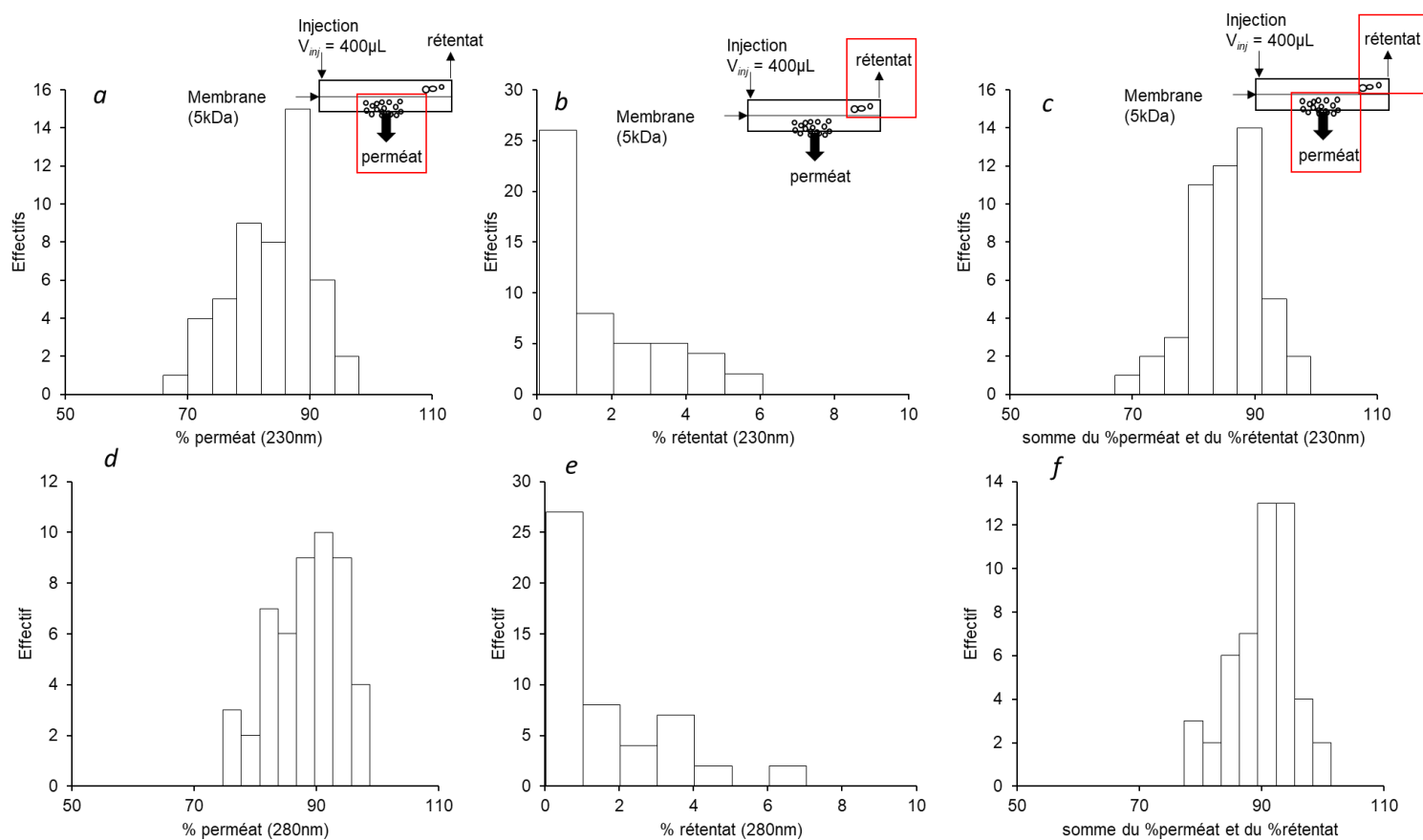
1.1 Taux de recouvrement et étude spectroscopique

1.1.1 Taux de recouvrement

La Figure 40 montre la distribution des taux de recouvrement calculés sur les 50 échantillons de vin, pour le perméat (%P), le rétentat (%R) et la somme de ces deux fractions, à 230 et 280nm. Comme observé sur l'échantillon de syrah (*Chapitre III*), la majorité du matériel absorbant dans l'UV des échantillons a traversé la membrane du canal et a été récupérée dans le perméat (Figure 40a), et la quantité récupérée dans le rétentat (%R) correspond en moyenne à ~2% aux deux longueurs d'onde considérées (Figure 40b). On observe que le %P est moins important à 230nm qu'à 280nm (~80% et 88%, respectivement, $p<0,0001$, $\alpha = 0,05$ selon le test t de Student) et que le pourcentage total de

recouvrement est plus élevé à 280nm qu'à 230nm (~90% et 85%, respectivement, $p < 0,0001$, $\alpha = 0,05$, selon le test t de Student). En revanche la part du rétentat ne présente pas de différences significatives entre les deux longueurs d'ondes. Ces observations suggèrent que les pertes après séparation (par adsorption sur la membrane et/ou dans le système HPLC), concernent davantage les composés avec un ratio A230/A280 plus élevé.

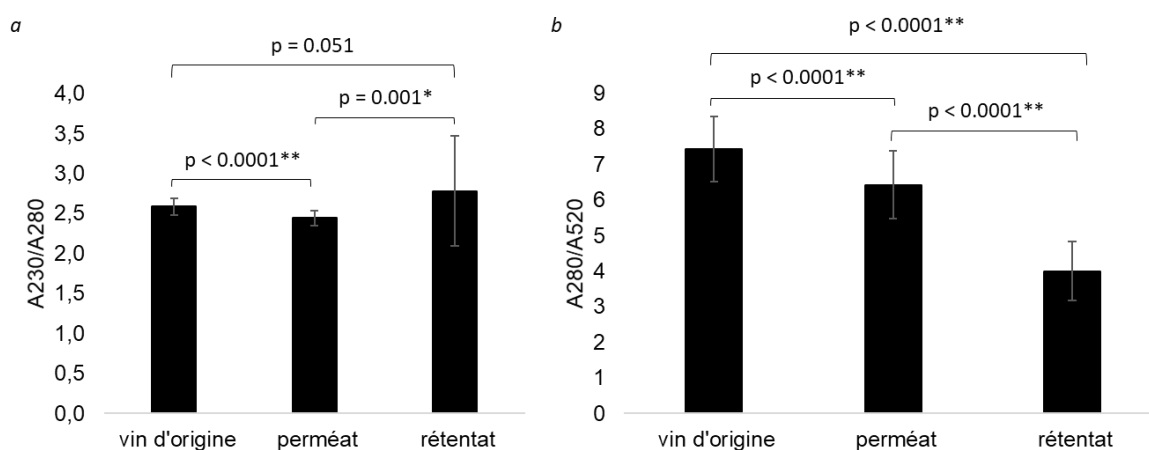
Figure 40. Distribution de la part du perméat, du rétentat et de la somme de ces deux fractions, mesurée sur les 50 échantillons de la série de vin dans l'UV à 230nm (a, b, c) et à 280nm (d, e, f)



1.1.2 Etude des rapports d'absorbances (A_{230}/A_{280} et A_{280}/A_{520})

La Figure 41 représente les valeurs moyennes des rapports A_{230}/A_{280} (Figure 41a) et A_{280}/A_{520} (Figure 41b), mesurés sur les vins d'origine, la fraction perméat et la fraction rétentat.

Figure 41. Rapport des absorbances A_{230}/A_{280} (a) et A_{280}/A_{520}

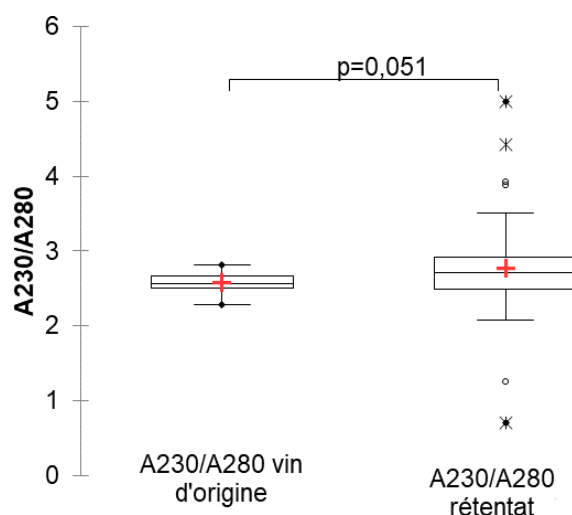


Un test de significativité (test t de Student, $\alpha = 5\%$) a été réalisé entre la moyenne des rapports des vins d'origine par rapport à la fraction perméat, puis par rapport à la fraction rétentat.

Pour les vins d'origine et la fraction perméat, ces valeurs sont de 2,58 ($SD = 0,11$) et 2,44 ($SD = 0,09$), respectivement et sont significativement différentes ($p < 0.0001$, Figure 41a). La valeur moyenne de ce rapport pour la fraction rétentat (2,78, $SD = 0,69$, Figure 41a), est significativement plus élevée que celle du perméat. En revanche, ce n'est pas le cas avec celle des vins d'origine ($p = 0,051$). Cela s'explique par la présence de valeurs extrêmes dans la série de la fraction rétentat (Figure 42). Parmi les valeurs extrêmes hautes, on retrouve les échantillons n°3, 28 et 30 qui sont des échantillons jugés très astringents (n°3, note 8,2/10) et moyennement astringents (n°28 et 30, notes 6,1 et 6,7/10, respectivement). L'échantillon n°4 possède également une valeur haute du ratio A_{230}/A_{280} , mais contrairement aux autres, sa note d'astringence est peu élevée (note = 5,3/10). Les valeurs extrêmes basses sont quant à elles toutes liées à des échantillons peu astringents (n°40 et 42, notes 5,2 et 4,7, respectivement). La suppression de ces individus aux valeurs extrêmes, permet d'obtenir une différence significative entre les valeurs

moyennes du rapport A_{230}/A_{280} des vins d'origine et de la fraction rétentat (A_{230}/A_{280} pour la fraction rétentat = 2,71, $SD = 0,36$, $p = 0,027$, résultat non exposé).

Figure 42. Box plot : comparaison des A_{230}/A_{280} des vins d'origine avec la fraction rétentat



Ce rapport ne permet pas d'expliquer le niveau d'astringence des vins ($r^2 < 0,15$). Toutefois, il permet de mettre en évidence qu'il est supérieur en moyenne à celui du matériel des vins d'origine et à celui passé dans le perméat et que donc leur composition phénolique est différente. Les valeurs des rapports A_{280}/A_{520} sont de 7,4 ($SD = 0,91$), 6,4 ($SD = 0,95$) et 4,0 ($SD = 0,83$) pour les vins d'origine et pour les fractions de perméat et de rétentat, respectivement (Figure 41b). D'après le test de Student, les différences observées sont toutes significatives (Figure 41b). Ces résultats indiquent que la fraction perméat absorbe davantage à 520nm par rapport aux vins d'origine, suggérant que les pigments de petite masse molaire, comme les anthocyanes ou les petits pigments polymériques sont retrouvés dans la fraction perméat. Par ailleurs, on constate que la valeur de ce rapport est encore plus basse dans la fraction du rétentat (Figure 41b) et donc la part d'absorbance à 520nm plus importante dans la fraction de rétentat.

Les valeurs du rapport A_{230}/A_{280} peuvent être comparées à celles de la littérature (Boulet et al, 2017). Ces auteurs rapportent que ce rapport est aux environs de 4 pour la catéchine et l'épicatéchine. Des valeurs plus basses sont rapportées pour l'épicatéchine gallate ($A_{230}/A_{280} = 2,2$), la maldivine-3-O-

glucoside ($A_{230}/A_{280} = 1,4$ à un $pH = 1,43$), les acides phénols et les flavonols et une valeur très élevée est observée pour l'épigallocatechine ($A_{230}/A_{280} = 14$) (Boulet et al, 2017). Ce rapport a également été calculé pour des tanins, issus de pellicule de pomme et de pépins de raisin à l'état natif et à l'état oxydé. Les valeurs liées à ces polymères sont de ~ 5 pour les tanins natifs de pellicule de pomme (DP6 et DP12), qui sont essentiellement constitués d'épicatéchine et sont de ~ 4 pour ces mêmes tanins oxydés (Boulet et al, 2017). Des valeurs similaires ont été relevées (~ 4) pour les tanins issus de pépin de raisin (DP7), natifs comme oxydés (Boulet et al, 2017). Les valeurs retrouvées dans les vins et les fractions de perméat et de rétentat sont à la fois plus élevées que celles des anthocyanes, des flavonols et des acides phénols (A_{230}/A_{280} entre 1 et 2) et plus basses que celles des flavan-3-ols (entre 4 et 5). Cela paraît logique, étant donné que toutes ces espèces sont présentes dans le vin.

La comparaison des rapports A_{230}/A_{280} du vin, du perméat et du rétentat montre que le perméat est enrichi en anthocyanes acides phénols et flavonols, appauvri en flavan-3-ols par rapport au vin, tandis que le rétentat contient une plus forte proportion de flavan-3-ols que le perméat (mais pas que le vin).

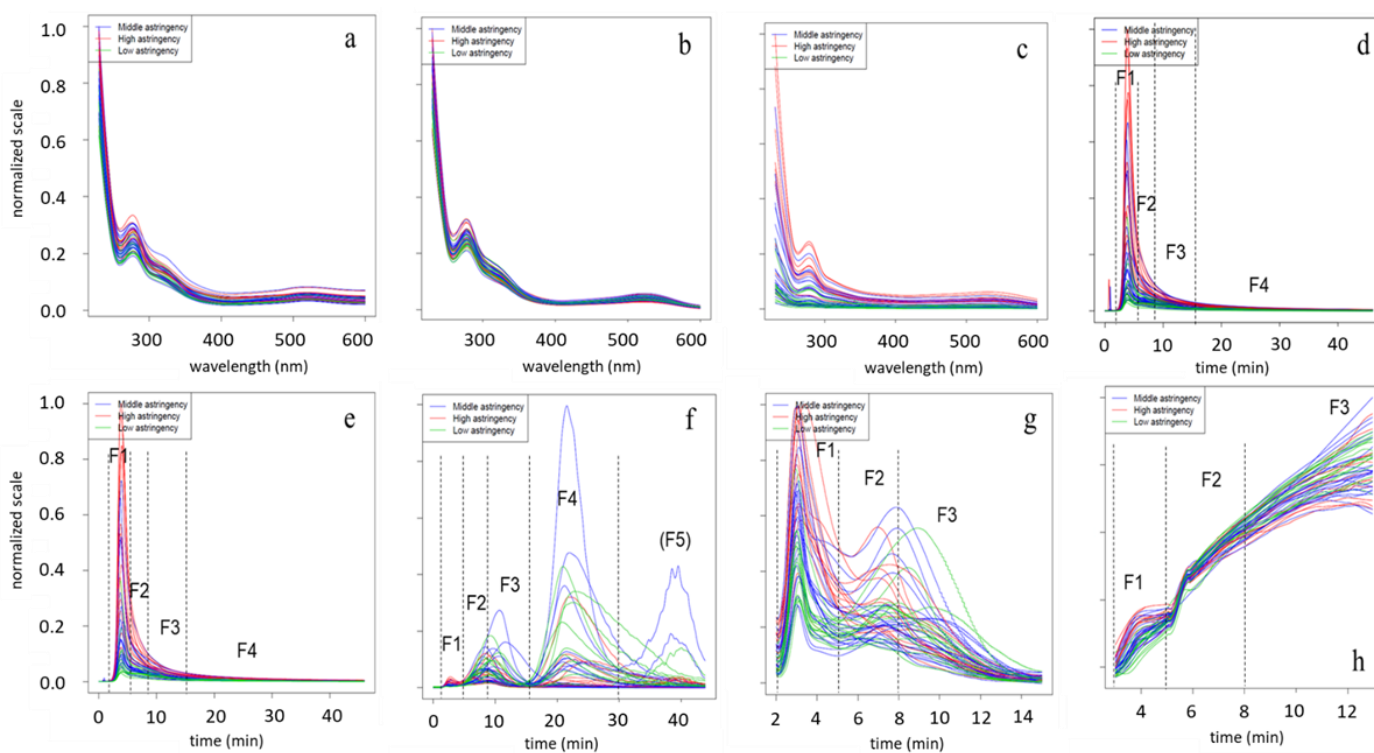
La valeur du rapport A_{280}/A_{520} obtenue à partir de la fraction de perméat est inférieure à celle du vin, comme pour A_{230}/A_{280} . Cela se traduit par l'enrichissement du perméat en molécules qui absorbent dans le rouge comme les anthocyanes natives et les petits pigments dérivés qui sont passés à travers la membrane de l'AsFIFFF. Le fait que ce rapport soit encore plus bas (en moyenne) pour le perméat suggère qu'on a une assez forte proportion d'anthocyanes dans les structures des tanins du rétentat, avec des implications sur la présence d'anthocyanes dans les structures des hauts polymères qui interagissent avec d'autres macromolécules comme les PS et/ou les protéines.

1.2 Description des spectres UV-vis et des fractogrammes

Les spectres UV-visible des vins d'origine, des perméats et des rétentats sont présentés dans les Figure 43a - c. Les groupes d'astringence EAF, EAM et EAE peuvent être distingués en fonction de leurs spectres d'absorbance montrant des intensités faibles, intermédiaires et élevées, respectivement, le long de l'ensemble du spectre pour les fractions de rétentat et à des longueurs d'onde inférieures seulement pour les vins d'origine. Ceci suggère que les composés phénoliques de masse molaire plus élevée

présents dans le rétentat sont astringents. Les valeurs d'absorbance plus élevées observées dans la gamme 254-600 nm pour les spectres du vin et du perméat reflètent la présence de composés phénoliques tels que les anthocyanes, les flavonols et les acides phénoliques qui contribuent peu à l'astringence et sont récupérés principalement dans le perméat. Les valeurs d'absorbance du vin à 230 nm semblent également liées au groupe d'astringence, confirmant des résultats antérieurs (Boulet et al, 2016, 2017).

Figure 43. Spectres UV-visible lissés et normalisés du vin entier (a), du perméat (b) et du rétentat (c). Fractogrammes du détecteur UV à 280nm (d) et à 230nm (e), détecteur MALS (angle à 90°) (f), détecteur dRI (g), Log(masse molaire) (h). Chaque profil a été coloré selon les groupes d'astringence : échantillons pour lesquels l'astringence est élevée en rouge, échantillons pour lesquels l'astringence est moyenne en bleu et échantillons pour lesquels l'astringence est faible en vert.



Les profils de l'AsFIFFF des 50 vins obtenus avec les trois détecteurs et la distribution de masse molaire (Figure 43d - h) montrent la présence de plusieurs fractions comme décrit précédemment (Chapitre III). La première (F1), éluée entre deux et cinq minutes, est clairement visible sur les fractogrammes UV et dRI et dans une moindre mesure sur les fractogrammes du MALS. Comme vu dans le chapitre III, ces fractions correspondent à des tanins de masse molaire élevée, coélus avec du RGII, ainsi que des PRAGs et des MPs de petite masse. Dans l'ensemble, l'abondance de cette fraction, en particulier dans les profils UV acquis à 280 nm (Figure 43d) et 230nm (Figure 43e) augmente en lien avec le niveau

d'astringence du vin, ce qui est cohérent avec la contribution connue des tanins de haute masse molaire à l'astringence du vin.

Les fractions (F2 et F3) sont principalement visibles sur les fractogrammes MALS et dRI (Figure 43f - g). Ces fractions, éluées entre ~cinq et huit minutes et entre ~huit et quinze minutes, respectivement, ont été attribuées à des polysaccharides de masse molaire intermédiaire (F2) et haute (F3).

Cependant, aucune relation n'a été observée entre le niveau d'astringence et l'intensité des pic de ces fractions ou leur temps de rétention en MALS ou en dRI. En outre, la présence de matériaux absorbant dans l'UV dans ces fractions pourrait refléter la présence de protéines ou de tanins interagissant avec le matériau polysaccharidique, ou encore de tanins de très haute masse molaire (ou très grand diamètre, pour des tanins).

La quatrième fraction (F4) clairement visible sur le fractogramme MALS a été éluée entre ~quinze et trente minutes (Figure 43f). Une grande variabilité a été observée d'un échantillon à l'autre pour F4. Par ailleurs, certains échantillons présentent un cinquième pic dans le MALS (F5, Figure 43f). Comme cela a été supposé pour le vin de syrah (*Chapitre III/VI*) les fractions (F4 et F5) sont présentes en très petite quantité parce que le signal dRI ou UV correspondant est proche de la ligne de base. Par conséquent, la masse molaire n'a pas pu être calculée pour ces fractions.

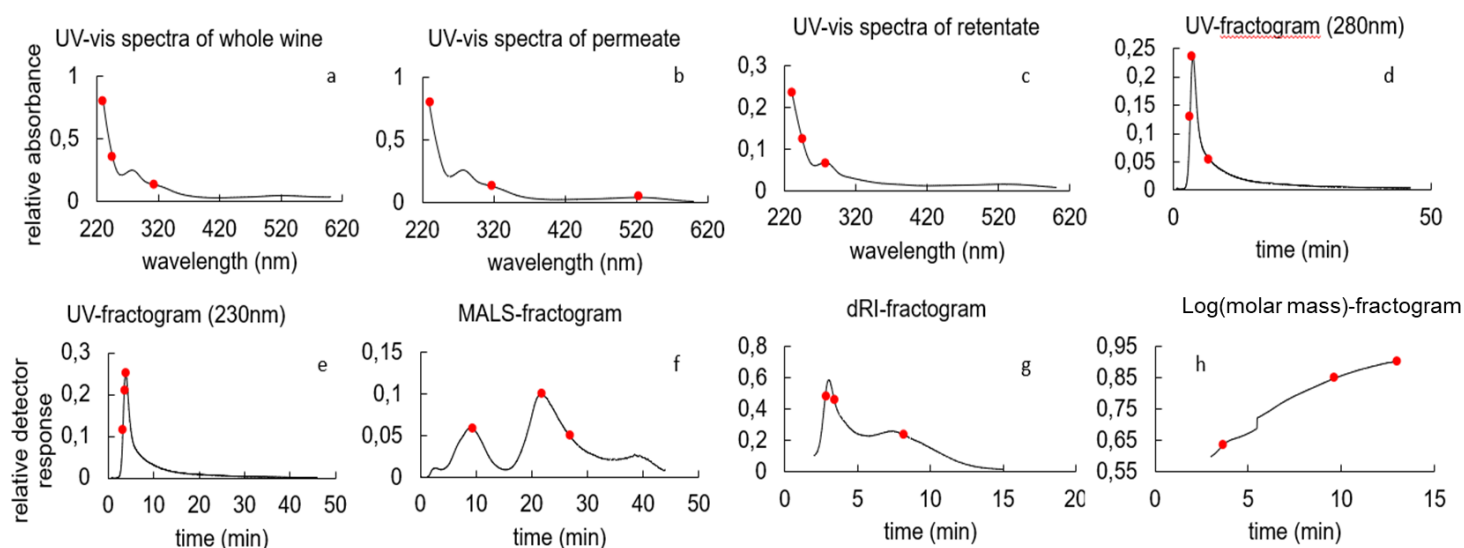
Enfin, la M_w calculée pour F1, F2 et F3 varie entre 7,5 et 23kDa (F1), entre 62 et 135kDa (F2) et entre 160 et 600kDa (F3), respectivement (Figure 43g). La masse molaire de F1 augmente avec le niveau d'astringence alors qu'aucune relation n'est visuellement observable pour F2 et F3.

2 Analyses multivariées des données

2.1 Sélection de variables

Les spectres UV-visible et les fractogrammes ont été rassemblés dans sept tableaux formant la matrice **X**. Afin d'éviter les biais dus au grand nombre de variables dans chaque spectre ou fractogramme et aux corrélations élevées entre elles lors de l'exécution de l'AFM, trois variables ont été sélectionnées à partir de chaque tableau **X**, indépendamment, sur la base de leur corrélation avec les notes d'astringence du vin, en utilisant la procédure CovSel (Roger, Palagos, Bertrand, & Fernandez-ahumada, 2011). Les variables sélectionnées ainsi que la fraction à laquelle elles correspondent sont illustrées sur la Figure 44 et répertoriées dans le Tableau 9. La longueur d'onde de 230 nm a été sélectionnée dans tous les spectres UV (rétentat, perméat et vin d'origine), confirmant le bon potentiel de cette longueur d'onde pour prédire les notes d'astringence (Boulet et al, 2016). Cependant, les autres longueurs d'onde sélectionnées diffèrent selon la fraction (perméat, rétentat ou vin d'origine). En effet, une longueur d'onde d'environ de 277 nm n'a été sélectionnée qu'à partir des spectres de la fraction de rétentat.

Figure 44. Représentation des variables sélectionnées par CovSel (points rouges) sur les profils moyens des spectres UV-visible (a, b, c) et des fractogrammes AF4 (d, e, f, g, h).



Elle peut être attribuée aux polyphénols de poids moléculaire élevé retenus au-dessus de la membrane du canal qui sont connus pour être des contributeurs majeurs de l'astringence du vin (Boulet et al. 2016;

Hufnagel & Hofmann 2008b). Les absorbances à 317 et 523 nm, reflétant la présence d'acides hydroxycinnamiques (Somers & Ziemelis, 1972) et d'anthocyanes, respectivement, ont été sélectionnées comme les variables les plus pertinentes pour la prédiction de l'astringence dans les spectres du perméat. Il a été rapporté que les anthocyanes augmentent l'astringence du vin (Brossaud et al, 2001) et interagissent avec les protéines salivaires (Ferrer-Gallego et al. 2015).

Par ailleurs, les acides phénoliques ont été identifiés comme contributeurs à l'astringence (Ferrer-Gallego et al, 2014; Hufnagel & Hofmann, 2008a, 2008b; Peleg et al., 1999; Vidal et al., 2018) et la prédiction de l'astringence du vin a été améliorée en tenant compte de leur concentration (Boulet et al,

Tableau 9. Résumé des variables sélectionnées dans les tableaux X et leurs fractions correspondantes.

Type de donnée	Tableau des X	Variables sélectionnées ^a	Nom des variables	Fraction d'AsFIFFF correspondante
Fractogrammes	Fractogramme UV ($\lambda = 280\text{nm}$)	3.3	UV280-3.3	F1
		3.8	UV280-3.8	
		7.0	UV280-7.0	
	Fractogramme UV ($\lambda = 230\text{nm}$)	3.2	UV230-3.2	F1
		3.5	UV230-3.5	
		3.8	UV230-3.8	
	Fractogramme MALS (angle 90°)	9.2	LS-9.2	F3
		21.7	LS-21.7	F4
		26.9	LS-26.9	
		2.8	dRI-2.8	F1
	Fractogramme dRI	3.4	dRI-3.4	F1
		8.2	dRI-8.2	F3
		3.7	Mw-3.7	F1
Log(M_w)	9.6	Mw-9.6	F3	
	13	Mw-13		
Spectres UV-vis	Spectre UV-vis de la fraction de rétentat	230	Ret-230	-
		244	Ret-244	-
		277	Ret-277	-
	Spectre UV-vis de la fraction de perméat	230	Per-230	-
		317	Per-317	-
		523	Per-523	-
	Spectre UV-vis du vin d'origine	230	VO-230	-
		245	VO-245	-
		313	VO-313	-

^aLes valeurs des variables correspondent au temps de rétention (min) et la longueur d'onde (nm) pour les fractogrammes et les spectres UV-vis, respectivement.

2016). L'absorbance à 313 nm sélectionnée dans les spectres de vin, correspond également aux acides hydroxycinnamiques ou aux anthocyanes substitués par ces acides (coumaroylée notamment). Ces anthocyanes montrent une affinité plus élevée envers la polyvinylpyrrolidone (PVPP) utilisée comme agent de collage que les anthocyanes non acylées (Gil et al, 2017), ce qui suggère qu'elles pourraient être plus astringentes. En outre, la longueur d'onde de 245nm a été sélectionnée dans les spectres des vins d'origine et des rétentats parmi les variables les plus corrélées avec l'astringence. En revanche, elle n'a pas été sélectionnée dans la fraction perméat, qui contient des molécules mono- et oligomériques (Figure 44, Tableau 9).

Ceci suggère que les composés associés à l'absorbance à 245nm, dont la nature reste à déterminer, n'ont pas un impact majeur sur l'astringence lorsqu'ils sont présents sous forme de monomères ou de molécules oligomériques, mais contribuent plus fortement lorsqu'ils sont impliqués dans de plus grands polymères. Deux variables sélectionnées à partir des fractogrammes UV à 280nm sont localisées au niveau de F1 et F2 (Figure 44, Tableau 9), indiquant que ces données fournissent des informations relatives à la fois à la présence de tanins et de tanins interagissant (ou coélués) avec les polysaccharides de masse molaire moyenne tels que les PRAGs. Toutefois, les trois variables sélectionnées à partir du fractogramme UV à 230nm se trouvent toutes au niveau F1 (Figure 44, Tableau 9).

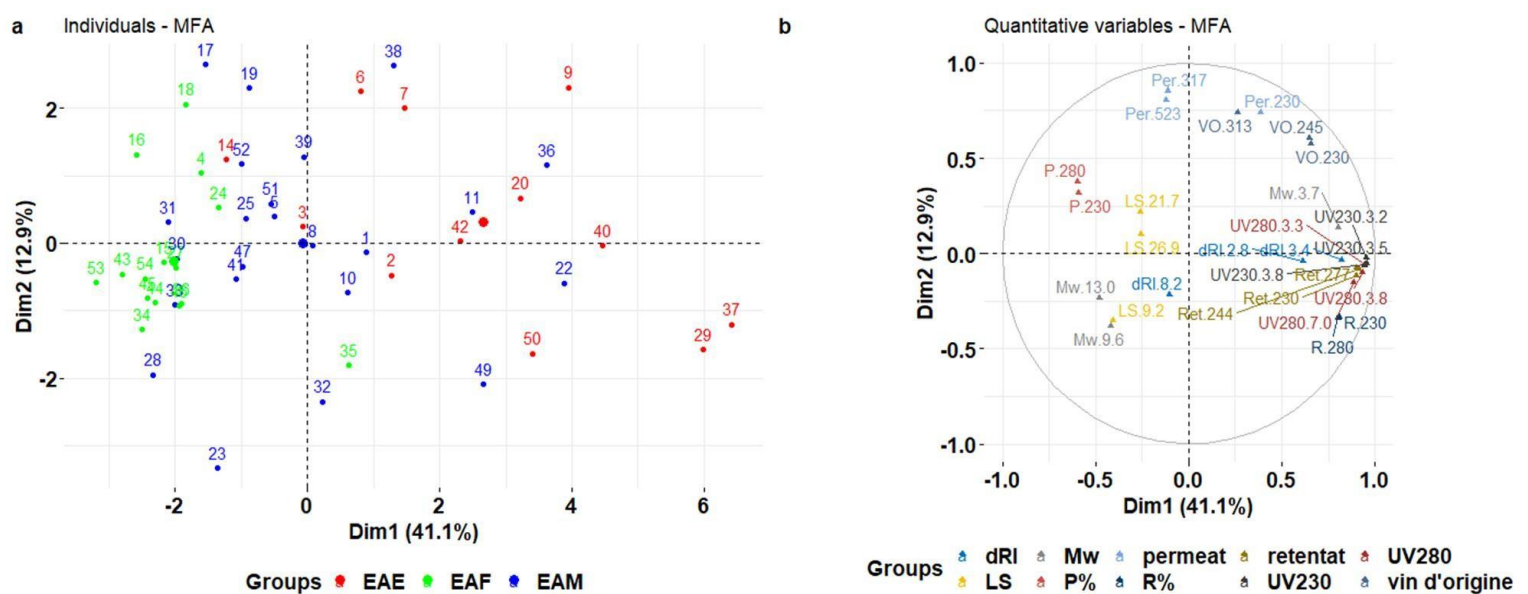
En revanche, les variables sélectionnées à partir des fractogrammes MALS sont plutôt situées sur les fractions F2/F3 et F4 (Figure 44, Tableau 9). Cela indique que ce tableau de donnée a apporté des variables liées à la fois aux composés polysaccharidiques contenus dans F3 et aux composés inconnus contenus dans F4 pour expliquer les notes d'astringence. De plus, les variables sélectionnées à partir des fractogrammes dRI et de la masse molaire, concernent à la fois des fractions de tanins/RG-II/petits PS et des fractions contenant essentiellement des composés polysaccharidiques de masse molaire plus importante (Figure 44, Tableau 9). Deux variables relatives à F1 et une à F3 ont été extraites du fractogramme dRI une variable relative à la masse de F1 et deux relatives aux masses de polysaccharides.

2.2 Analyse Factorielle Multiple (AFM)

Les variables sélectionnées à partir des sept tableaux X et les taux de recouvrement obtenus à 230 et 280nm (R%230 et R%280) ont été utilisés pour réaliser une analyse factorielle multiple, La Figure 45 montre la répartition des individus, colorés selon les groupes d'astringence (a), et les groupes de variables quantitatives (cercle de corrélation, b) sur le premier plan de l'AMF. Les EAE sont bien séparés des EAF le long de la composante principale 1 (CP1) qui est la composante la plus influencée par les groupes d'astringence (Figure 45a), En outre, les EAF semblent mieux groupés par rapport aux groupes EAE ou EAM, ce qui suggère que ces échantillons ont plus de similitudes en ce qui concerne leurs caractéristiques analytiques par rapport aux autres groupes.

La projection des variables sur le cercle de corrélation (Figure 45b), montre que les EAE sont caractérisés par des valeurs d'absorbance UV plus élevées du rétentat, les variables associées à F1 dans les fractogrammes de l'AsFIFFF (Mw à 3.7 min, dRI à 2.8 et 3.4 min, UV-280 et 230 nm à 3.2, 3.5, 3.8 min) et par une valeur plus élevée du taux de recouvrement dans le rétentat (%R 280 et 230 nm). Ces observations suggèrent que les composés phénoliques élués dans la F1 contribuent fortement à

Figure 45. Projection sur les deux premiers axes de l'analyse factorielle multiple (AFM) des individus (a) et des variables sélectionnées (b)



l'astringence des vins qui augmente aussi avec la M_w de cette fraction, comme proposé précédemment (Vidal et al 2003a).

En outre, la variable sélectionnée à $t_r = 7$ min dans les fractogrammes UV à 280nm (correspondant à F2), est également positivement corrélée à la CP1. Cela suggère qu'une partie des composés phénoliques des EAE est éluée dans la fraction F2 et correspond donc probablement à des tanins de masse molaire très élevée (ou associés à d'autres macromolécules).

En revanche, la projection des variables sélectionnées à partir des tableaux dRI, MALS et M_w sur le cercle de corrélations indique que les EAF ont des valeurs plus élevées des variables liées aux fractions F3 (LS-9.2min, M_w -9.6, et M_w -13.0min, dRI-8.2min) et F4 (LS-21.7 et LS 26.9).

Cela confirme que l'astringence perçue est contrecarrée par la présence des polysaccharides, mais aussi par les composés élués en F4 qui n'ont pas encore été identifiés. En outre, il est intéressant de noter que la masse molaire moyenne des polysaccharides semble avoir un impact aussi bien que leur concentration, exprimée par le dRI (Figure 45a). En outre, les EAF sont également les échantillons qui présentent le %P le plus élevé, et donc la plus forte proportion de composés phénoliques de faible poids moléculaire, non retenus par le système AsFIFFF. Cette observation est conforme aux résultats mentionnés ci-dessus, montrant que les vins les plus astringents ont les pourcentages de récupération (R%) les plus élevés.

Par ailleurs, les EAM sont très dispersés et se chevauchent avec les EAE et les EAF. Deux hypothèses ont été envisagées : (i) : Cette variabilité peut s'expliquer par le fait que les notes moyennes d'astringence pour ces vins, ne sont pas significativement différentes de celles des deux autres groupes. (ii) : la présence de protéines dans les fractions à des temps de rétention plus faibles, correspondant à F1 dans ce travail, a été récemment démontrée (Marassi et al, 2020) et peut contribuer à l'abondance de la F1 mesurée par détection UV.

D'autre part, la CP2 est positivement associée aux valeurs d'absorbance à 317 et 523 nm de la fraction perméat et du vin d'origine, (particulièrement à 313 nm), mais également aux variables liées à la fraction F4 (LS-21.7 et LS 26.9). Les valeurs d'absorbance à 313, 317 et 525 nm ne contribuent pas à la CP1

bien qu'elles aient été sélectionnées sur la base de leur corrélation avec les notes d'astringence, ce qui indique que la contribution des molécules associées à ces longueurs d'onde (acides hydroxycinnamiques et anthocyanes) à l'astringence du vin est en fait négligeable par rapport à celle des composés phénoliques de haute masse molaire élués en F1 et F2, qui représentent également la majeure partie de l'absorbance du vin à 230 nm.

En outre, les longueurs d'onde sélectionnées à partir des spectres du vin d'origine sont relativement bien représentées sur CP1 et CP2. VO-245 et VO-230 contribuent à l'axe 1 (et donc à l'astringence), tandis que VO-245 et VO-230 et VO-313 contribuent à l'axe 2 qui est plutôt associé aux anthocyanes et aux acides hydroxycinnamiques qui sont élués dans le perméat (Figure 45b). Cela reflète la distribution des composés phénoliques des vins entre perméat et rétentat

3 Conclusion

En somme, ces résultats montrent que l'AsFIFFF est un outil prometteur pour évaluer l'impact de la fraction colloïdale du vin rouge sur les propriétés gustatives et vins et particulièrement sur l'astringence. L'analyse multivariée a mis en évidence que les vins présentant la plus forte astringence étaient caractérisés à la fois par des valeurs plus élevées d'absorbance dans l'UV du rétentat et des variables associées à F1. Cela signifie que l'astringence perçue augmente avec la quantité de tanins retenus (> 5kDa) et leur masse molaire. En revanche, les vins avec l'astringence la plus faible ont montré des valeurs plus élevées de variables issues des autres détecteurs et liées à F2, F3 et F4, confirmant que l'astringence perçue est atténuée par les polysaccharides et les composés élués en F4. Les résultats ont également montré que la masse molaire des polysaccharides est associée à une moindre astringence. Cependant, il a été conclu que la fraction perméat et les variables relatives à F4 ont eu une contribution négligeable à l'astringence de vin comparées aux composés phénoliques de masse molaire plus grande, élués dans F1.

Chapitre VI

Caractérisation des fractions de l'AsFIFFF de plusieurs vins avec différents niveaux d'astringence

Introduction

A partir des résultats obtenus sur les relations entre les fractogrammes d'une série de vins et leur niveau d'astringence présentés dans le chapitre précédent, six vins représentatifs des trois groupes de niveau d'astringence ont été sélectionnés. Les critères de cette sélection ont été basés sur les notes d'astringence des vins et leurs différences au niveau des fractogrammes. Parmi les échantillons sélectionnés figurent deux échantillons issus du groupe des vins peu astringents (n°16 et 43), dont les notes moyennes déterminées par le jury de dégustation sont de 5,4/10 et 5,2/10, respectivement, deux vins issus du groupe des vins moyennement astringents (n°25 et 52) dont les notes moyennes sont de 6,7/10 et 6,3/10, respectivement et deux vins issus du groupe des vins très astringents (n°37 et 40) qui ont été notés 8,1/10 et 7,7/10, respectivement (Figures 36 et 40, *Chapitre V*). Les fractions F1, F2, F3 et F4 ont été collectées pour chacun de ces vins, pendant la séparation sur l'AsFIFFF. Comme cela a été fait pour vin de Syrah, décrit dans le *Chapitre IV*, les tanins contenus dans ces fractions ont été caractérisés par HPLC-UV-MS après dépolymérisation en présence de phloroglucinol et par HPSEC-UV. Les PS de ces fractions ont également été analysés L'objectif de cette expérimentation est d'apporter davantage d'information sur la composition de ces fractions en tanins et en PS et de mettre cela en lien avec le niveau d'astringence des vins.

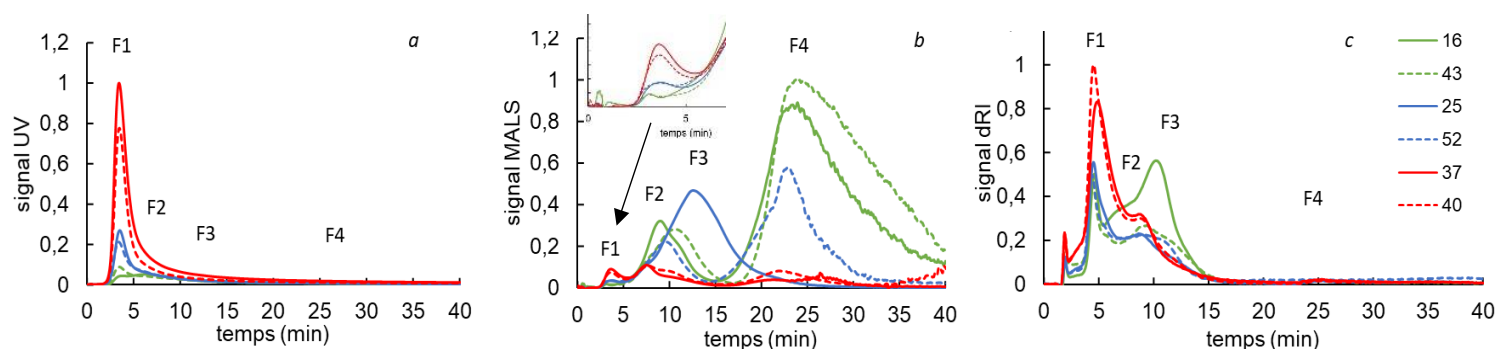
1 Description des fractogrammes des vins sélectionnés

Les fractogrammes UV, MALS et dRI des six vins sélectionnés sont représentés dans la Figure 46 et quelques caractéristiques comme le temps de rétention (t_r), la M_w et le R_i des fractions sont reportées dans le Tableau 10. La description de ces profils en particulier est reprise dans ce chapitre en apportant davantage de précision par rapport à ce qui est décrit dans le *Chapitre V*.

Comme cela a été montré précédemment (*Chapitre V*), l'abondance de la fraction F1 dans l'UV augmente avec le niveau d'astringence du vin (Figure 46a). Pour ces échantillons en particulier, les différences d'intensité de la fraction F1 dans l'UV entre les groupes de niveau d'astringence sont bien visibles. Cette relation est aussi observée dans le MALS (Figure 46b). En revanche, le dRI montre un

pic abondant pour la fraction F1 des deux vins les plus astringents, mais ne permet pas de faire la distinction entre les vins peu et moyennement astringents (Figure 46c). La M_w de la fraction F1 augmente également avec le niveau d'astringence des vins, comme cela a été vu dans le *Chapitre V* (~15, 12 et 8kDa pour les échantillons très, moyennement et peu astringents, respectivement, Tableau 10).

Figure 46. Fractogrammes des six vins sélectionnés avec détection UV à 280nm (a), MALS (b) et dRI (c),



Les fractions F2/F3 et F4 sont bien visibles sur le profil MALS (Figure 46b). L'intensité du signal MALS au niveau de ces fractions et en particulier la fraction F4 est élevée pour les échantillons peu astringents et faible pour les échantillons très astringents (Figure 46b). En revanche, les échantillons moyennement astringents ont des profils MALS peu ressemblants entre eux (Figure 46c). L'échantillon n°52 montre des intensités intermédiaires du MALS au niveau de F2/F3 et F4. En revanche, l'échantillon n°25 possède un profil MALS assez atypique. La distinction entre les fractions F2 et F3 est difficile sur le profil MALS de cet échantillon. Néanmoins, le fractogramme MALS de l'échantillon n°25 montre de légers épaulements aux temps de rétention qui correspondent classiquement aux fractions qui ont été définies. La fraction F4 a une intensité assez faible et semble coéluée avec la fraction F3 (Figure 46b).

Les fractions F2/F3 sont également visibles sur les fractogrammes dRI (Figure 46c). L'intensité des fractions F2 et surtout F3 montrées par le dRI sont très élevées dans l'échantillon n°16 (Figure 46c). Cela suggère que les PS représentent une part relativement importante de la fraction macromoléculaire de cet échantillon, jugé parmi les moins astringents. En revanche, les fractions F2/F3 dans l'échantillon

n°43 (également peu astringent) sont présentes dans des quantités beaucoup plus faibles et proches des autres échantillons (Figure 46c).

Tableau 10. Temps de rétention (t_r , en minute), masse molaire moyenne en masse (M_w , en kDa). Rayon hydrodynamique (R_h , en nm) et ratio M_w/R_h des fractions de l'AsFFFF des vins sélectionnés et de deux standards pullulans.

<i>n° vin</i>	<i>fractions</i>	t_r^a	M_w	R_h^b	M_w/R_h
16	F1	2.0 - 4.5	7.0 ($\pm 15.3\%$)	nc	nc
	F2	4.5 - 8.0	59.5 ($\pm 2.3\%$)	3.6 ($\pm 1.1\%$)	16.5
	F3	8.0 - 13.0	218.2 ($\pm 1.2\%$)	10.3 ($\pm 0.4\%$)	21.2
	F4	18.0 - 27.5	nc	143.0 ($\pm 0.3\%$)	nc
43	F1	2.4 - 5.0	9.3 ($\pm 15.4\%$)	nc	nc
	F2	5.0 - 8.5	100.9 ($\pm 2.4\%$)	3.8 ($\pm 1.3\%$)	26.6
	F3	8.5 - 16.0	515.6 ($\pm 1.2\%$)	11.8 ($\pm 0.3\%$)	43.7
	F4	18.0 - 43.0	nc	126.6 ($\pm 0.2\%$)	nc
25	F1	2.0 - 5.0	11.5 ($\pm 1.3\%$)	nc	nc
	F2	5.0 - 8.5	100.2 ($\pm 0.3\%$)	3.2 ($\pm 1.4\%$)	31.3
	F3	8.5 - 18.0	1886.7 ($\pm 0.3\%$)	18.7 ($\pm 0.3\%$)	100.9
	F4	18.0 - 23.4	nc	46.9 ($\pm 1.3\%$)	nc
52	F1	2.0 - 4.5	12.7 (± 8.34)	nc	nc
	F2	4.5 - 8.0	84.2 ($\pm 2.9\%$)	2.5 ($\pm 1.7\%$)	33.7
	F3	8.0 - 13.0	345.7 ($\pm 1.6\%$)	9.4 ($\pm 0.6\%$)	36.8
	F4	18.0 - 26.7	nc	136 ($\pm 0.5\%$)	nc
37	F1	2.0 - 5.5	15.1 ($\pm 3.5\%$)	nc	nc
	F2	5.5 - 9.0	75.8 ($\pm 2.4\%$)	3.1 ($\pm 1.5\%$)	24.5
	F3	9.0 - 15.0	166.6 ($\pm 0.5\%$)	nc	nc
	F4	16.0 - 22.5	nc	nc	nc
40	F1	2.0 - 5.0	14.5 ($\pm 11.1\%$)	nc	nc
	F2	5.0 - 8.5	102.0 ($\pm 16.4\%$)	2.5 ($\pm 1.6\%$)	40.8
	F3	8.5 - 15.0	nc	nc	nc
	F4	16.0 - 27.0	nc	nc	nc
P110	-	8.8 - 15	115.8	11	10.5
P400	-	12 - 21	390.8	21.9	17.8

^aTemps de rétention pris en compte à partir du $t_{starter}$ de la phase d'éluion et considérant $t_{starter} = 0min$.

^b R_h mesuré par Qels

On observe également que la fraction F2 des deux échantillons très astringents est plus importante par rapport aux échantillons moyennement astringents (Figure 46c). Le R_h mesuré par Qels est compris entre 2,5 et 3,8nm pour la fraction F2, entre 9,5 et 18,0nm pour la fraction F3 et entre 126 et 143nm pour la

fraction F4, hormis pour l'échantillon n°25 où il n'est que de 47 nm (Tableau 10). Le R_h des fractions F1 n'a pas pu être mesuré, car la taille de ces composés est en dessous de la limite de détection du QELS, comme cela a été discuté dans le *Chapitre IV*. Le R_h de la fraction F4 pour les échantillons très astringents n'a pas été pris en compte car l'erreur de mesure était trop importante en raison de la faible intensité du signal, de même que pour la fraction F3 de l'échantillon n°40. Le ratio M_w/R_h apporte des informations sur la densité des composés. Ce ratio a été calculé pour les fractions F2/F3, quand cela était possible. Il a également été calculé pour deux standards de pullulans (P110 et P400) afin de fournir des éléments de comparaison. La M_w et le R_h des pullulans ont été mesurés dans les mêmes conditions que pour les échantillons de vin. Les valeurs de M_w/R_h obtenues pour la fraction F2 sont comprises entre 16 et 33 (Tableau 10). Ces valeurs sont nettement plus élevées par rapport au P110 ($M_w/R_h = 10,5$) dont la M_w est similaire à celle des composés des fractions F2 (Tableau 10). Cela indique que ces composés sont plus denses comparés aux pullulans P110. Les valeurs obtenues pour la fraction F3 sont globalement plus élevées par rapport à la fraction F2 et particulièrement pour l'échantillon n°25 (Tableau 10). Ce qui indique que ces composés sont plus compacts. Les différences observées au niveau des valeurs de ce ratio n'ont pas permis de dégager des tendances claires, en lien avec le niveau d'astringence des vins.

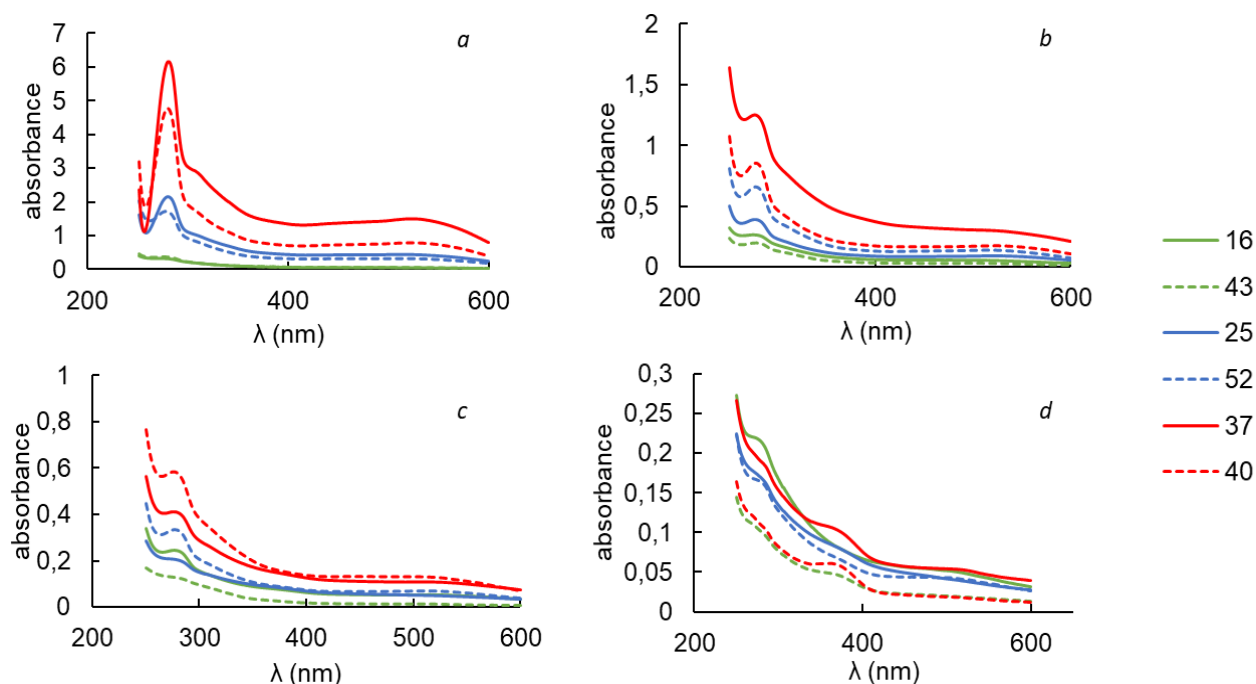
2 Caractérisation des fractions de l'AsFIFFF des vins sélectionnés

2.1 Caractérisation par spectroscopie UV-visible

Comme cela a été fait pour le vin de syrah (*Chapitre IV*), les fractions des vins décrites au-dessus ont été collectées pendant la séparation sur l'AsFIFFF et les spectres d'absorbance de ces fractions ont été mesurés entre 250 et 600nm (Figure 47). Les différences d'intensités de l'absorbance qui caractérisent les groupes d'astringence sont retrouvées dans les spectres des fractions F1 et F2, telles qu'elles sont observées dans les fractogrammes UV (Figure 46a, b).

Ces différences d'intensité sont également retrouvées sur toute la plage de longueur d'onde des spectres. Les absorbances comprises entre 300 et 350nm sont très marquées, notamment sur les spectres de la fraction F1 (Figure 47).

Figure 47. Spectres UV-visible des fractions de l'AsFlFFF des échantillons de vin sélectionnés avant l'étape de dessalage. Fraction F1 (a), fraction F2 (b), fraction F3 (c) et fraction F4 (d).



Mesures réalisées sous 1cm de trajet optique, hormis pour les fractions F1 des échantillons n°25, 52, 34 et 37 pour lesquelles le trajet optique était de 1mm. Les valeurs d'absorbance de ces fractions ont donc été multipliées par 10. (cf. Chapitre II, section 7)

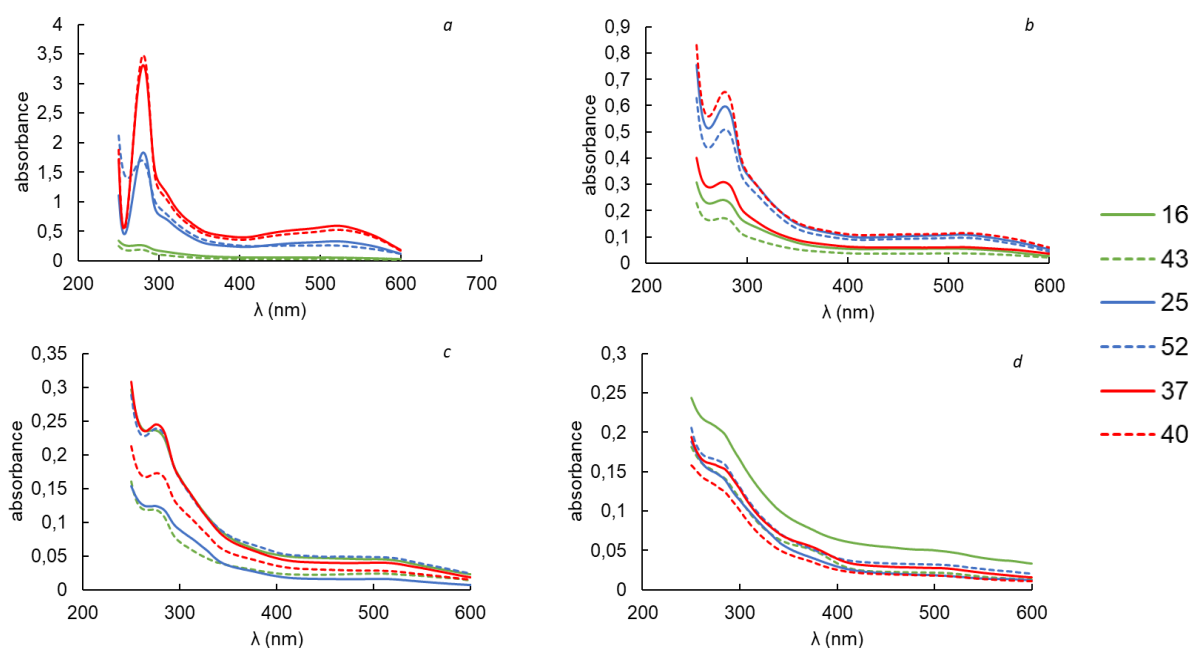
Cela pourrait indiquer la présence de motifs de type acides hydroxycinnamiques, d'anthocyanes coumaroylés, de flavonols ou encore d'unité galloylés (310nm, (Escribano-Bailon et al. 1992)) dans les polymères. On constate également que l'absorbance à 520nm est intense, notamment pour les spectres de la fraction F1, indiquant, comme observé pour le vin de syrah, (chapitre IV), la présence d'anthocyanes dans la structure de ces polymères.

Les spectres de la fraction F3 montrent des intensités plus élevées pour les échantillons très astringents, mais ne permettent pas de distinguer les échantillons peu et moyennement astringents (Figure 47c). En revanche, le lien entre les intensités d'absorbance et le niveau d'astringence des vins n'est pas retrouvé dans les spectres de la fraction F4, ce qui indique que les polyphénols contenus dans cette fraction, ne contribuent pas à l'astringence des vins, ou qu'ils sont présents en trop faible quantité pour avoir un impact (Figure 47d). On distingue tout de même, notamment pour les deux échantillons les plus astringents, un pic d'absorbance marqué vers 360 nm, qui n'était pas visible sur le spectre de la fraction

F4 du vin de syrah. Ce pic indique la présence de pigments jaunes, qui pourraient correspondre à des motifs de type flavonols ou à des tanins oxydés (Guyot et al. 1996; Oszmianski, Cheynier, & Moutounet 1996).

La Figure 48 présente les spectres UV-visible des fractions de l'AsFIFFF après élimination des sels par SPE. Des chutes d'intensités plus ou moins importantes selon les échantillons et les fractions sont observées à toutes les longueurs d'onde des spectres après dessalage des fractions. Elles ont été quantifiées à partir de l'absorbance à 280 nm (Figure 49). Elles sont notamment observées sur les fractions F1, F2 et F3 des échantillons très astringents (Figure 49). Ces pertes peuvent être dues à des phénomènes d'adsorption irréversible des tanins sur la phase de SPE. Par ailleurs, une coloration rosée de la fraction F_{EI} (acide acétique 2%) a été observée pour les fractions les plus concentrées en polyphénols (i.e : fractions F1 des échantillons n°37 et 40). Cela indique probablement que le volume de la phase stationnaire n'était pas suffisant pour absorber la totalité des polyphénols et qu'une partie a donc été éliminée dans la fraction F_{EI} . Cette hypothèse peut être confirmée en mesurant l'absorbance des fractions F_{EI} . Cependant, cette expérimentation n'a pas pu être réalisée dans le cadre de ce travail.

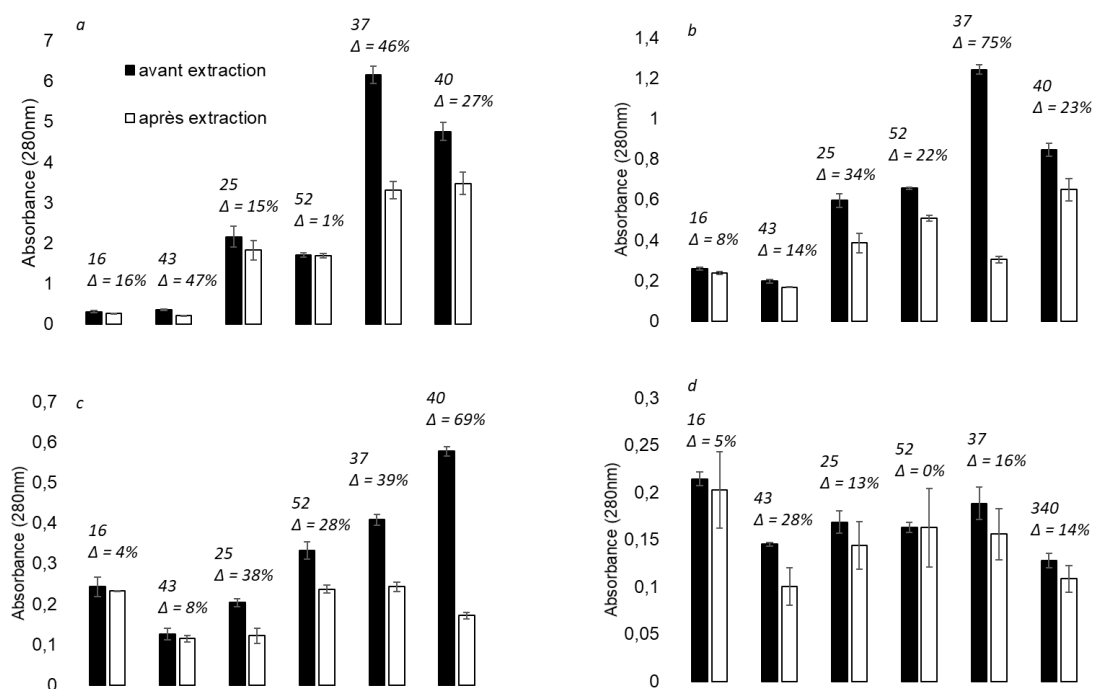
Figure 48. Spectres UV-visible des polyphénols extraient des fractions de l'AsFIFFF. Fraction F1 (a), fraction F2 (b), fraction F3 (c) et fraction F4 (d).



Mesures réalisées sous 1cm de trajet optique, hormis pour les fractions F1 des échantillons n°25, 52, 34 et 37 pour lesquelles l'épaisseur de la cuvette était de 1mm. Les valeurs d'absorbance de ces fractions ont donc été multipliées par 10. (cf. Chapitre II, section 7)

Un volume de phase insuffisant ne permet pas d'expliquer tous les cas de perte observés. En effet, on constate également des pertes importantes sur des fractions beaucoup moins concentrées. C'est le cas par exemple de la fraction F1 de l'échantillon n°43 (47% de perte, Figure 49a) ou de la fraction F2 de l'échantillon n°37 (75% de perte, Figure 49b). Pour des cas comme ceux qui viennent d'être mentionnés, les pertes peuvent s'expliquer par la présence de composés qui contribuent à l'absorbance à 280nm, mais qui ne sont pas de nature phénolique et ne sont pas retenus par la phase, comme les protéines par exemple. La présence de complexes hydrosolubles tanins - polysaccharides, pourrait aussi expliquer pourquoi une partie des polyphénols n'auraient pas été retenus sur la phase stationnaire et auraient été élués avec l'acide acétique à 2% pour se retrouver dans F_{E1} .

Figure 49. A_{280} , des fractions de l'AsFIFFF, avant et après l'étape de dessalage. Fraction F1 (a), fraction F2 (b), fraction F3 (c) et fraction F4 (d).



Mesures réalisées sous 1cm de trajet optique, hormis pour les fractions F1 des échantillons n°25, 52, 34 et 37 pour lesquelles trajet optique était de 1mm. Les valeurs d'absorbance de ces fractions ont donc été multipliées par 10. (cf. Chapitre II, section 7)

2.2 Caractérisation des tanins par HPLC-UV-MS après phloroglucinolyse

2.2.1 Vins d'origine

Tableau 11. Teneur en polyphénols totaux et résultat de la phloroglucinolyse sur les vins d'origine.

échantillon	concentration polyphénols totaux (mg.L ⁻¹) ^a	IPT	concentration en proanthocyanidine (mg.L ⁻¹) ^b	% récupéré en sortie de colonne ^c	%proanthocyanidine ^c	% de la surface en fin de chromatogramme ^c	DPm	%G	%EgC
16	4083	49	136	86	3	32	2	8	11
43	4375	53	519	98	12	19	3	1	21
25	4375	53	584	96	13	24	3	2	26
52	4100	49	523	90	13	25	3	2	21
37	4740	57	1078	72	23	25	5	4	29
40	4797	58	960	94	20	19	4	2	26

^aconcentration en mg.L⁻¹ équivalent catéchine déterminé par spectrophotométrie (A₂₈₀),

^bdéterminé par HPLC après phloroglucinolyse en mg.L⁻¹ équivalent catéchine,

^ccalculé par rapport à la A₂₈₀

(cf. Chapitre II, section 8.2)

Comme pour le vin de syrah (*Chapitre IV*), la concentration en polyphénols totaux, en proanthocyanidines (unités natives libérées par phloroglucinolyse), l'aire du pic élué en fin de chromatogramme (composés résistants à la phloroglucinolyse) et le taux de récupération en sortie de colonne des six vins d'origine, ont été évalués afin d'apprécier la pertinence des paramètres en lien avec la structure des tanins (DPm, %G et %EgC) (Tableau 11).

Les concentrations en polyphénols totaux sont de l'ordre de 4 à 5 g.L⁻¹ équivalent catéchine, ce qui correspond à des indices en polyphénols totaux (IPT = A₂₈₀*facteur de dilution) compris entre ~50 et 60 (Tableau 11). Ces valeurs sont conformes à celles classiquement observées pour les vins rouges (Mercurio, Damberg, Cozzolino, Herderich, & Smith, 2010). Les concentrations en proanthocyanidines mesurées par phloroglucinolyse sont comprises entre ~135 et 1000 mg.L⁻¹ (Tableau 11). La contribution de ces unités de proanthocyanidines à l'absorbance totale à 280 nm est particulièrement faible (3%, Tableau 11) pour l'échantillon n°16 (vin peu astringent). Ceci peut refléter la présence dans ce vin de concentrations plus importantes d'autres composés phénoliques tels que les anthocyanes ou les acides phénols qui absorbent fortement à 280 nm. Cependant, la surface du pic élué en fin de chromatogramme est relativement importante (représentant ~32% de l'absorbance à 280 nm, mesurée par

spectrophotométrie), ce qui indique que cet échantillon contient également une proportion non négligeable de tanins non dépolymérisables. Pour les autres échantillons peu et moyennement astringents (n°43, 25 et 52), la part de proanthocyanidines s'élève à environ 12,5%, tandis qu'elle est plus élevée dans les échantillons très astringents (autour de 20%, Tableau 11).

Les valeurs du DPM sont comprises entre 2 et 5 et sont fortement corrélées avec les teneurs mesurées par phloroglucinolyse (Tableau 11). Ces valeurs sont cohérentes avec des valeurs rapportées dans les vins (Chira, Pacella, Jourdes, & Teissedre, 2011; Cosme, Ricardo-Da-Silva, & Laureano, 2009; Drinkine, Lopes, Kennedy, Teissedre, & Saucier, 2007; Fernández, Kennedy, & Agosin, 2007).

Les valeurs de DPM sont fortement corrélées avec les teneurs mesurées par phloroglucinolyse ($r^2 = 0,97$) et augmentent avec le niveau d'astringence de l'échantillon. Quoique le calcul du DPM soit à considérer avec précaution dans la mesure où il ne prend en compte qu'une partie des unités constitutives des tanins du vin (Cheynier et al. 2006 ; Fernández, Kennedy & Agosin 2007), et où les analyses n'ont pas été répliquées, cette observation est en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature. En effet, l'augmentation de l'astringence avec le DPM des tanins a déjà été observée en solution modèle avec des tanins purifiés (Vidal et al, 2003a), puis dans les vins (Boulet et al, 2016 ; Chira et al. 2011).

Par ailleurs, les taux d'unités galloylées (%G) et d'unités trihydroxylées (%EgC) sont respectivement compris entre 1 - 8% et 11 - 29% (Tableau 11). Les proportions d'unité galloylées (%G) sont également cohérentes avec ce qui est rapporté dans la littérature (Ducasse et al. 2010; Morel-Salmi et al. 2006; Vernhet et al. 2020). Les haut taux d'EgC indiquent que les polyphénols contenus dans ces échantillons sont plutôt issus de la pellicule des raisins et que peu ont été extraits des pépins, hormis pour l'échantillon n°16, qui possède le plus grand %G et la plus faible %EgC. Cependant, le %EgC est très variable selon le cépage (Fernández et al, 2007).

2.2.2 Fractions de l'AsFIFFF

Les concentrations des polyphénols récupérés dans les fractions de l'AsFIFFF après l'étape de SPE ont été ramenées aux concentrations du vin d'origine (Tableau 12). Les teneurs en polyphénols totaux s'élèvent jusqu'à plusieurs centaines de mg.L^{-1} équivalent catéchine dans la fraction F1 pour les

échantillons les plus riches. Elles représentent 1% de la valeur d'absorbance du vin pour les échantillons les moins astringents, 3% pour les moyennement astringents et 5% pour les plus astringents. Ces concentrations sont comprises entre 12 et 45 mg.L⁻¹ équivalent catéchine pour la fraction F2 et entre 8 et 17 mg.L⁻¹ équivalent catéchine dans les fractions F3 et F4 (Tableau 12).

Tableau 12. Teneur en polyphénols totaux et résultat de la phloroglucinolyses sur les fractions de l'AsF1FFF

<i>fraction</i>	<i>échantillon</i>	<i>concentration polyphénols totaux (mg.L⁻¹)^a</i>	<i>concentration en proanthocyanidine (mg.L⁻¹)^b</i>	<i>% récupéré en sortie de colonne^c</i>	<i>%proanthocyanidine^c</i>	<i>% de la surface en fin de chromatogramme^c</i>	<i>DPm</i>	<i>%G</i>	<i>%EgC</i>
F1	16	22	<1	60	2	27	4	14	40
	43	25	1	96	5	26	6	11	11
	25	118	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	52	118	8	87	7	36	11	7	13
	37	233	35	96	15	39	21	5	22
	40	241	65	92	27	56	16	5	16
F2	16	16	<1	2	<1	10	17	2	75
	43	12	<1	40	1	17	9	6	51
	25	27	1	78	4	40	6	4	30
	52	35	3	98	8	47	11	7	4
	37	24	1	49	4	27	11	5	21
	40	45	3	70	6	30	11	6	13
F3	16	16	<1	80	3	38	18	4	67
	43	8	<1	51	4	18	49	1	88
	25	8	<1	73	2	29	9	2	63
	52	16	1	25	3	29	12	4	49
	37	17	1	69	3	31	6	3	41
	40	12	<1	68	2	35	7	9	80
F4	16	18	<1	43	1	16	7	13	46
	43	9	<1	77	<1	17	0	0	100
	25	13	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	52	14	<1	25	1	9	6	11	43
	37	17	<1	38	1	14	8	0	63
	40	9	<1	47	1	16	6	5	63

^aconcentration en mg.L⁻¹ équivalent catéchine déterminé par spectrophotométrie (A₂₈₀),

^bdéterminé par HPLC après phloroglucinolyse en mg.L⁻¹ équivalent catéchine,

^ccalculé par rapport à la A₂₈₀

nc : non calculé

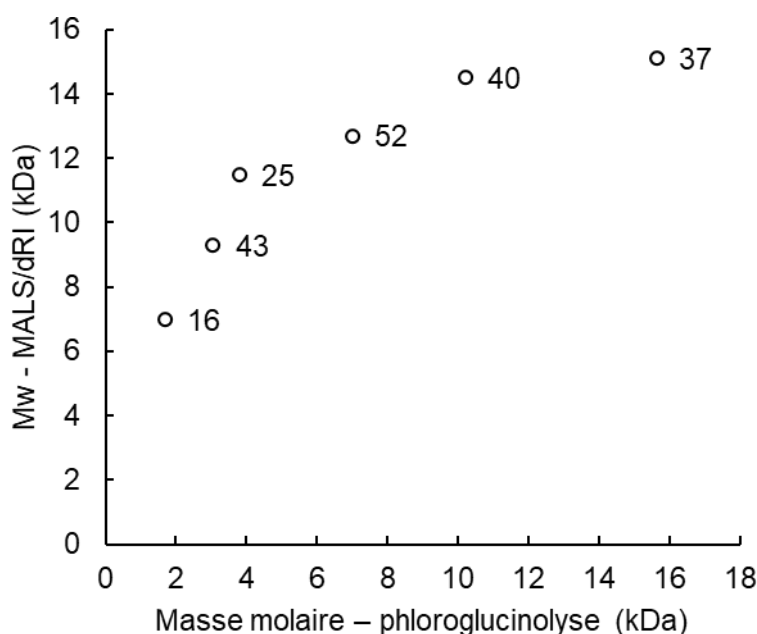
(cf. Chapitre II, section 8.2)

Les taux de récupération en sortie de colonne après phloroglucinolyse (mesurés par rapport à l'A₂₈₀ des fractions après dessalage) sont globalement satisfaisants pour la fraction F1, hormis pour l'échantillon n°16 pour lequel on constate environ 40% de perte (Tableau 12). Les taux de récupération au niveau des autres fractions (F2 – F4), montrent que les pertes sont proportionnellement plus importantes quand les quantités de polyphénols sont faibles mais on observe aussi une forte variabilité probablement due à des

imprécisions liées aux manipulations. Un taux de récupération extrêmement faible a été observé pour la fraction F2 de l'échantillon n°16 (Tableau 12), mais l'absence de répétition ne permet pas de confirmer cette observation. Comme cela a été supposé précédemment (*Chapitre IV*), ces pertes ont pu être occasionnées pendant la réaction de phloroglucinyse (insolubilisation, élimination par centrifugation) et/ou pendant l'élution sur la colonne chromatographique (adsorption irréversible sur la colonne HPLC).

La part de proanthocyanidines (tanins dépolymérisables) dans la fraction F1 est comprise entre 2 et 5% pour les deux échantillons les moins astringents, tandis qu'elle est bien plus importante pour les échantillons très astringents (15 et 27%, Tableau 12). Les valeurs du DPm calculées pour cette fraction sont également plus élevées dans les vins les plus astringents.

Figure 50. Relation entre les masses molaires calculées à partir des données MALS/dRI et des phloroglucinyse



Les masses molaires déduites des données de la phloroglucinyse prennent en compte le pourcentage d'unités d'(épi)catéchine (MM = 290Da) et galloylées (MM = 442Da) et (epi)gallocatéchine (MM = 306Da)

La Figure 50 compare les masses molaires déterminées à partir des données de la phloroglucinyse et par MALS/dRI et montre que les masses molaires estimées par les deux méthodes varient dans le même sens et augmentent avec l'astringence des vins. On constate que les plus grands écarts entre les deux

valeurs de masse molaire concernent les échantillons peu et moyennement astringents et cet écart semble diminuer pour les vins moyennement et très astringents, qui ont des taux de proanthocyanidines plus importants. Cela indique que les DPM calculés par phloroglucinolyse sont fortement sous-estimés, notamment pour les vins les moins astringents qui présentent des teneurs en polyphénols plus faibles. Cela suggère que ces vins possèdent une plus forte proportion de tanins évolués.

Cependant, on observe que la part du pic en fin chromatogramme (attribué à des tanins non dépolymérisables) est de 26% pour les vins peu astringents, tandis qu'elle est comprise entre 40 et 55% pour les vins très astringents (Tableau 12). Ce résultat montre que les fractions F1 des vins très astringents sont plus riches en tanins qui comprennent à la fois une plus forte proportion d'unités de proanthocyanidines libérées par la phloroglucinolyse et de composés résistants ou partiellement résistants à cette réaction élués sous forme de bosse en fin de chromatogramme (où à des pics non identifiés dans le chromatogramme). La part de proanthocyanidines dans les fractions F2 – F4, est globalement plus basse par rapport à F1 et particulièrement pour la fraction F4 ($<1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Tableau 12). Cela suggère que les tanins retrouvés dans ces fractions possèdent des structures complexes et peu adaptées à ces conditions d'analyse. Cependant, vu les faibles concentrations présentes et la variabilité en l'absence de répétition, il est difficile de conclure clairement sur ces résultats.

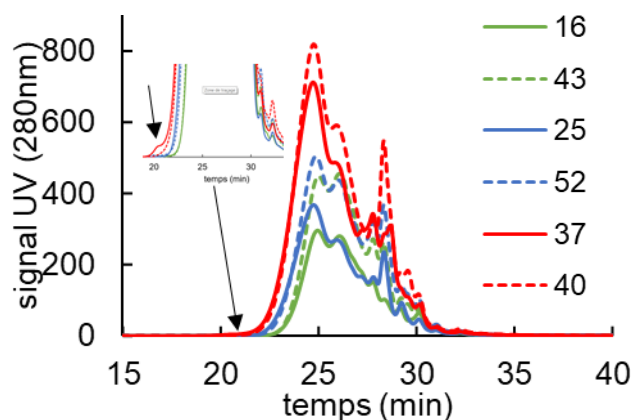
2.3 Analyse par SEC-UV

2.3.1 Vins d'origine

La Figure 51 représente les profils obtenus par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur UV (280 nm) des six vins d'origine. Les profils montrent des liens avec le niveau d'astringence des vins. Les vins les plus astringents présentent des intensités supérieures notamment aux temps de rétention les plus précoces (de 21 à 24 min), voisins de ceux de l'extrait de procyanidines de DP40 (Figure 36, *Chapitre IV*, Figure 51). Des différences en lien avec le niveau d'astringence des vins sont aussi visibles entre 24 et 26min (Figure 51). L'intensité du pic sur cette plage de temps de rétention est plus élevée dans les vins très astringents. En revanche, on ne constate pas de différences entre les vins moyennement et peu astringents (Figure 51), suggérant que ces polymères, élués aux mêmes temps de

réretention que des procyanidines de DP6 – DP7 (Figure 37, *Chapitre IV*) sont moins impliqués dans la perception de l'astringence.

Figure 51. Chromatogrammes d'exclusion stérique des vins d'origines



2.3.2 Fractions de l'AsFIFFF

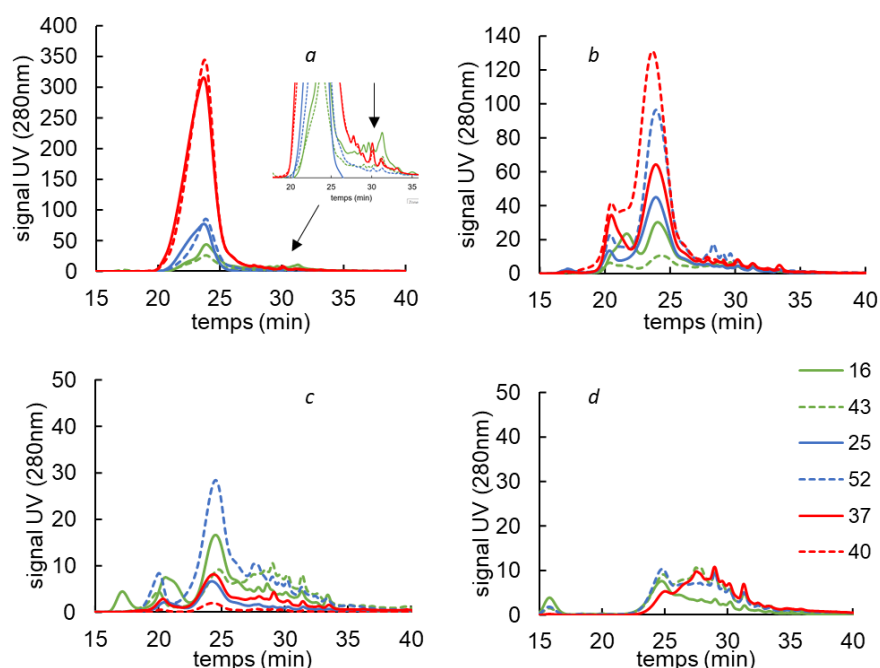
Les chromatogrammes des tanins extraits des fractions de l'AsFIFFF (F1 – F4) sont exposés dans la Figure 52. Les tanins issus de la fraction F1 des vins peu et moyennement astringents ont été élués entre 21 et 25 min, tandis que ceux qui ont été extraits des vins très astringents ont été élués sur une plage de temps plus large, comprise entre 19,5 et 26,0min (Figure 52a).

L'intensité des pics dans ces chromatogrammes reflète celle des fractogrammes UV (Figure 46a) et des spectres UV-vis des tanins extraits de la fraction F1 (Figure 48a).

De plus, on constate que les plus gros polymères (entre ~20 et 22min) sont présents en quantité plus importante dans les échantillons les plus astringents et que cette proportion diminue avec le niveau d'astringence des vins (Figure 52a). Cette observation va dans le même sens que les DPm calculés pour cette fraction et les M_w déterminées par MALS/dRI.

Par ailleurs, les temps de rétention des tanins de la fraction F1 correspondent à la fraction de tanins de référence DP40 (Figure 36, *Chapitre IV*), dont la M_w estimée est de ~ 12 kDa, ce qui est relativement en bon accord avec les M_w déterminées par MALS/dRI de la fraction F1 (Tableau 10).

Figure 52. Chromatogrammes d'exclusion stérique des tanins extraits des fractions de l'AsF1FFF, F1(a), F2(b), F3(c) et F4 (d).



Les tanins issus de la fraction F2 ont des temps de rétention comparables à ceux de la fraction F1 (entre 19.5 - 26min). Cette fraction peut globalement être divisée en deux sous-populations, entre 19.5 – 22min et 22 – 26min (Figure 52b). Il peut en être déduit que la proportion de gros tanins (entre 19.5 – 22min) est plus importante dans la fraction F2 comparé à ceux qui sont issus de la fraction F1, notamment pour les échantillons très astringents. Cependant, les taux de récupération des tanins sur colonne de SPE (Figure 49) ne permettent pas de conclure clairement sur la proportion réelle de ces deux sous-populations, ni sur leur lien avec le niveau d'astringence. On constate tout de même que les échantillons les moins astringents possèdent les intensités les plus basses et les meilleurs taux de récupération (Figure 52b et 49b), ce qui suggère que les observations faites pour ces échantillons sont fiables. En revanche, cela est moins le cas pour les deux autres catégories d'échantillons, pour lesquels les taux de pertes

occasionnées pendant l'étape de dessalage des fractions de l'AsFIFFF sont trop importantes (Figure 49b).

Les deux sous-populations décrites pour les tanins de la fraction F2 sont également retrouvées avec les tanins de la fraction F3 (Figure 52c). Les pertes observées lors de l'extraction des tanins de la fraction F3 sont également importantes, notamment pour les échantillons moyennement et très astringents, ce qui rend l'interprétation de ces chromatogrammes plus difficile. En revanche, les taux de récupération sont satisfaisants pour les échantillons peu astringents. Une population supplémentaire éluée autour de 15min est observée pour l'échantillon n°16 (Figure 52c). Cette population pourrait correspondre à la présence de tanins très massifs ou à des protéines, mais serait présente en très petite quantité. Cependant, l'absence de répétition des analyses ne permet pas de conclure clairement à ce sujet.

La sous-population éluée entre 19,5 et 22,0min n'est plus visible dans les chromatogrammes des tanins issus de la fraction F4 et la sous-population entre 22 et 26min est présente en très faible quantité (Figure 52d). Par ailleurs, une petite population de très gros polymères est visible autour de 15min pour les échantillons peu et moyennement astringents (Figure 52d). Cette population pourrait correspondre à des tanins de très haut DP ou à des protéines par exemple. Les taux d'extraction sont relativement satisfaisants pour cette fraction (Figure 49d), ce qui suggère que les tanins contenus dans cette fraction pour les échantillons très astringents sont présents en moins grande quantité, par rapport aux deux autres catégories.

Par ailleurs, on constate également la présence de petites molécules, éluées entre 26 et 30min et dans chacune des fractions (Figure 52). Les composés élués entre 26 et 28 min pourraient correspondre à des tanins dimères et à des monomères tels que la catéchine (Figure 36, *Chapitre IV*). Les pics plus tardifs ($t_r > 28\text{min}$), pourraient correspondre à des acides phénoliques par exemple. Leurs proportions par rapport aux populations polymériques est négligeable dans la fraction F1, cependant elle est plus importante dans les fractions F2 et F3 et constitue la majorité des composés élués dans F4 (Figure 52). La présence de ces populations de petites molécules, pourrait s'expliquer par le fait qu'elles étaient adsorbées (ou associées) sur les complexes macromoléculaires présents dans les fractions de l'AsFIFFF et que les solvants utilisés pour la SPE et la SEC ont dissocié ces interactions. Cela a permis de les

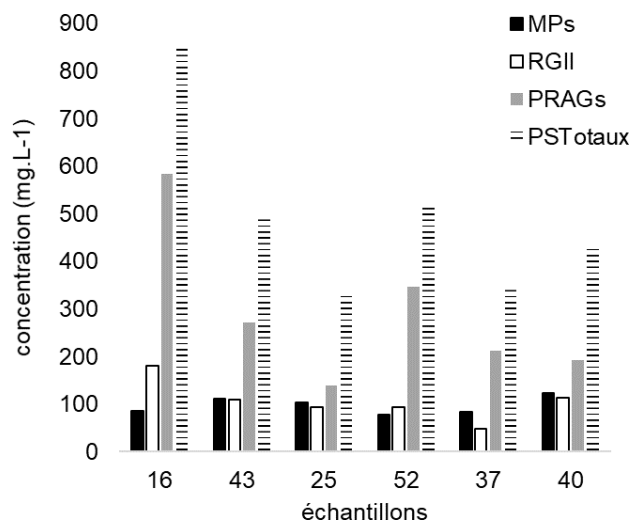
maintenir au-dessus de la membrane de l'AsFIFFF. Or les conditions d'extraction des tanins depuis les fractions de l'AsFIFFF et de la SEC (solvants favorables à la dissolution des tanins), ont dissocié ces interactions.

D'un point de vu plus global, les tanins extraits des fractions de l'AsFIFFF, possèdent dans des proportions plus ou moins importantes, des populations éluées à des temps de rétentions similaires. C'est le cas notamment pour la population éluée autour de 25min et pour les composés de faible masse molaire, élués entre 26 et 35min, (Figure 52). Ce résultat est semblable à ce qui a été observé avec le vin de syrah (*Chapitre IV, section 2.3*). Cela confirme l'hypothèse que les composés absorbant dans l'UV, élués tardivement sur l'AsFIFFF (fractions F2, F3 et F4) sont en partie constitués de tanins engagés dans des complexes macromoléculaires, impliquant aussi des PS et probablement des protéines.

2.4 Analyse de la composition en polysaccharides

2.4.1 Vins d'origine

Figure 53. Dosage des polysaccharides dans les vins d'origine



L'objectif de cette analyse est d'évaluer la distribution des différentes familles de PS dans les quatre fractions de l'AsFIFFF et de voir si cette distribution présente un lien avec le niveau d'astringence des vins. Dans un premier temps, les teneurs en PS ont été évaluées sur les vins d'origine, puis dans un second temps, sur les fractions de l'AsFIFFF. Les données relatives aux vins d'origines ont été comparées à celles des fractions pour estimer les taux de récupération des PS dans les fractions. La

Figure 53, représente les teneurs en PS dans les vins d'origine. Les valeurs observées sont du même ordre de grandeur que ce qui a été rapporté dans la littérature (Guadalupe, Martínez-Pinilla, Garrido, Carrillo, & Ayestarán, 2012; Apolinar-Valiente et al, 2013).

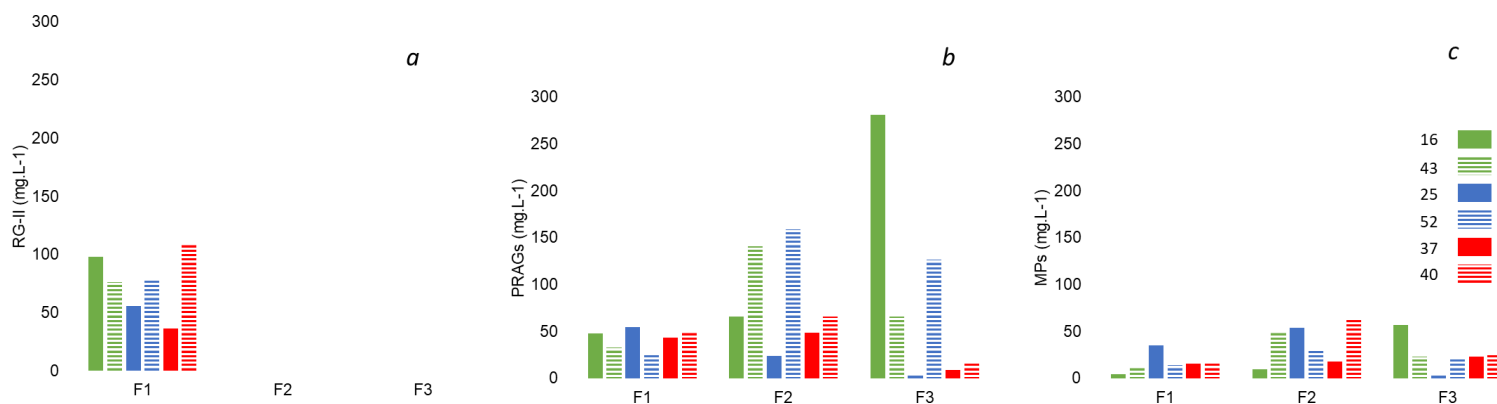
Dans ce cas aussi, l'absence de répétition des analyses ne permet pas de conclure sur des différences significatives entre les échantillons. Toutefois, quelques tendances en lien avec le niveau d'astringence des vins sont visibles.

Les teneurs en PS totaux des vins peu astringents semblent être plus importantes par rapport aux vins très astringents. En revanche, les vins moyennement et très astringents ne présentent pas de grandes différences entre eux (Figure 53). L'échantillon n°16 présente la plus grande teneur en PS totaux, ce qui est cohérent avec l'abondance des fractions F2/F3 sur le fractogramme dRI de cet échantillon (Figure 46c). Les PRAGs sont les principaux contributeurs de la teneur en PS (Figure 53).

2.4.2 Fractions de l'AsFIFFF

La teneur des PS a également été analysée dans les fractions de l'AsFIFFF afin de voir comment étaient distribuées les différentes familles de PS dans les fractions. Les teneurs dans les vins d'origine ont été utilisées comme référence pour calculer le taux de récupération des PS, dans chaque fraction.

Figure 54. Dosage des polysaccharides dans les fractions de l'AsFIFFF



La Figure 54 montre les teneurs en RG-II (a), PRAGs (b) et MPs (c) dans les fractions F1, F2 et F3 de l'AsFIFFF. La teneur en PS dans la fraction F4 n'a pu être déterminée à cause des quantités insuffisantes pour cette analyse. Le Tableau 13 résume les taux de récupération des PS dans chaque fraction de l'AsFIFFF. Les taux de récupération au niveau des polysaccharides totaux (PST) varient entre 42 et 71% (Tableau 13). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que pour l'échantillon de syrah dans le (*Chapitre IV, section 2.4*) et sont relativement faibles. Cela suggère qu'une proportion non négligeable des PS s'adsorbe sur la membrane d'ultrafiltration de l'AsFIFFF. Il est également possible que des pertes aient été occasionnées lors de l'extraction des PS depuis les fractions de l'AsFIFFF (cf. *Chapitre II, section 6.2.1*).

Tableau 13. Taux de récupération (%) calculé par rapport aux teneurs des vins d'origine par famille de PS et par fraction.

<i>n°échantillon</i>	<i>PST^a</i>	<i>fractions</i>	<i>RG-II</i>	<i>PRAGs</i>	<i>MPs</i>
16	66	F1	41	6	4
		F2	0	8	8
		F3	0	36	50
		somme	41	51	62
43	61	F1	53	9	9
		F2	0	39	34
		F3	0	18	16
		somme	53	66	59
25	51	F1	45	29	26
		F2	0	13	39
		F3	0	2	2
		somme	45	44	66
52	66	F1	62	6	14
		F2	0	34	28
		F3	0	28	21
		somme	62	68	62
37	42	F1	56	15	14
		F2	0	17	16
		F3	0	3	21
		somme	56	35	50
40	53	F1	71	20	10
		F2	0	26	38
		F3	0	6	15
		somme	71	52	64

^aPST = Polysaccharide totaux

Au niveau de la distribution des différentes familles de PS dans les différentes fractions, on constate que le RG-II a été détecté uniquement dans la fraction F1 (Figure 54a, Tableau 13), comme cela a été vu dans le vin de syrah (*Chapitre IV, section 2.4*). Ces résultats suggèrent que le RG-II est toujours élué dans F1, pour les conditions qui ont été mises au point sur l'AsFIFFF. Par ailleurs, les PRAGs et les MPs, ont été retrouvés dans toutes les fractions, y compris F1, comme observé sur le vin de syrah (*Chapitre IV, section 2.4*). Les vins n°16, 43 et 52 sont les plus riches en PRAGs (Figure 53). Pour les n°43 et 52, ces teneurs sont notamment retrouvées dans les fractions F2 et F3 et peu dans la fraction F1, tandis que pour l'échantillon n°16, les PRAGs sont essentiellement localisés dans la fraction F3 (Figure 54b, Tableau 13). Les trois échantillons d'origine les moins riches en PRAGs sont les n°25, 37 et 40 (Figure 53).

Pour ces échantillons, les PRAGs sont plutôt retrouvés dans les fractions F1 et F2 et très peu dans les fractions F3. La teneur en PRAGs dans la fraction F1 est similaire dans tous les échantillons, quel que soit le niveau d'astringence (Figure 54b).

En revanche les teneurs en PRAGs dans les fractions F3/F3 sont élevées pour les échantillons peu et moyennement astringents, hormis pour l'échantillon n°25 où la quantité et la répartition des PRAGs dans les différentes fractions est proche celle des vins très astringents (Figure 54b, Tableau 13).

Au vu de ce qui a été discuté dans le *Chapitre V*, les masses molaires très élevées des composés contenus dans la fraction F3 de l'échantillon n°25 (Tableau 10) peuvent expliquer pourquoi le niveau d'astringence de ce vin en particulier est moins élevé.

Les teneurs en MPs sont moins importantes que celles des PRAGs (Figure 54c). Ces PS sont notamment retrouvés dans la fraction F2, contrairement à ce qui a été supposé dans le *Chapitre IV*, hormis pour l'échantillon n°16 pour lequel la majeure partie des MPs est retrouvée dans la fraction F3 (Figure 54c).

Toutefois, au vu des taux de récupération obtenus et de l'absence de répétition de ces analyses, il est difficile de conclure sur les concentrations des différentes familles de PS dans chaque fraction et d'établir un lien avec l'astringence des vins.

3 Conclusion

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre était d'apporter davantage d'information sur la structure des tanins et les compositions des PS présents dans chaque fraction de l'AsFIFFF et de mettre cela en lien avec le niveau d'astringence des vins. Les pertes occasionnées lors de l'extraction des tanins et des PS depuis les fractions de l'AsFIFFF. Les bilans matière réalisés dans l'UV ont montré que ces pertes pouvaient varier de façon conséquente d'un échantillon et d'une fraction à l'autre. Ces pertes peuvent provenir de phénomènes d'absorption irréversible ou d'une adsorption insuffisante des polyphénols sur la phase de SPE utilisée pour éliminer les sels de l'éluant utilisé pour l'AsFIFFF. L'analyse des tanins par phloroglucinolyse – HPLC-UV-MS montre que les DPm obtenus pour la fraction F1 vont dans le même sens que les M_w déterminées par MALS/dRI. Par ailleurs, les rendements de réaction de dépolymérisation sont globalement plus faibles pour les fractions F2 – F4, ce qui suggère que les structures de ces polyphénols sont plus complexes et évoluées par rapport à ceux qui sont retrouvés dans F1. Par conséquent il peut être suggéré que les polyphénols les plus évolués, interagissent préférentiellement avec les PS.

Les analyses par SEC-UV ont permis de confirmer ce qui avait été observé sur le vin de syrah auparavant (*Chapitre IV, section 2.3*). En effet, des populations de tanins et de polyphénols de faible masse molaire ayant les mêmes temps de rétention ont été retrouvées dans chaque fraction de l'AsFIFFF. Cela confirme la présence de complexes macromoléculaires dans les fractogrammes.

Par ailleurs, l'analyse des teneurs en PS dans les différentes fractions avait pour but d'évaluer comment ces familles de PS étaient distribuées à travers ces quatre fractions et de voir si cette distribution avait un lien avec l'astringence des vins. Des pertes conséquentes ont également été observées au niveau des PS, après les avoir extraits des fractions de l'AsFIFFF. Comme pour les tanins, les taux de récupération des PS sont trop insuffisants et trop variables d'un échantillon à l'autre pour conclure clairement sur les tendances observées et l'absence de répétition n'a pas permis de confirmer les résultats obtenus. Néanmoins, il a été possible d'apprécier ces résultats d'un point de vue qualitatif. En effet, il a été constaté que le RG-II était présent uniquement dans la fraction F1, tandis que les MPs ainsi que les

PRAGs ont été retrouvés dans toutes les fractions (y compris F1). Ce résultat confirme également ce qui a été observé sur le vin de syrah.

Conclusion Générale

L'objectif de ce travail était de mettre au point une méthode permettant de fractionner et de caractériser les macromolécules et les complexes du vin rouge, afin d'approfondir nos connaissances sur l'implication de ces composés dans l'astringence des vins. L'analyse de ces macromolécules est particulièrement difficile du fait de leur taille et de leur diversité structurale, mais un autre enjeu est de respecter les interactions fragiles impliquées dans la formation de complexes supramoléculaires qui peuvent également jouer un rôle dans la perception de l'astringence. Dans cette étude, l'AsFIFFF couplée à un système de multi-détection (UV-MALS/Qels-dRI) a été proposée comme une approche originale permettant de répondre à ces objectifs.

Nos résultats montrent que l'AsFIFFF est un outil performant pour fractionner les macromolécules du vin rouge. Dans les conditions qui ont été mises au point, la fraction retenue au-dessus de la membrane de l'AsFIFFF ne représente qu'une faible proportion des composants du vin contribuant à son absorption dans l'UV et cette fraction est fortement polydisperse. Le fractogramme du vin a été divisé en quatre fractions (F1 – F4) et il a été vérifié que ces profils étaient répétables pour une membrane donnée et jusqu'à ~30 mL de vin injecté. Les fractogrammes obtenus à partir d'un grand nombre de vins ont permis de montrer qu'il existe un profil type du vin rouge, où les différentes fractions qui ont été définies sont retrouvées, dans différentes proportions.

La fraction F1 contient la plus forte concentration en polyphénols. Ces concentrations peuvent varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de mg.L^{-1} , selon la richesse initiale du vin. Ces polyphénols possèdent des masses molaires relativement élevées, allant de ~7 à plus de 20kDa. Les masses molaires estimées par MALS/dRI et par HPLC-UV-MS après dépolymérisation des tanins, varient dans le même sens, montrant que l'astringence augmente avec le DPm. De plus, il a été montré que les polyphénols contenus dans la fraction F1 sont coélués avec des PS de faible masse molaire et notamment le RGII. La fraction F2 contient des PS de masses molaires intermédiaires tandis que des PS de masses molaires plus élevées sont élués dans F3. La dernière fraction (F4) pourrait correspondre à de très gros objets,

comme par exemple des protéines ou des complexes tanins-protéines mais elle n'a pas pu être caractérisée à cause des très faibles quantités.

Les fractogrammes des vins se distinguent de ceux obtenus par injection de mélanges de fractions de tanins et de polysaccharides par la présence de matériel absorbant dans l'UV dans les fractions F2-F3, et dans une moindre mesure, dans F4. Il peut s'agir de composés phénoliques de très haute masse ou en interaction avec les polysaccharides et /ou des protéines. Les analyses par SEC-UV ont montré une large distribution de taille des polyphénols dans les fractions F2, F3 et F4, ce qui conforte ces deux hypothèses et confirme que l'AsFIFFF permet de fractionner les complexes macromoléculaires du vin rouge, sans les démanteler.

L'analyse des fractions par HPLC-UV-MS après dépolymérisation en présence de phloroglucinol a permis de détecter des unités constitutives des proanthocyanidines dans chacune des fractions. La proportion de ces unités est moins élevée dans les fractions F2/F3 (et F4) que dans F1. Ceci suggère que les tanins présents dans ces fractions possèdent des structures plus complexes, ce qui pourrait vouloir dire que les tanins les plus évolués interagissent préférentiellement avec les PS. La présence d'une bosse résiduelle confirme qu'une proportion importante des polyphénols présents sont partiellement résistants à la phloroglucinolyse. Plusieurs pics supplémentaires correspondant à des composés inconnus ont également été détectés dans les fractions, après phloroglucinolyse (résultats non exposés). Leur identification devrait permettre de progresser dans la caractérisation des motifs structuraux initialement présents dans les polymères.

La méthode d'AsFIFFF-multi-détection développée a été utilisée pour explorer les relations entre les fractogrammes AsFIFFF-UV-visible -MALS -dRI et les notes d'astringence d'une série de vins qui ont été dégustés par un panel sensoriel.

Les résultats obtenus montrent que l'AsFIFFF est un outil prometteur pour évaluer l'impact de la fraction colloïdale du vin rouge sur les propriétés gustatives et particulièrement sur l'astringence. Les analyses statistiques multivariées ont mis en évidence que les vins présentant la plus forte astringence étaient caractérisés à la fois par des valeurs plus élevées d'absorption dans l'UV de la matière retenue au-dessus

de la membrane de l'AsFIFFF et des variables associées à la fraction F1. L'astringence perçue augmente avec la quantité de tanins retenus (> 5kDa) et leur masse molaire, en accord avec les résultats de la littérature. En revanche, les vins avec l'astringence la plus faible ont montré des valeurs plus élevées de variables issues des autres détecteurs et liées à F2, F3 et F4, confirmant que l'astringence perçue est atténuée par les polysaccharides et les composés élués en F4. Les résultats ont également montré que l'augmentation de la masse molaire des polysaccharides est associée à une moindre astringence. Cependant, il a été conclu que la fraction perméat et les variables relatives à F4 ont une contribution négligeable à l'astringence de vin comparée aux composés phénoliques élués dans F1.

Il serait intéressant de vérifier les résultats obtenus par des tests sensoriels sur les fractions de l'AsFIFFF. Pour ce faire, une méthode de collecte des fractions doit être mise au point à l'échelle préparative de façon à récupérer des quantités suffisantes de matière et de les déguster. De plus, il est impératif d'élaborer cette méthode dans des conditions qui soient à la fois proches des conditions d'analyse mises au point dans ce travail et compatibles avec les normes sanitaires de dégustation.

Par ailleurs, certains points concernant l'analyse des macromolécules du vin par AsFIFFF-UV-MALS/Qels-dRI, peuvent être améliorés, notamment au niveau de la détermination de la masse molaire des composés par MALS/dRI. En effet, la valeur du dn/dc utilisée dans cette étude pour caractériser les tanins contenus dans la fraction F1, est spécifique des proanthocyanidines (Vernhet et al, 2011). Or, nous ignorons encore s'il est valable pour les tanins dérivés du vin. De plus, il a été vu que des polysaccharides sont présents dans chaque fraction du vin obtenus par AsFIFFF (en plus d'une probable présence de protéines, notamment dans F4). Par conséquent, il est possible que les masses molaires déterminées avec les méthodes qui ont été utilisées dans ce travail comportent un biais.

Une perspective envisageable serait d'approfondir les recherches sur cet aspect. Une méthode intéressante basée sur les différences des dn/dc et/ou des coefficients d'extinction molaire (ϵ) des deux composants d'un complexe, permet de calculer la masse molaire de chaque composant en utilisant la combinaison de trois signaux : UV, MALS et dRI (Kendrick, Kerwin, Chang, & Philo, 2001). Cela représente peut-être un nouvel axe d'étude pertinent pour caractériser avec plus de précision la masse molaire de ces composés.

D'autres champs d'ouverture sont également envisageables sur les polyphénols et les complexes macromoléculaires dans lesquels ils sont impliqués. La plupart des données retrouvées dans la littérature au sujet des complexes macromoléculaires porte sur des études en solution modèle impliquant des fractions de proanthocyanidines purifiées, en mélange avec des polysaccharides également issus d'une extraction et d'une purification. Or, l'influence de la structure des tanins dérivés retrouvés dans le vin est encore mal connue. De plus, nous ignorons si les complexes se forment de la même manière en solution modèle et dans le vin. Comme dit plus haut, l'AsFIFFF permet de fractionner ces complexes macromoléculaires et de les collecter, offrant l'opportunité d'en étudier la composition, comme cela a été fait dans le cadre de cette thèse. Toutefois, les méthodes d'extraction des composés d'intérêt depuis les fractions de l'AsFIFFF qui ont été utilisées ont causé beaucoup de perte de matière (sur les polyphénols comme les polysaccharides). Il serait intéressant d'imaginer de nouveaux protocoles d'extraction, permettant d'éviter au maximum les pertes de matière. Cela permettrait d'obtenir une vision plus complète et plus précise de la composition de ces fractions. En dépit de ce problème et quoique les analyses des fractions n'aient pas pu être répliquées, la cohérence des résultats obtenus par les différentes méthodes de caractérisation et des liens établis entre les profils FFF, la composition des fractions et l'astringence sur un ensemble de vins valide la pertinence de l'approche proposée.

En résumé, cette étude a permis d'apporter une nouvelle façon d'étudier les macromolécules du vin rouge et d'ouvrir des portes vers de futures recherches.

Littérature citée:

- Abian, J. (1999). The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 34(3), 157–168.
- Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Doco, T. (2013). Polysaccharide composition of monastrell red wines from four different Spanish terroirs: Effect of wine-making techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(10), 2538–2547. <https://doi.org/10.1021/jf304987m>
- Arnold, R. A., Noble, A. C., & Singleton, V. L. (1980). Bitterness and Astringency of Phenolic Fractions in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(3), 675–678.
<https://doi.org/10.1021/jf60229a026>
- Asenstorfer, R. E., Hayasaka, Y., & Jones, G. P. (2001). Isolation and structures of oligomeric wine pigments by bisulfite-mediated ion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5957–5963.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters*, 43(35), 6151–6153.
- Ayestarán, B., Guadalupe, Z., & León, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 29–39.
- Bae, Y. S., Foo, L. Y., & Karchesy, J. J. (1994). GPC of Natural Procyanidin Oligomers and Polymers. *Holzforschung*, 48(1), 4–6. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1994.48.1.4>
- Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1997). Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 35–43. <https://doi.org/10.1021/jf960252c>

- Bate-Smith, E. C. (1973). Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 12(4), 907–912. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80701-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80701-0)
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36, 5566–5577. <https://doi.org/10.1021/bi9700328>
- Bendixen, N., Losert, S., Adlhart, C., Lattuada, M., & Ulrich, A. (2014). Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Chromatography A*, 1334, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.066>
- Bindon, K. A., Carew, A. L., Mierczynska-Vasilev, A., Kassara, S., Kerslake, F., & Smith, P. A. (2016). Characterization of macromolecular complexes in red wine: Composition, molecular mass distribution and particle size. *Food Chemistry*, 199, 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.079>
- Bindon, K., Kassara, S., Hayasaka, Y., Schulkin, A., & Smith, P. (2014). Properties of wine polymeric pigments formed from anthocyanin and tannins differing in size distribution and subunit composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(47), 11582–11593. <https://doi.org/10.1021/jf503922h>
- Boulet, J.-C., Ducasse, M.-A., & Cheynier, V. (2017). Ultraviolet spectroscopy study of phenolic substances and other major compounds in red wines: Relationship between astringency and the concentration of phenolic substances. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), 193–199.
- Boulet, J. C., Trarieux, C., Souquet, J. M., Ducasse, M. A., Caillé, S., Samson, A., Cheynier, V. (2016). Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols, oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.062>

- Brandão, E., Santos Silva, M., García-Estévez, I., Mateus, N., de Freitas, V., & Soares, S. (2017a). Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food Chemistry*, 228, 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.027>
- Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., Doco, T., Soares, S. (2017b). The role of wine polysaccharides on salivary protein-tannin interaction: A molecular approach. *Carbohydrate Polymers*, 177(July), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.075>
- Brossaud, F., Cheynier, V., & Noble, A. C. (2001a). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(1), 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00191.x>
- Caldwell, K. D., Brimhall, S. L., Gao, Y., & Giddings, J. C. (1988). Sample overloading effects in polymer characterization by field-flow fractionation. *Journal of Applied Polymer Science*, 36(3), 703–719. <https://doi.org/10.1002/app.1988.070360319>
- Canon, F., Giuliani, A., Paté, F., & Sarni-Manchado, P. (2010). Ability of a salivary intrinsically unstructured protein to bind different tannin targets revealed by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 815–822. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3997-9>
- Cartalade, D., & Vernhet, A. (2006). Polar interactions in flavan-3-ol adsorption on solid surfaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 3086–3094. <https://doi.org/10.1021/jf0514928>
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8936–8944. <https://doi.org/10.1021/jf061835h>
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 50(6), 1593–1601. <https://doi.org/10.1021/jf010897z>

- Cheyrier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298–305.
- Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126(4), 1971–1977. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.056>
- Chris Somers, T., & Evans, M. E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical age.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(3), 279–287.
- Coelho, C., Parot, J., Gonsior, M., Nikolantonaki, M., Schmitt-Kopplin, P., Parlanti, E., & Gougeon, R. D. (2017). Asymmetrical flow field-flow fractionation of white wine chromophoric colloidal matter. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(10), 2757–2766. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0221-1>
- Colonna A.E, Adams D.O, N. A. . (2004). Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 26–31. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00005.x>
- Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2009). Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, 112(1), 197–204.
- Czochanska, Z., Foo, L. Y., & Porter, L. J. (1979). Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*, 18(11), 1819–1822.
- Da Silva, J. M. R., Rigaud, J., Cheyrier, V., Cheminat, A., & Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, 30(4), 1259–1264.
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1463–1473.

- De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940–945.
<https://doi.org/10.1021/jf000981z>
- de Gaulejac, N. V., Vivas, N., Absalon, C., & Nonier, M.-F. (2001). Identification of procyanidin A2 in grape and wine of *Vitis vinifera* L. cv: Merlot noir and Cabernet Sauvignon. *OENO One*, 35(1), 51–56.
- Depledt Félix, M. J.-L. (2009). *Évaluation sensorielle (3e éd.)*. (Lavoisier Ed. Paris, Ed.).
- Doco, T., & Brillouet, J. M. (1993). Isolation and characterisation of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, 243(2), 333–343. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)87037-S](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)87037-S)
- Doco, T., Quellec, N., Moutounet, M., & Pellerin, P. (1999). Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 25–32.
- 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>
- Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J. A., Teissedre, P.-L., & Saucier, C. (2007). Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6292–6299.
- Dubourdieu, D., Llaubères, R.-M., & Ollivier, C. (1986). Estimation rapide des constituants macromoléculaires des moûts et des vins par chromatographie liquide haute pression (CLHP) de tamisage moléculaire. *OENO One*, 20(2), 119–123.
- Ducasse, M.-A., Canal-Llauberes, R.-M., de Lumley, M., Williams, P., Souquet, J.-M., Fulcrand, H., Cheynier, V. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, 118(2), 369–376.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.130>
- Ducasse, M. A., Canal-Llauberes, R. M., de Lumley, M., Williams, P., Souquet, J. M., Fulcrand, H.,

- Cheyrier, V. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, *118*(2), 369–376.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.130>
- Ducasse, M. A., Williams, P., Meudec, E., Cheyrier, V., & Doco, T. (2010). Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS. *Carbohydrate Polymers*, *79*(3), 747–754. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.001>
- Einstein, A. (1910). Opalescence theory of homogeneous liquids and liquid mixtures in the vicinity of the critical state. *Annalen Der Physik (Weinheim, Germany)*, *33*, 1275–1298.
- Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheyrier, V., & Moutounet, M. (1999a). Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(5), 2088–2095.
- Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheyrier, V., & Moutounet, M. (1999b). Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin 3-O-glucoside in a model solution system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(5), 2096–2102.
- Es-Safi, N. E., Cheyrier, V., & Moutounet, M. (2000). Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(12), 5946–5954.
<https://doi.org/10.1021/jf000394d>
- Fernández, K., Kennedy, J. A., & Agosin, E. (2007). Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(9), 3675–3680. <https://doi.org/10.1021/jf063232b>
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: Synergistic effect and modulation by aromas. *Food Research International*, *62*, 1100–1107.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.049>

- Ferrer-Gallego, R., Soares, S., Mateus, N., Rivas-Gonzalo, J., Escribano-Bailón, M. T., & Freitas, V. (2015). New Anthocyanin–Human Salivary Protein Complexes. *Langmuir*, *31*(30), 8392–8401. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01122>
- Ferrer-Gallego Raúl, Susana, S., Nuno, M., Julián, R.-G., Escribano-Bailón M. Teresa, & Victor, D. F. (2015). New Anthocyanin-Human Salivary Protein Complexes. *Langmuir*, *31*(30), 8392–8401. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01122>
- Findlay, C. J., Castura, J. C., Schlich, P., & Lesschaeve, I. (2006). Use of feedback calibration to reduce the training time for wine panels. *Food Quality and Preference*, *17*(3–4), 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.07.005>
- Flanzy, M., & Poux, C. (1958). Les possibilités de la microvinification, application à l'étude de la macération. In *Annales de Technologie Agricole* (Vol. 7, pp. 377–401).
- Fulcrand, H., Cheynier, V., Oszmianski, J., & Moutounet, M. (1997). An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry*, *46*(2), 223–227. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00276-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00276-8)
- Fulcrand, H., Mané, C., Preys, S., Mazerolles, G., Bouchut, C., Mazauric, J.-P., Cheynier, V. (2008). Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, *69*(18), 3131–3138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.03.016>
- Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J.-M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(3), 1023–1028.
- Galina E. Kassalainen, S. K. R. W. (2012). Field-flow fractionation in biopolymer analysis. *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis, Chapter 2*, 1–305. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0154-4>
- Gao, R., Liu, H., Peng, Z., Wu, Z., Wang, Y., & Zhao, G. (2012). Adsorption of (Å) -

- epigallocatechin-3-gallate (EGCG) onto oat β -glucan. *Food Chemistry*, 132(4), 1936–1943.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.029>
- García-Estévez, I., Cruz, L., Oliveira, J., Mateus, N., de Freitas, V., & Soares, S. (2017). First evidences of interaction between pyranoanthocyanins and salivary proline-rich proteins. *Food Chemistry*, 228, 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.030>
- Gawel, R., Iland, P. G., & Francis, I. L. (2001). Characterizing the astringency of red wine: A case study. *Food Quality and Preference*, 12(1), 83–94. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(00\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(00)00033-1)
- Gawel, Richard. (1998). Red wine astringency : Rewiev. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 74–95. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1998.tb00137.x>
- Giddings, J. C. (1978). Displacement and dispersion of particles of finite size in flow channels with lateral forces. Field-flow fractionation and hydrodynamic chromatography. *Separation Science and Technology*, 13(3), 241–254.
- Giddings, J. C. (1982). Analysis of fundamental obstacles to the size exclusion chromatography of polymers of ultrahigh molecular weight. *Adv. Chromatogr*, 20, 217–258.
- Giddings, J. C., Yang, F. J., & Myers, M. N. (1976). Flow-field-flow fractionation: a versatile new separation method. *Science*, 193(4259), 1244–1245.
- Gigault, J., Pettibone, J. M., Schmitt, C., & Hackley, V. A. (2014). Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 809, 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.021>
- Gil, M., Avila-Salas, F., Santos, L. S., Iturmendi, N., Moine, V., Cheynier, V., & Saucier, C. (2017). Rosé Wine Fining Using Polyvinylpolypyrrolidone: Colorimetry, Targeted Polyphenomics, and Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10591–10597. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04461>
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interprétation. *Connaissance de La*

Vigne et Du Vin, 4, 253–271.

- Gombau, J., Nadal, P., Canela, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Smith, P., Zamora, F. (2019). Measurement of the interaction between mucin and oenological tannins by Surface Plasmon Resonance (SPR); relationship with astringency. *Food Chemistry*, 275(September 2018), 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.075>
- Gonçalves, F., Heyraud, A., De Pinho, M. N., & Rinaudo, M. (2002). Characterization of white wine mannoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6097–6101. <https://doi.org/10.1021/jf0202741>
- Green, B. G. (1993). Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychologica*, 84(1), 119–125. [https://doi.org/10.1016/0001-6918\(93\)90078-6](https://doi.org/10.1016/0001-6918(93)90078-6)
- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2007). Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of tempranillo red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10720–10728. <https://doi.org/10.1021/jf0716782>
- Guadalupe, Z., Martínez-Pinilla, O., Garrido, Á., Carrillo, J. D., & Ayestarán, B. (2012). Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chemistry*, 131(1), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.049>
- Guerreiro, J. R. L., Teixeira, N., De Freitas, V., Sales, M. G. F., & Sutherland, D. S. (2017). A saliva molecular imprinted localized surface plasmon resonance biosensor for wine astringency estimation. *Food Chemistry*, 233, 457–466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.051>
- Guyot, S., Doco, T., Souquet, J.-M., Moutounet, M., & Drilleau, J.-F. (1997). Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry*, 44(2), 351–357. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00480-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00480-3)
- Hagerman, A. E. (1989). Chemistry of Tannin-Protein Complexation. In R. W. Hemingway, J. J.

- Karchesy, & S. J. Branham (Eds.), *Chemistry and Significance of Condensed Tannins* (pp. 323–333). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7511-1_20
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1978). Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 809–812. <https://doi.org/10.1021/jf60218a027>
- Harbertson, J. F., Kennedy, J. A., & Adams, D. O. (2002). Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir Berries during Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1), 54 LP – 59. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/53/1/54.abstract>
- Haslam, E. (1974). Polyphenol--protein interactions. *Biochemical Journal*, 139(1), 285.
- Haslam, E. (1980). In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, 19(12), 2577–2582. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83922-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83922-9)
- Haslam, E., Lilley, T. H., & Butler, L. G. (1988). Natural astringency in foodstuffs: a molecular interpretation. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 27(1), 1–40.
- Hasslam. (1981). The Association of Proteins with Polyphenols, 309–311.
- Hayasaka, Y., & Kennedy, J. A. (2003). Mass spectrometric evidence for the formation of pigmented polymers in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(3), 210–220. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00272.x>
- Hemingway, R. W.; McGraw, G. W. (1983). KINETICS OF ACID-CATALYZED CLEAVAGE OF PROCYANIDINS. *J. Wood Chem. Technol.*, 3, 421–435.
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008a). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1376–1386. <https://doi.org/10.1021/jf073031n>
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008b). Quantitative reconstruction of the nonvolatile

- sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9190–9199. <https://doi.org/10.1021/jf801742w>
- Kanzer, J., Hupfeld, S., Vasskog, T., Tho, I., Hölig, P., Mägerlein, M., ... Brandl, M. (2010). In situ formation of nanoparticles upon dispersion of melt extrudate formulations in aqueous medium assessed by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.04.012>
- Kassalainen, Galina E. and Williams, S. K. R. (2012). *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis*. (K. D. Williams, S. Kim R, and Caldwell, Ed.). Vienna: Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0154-4_2
- Kelm, M. A. (2006). Cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1571–1576. Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10025443749/en/>
- Kendrick, B. S., Kerwin, B. A., Chang, B. S., & Philo, J. S. (2001). Online size-exclusion high-performance liquid chromatography light scattering and differential refractometry methods to determine degree of polymer conjugation to proteins and protein-protein or protein-ligand association states. *Analytical Biochemistry*, 299(2), 136–146. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5411>
- Kennedy ; Alan W.Taylor, J. A. (2003). Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, 199(4539), 99–107. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00420-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00420-5)
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1740–1746. <https://doi.org/10.1021/jf001030o>
- Kramling, T. E., & Singleton, V. L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20(2), 86–92.

- Krebs, G., Becker, T., & Gastl, M. (2017). Characterization of polymeric substance classes in cereal-based beverages using asymmetrical flow field-flow fractionation with a multi-detection system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(24), 5723–5734. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0512-6>
- Krebs, G., Müller, M., Becker, T., & Gastl, M. (2019). Characterization of the macromolecular and sensory profile of non-alcoholic beers produced with various methods. *Food Research International*, 116(August 2018), 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.067>
- Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. G. C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3), 213–248. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499808>
- Le Bourvellec, Carine, Guyot, S., & Renard, C. M. G. C. (2004). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1672(3), 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.04.001>
- Le Bourvellec, Carine, Le Quere, J. M., & Renard, C. M. G. C. (2007). Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: Studies in model suspensions and application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7896–7904. <https://doi.org/10.1021/jf071515d>
- Le Bourvellec, Watrelot, A., Ginies, C., Imbert, A., & Renard, C. M. G. C. (2012). Impact of processing on the noncovalent interactions between procyanidin and apple cell wall. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(37), 9484–9494. <https://doi.org/10.1021/jf3015975>
- Le Roux, E., Doco, T., Sarni-Manchado, P., Lozano, Y., & Cheynier, V. (1998). A-type proanthocyanidins from pericarp of Litchi chinensis. *Phytochemistry*, 48(7), 1251–1258.
- Leeman, M., Wahlund, K. G., & Wittgren, B. (2006). Programmed cross flow asymmetrical flow field-flow fractionation for the size separation of pullulans and hydroxypropyl cellulose. *Journal*

of Chromatography A, 1134(1–2), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.065>

Leriche, C., Molinier, C., Caillé, S., Razungles, A., Symoneaux, R., & Coulon-Leroy, C. (2020). Development of a methodology to study typicity of PDO wines with professionals of the wine sector. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(10), 3866–3877. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10428>

Li, S., Wilkinson, K. L., Mierczynska-Vasilev, A., & Bindon, K. A. (2019). Applying nanoparticle tracking analysis to characterize the polydispersity of aggregates resulting from tannin–polysaccharide interactions in wine-like media. *Molecules*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/molecules24112100>

Liao, H., Cai, Y., & Haslam, E. (1992). Polyphenol interactions. Anthocyanins: Co-pigmentation and colour changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(3), 299–305. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740590305>

Litzén, A., & Wahlund, K. G. (1989). Improved separation speed and efficiency for proteins, nucleic acids and viruses in asymmetrical flow field flow fractionation. *Journal of Chromatography A*, 476(C), 413–421. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93885-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93885-3)

Litzén, Anne, & Wahlund, K. G. (1991). Zone Broadening and Dilution in Rectangular and Trapezoidal Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channels. *Analytical Chemistry*, 63(10), 1001–1007. <https://doi.org/10.1021/ac00010a013>

Litzén, Anne, Walter, J. K., Krischollek, H., & Wahlund, K. G. (1993). Separation and quantitation of monoclonal antibody aggregates by asymmetrical flow field-flow fractionation and comparison to gel permeation chromatography. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1356>

Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozés, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 742–746. <https://doi.org/10.1021/jf034795f>

- López-Barajas, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (1998). Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the simple analysis of grape juice and wine polysaccharides. *Journal of Chromatography A*, 823(1–2), 339–347.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00640-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00640-2)
- Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37(2), 357–371.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85061-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85061-5)
- Lyvén, B., Hassellöv, M., Turner, D. R., Haraldsson, C., & Andersson, K. (2003). Competition between iron- and carbon-based colloidal carriers for trace metals in a freshwater assessed using flow field-flow fractionation coupled to ICPMS. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(20), 3791–3802. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(03\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(03)00087-5)
- Macfie, H. J., Bratchell, N., Greenhoff, K., & Vallis, L. V. (1989). Designs To Balance the Effect of Order of Presentation and First-Order Carry-Over Effects in Hall Tests. *Journal of Sensory Studies*, 4(2), 129–148. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1989.tb00463.x>
- Mané, C., Souquet, J. M., Ollé, D., Verries, C., Veran, F., Mazerolles, G., Fulcrand, H. (2007). Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7224–7233.
- Manjón, E., Brás, N. F., García-Estévez, I., & Escribano-Bailón, M. T. (2020). Cell Wall Mannoproteins from Yeast Affect Salivary Protein–Flavanol Interactions through Different Molecular Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08083>
- Marassi, V., Marangon, M., Zattoni, A., Vincenzi, S., Versari, A., Reschiglian, P., ... Curioni, A. (2020). Characterization of red wine native colloids by asymmetrical flow field-flow fractionation with online multidetection. *Food Hydrocolloids*, 110(July 2020), 106204.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106204>

- Maret, G. (1997). *Diffusing-wave spectroscopy. Current opinion in colloid & interface science* (Vol. 2). Elsevier.
- Mateus, N., Carvalho, E., Luís, C., & De Freitas, V. (2004). Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.08.072>
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2019). Highlighting protein fining residues in a model red wine. *Food Chemistry*, 279, 272–278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.141>
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2001). Influence of Fining with Different Molecular Weight Gelatins on Proanthocyanidin Composition and Perception of Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 140 LP – 145. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/52/2/140.abstract>
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003). Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(2), 105–111.
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Poinssaut, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2016). Influence of polysaccharides and glycerol on proanthocyanidin precipitation by protein fining agents. *Food Hydrocolloids*, 60, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.034>
- Maury, C., Sarni-manchado, P., Poinssaut, P., & Moutounet, M. (2016). Food Hydrocolloids Influence of polysaccharides and glycerol on proanthocyanidin precipitation by protein fining agents, 60, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.034>
- Mazeau, K., & Pérez, S. (1998). The preferred conformations of the four oligomeric fragments of Rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 311(4), 203–217. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00190-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00190-6)
- McManus, J. P., Davis, K. G., Beart, J. E., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1985).

- Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 28(9), 1429. <https://doi.org/10.1039/p29850001429>
- McRae, J. M., Schulkin, A., Kassara, S., Holt, H. E., & Smith, P. A. (2013). Sensory Properties of Wine Tannin Fractions: Implications for In-Mouth Sensory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 719–727. <https://doi.org/10.1021/jf304239n>
- Mehansho, H., Hagerman, A., Clements, S., Butler, L., Rogler, J., & Carlson, D. M. (1982). Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid glands by sorghums with high tannin levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(13 I), 3948–3952. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.13.3948>
- Mercurio, M. D., Damberg, R. G., Cozzolino, D., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2010). Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolics concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12313–12319.
- Miyagishi, S., Okada, K., & Asakawa, T. (2001). Salt effect on critical micelle concentrations of nonionic surfactants, N-acyl-N-methylglucamides (MEGA-n). *Journal of Colloid and Interface Science*, 238(1), 91–95. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7503>
- Moon, M. H. (2019). Flow field-flow fractionation: Recent applications for lipidomic and proteomic analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 118, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.024>
- Morel-Salmi, C., Souquet, J.-M., Bes, M., & Cheynier, V. (2006). Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4270–4276.
- Mouls, L., & Fulcrand, H. (2012). UPLC-ESI-MS study of the oxidation markers released from tannin depolymerization: toward a better characterization of the tannin evolution over food and beverage processing. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(11), 1450–1457.

- Mouls, L., Hugouvieux, V., Mazauric, J.-P., Sommerer, N., Mazerolles, G., & Fulcrand, H. (2014). How to gain insight into the polydispersity of tannins: A combined MS and LC study. *Food Chemistry*, *165*, 348–353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.121>
- Mouls, L., Mazauric, J.-P., Sommerer, N., Fulcrand, H., & Mazerolles, G. (2011). Comprehensive study of condensed tannins by ESI mass spectrometry: average degree of polymerisation and polymer distribution determination from mass spectra. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*(2), 613–623.
- Murray, N. J., Williamson, M. P., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1994). Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by ¹H-NMR spectroscopy. *European Journal of Biochemistry*, *219*(3), 923–935.
- Naczka, M., Oickle, D., Pink, D., & Shahidi, F. (1996). Protein Precipitating Capacity of Crude Canola Tannins: Effect of pH, Tannin, and Protein Concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(8), 2144–2148. <https://doi.org/10.1021/jf960165k>
- Nagel, C W, & Wulf, L. W. (1979). Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, *30*(2), 111–116.
- Nagel, Charles W., & Bishop, P. D. (1984). Characterization of the Condensation Product of Malvidin 3,5-Diglucoside and Catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *32*(5), 1022–1026. <https://doi.org/10.1021/jf00125a019>
- Nicod, H. (1998). *L'organisation pratique de la mesure sensorielle, l'entraînement*. (Lavoisier, Ed.) (2nd ed).
- Niessen, W. M. A., & Tinke, A. P. (1995). Liquid chromatography-mass spectrometry general principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A*, *703*(1–2), 37–57.
- Nilsson, L. (2013). Separation and characterization of food macromolecules using field-flow fractionation: A review. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.007>

- Obreque-Sl er, E., Peña-Neira,  ., & López-Solís, R. (2010). Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(6), 3729–3735. <https://doi.org/10.1021/jf903659t>
- Oliveira, J., Br s, N. F., da Silva, M. A., Mateus, N., Parola, A. J., & de Freitas, V. (2014). Grape anthocyanin oligomerization: A putative mechanism for red color stabilization? *Phytochemistry*, *105*, 178–185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.006>
- Oliveira, J., da Silva, M. A., Jorge Parola, A., Mateus, N., Br s, N. F., Ramos, M. J., & de Freitas, V. (2013). Structural characterization of a A-type linked trimeric anthocyanin derived pigment occurring in a young Port wine. *Food Chemistry*, *141*(3), 1987–1996. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.091>
- Oliveira, J., Mateus, N., & de Freitas, V. (2017). Wine-inspired chemistry: Anthocyanin transformations for a portfolio of natural colors. *Synlett*, *28*(08), 898–906.
- Oszmianski, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(7), 1712–1715.
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calder n, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2009). New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chemistry*, *112*(2), 432–441.
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2007). Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chemistry*, *105*(2), 838–846.
- Pascal, C., Pat , F., Cheynier, V., & Delsuc, M.-A. (2009). Study of the interactions between a proline-rich protein and a flavan-3-ol by NMR: Residual structures in the natively unfolded protein provides anchorage points for the ligands. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, *91*(9), 745–756.

- Pascal, C., Poncet-Legrand, C., Cabane, B., & Vernhet, A. (2008). Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: Effect of protein glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6724–6732.
<https://doi.org/10.1021/jf800790d>
- Pecora, R. (2013). *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(8), 1123–1128. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199906\)79:8<1123::AID-JSFA336>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199906)79:8<1123::AID-JSFA336>3.0.CO;2-D)
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J. M. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, *277*(1), 135–143. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00206-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00206-9)
- Pellerin, Patrice, Doco, T., Jean-Marc, B., Vida, S., Williams, P., & Malcolm, O. (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, *290*(2), 183–197. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00139-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00139-5)
- Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, *85*(1–2), 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00053-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00053-1)
- Pianet, I., André, Y., Ducasse, M. A., Tarascou, I., Lartigue, J. C., Pinaud, N., Laguerre, M. (2008). Modeling procyanidin self-association processes and understanding their micellar organization: A study by diffusion NMR and molecular mechanics. *Langmuir*, *24*(19), 11027–11035. <https://doi.org/10.1021/la8015904>
- Pinasseau, L., Vallverdú-Queralt, A., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Le Cunff, L. (2017). Cultivar diversity of grape skin polyphenol composition and changes in response to drought investigated by LC-MS based metabolomics. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1826.

- Poncet-Legrand, C., Cabane, B., Bautista-Ortín, A. B., Carrillo, S., Fulcrand, H., Pérez, J., & Vernhet, A. (2010). Tannin oxidation: Intra-versus intermolecular reactions. *Biomacromolecules*, *11*(9), 2376–2386. <https://doi.org/10.1021/bm100515e>
- Poncet-Legrand, C., Cartalade, D., Putaux, J. L., Cheynier, V., & Vernhet, A. (2003). Flavan-3-ol aggregation in model ethanolic solutions: Incidence of polyphenol structure, concentration, ethanol content, and ionic strength. *Langmuir*, *19*(25), 10563–10572. <https://doi.org/10.1021/la034927z>
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, *36*(3), 781–784. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89817-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89817-9)
- Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J. C., Doco, T., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry*, *154*, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.101>
- Redgwell, R. J., Schmitt, C., Beaulieu, M., & Curti, D. (2005). Hydrocolloids from coffee: Physicochemical and functional properties of an arabinogalactan-protein fraction from green beans. *Food Hydrocolloids*, *19*(6), 1005–1015. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.010>
- Remy, S., Fulcrand, H., Labarbe, B., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin–tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(6), 745–751.
- Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., & Drilleau, J. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols : quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, *29*, 115–125.
- Ribéreau-Gayon, P. (1982). The anthocyanins of grapes and wines. *Anthocyanins as Food Colors*, *6*, 214–215.

- Ricardo-da-Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J.-M., Moutounet, M., Cabanis, J.-C., & Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57(1), 111–125.
- Ricardo-da-Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. -M, Moutounet, M., Cabanis, J. -C, & Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57(1), 111–125.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740570113>
- Rigaud, J., Perez-Illzarbe, J., Da Silva, J. M. R., & Cheynier, V. (1991). Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 540(C), 401–405.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88830-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88830-0)
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine - Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 17–23.
[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00034-0)
- Robichaud, J. L., & Noble, A. C. (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(3), 343–353.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740530307>
- Robinson, D. R., & Jencks, W. P. (1965). The Effect of Concentrated Salt Solutions on the Activity Coefficient of Acetyltetraglycine Ethyl Ester. *Journal of the American Chemical Society*, 87(11), 2470–2479. <https://doi.org/10.1021/ja01089a029>
- Roger, J. M., Palagos, B., Bertrand, D., & Fernandez-ahumada, E. (2011). Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems CovSel : Variable selection for highly multivariate and multi-response calibration Application to IR spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 106(2), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.10.003>
- Runyon, J. R., Ulmius, M., & Nilsson, L. (2014). A perspective on the characterization of colloids and

macromolecules using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 25–33.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.04.010>

Sáenz-Navajas, M.-P., Avizcuri, J.-M., Ferrero-del-Teso, S., Valentin, D., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2017). Chemo-sensory characterization of fractions driving different mouthfeel properties in red wines. *Food Research International*, 94, 54–64.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.002>

Salas, E., Fulcrand, H., Meudec, E., & Cheynier, V. (2003). Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7951–7961.

Salas, E., Guernevé, C. Le, Fulcrand, H., Poncet-Legrand, C., & Cheynier, V. (2004). Structure determination and colour properties of a new directly linked flavanol–anthocyanin dimer. *Tetrahedron Letters*, 45(47), 8725–8729.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.09.127>

Sarneckis, C. J., Damberg, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1), 39–49. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00042.x>

Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2002). Study of non-covalent complexation between catechin derivatives and peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 37(6), 609–616.

Sarni-Manchado, P., Deleris, A., Avallone, S., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Analysis and Characterization of Wine Condensed Tannins Precipitated by Proteins Used as Fining Agent in Enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 81 LP – 86. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/50/1/81.abstract>

SARNI-MANCHADO, P., FULCRAND, H., SOUQUET, J.-M., CHEYNIER, V., & MOUTOUNET,

- M. (1996). Stability and Color of Unreported Wine Anthocyanin-derived Pigments. *Journal of Food Science*, 61(5), 938–941. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10906.x>
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., & Glories, Y. (1997). Characterization of (+)-Catechin-Acetaldehyde Polymers: A Model for Colloidal State of Wine Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1045–1049. <https://doi.org/10.1021/jf960597v>
- Schwarz, B., & Hofmann, T. (2008). Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology*, 227(6), 1693–1698.
- Scollary, G. R., Pásti, G., Kállay, M., Blackman, J., & Clark, A. C. (2012). Astringency response of red wines: Potential role of molecular assembly. *Trends in Food Science and Technology*, 27(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.05.002>
- Segarra, I., Lao, C., López-Tamames, E., & De La Torre-Boronat, M. C. (1995). Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(4), 564–570.
- Serafini, M., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1997). Effect of Ethanol on Red Wine Tannin - Protein (BSA) Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3148–3151. <https://doi.org/10.1021/jf960864x>
- Siebert, K. J., Carrasco, A., & Lynn, P. Y. (1996). Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 1997–2005. <https://doi.org/10.1021/jf950716r>
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2020). Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25112590>
- Soares, S., Ferrer-Galego, R., Brandao, E., Silva, M., Mateus, N., & Freitas, V. de. (2016). Contribution of human oral cells to astringency by binding salivary protein/tannin complexes.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(41), 7823–7828.
- Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2007). Interaction of different polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α -Amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6726–6735.
<https://doi.org/10.1021/jf070905x>
- Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2012). Carbohydrates Inhibit Salivary Proteins Precipitation by Condensed Tannins. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 3966–3972. <https://doi.org/10.1021/jf3002747>
- Somers. (1971). the Polymeric Nature of wine pigments, *10*(1969), 2175–2186.
- Somers, T. C., & Ziemelis, G. (1972). Interpretations of ultraviolet absorption in white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23(4), 441–453.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2740230404>
- Souquet, J. M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43(2), 509–512. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00301-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00301-9)
- Souquet, J. M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1076–1080.
<https://doi.org/10.1021/jf991171u>
- Stone and Sidel. (2004). *Quantitative Descriptive Analysis (The QDA method). Sensory evaluation practices*. (C. Elsevier Academic Press, San Diego, Ed.) ((3rd ed.)).
- Strous, G. J., & Dekker, J. (1992). Mucin-type glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27(1–2), 57–92.
- Strutt, J. W. (1910). The incidence of light upon a transparent sphere of dimensions comparable with the wave-length. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 84(567), 25–46.
- Swain, T. (1962). *EC Bate-Smith in Comparative Biochemistry, Vol. 3*. Academic Press, New York.

- Sylvain, G., Patrice, P., Jean-Marc, B., & Véronique, C. (1996). Inhibition of β -glucosidase (Amygdalae dulces) by (+)-catechin oxidation products and procyanidin dimers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(7), 1131–1135.
- Tang, H. R., Covington, A. D., & Hancock, R. A. (2003). Structure-Activity Relationships in the Hydrophobic Interactions of Polyphenols with Cellulose and Collagen. *Biopolymers*, 70(3), 403–413. <https://doi.org/10.1002/bip.10499>
- Taylor, A. W., Barofsky, E., Kennedy, J. A., & Deinzer, M. L. (2003). Hop (Humulus lupulus L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4101–4110. <https://doi.org/10.1021/jf0340409>
- Thompson, R. S., Jacques, D., Haslam, E., & Tanner, R. J. N. (1972). Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1387–1399. <https://doi.org/10.1039/P19720001387>
- Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Eder, M., Lamuela-Raventos, R. M., Sommerer, N., & Cheynier, V. (2017). The hidden face of wine polyphenol polymerization highlighted by high-resolution mass spectrometry. *ChemistryOpen*, 6(3), 336.
- Vernhet, A., Bellon-Fontaine, M. N., Brillouet, J. M., Roesink, E., & Moutounet, M. (1997). Wetting properties of microfiltration membrane: Determination by means of the capillary rise technique and incidence on the adsorption of wine polysaccharide and tannins. *Journal of Membrane Science*, 128(2), 163–174. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(96\)00308-0](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(96)00308-0)
- Vernhet, Aude, Carrillo, S., Rattier, A., Verbaere, A., Cheynier, V., & Nguela, J. M. (2020a). Fate of Anthocyanins and Proanthocyanidins during the Alcoholic Fermentation of Thermovinified Red Musts by Different Saccharomyces cerevisiae Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3615–3625. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00413>
- Vernhet, Aude, Dubascoux, S., Cabane, B., Fulcrand, H., Dubreucq, E., & Poncet-Legrand, C. (2011).

Characterization of oxidized tannins: Comparison of depolymerization methods, asymmetric flow field-flow fractionation and small-angle X-ray scattering. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1563–1573. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5076-2>

Vidal, L., Antúnez, L., Rodríguez-Haralambides, A., Giménez, A., Medina, K., Boido, E., & Ares, G. (2018). Relationship between astringency and phenolic composition of commercial Uruguayan Tannat wines: Application of boosted regression trees. *Food Research International*, 112(June), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.024>

Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M. A., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45(4), 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00285-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00285-X)

Vidal, Stéphane, Cartalade, D., Souquet, J. M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2002). Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2261–2266. <https://doi.org/10.1021/jf011180e>

Vidal, Stéphane, Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Waters, E. J. (2003a). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564–573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1394>

Vidal, Stéphane, Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003b). The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439–447. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00152-8)

Vidal, Stéphane, Meudec, E., Cheynier, V., Skouroumounis, G., & Hayasaka, Y. (2004a). Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7144–7151.

Vidal, Stéphane, Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. (2004b). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium.

- Food Chemistry*, 85(4), 519–525. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00084-0)
- Vidal, Stéphane, Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Cheynier, V. (2004c). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15(3), 209–217. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00059-4)
- Vincent M, Williams, Lawrence J. Porter, R. W. H. (1983). MOLECULAR WEIGHT PROFILES OF PROANTHOCYANIDIN POLYMERS, 22(2), 569–572.
- Vivar-Quintana, A. M., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 147–155. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01619-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01619-1)
- Wahlund, K. G. (2013). Flow field-flow fractionation: Critical overview. *Journal of Chromatography A*, 1287, 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.028>
- Wahlund; A.Litzén. (1989). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam - Printed in The Netherlands. *Journal of Chromatography*, 4(461), 39–55.
- Wahlund, K. G., & Giddings, J. C. (1987). Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. *Analytical Chemistry*, 59(9), 1332–1339.
- Watrelot, A., Heymann, H., & Waterhouse, A. L. (2020). Red Wine Dryness Perception Related to Physicochemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), 2964–2972. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01480>
- Watrelot, A., Le Bourvellec, C., Imberty, A., & Renard, C. M. G. C. (2013). Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules*, 14(3), 709–718. <https://doi.org/10.1021/bm301796y>
- Watrelot, A., Schulz, D. L., & Kennedy, J. A. (2017). Wine polysaccharides influence tannin-protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 63, 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.010>
- Willemse, C. M., Stander, M. A., Vestner, J., Tredoux, A. G. J., & de Villiers, A. (2015).

Comprehensive Two-Dimensional Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) × Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry (RP-LC-UV-MS) Analysis of Anthocyanins and Derived Pigments in Red Wine. *Analytical Chemistry*, 87(24), 12006–12015. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03615>

Zanchi, D., Konarev, P. V, Tribet, C., Baron, A., Svergun, D. I., & Guyot, S. (2009). Rigidity, conformation, and solvation of native and oxidized tannin macromolecules in water-ethanol solution. *Journal of Chemical Physics*, 130(24). <https://doi.org/10.1063/1.3156020>

Zanchi, D., Vernhet, A., Poncet-Legrand, C., Cartalade, D., Tribet, C., Schweins, R., & Cabane, B. (2007). Colloidal dispersions of tannins in water-ethanol solutions. *Langmuir*, 23(20), 9949–9959. <https://doi.org/10.1021/la700694b>