



**HAL**  
open science

# L'eugénol, marqueur de qualité du raisin Baco blanc : de sa tolérance à *Botrytis cinerea* à la production d'eau-de-vie blanche d'Armagnac

Xavier Hastoy

## ► To cite this version:

Xavier Hastoy. L'eugénol, marqueur de qualité du raisin Baco blanc : de sa tolérance à *Botrytis cinerea* à la production d'eau-de-vie blanche d'Armagnac. Sciences et techniques de l'agriculture. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0402 . tel-04536161

**HAL Id: tel-04536161**

**<https://theses.hal.science/tel-04536161v1>**

Submitted on 8 Apr 2024

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE

DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité : ŒNOLOGIE

Par Xavier HASTOY

**L'eugénol, marqueur de qualité du raisin Baco blanc :  
de sa tolérance à *Botrytis cinerea* à la production d'eau-de-vie blanche  
d'Armagnac**

Sous la direction de : Gilles de REVEL

*Soutenue publiquement le Mercredi 13 Décembre 2023*

Membres du jury :

M. de REVEL Gilles, Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Mme. TAILLANDIER Patricia, Professeure, Toulouse INP-ENSIACET	Rapporteuse
M. VALDÉS Héctor, Professeur associé, Pontificia Universidad Católica de Chile	Rapporteur
M. FARINES Vincent, Professeur, Université de Montpellier	Président du jury
Mme. PEDNEAULT Karine, Professeure agrégée, Université du Québec en Outaouais	Examinatrice
M. FERMAUD Marc, Chargé de recherche, INRAE Bordeaux	Invité
Mme. SÉGUR Marie-Claude, Responsable R&D, BNIA, Eauze	Invitée



*Hegoak ebaki banizkio*

*Nerea izango zen*

*Ez zuen aldegingo.*

*Bainan honela*

*Ez zen gehiago txoria izango.*

*Eta nik,*

*Txoria nuen maite*





*À Grand-Père,*

*À Papi,*

*À mes deux trésors :*

*À Grand-Mère,*

*À Mamie*



## REMERCIEMENTS .....

Tout d'abord je tiens à remercier le Professeur **Gilles de Revel**. Gilles, il y a un peu plus de 3 ans maintenant, vous m'avez fait confiance et impliqué dans ce beau projet de thèse. Trois années après, si longues et si courtes à la fois, j'espère vous avoir rendu un peu de l'honneur que vous m'avez fait en me choisissant. Merci pour tout ! Merci pour avoir façonné une grande partie du scientifique que je suis aujourd'hui ! Merci pour m'avoir guidé tout au long de ce doctorat ! Merci pour le soutien moral et psychologique ! Merci enfin pour ces 3 belles et intenses années de thèse !

Je tiens également à remercier le Docteur **Marc Fermaud**. Marc je vous dois également beaucoup ! Vous m'avez également beaucoup apporté durant ces 3 ans ! Merci pour votre rigueur, votre sens du détail qui m'a poussé à toujours faire mieux ! Merci également pour nos nombreuses discussions, scientifiques bien sûr et pas nécessairement liées à la thèse, et parfois plus rugbystiques !

Je voudrais bien sûr remercier Madame **Marie-Claude Ségur**. Je sais que je vous dois beaucoup Marie-Claude ! Si votre curiosité n'avez pas poussé le BNIA à financer ce projet de thèse, je ne serai pas là aujourd'hui ! Merci pour votre indéfectible aide dans de nombreux domaines : la prise d'échantillons, les dégustations, les corrections de thèse, d'articles, les discussions mais également votre saine exigence ! Merci pour votre soutien à chaque étape ! Merci de m'avoir ouvert les portes de l'Armagnac et de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des spiritueux. Merci également pour votre énergie sans laquelle beaucoup de choses n'auraient pas été possibles ! Merci pour tout !

Je tiens à remercier l'ensemble de mon jury de thèse. Merci, donc, à la Professeure **Patricia Taillandier** et au Docteur **Héctor Valdés** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Trouvez-ici la marque de ma reconnaissance. Merci également à la Docteure **Karine Pedneault** et au Docteur **Vincent Farines** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tenais également à remercier la **région Occitanie** et le Bureau National Interprofessionnel de l'Armagnac (**BNIA**), représenté par Monsieur **Oliver Goujon** d'avoir accepté de financer mes travaux.

Je voudrais aussi remercier les nombreuses et nombreux actrices et acteurs de la filière Armagnac qui ont participé à ces travaux de thèse. Merci à Monsieur **Thierry Dufourcq** de l'Institut Français de la Vigne et du Vin (**IFV**) d'avoir mené à bien l'ensemble des vinifications dont les résultats représentent une part majeure de ma thèse. Merci Thierry pour ton aide précieuse, ta disponibilité et ta participation à ce travail ! Peut-être à bientôt pour un match Pau – La Rochelle ! Merci à Madame **Anne Kabakian** de l'**Œnopôle de Gascogne** qui s'est chargé des analyses courantes des vins et eaux-de-vie des différents essais ainsi que des microdistillations mais, qui a également participé à l'ensemble des dégustations durant les 3 années de la thèse ! Merci Anne pour ta gentillesse, tes conseils et ta disponibilité ! Tu as beaucoup contribué aux résultats de ma thèse ! Merci à Mesdames **Mathilde Guinoiseau** et **Magaly Farel** des Chambres d'Agriculture du Gers et des Landes ! Merci à toutes les deux pour m'avoir accompagné dans la mise en place des essais au vignoble ! Merci pour avoir été à chaque fois disponible lorsque j'avais besoin de faire des mesures, des prélèvements, pour votre gentillesse et votre capacité à vous adapter ! Merci beaucoup à Madame **Sarah Lacquemant** du Domaine d'Ognoas, pour son aide et sa disponibilité sur la parcelle de clone et pour sa participation au panel de dégustateurs ! Merci Sarah ! Un grand merci à Monsieur **Marc Saint-Martin**, président de la commission technique du BNIA, pour tout le volume de Baco blanc qu'il a bien voulu mettre à notre disposition pour les essais œnologiques de cette thèse et pour sa participation sans faille au panel de dégustateurs ! Merci beaucoup Marc pour votre aide constante, votre disponibilité sans faille et tout votre travail durant cette thèse ! Je voudrais remercier tous les membres du panel de professionnels qui ont vaillamment dégusté un très important nombre d'eaux-de-vie au cours de ces 3 ans, de s'être prêté à certaines expériences sensorielles insolites (poivre, huile et j'en passe) ! Merci à toutes et tous, je ne peux pas trahir votre identité, bien que j'ai déjà enfreint la règle pour certaines et certains d'entre vous, mais soyez assurés de toute ma gratitude pour votre patience, votre investissement et votre aide si précieuse durant ces 3 années ! Merci de m'avoir raconté votre histoire du Baco blanc ! Je voudrais également remercier l'ensemble des producteurs d'Armagnac qui ont pleinement contribué à ma thèse en fournissant les nombreux échantillons analysés et/ou dégustés ! Je dois également remercier **Josep Valls Fonayet** et **Tiziana Lisanti** pour toute leur aide sur les précurseurs de l'eugénol ! Merci également pour votre gentillesse, vos conseils et votre accompagnement durant la thèse !

Je tiens également à remercier **Christelle Boisbineuf** pour l'important travail de bibliographie qu'elle a réalisé sur les recherches en hybridation de François Baco ! Christelle un très grand merci !

Je voudrais véritablement remercier l'ensemble des étudiantes que j'ai pu encadrer au cours de leur stage de master. Donc un grand merci à **Juliana Riou**, **Claire Thouvenot** et tout particulièrement à **Julia Canac** et **Émilie Paudois**, sans qui une partie de la thèse n'aurait pas été possible !

J'aimerais également remercier toutes les personnes qui participent au bon déroulement d'une thèse. À commencer par sa faisabilité dans une unité de recherche, c'est pourquoi je remercie les Professeurs **Philippe Darriet** et **Patrick Lucas**, en leur qualité d'ancien et actuel **directeurs de l'UMR Œnologie**, de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de cette belle équipe. Je tiens également à remercier Madame **Céline Goutteux**, gestionnaire de l'UMR Œnologie, d'avoir été aussi réactive et souple durant toute la durée de mon doctorat ! Merci Céline, pour ton aide dans les nombreuses missions, merci de ta souplesse face à mes retards chroniques dans les formalités ! Je voudrais remercier Madame **Maïte Lestrade**, gestionnaire administrative de l'École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux, pour son aide précieuse dans toutes les démarches attenantes au dépôt du manuscrit et à la soutenance de la thèse ! J'aimerais également remercier les membres de la bibliothèque universitaire de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin pour leur aide et leur gentillesse ! Merci donc à **Matthieu Jaureguiberry**, **Nathalie Monge** et **Benoît Pénicaud** !

La thèse a été pour moi une aventure humaine riche en émotions. J'ai pu rencontrer de nombreuses personnes avec qui j'ai partagé un bout de chemin, des sourires, des rires, parfois des pleurs, de la tristesse mais surtout beaucoup de bonheur. Il y a beaucoup de monde à qui j'aimerais dédier quelques lignes en modeste témoignage de ma gratitude et de mon amitié. Je ne sais pas par qui commencer, pour moi l'ordre importe peu. Ces quelques mots, ces petites plaisanteries qui vous concernent ne sont que peu de choses si on doit les comparer à ce que je vous doit !

Merci à mes voisins de bureau, qui sont rapidement devenu beaucoup plus que ça ! Merci nos débats, nos discussions moins sérieuses, nos blind-tests (oui cela me coûte d'écrire en anglais) du vendredi et notre armoire à nourriture. **Inès Elali** merci de m'avoir supporté, accompagné

et écouté durant 3 ans ! Ce fût un honneur de « thésier » ensemble de bout en bout, et un bonheur de d'avoir rencontré une amie et ce malgré ta condescendance ! **Paul Le Montagner** merci pour tes blagues d'un goût douteux, tes connaissances zoologiques, en particulier sur les poules, pour Parpaing et tes râleries mais surtout pour les bons moments passés ensemble ! Merci à Paulette, **Pauline Rousserie**, la doyenne de ce bureau que tu as su rendre joyeux par ton grain de folie et tes rires ! **Pierre Moulis**, merci de m'avoir donné ce bureau que je t'ai volé ! Merci de ta curiosité sans faille, des jeux de pistes particulièrement agaçants (heureusement que je suis bon tricheur aux jeux). **Hugo Mastain**, le plus fidèle de tous les stagiaires. Merci pour ton sourire et ta bonne humeur indéfectibles ! Vous êtes deux à vous être assises à ce bureau mais qu'importe, merci à **Margot Larose**, petite benjamine de ce bureau et merci à **Yasma Barchi**, surtout ne t'arrête jamais de sourire.

Merci également à toutes celles et ceux qui font partie de cette belle unité de recherche ! Merci à **Justine Garbay**, tu n'as pas encore tout à fait terminé mais nous serons là pour t'admirer lors de ta soutenance, merci pour la belle personne que tu es ! Merci à **Manon Ferreira** ! Surtout ne change rien, reste telle que tu es, entière, vraie et déterminée ! Merci aux joueurs du midi, saboteurs, pirates ou lanceurs invétérés de dés, que j'ai trop tardivement appris à connaître ! Merci donc à **Sixtine Blandeau**, **Claire Payan**, et **Marie-Amélie Aleyrac** ! Merci à mon entraîneur personnel, **Gauthier Lagarde**, qui a réussi à me traîner dans une salle de sport durant la rédaction. Merci à **Julie Miranda** ! Merci Julie pour avoir été présente dans cette belle promo de thésards et pour le soutien dans la dernière ligne droite !

Je dois bien évidemment remercier toutes les personnes que j'ai rencontré durant ces travaux qui m'ont énormément apporté scientifiquement et humainement ! Je voudrais donc remercier comme il se doit **Laurent Riquier** ! Laurent sans toi, la machinerie d'un chromatogramme serait resté un mystère ! Merci à **Céline Franc**, merci pour ton extrême rigueur, tes oublis d'après week-end mais surtout pour ta disponibilité, ta gentillesse ! Je sais ce que je te dois ! Merci à **Sophie Tempère** ! Merci Sophie pour ta patience, ton écoute, tes précieux conseils et ton soutien ! Un très grand merci à **Stéphanie Marchand** ! Stéphanie merci pour m'avoir fait grandir, pour m'avoir accompagné, écouté et tes injonctions à me reposer ! Merci à **Margaux Cameleyre** ! Bonjour Margaux et merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et tes conseils ! Merci également à **Nicolas Le Menn** ! Merci Nico pour ta curiosité sans faille et pour wikinico qui trône encore fièrement sur la porte ! Merci à **Adeline Vignault**. Merci en premier lieu pour ton amitié mais également pour ton aide et ton accompagnement tout au long de la thèse ! Merci

également à **Stéphanie Cestaret** ! Merci Steph pour ta bienveillance, ton écoute et les bons moments passés !

Il y a aussi celles et ceux qui sont partis de l'ISVV mais qui ont continué à m'accompagner en tant qu'ami ! Merci donc à **Jules Harrouard**, pour ton rôle capitaine de soirée, pour tes meilleurs compétences de volleyeur que de squasheur mais surtout pour ton écoute et ta curiosité sans malice qui pousse à grandir et bien sûr ton amitié ! Merci à **Justine Laboyrie** ! Tu as été la première à m'accueillir dans ce laboratoire et pour cela merci ! Quand un basque remercie une landaise, il faut que cette dernière le mérite, qu'elle soit une amie ou les deux à la fois ! Je rejouterai ici **Ivan Lainé**, que j'ai pu rencontrer grâce à Justine, Ivan tu es devenu un ami cher, merci de m'avoir suivi et d'être venu le 13 Décembre ! Merci à **Mathilde Gadrat** ! Je te l'ai dit de nombreuses fois mais te retrouver a été un véritable bonheur et un magnifique hasard de la vie ! Merci de m'avoir accompagné, scientifiquement et humainement jusqu'au bout de cette aventure ! **Édouard-Pelonnier Magimel**, merci pour ta rigueur, ton exigence mais surtout pour avoir partagé ton amitié !

Il ne faut pas oublier d'où l'on vient et à ce titre, je ne peux décemment pas oublier les membres du hall de technologie de l'ISVV ! Merci donc à **Remy Ghidossi**, grand chef qui sait bien que la France regorge de fines appellations ! Merci à **Marion Breniaux**, pour les conseils littéraires, les débats politiques et les discussions plus ou moins profondes ! Merci à **Benjamin Poulain**, merci pour tes qualités de cuisinier italien mais surtout pour les nombreuses discussions que l'on peut avoir, scientifiques mais pas que ! Merci à **François Clavero**, pour ton langage parfois hermétique et ton bienveillance ! Merci à **Julie Maupeu** ! Merci presque cousine, pour ton écoute, les discussions et ton légendaire flair ! Je tiens à remercier **Fabrice Meunier**, mon parrain ISVV ! Merci de m'avoir accompagné tout au long de la thèse, merci également pour tes photos, vidéos et autres montages dont tu as le secret ! Un merci tout particulier à **Claudia Nioi**, ma mômman ISVV. Claudia tu m'as fait confiance durant le stage, tu m'as accompagné en tant que scientifique mais aussi humainement ! Merci pour tout ! Je voudrais également remercier **Julien Dumercq**, mon autre presque cousin, merci pour le squash, tes conseils « d'ancien » et ton parler rugby ! Merci également à **Claire Guyot**, merci pour ta gentillesse et ton accompagnement dans l'édition de mon premier article ! Merci enfin à **Gracie Boland** ! Merci Gracie pour ta gentillesse et ta disponibilité ! Merci à **Luca Garcia**, rencontré lors des différents congrès d'œnologie qui a récemment intégré cette belle équipe du hall !



Il y a encore beaucoup de personnes que je voudrais remercier avec qui j'ai passé d'excellents moments, « quelques » soirées animées et avec qui j'ai eu des discussions qui m'ont fait avancer et grandir ! Merci donc à **Charlotte Vion**, merci Chacha pour ton inépuisable énergie et ta reprise de Depan'R ! Merci à **Philippe Marullo**, merci Philippe pour tes conseils et pour ton opiniâtreté au squash ! Merci à **Amel Chaïb**, merci Amel pour la franchise de nos discussions ! Merci à **Anaïs Poirier**, merci pour toute ton aide durant la thèse ! Merci à toutes les doctorantes, post-doctorantes et tous les doctorants et post-doctorants avec qui j'ai partagé de très bons moments, au labo, parfois même entre deux couloirs en dehors et en congrès. Merci donc à **Lisa Texier, Emilie Suhas, Emilio De Longhi, Marie Le Scanff, Tom Estier, Marie Courregelongue, Marie André** ! Je suis très heureux d'avoir pu partager ces moments avec vous !

Je voudrais bien entendu remercier toute ma famille : ma mère **Sophie**, mon beau-père **Christophe**, mon père **Serge**, ma belle-mère **Carine**, mes frères, **Antoine et Baptiste**, et sœurs, **Emma et Mathilde**, ainsi que les oncles et tantes, mes cousins et cousines, mes grands oncles et grandes tantes. Sans oublier mes deux grands-mères Danielle et Denise ! Vous tous et vous toutes qui m'avez accompagné, aidé, encouragé tout au long de la thèse ! Nous avons partagé ensemble ce moment fort de la soutenance. Ce jour-là, j'ai voulu vous rendre fier, vous donner en retour tout l'Amour et le soutien que vous m'avez témoigné ! Merci ...

J'aimerais également remercier **Nathalie** d'avoir été présente pour la soutenance, merci pour ton soutien ! Merci également à **JB, Marceau, Paulette, Guy-Rémi, Kiki** et **Christophe** ainsi que les familles **Sauvaget** et **Windholtz**.

Et enfin, je te remercie toi. Toi **Sara** qui m'a amené, soutenu, porté jusqu'au bout de la thèse. Mais finalement c'est peu de chose comparé au bonheur que tu m'apportes au quotidien ! Je t'ai enfin rencontré après t'avoir tant de fois croisé. Merci pour hier, merci pour aujourd'hui, merci pour demain...



VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHES.....

**Publications dans des journaux internationaux à comité de lecture**

Franc, C., Riquier, L., **Hastoy, X.**, Monsant, C., Noiville, P., Pelonnier-Magimel, E., Marchand-Marion, S., Tempère, S., Ségur., M. C., De Revel, G. (2023). Highlighting the varietal origin of eugenol in Armagnac wine spirit from Baco blanc, a hybrid grape variety. *Food Chemistry*, 136405, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136405>

**Hastoy, X.**, Franc, C., Riquier, L., Ségur., M. C., De Revel, G., Fermaud, M. (2023). Fungitoxic role of endogenous eugenol in the hybrid grapevine cultivar Baco blanc resistant to *Botrytis cinerea*. *ENO One*, 57(2), 159–175, <https://doi.org/10.20870/oenone.2023.57.2.7454>

**Communications de vulgarisation**

**Hastoy, X.**, Poirier, A., Franc, C., Riquier, L., Ségur., M. C., De Revel, G., Fermaud, M. (2023). High eugenol content of Armagnac hybrid variety Baco Blanc, an asset in combating *Botrytis cinerea*. *IVES Technical Reviews, vine and wine*, <https://ives-technicalreviews.eu/article/view/7779>

**Hastoy, X.**, Marquier, S., Blanc, G., Lagarde-Pascal., C. (2020). Utilisation de la voltamétrie linéaire de balayage pour déterminer la date de récolte de parcelle de Sauvignon blanc. *Revue des œnologues n°176*

**Communication orale au cours de congrès internationaux**

**Hastoy, X.**, Franc, C., Riquier, L., Ségur., M. C., Marchand, S., Fermaud, M., De Revel, G. (2023). Eugenol as quality marker of wines and spirits from hybrid vines : impact of different winemaking and distillation processes. *Eno-Macrowine 2023. July 10 to July 13. Bordeaux (France)*

**Young Searcher Price**, au cours du congrès Eno-Macrowine 2023, décerné par la Chaire Denis Dubourdieu – Qualité et Identité des Vins

### **Communications affichées au cours de congrès internationaux**

**Hastoy, X.**, Poirier, A., Franc, C., Riquier, L., Ségur., M. C., De Revel, G., Fermaud, M. (2023). Role of endogenous eugenol in the resistance to *Botrytis cinerea* of the hybrid grapevine cultivar Baco blanc. 12<sup>th</sup> *International Congress on Plant Pathology. August 20 to August 25. Lyon (France)*

**Hastoy, X.**, Poirier, A., Franc, C., Riquier, L., Ségur., M. C., De Revel, G., Fermaud, M. (2023). Hybrid grapevine cv Baco blanc, between tradition and modernism: focus on endogenous eugenol as resistance factor to *Botrytis cinerea*. *Eno-Macrowine 2023. July 10 to July 13. Bordeaux (France)*

**Hastoy, X.**, Franc, C., Riquier, L., Marchand-Marion, S., Ségur., M. C., De Revel, G. (2022). Quantification of eugenol in various matrixes from hybrid vines. Case study of Armagnac white spirits production. *In Vino Analytica Scientia 2022. July 3 to July 7. Neustadt in der Weinstraße (Germany)*

**Hastoy, X.**, Franc, C., Riquier, L., Marchand-Marion, S., Ségur., M. C., De Revel, G. (2022). Eugenol : a new marker of hybrid vines ? The case study of Baco blanc in Armagnac. *Wine Active Compounds 2022. June 29 to July 1. Dijon (France)*

**Hastoy, X.**, Magaly, F., Ségur., M. C., De Revel, G., Fermaud, M. (2022). Eugenol, endogenous compound in the Baco blanc cultivar, may affect *Botrytis cinerea* development in grapevine. *BotrySclero2022. June 13 to June 17. Avignon (France)*

### **Communication orale de vulgarisation**

**Hastoy, X.**, Ollat, N., Grosbellet., C. (2022). Intégration des nouvelles variétés dans les AOC : l'enjeu des VIFA. *Vinitech-Sifel 2022. 30 Novembre. Bordeaux (France)*

TABLE DES MATIÈRES .....	
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>État de l'art .....</b>	<b>7</b>
Chapitre 1 : Le Baco blanc, l'exemple d'une vigne hybride résiliente.....	9
I. La lutte contre la crise phylloxérique, la voie de l'hybridation.....	9
I.1. Le genre <i>Vitis</i> et le concept de cépage .....	9
I.2. Hybridation intentionnelle de la seconde moitié du XIX <sup>e</sup> siècle au début du XX <sup>e</sup> siècle .....	10
II. La caractéristique aromatique des vignes hybrides.....	12
II.1. Les molécules impliquées dans l'aromatique « foxée » des vins .....	12
II.1.1. L'anthranilate de méthyle, l'arôme « foxé » originel.....	12
II.1.2. L' <i>o</i> -aminoacétophénone, la molécule cachée du « foxé » .....	13
II.1.3. Le furanéol®, la note de sur-mûri dans le « foxé ».....	14
II.2. Le rôle particulier des composés soufrés.....	15
II.3. Arôme « foxé » et arôme des vignes américaines : synonymes ou idiosyncrasie ? .....	16
III. François Baco et le développement du Baco 22A .....	18
III.1. La vie de François Baco et l'école du greffage .....	18
III.2. La création du Baco 22A.....	19
III.2.1. Choix et origines des géniteurs .....	19
III.2.2. Les critères et conditions de sélections .....	20
III.2.3. La résistance du Baco 22A aux maladies de la vigne .....	20
III.3. Les résultats œnologiques du Baco blanc.....	20
IV. L'évolution du Baco blanc, au XX <sup>e</sup> et XXI <sup>e</sup> siècle.....	21
IV.1. Une histoire chaotique liée à la réglementation .....	21
IV.2. L'évolution du parcellaire de Baco blanc en France.....	22
IV.3. État des lieux du Baco blanc en 2023 .....	23
Chapitre 2 : Les eaux-de-vie de vins d'Armagnac .....	25
I. La plus ancienne eau-de-vie française .....	25
II. La terre, les vignes et le vin d'Armagnac.....	25
III. La distillation .....	27
III.1. L'alambic à repasse ou double-chauffe (distillation discontinue).....	28
III.2. L'alambic continu de type armagnacais .....	29
III.3. Blanche d'Armagnac et vieillissement des armagnacs .....	32
Chapitre 3 : <i>Botrytis cinerea</i> , la pourriture grise de la vigne.....	35
I. Biologie de <i>Botrytis cinerea</i> .....	35
I.1. Cycle de développement de la pourriture grise.....	36
I.2. Quiescence du champignon .....	38
I.3. Facteurs de sensibilité au champignon.....	39
I.3.1. Intégrité de la pellicule .....	39
I.3.2. Insectes et invertébrés vecteurs de <i>B. cinerea</i> .....	39
I.3.3. Nutrition de la plante hôte .....	39
II. Les interactions vigne- <i>B. cinerea</i> .....	40
II.1. Les variétés résistantes et tolérantes au champignon.....	40

II.1.1. L'effet variétal .....	40
II.1.2. L'effet porte-greffe .....	41
II.2. Résistance ontogénique des organes fructifères .....	41
II.2.1. Relation entre maturité des baies et sensibilité à <i>B. cinerea</i> .....	41
II.2.2. Résistance pelliculaire : variation de la composition liée à la sensibilité .....	42
II.3. Gestion de la canopée et de la vigueur .....	43
II.3.1. Systèmes de conduite .....	43
II.3.2. Taille de la vigne .....	43
III. Moyens de lutte contre <i>B. cinerea</i> .....	44
III.1. Prophylaxies .....	44
III.1.1. Avancement de la date de récolte .....	44
III.1.2. Effeuilage .....	44
III.1.3. Gestion des sources d'inocula .....	44
III.2. Produits de biocontrôle .....	45
III.3. Lutte chimique .....	46
Chapitre 4 : L'eugénol, une molécule aux multiples propriétés .....	49
I. Vision d'ensemble de l'eugénol .....	49
I.1. Panorama historique du giroflier .....	49
I.2. Chimie et propriétés pharmacologiques de l'eugénol .....	50
I.2.1. Généralités .....	50
I.2.2. Répartition dans le règne végétal .....	50
I.2.3. Propriétés antifongiques .....	51
II. L'eugénol en œnologie .....	52
II.1. L'eugénol du bois de chêne .....	52
II.2. Sa présence atypique dans les vins et les eaux-de-vie d'hybrides .....	52
II.3. L'influence sensorielle .....	53
II.3.1. Influence sur l'aromatique des vins .....	53
II.3.2. Influence somesthésique .....	54
III. Les formes précurseurs de l'eugénol .....	54
Chapitre 5 : Du sensoriel à la dégustation .....	57
I. La dégustation des eaux-de-vie .....	57
I.1. De la manière de déguster une eau-de-vie .....	57
I.2. L'important rôle de l'éthanol .....	58
I.2.1. Effets physicochimiques .....	58
I.2.2. Effets sensoriels .....	60
II. Le système de perception .....	61
II.1. Olfaction .....	61
II.2. Gustation .....	62
II.3. Somesthésie .....	63
III. L'analyse sensorielle .....	63
III.1. Les différents types de perception .....	63
III.1.1. La perception quantitative .....	63
III.1.2. La perception qualitative .....	64
III.2. Les interactions perceptives .....	64

III.2.1. Modification de la perception quantitative .....	65
III.2.2. Modification de la perception qualitative .....	66
III.3. Le rôle de l'expertise .....	67
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>69</b>
Chapitre 1 : Tests microbiologique et agronomique.....	71
I. Tests <i>in vitro</i> .....	71
I.1. Matériel fongique utilisé .....	71
I.2. Composés chimiques utilisés .....	71
I.3. Préparation des tests .....	72
I.4. Évaluation du développement de <i>B. cinerea</i> et calcul des concentrations inhibitrices.....	73
II. Tests <i>in vivo</i> .....	74
II.1. Échantillonnage et préparation des baies.....	74
II.2. Évaluation du développement de <i>B. cinerea</i> .....	75
II.3. Quantification du nombre de spores de <i>B. cinerea</i> .....	75
III. Études au vignoble.....	76
III.1. Parcelles tests .....	76
III.2. Dispositifs expérimentaux .....	77
III.2.1. Effeuvillage total et contrôlé en 2021 .....	77
III.2.2. Suivi des clones de Baco blanc en 2021 .....	78
III.2.3. Éclaircissage partiel en 2022.....	79
III.2.4. Suivi du rang de Baco blanc de la parcelle CONS32 en 2022.....	80
III.3. Mesures et prélèvements .....	81
III.3.1. Prélèvements pour quantification d'eugénol et pour tests microbiologiques .....	81
III.3.2. Mesure de la vigueur végétative .....	81
III.3.3. Charge de la vigne.....	82
III.3.4. Compacité des grappes.....	82
III.3.5. Taux de contact entre grappes ( $\tau$ ) .....	83
III.3.6. Évaluation visuelle de l'infection par <i>B. cinerea</i> .....	83
Chapitre 2 : Analyses sensorielles .....	85
I. Les participants.....	85
I.1. Panel d'experts BNIA .....	85
I.2. Panel d'experts de l'ISVV .....	86
II. Environnement et matériels.....	87
II.1. Salles d'analyse sensorielle .....	87
II.2. Matériel et produits dégustés .....	87
III. Les épreuves d'analyse sensorielle .....	88
III.1. Épreuves discriminatives.....	88
III.1.1. Test par paire.....	88
III.1.2. Test triangulaire .....	88
III.2. Profil sensoriel.....	89
III.3. Évaluation de la typicité .....	89
III.3.1. Imagerie mentale des dégustateurs.....	90
III.3.2. Épreuves sensorielles d'association et de notation .....	90

Chapitre 3 : Analyses par chromatographie en phases gazeuse et liquide.....	91
I. Analyses par HS-SPME-GC/MS.....	91
I.1. Phénylpropènes et phénols volatils.....	91
I.1.1. Préparation des échantillons.....	91
I.1.2. Hydrolyse enzymatique.....	92
I.1.3. Spécificité de dosage pour les eaux-de-vie riches en cuivre.....	93
I.1.4. Analyse par HS-SPME-GC-MS.....	93
I.2. Quantification des esters.....	96
I.2.1. Préparation des échantillons.....	97
I.2.2. Analyse par HS-SPME-GC-MS.....	97
II. Analyses par GC/FID.....	99
II.1. Les alcools supérieurs, l'éthanal, l'acétate d'éthyle, le 1,1-diéthoxyéthane et le méthanol.....	99
II.2. Préparation des échantillons.....	100
II.3. Analyse par GC/FID.....	100
III. Analyses par HPLC-QqQ/MS des précurseurs de l'eugénol présents dans la pellicule de raisin.....	102
III.1. Le géoside et la citrusine C.....	102
III.2. Préparation des échantillons.....	102
III.3. Quantification des précurseurs de l'eugénol.....	103
Chapitre 4 : Analyses œnologiques.....	105
I. Analyses de contrôle de la maturité des raisins.....	105
I.1. Concentration en sucres par réfractométrie.....	105
I.2. Acidité Totale et pH.....	105
I.3. Indice de maturité technologique.....	105
I.4. Quantification des tanins condensés de la pellicule de raisins.....	105
I.4.1. Préparation de poudre de pellicules.....	105
I.4.2. Extraction et quantification des tanins condensés de la pellicule.....	106
II. Analyses œnologiques par Infra Rouge à Transformées de Fourier (IRTF).....	106
Chapitre 5 : Analyses statistiques et traitement des données récoltées.....	107
I. Traitement des données.....	107
II. Tests de la normalité des données et de leur homoscedasticité.....	107
III. Tests statistiques univariés réalisés pour les variables quantitatives.....	108
III.1. Test de Student (paramétrique) et test de Wilcoxon (non-paramétrique).....	108
III.2. ANOVA univariée et test <i>post hoc</i> de Newman-Keuls.....	108
III.3. Test de Kruskal-Wallis et <i>post hoc</i> de Wilcoxon-Mann-Whitney ; test de Friedman et <i>post hoc</i> de Nemenyi.....	108
IV. Tests statistiques bivariés réalisés pour les variables quantitatives.....	109
V. Test statistique univarié du $\chi^2$ pour variables qualitatives.....	109
VI. Tests statistiques et graphiques multivariés.....	109
VI.1. Le Multi Dimensional Scaling (MDS).....	109
VI.2. L'Analyse en Composante Principale (ACP).....	110
VI.3. La classification ascendante hiérarchique (CAH).....	110



**PARTIE 1 : L'eugénol, marqueur de la résistance ontogénique du Baco blanc ..... 111**

Chapitre 1 : L'effet intrinsèque de l'eugénol face à <i>B. cinerea</i> .....	113
I. Mise au point méthodologique .....	113
I.1. Effet de l'éthanol sur la croissance de <i>B. cinerea</i> .....	113
I.2. Effets de différents facteurs sur la croissance de <i>B. cinerea</i> et le pouvoir antifongique de l'eugénol .....	116
I.2.1. Les modes d'application de l'eugénol .....	119
I.2.2. Les isolats de <i>B. cinerea</i> .....	122
II. Détermination des CI <sub>50</sub> de l'eugénol <i>in vitro</i> .....	124
II.1. Effet direct de l'eugénol .....	124
II.2. L'effet vapeur de l'eugénol.....	126
III. Conclusions et discussion .....	127
Chapitre 2 : L'eugénol dans le développement de la baie de Baco blanc .....	129
I. L'eugénol, composé pelliculaire de la baie .....	129
I.1. Répartition de l'eugénol dans les tissus de la baie de raisin .....	129
I.2. Cinétique de l'eugénol dans la baie .....	131
I.3. Le lien entre l'eugénol et la maturation des baies.....	132
II. Le rôle de l'eugénol dans le Baco blanc .....	133
II.1. La tolérance du Baco blanc à <i>B. cinerea</i> .....	134
II.2. La variabilité intra-variétale du Baco blanc : concentration en eugénol et sensibilité à <i>B. cinerea</i> .....	135
III. Conclusions et discussion .....	139
Chapitre 3 : L'eugénol, une molécule inductible.....	141
I. Agression abiotique et induction de l'eugénol .....	141
I.1. Effet inductif de l'effeuillage .....	141
I.2. Lien avec la sensibilité à <i>B. cinerea</i> .....	143
II. Concentration des raisins par éclaircissage et inductibilité de l'eugénol.....	145
II.1. Quel(s) effet(s) de l'éclaircissage sur l'induction de l'eugénol ? .....	145
II.2. Effet sur la sensibilité à <i>B. cinerea</i> .....	147
III. Conclusions et discussions.....	149
Conclusion de la partie 1 : L'eugénol, marqueur de la résistance ontogénique du Baco blanc .....	151

**PARTIE 2 : De la caractéristique sensorielle des eaux-de-vie blanches de Baco blanc et influence de l'eugénol..... 153**

Chapitre 1 : Composition chimique des eaux-de-vie blanches et marqueurs sensoriels .....	155
I. L'eugénol .....	156
II. Les alcools supérieurs et autres composés d'importances dans les eaux-de-vie de vins .....	157
II.1. Vue d'ensemble de l'éthanal, de l'acétal et de quelques alcools supérieurs .....	157
II.2. Précisions sur le méthanol .....	159
III. Les esters.....	161
III.1. Les esters éthyliques d'acides gras.....	161
III.2. Les acétates d'alcools supérieurs.....	163
III.3. L'acétate d'isoamyle .....	164
Chapitre 2 : Existe-t-il un espace sensoriel propres aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc ?.....	167

I. Le développement d'une fiche de dégustation .....	168
I.1. Génération libre de vocabulaire et premières réductions du nombre de descripteurs.....	168
I.2. Regroupement de descripteurs .....	169
I.2.1. Regroupement par outil bibliographique .....	169
I.2.2. Regroupement de descripteurs par consensus des panélistes .....	169
I.3. La construction de la fiche .....	170
I.3.1. Consensus sur la forme et les descripteurs .....	170
I.3.2. Choix d'une échelle discontinue.....	171
I.3.3. Une fiche de dégustation propre aux eaux-de-vie blanches .....	171
II. Utilisation et validation de la fiche .....	173
II.1. Validation de l'outil.....	173
II.1.1. Consensus interindividuel sur les descripteurs.....	173
II.1.2. Répétabilité dans la notation .....	174
II.1.3. Reproductibilité de la notation .....	176
II.2. Tentative de discrimination des eaux-de-vie blanches .....	179
III. Analyse sémantique des termes associés aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc.....	181
IV. Les forces et limites de la fiche de dégustation ainsi que de l'usage du panel de professionnels.....	183
Chapitre 3 : L'eugénol peut-il contribuer à la caractérisation des eaux-de-vie blanches de Baco blanc ?.....	185
I. Lien entre typicité du Baco blanc et concentration en eugénol.....	185
II. Influences directe et somesthésique de l'eugénol .....	187
II.1. Influence directe .....	187
II.2. Influence somesthésique.....	187
III. La mise en évidence d'une interaction perceptive avec l'acétate d'isoamyle .....	188
III.1. L'interaction perceptive entre l'eugénol et l'acétate d'isoamyle .....	189
III.2. Effet quantitatif de l'eugénol sur la perception de l'acétate d'isoamyle.....	189
III.3. Effet qualitatif de l'eugénol sur la perception de l'acétate d'isoamyle.....	190
III.3.1. Sensibilisation du panel à plusieurs notes aromatiques de banane .....	190
III.3.2. L'effet qualitatif de l'eugénol en matrice simplifiée.....	191
III.3.3. L'effet qualitatif de l'eugénol en matrice eau-de-vie blanche .....	192
III.4. Effet de l'interaction entre l'eugénol et l'acétate d'isoamyle sur la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc .....	195
IV. Conclusions et discussions .....	197
Conclusions de la Partie 2 : De la caractéristique sensorielle des eaux-de-vie blanches de Baco blanc.....	199
<b>PARTIE 3 : L'optimisation de la richesse en eugénol dans les vins et les eaux-de-vie de Baco blanc .....</b>	<b>201</b>
Chapitre 1 : Les principaux facteurs influençant l'eugénol dans les vins de distillation de Baco blanc.....	203
I. La construction d'un plan d'expériences à large spectre d'observation.....	203
I.1. Choix du type de plan et des facteurs à étudier.....	203
I.2. Microvinifications et microdistillations .....	205
II. Les facteurs principaux influençant les concentrations en eugénol .....	206
II.1. La maturité.....	207
II.2. Le rôle des enzymes libératrices d'arômes.....	208
II.3. Implication des autres facteurs et des interactions sur la conduite des vinifications.....	210
II.4. Corrélation entre concentration en eugénol des vins et concentration en eugénol des distillats.....	212

III. Discussions et conclusion .....	213
Chapitre 2 : Le rôle particulier des enzymes .....	216
I.1. Exploration des enzymes œnologiques .....	216
I.1.1. Choix des préparations enzymatiques .....	216
I.1.2. La disponibilité en enzymes œnologiques .....	217
I.1.3. Plan d'expériences .....	217
II. La libération du potentiel aromatique en eugénol .....	219
II.1. Approche des formes précurseurs de l'eugénol .....	220
II.2. Rôle des enzymes dans le débouillage et la conservation sur lies sur la disponibilité en eugénol .....	222
III. Discussions et conclusion .....	224
Chapitre 3 : L'influence de la distillation sur la concentration et la récupération de l'eugénol du vin .....	226
I. Influence de quelques paramètres de distillation .....	226
I.1. Le TAV de coulage .....	226
I.2. Mode de distillation, différence entre distillations continue et double-chauffe .....	227
II. Simulation numérique de l'eugénol en distillation continue .....	230
II.1. Modèle thermodynamique .....	231
II.2. Étude de sensibilité de la concentration en eugénol en fonction de la variation de paramètres opératoires de l'alambic et leur influence sur des paramètres clefs de la conduite d'un alambic .....	232
II.2.1. Sensibilité de la quantité de chaleur apportée au bouilleur .....	232
II.2.2. Sensibilité du débit des queues .....	233
II.2.3. Sensibilité du débit de l'alimentation .....	234
III. Le rôle inattendu du cuivre .....	235
III.1. Le cuivre dans les eaux-de-vie blanches .....	236
III.1.1. Origine .....	236
III.1.2. Présence remarquable dans certaines eaux-de-vie blanches .....	236
III.2. Confirmation de la complexation du cuivre avec l'eugénol .....	238
III.2.1. Méthode expérimentale .....	238
III.2.2. Perte de sensibilité .....	239
III.2.1. Hypothèse de la complexation de l'eugénol par le cuivre .....	242
III.3. Conséquences analytiques et sensorielles .....	244
III.3.1. Complexation et chélation .....	244
III.3.2. Adaptation de la méthode de dosage de l'eugénol .....	245
III.3.3. Influence sensorielle potentielle de la complexation de l'eugénol par le cuivre .....	249
Chapitre 4 : La présence originale du 4-vinylphénol .....	251
I. Les eaux-de-vie blanches d'Armagnac et les phénols volatils .....	251
I.1. Composition des eaux-de-vie blanches .....	251
I.2. Les phénols volatils dans les vins et les eaux-de-vie .....	252
I.3. L'origine du 4-vinylphénol et la recherche de sa forme précurseur .....	253
I.4. Le rôle des facteurs étudiés en plans d'expériences sur la teneur en 4-vinylphénol des vins et des eaux-de-vie de Baco blanc .....	256
I.4.1. Les facteurs principaux .....	256
I.4.2. L'influence des préparations enzymatiques .....	258
I.5. Le 4VP, un comportement proche de l'eugénol en distillation .....	260
II. Discussion .....	263

Conclusions de la Partie 3 : L'optimisation de l'eugénol dans les vins et les eaux-de-vie de Baco blanc.....	265
<b>PARTIE 4 : Les composés précurseurs de l'eugénol.....</b>	<b>267</b>
Chapitre 1 : Détermination du géoside et autres précurseurs .....	269
I. Stratégie analytique de détermination .....	269
I.1. Préparation des échantillons et extraction solide-liquide.....	271
I.2. Pré-purification des extraits de pellicules .....	272
I.2.1. Élimination des composés apolaires, des composés volatils et des sucres.....	272
I.2.2. Élimination de composés ionisables.....	274
I.2.3. Vérification de l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique.....	277
I.3. Isolement des précurseurs de l'eugénol par fractionnement HPLC, à partir de l'extrait partiellement purifié .....	278
I.3.1. Méthodologie suivie .....	278
I.3.2. Résultats des fractionnements successifs.....	279
I.4. Détermination putative de la structure de précurseurs de l'eugénol .....	281
I.4.1. Matériel utilisé.....	281
I.4.2. Résultats des premières identifications des précurseurs par HPLC-QqQ-MS .....	282
I.4.3. Analyses de confirmation par UHPLC/HRMS.....	283
I.4.4. Comparaisons avec des standards commerciaux .....	285
II. Méthode de quantification des précurseurs de l'eugénol .....	287
II.1. Préparation des échantillons .....	287
II.2. Méthode d'analyse quantitative .....	288
II.3. Performance de la méthode LC-MS/MS .....	289
Chapitre 2 : Le suivi des précurseurs de l'eugénol dans différentes variétés de raisin .....	293
I. Comparaison avec des variétés <i>V. vinifera</i> .....	293
I.1. Choix et préparation des échantillons .....	293
I.2. Quantifications comparatives.....	293
II. Cinétique des précurseurs de l'eugénol durant le développement de la baie de Baco blanc .....	295
II.1. Échantillons de Baco blanc à différents stades de développement de la baie .....	295
II.2. Cinétique des précurseurs de l'eugénol comparée à celle de l'eugénol lié .....	295
II.3. Influence antifongique du géoside et de la citrusine C.....	297
Conclusions de la partie 4 : Les composés précurseurs de l'eugénol.....	301
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>303</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>309</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>317</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>350</b>

LISTE DES FIGURES.....	
Figure 1 : Structure chimique de l'anthranilate de méthyle .....	12
Figure 2 : Structure chimique de l' <i>o</i> -aminoacétophénone.....	13
Figure 3 : Structure chimique du furanéol®. L'étoile sur l'un des carbones indique le caractère asymétrique de ce dernier.....	14
Figure 4 : Structure chimique du 3-mercaptopropionate d'éthyle .....	15
Figure 5 : Composés soufrés impliqués dans l'aromatique des vins issus de vignes non <i>V. vinifera</i> et hybrides. Figure (a), 2-mercaptoéthanol. Figure (b), 4-mercapto-2,5-diméthylthiophén-3-one .....	16
Figure 6 : Évolutions des parcelles, national et de l'Armagnac. Figure (a) évolution du parcellaire français, entre 1958 et 2018, des variétés principales de l'Armagnac. Les surfaces annuelles de Baco blanc sont indiquées par les étiquettes de données présentes sur le graphique. La source de ces données est disponible sur le site Pl@ntGrape ( <a href="https://plantgrape.plantnet-project.org/fr/">https://plantgrape.plantnet-project.org/fr/</a> ). Figure (b), évolution du parcellaire, entre 2006 et 2022, affecté à l'AOC Armagnac et pour ses principales variétés. Les surfaces annuelles de Baco blanc sont indiquées par les étiquettes de données présentes sur le graphique.....	23
Figure 7 : Évolution du parcellaire de Baco blanc au cours de la dernière décennie (rapport d'activité ODG Armagnac).....	24
Figure 8 : Cartes de l'aire d'appellation Armagnac (BDcarto-IGN, MAPINFO, INAO, 07/2008 et 06 : 2008) .....	26
Figure 9 : Alambic à repasse de type charentais (Caumeil, 1983).....	28
Figure 10 : Alambic armagnacais pour la distillation continue (BNIA - <a href="http://www.armagnac.fr/distillation-et-vieillessement">http://www.armagnac.fr/distillation-et-vieillessement</a> ) .....	29
Figure 11 : Schéma d'un alambic armagnacais équipé de toutes les annexes possibles (Bertrand & Ségur, 1991) .....	31
Figure 12 : Différentes formes de <i>B. cinerea</i> . (a) Mycélium sur boîte de Petri, cultivé à partir d'un implant du champignon et sur milieu malt-agar (crédit personnel). (b) Mycélium observable sur baie, colonisant la totalité de cette dernière (crédit personnel). (c) Pourriture grise observable sur grappe de raisin blanc, directement au vignoble	

( <a href="http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes">http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes</a> ). (d) Spores asexuées observable sur baie, colonisant la totalité de cette dernière (crédit personnel). (e) Conidiophores portant des conidies à la surface d'une baie infectée par le champignon ( <a href="http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes">http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes</a> ). (f) Conidiophores portant des conidies ( <a href="http://ephytia.inra.fr/fr/C/6988/Vigne-Description-du-champignon">http://ephytia.inra.fr/fr/C/6988/Vigne-Description-du-champignon</a> ) .....	36
Figure 13 : Cycle biologique de <i>Botrytis cinerea</i> (Dubos, 2002).....	38
Figure 14 : Structure de l'eugénol .....	50
Figure 15 : Divers précurseurs de l'eugénol, extraits naturellement à partir de différents végétaux. (a) géoside, (b) sasanquine, (c) citrusine C, (d) 4-ally-2-méthoxyphényl-6-O-β-D-apiosyl(1→6)-β-D-glucoside, (e) 2-méthoxy-4-(2-propèn-1-yl)phényl 6-O-α-L-arabinofuranosyl-β-D-glucopyranoside .....	55
Figure 16 : Différentes organisations moléculaires d'un mélange eau-éthanol en fonction de la teneur en éthanol (v/v) (Ickes & Cadwallader, 2017).....	59
Figure 17 : Représentation des voies de stimulation orthonasale (a ; <i>orthonasal olfactory perceptual system</i> : système de perception olfactif orthonasal, figure de gauche) et rétronasale (b ; <i>retronasal olfactory flavour system</i> : système de perception rétro-olfactif, figure de droite) ainsi que de la structure du système nerveux impliquée dans la perception (d'après Sheperd, 2006). Les flux d'air sont représentés par des lignes en pointillés. ACC, accumbens ; AM, amygdale ; AVI, cortex insulaire ventral antérieur ; DI, cortex insulaire dorsal ; LH, hypothalamus latéral ; LOFC, cortex orbitofrontal latéral ; MOFC, cortex orbitofrontal médial ; NST, noyaux du tractus solitaire ; OB, bulbe olfactif ; OC, cortex olfactif ; OE, épithélium olfactif ; PPC, cortex pariétal postérieur ; SOM, cortex somatosensoriel ; V, VII, IX, X, nerfs crâniens ; VC, cortex primeur visuel ; VPM, noyaux thalamique ventral postéromédial .....	62
Figure 18 : Évolution de l'intensité perçue en fonction de la concentration du stimulus (Depled, 2013) .....	64
Figure 19 : Représentation pour les mélanges binaires hétérogènes des effets quantitatifs (Lytra, 2012) d'après (Thomas-Danguin, 1997). $\psi_\gamma$ : intensité du mélange ; $\psi_\alpha$ : intensité du composé A ; $\psi_\beta$ : intensité du composé B .....	66

Figure 20 : Dispositifs expérimentaux des différents tests <i>in vitro</i> : figure A description schématique d'un test d'étalement, figure B d'un test de fumigation et la figure C d'un test d'intégration .....	73
Figure 21 : Dispositif expérimental d'un test <i>in vivo</i> . Par convention, la baie située en haut à gauche de la grille (première ligne et première colonne) est considérée comme la première baie. La numérotation se poursuit de gauche à droite et ligne par ligne. Un morceau d'adhésif rouge a été utilisé comme repère sur l'une des arrêtes de la boîte de pathogénie afin de toujours identifier la baie n°1.....	74
Figure 22 : Dispositif expérimental de l'essai d'effeuillage total et contrôlé, mis en œuvre en 2021 sur la parcelle PREMS32 du Château de Mons .....	78
Figure 23 : Dispositif expérimental en carré latin de la parcelle CLONES40. Le seul clone autorisé de Baco blanc porte le code c1086. Les autres clones portent un code ENTAV-INRA donné en 2006 lorsqu'un travail sur les clones de Baco blanc a été engagé. Les couleurs choisies ici pour représenter chaque accession font référence aux marquages réalisés sur le terrain pour des questions de praticité et seront reprises dans les graphiques de données traitant des clones .....	79
Figure 24 : Dispositif expérimental de l'essai d'éclaircissages, mis en œuvre en 2022 sur la parcelle PREMS32 du Château de Mons .....	80
Figure 25 : Mise en œuvre d'une mesure de NDVI grâce à un GreenSeeker®. Ce dernier et le panneau blanc ont été portés par deux opérateurs différents, placés de chaque côté du rang.....	82
Figure 26 : Chromatogramme (a) des alcools supérieurs, de l'éthanal, de l'acétate d'éthyle et du méthanol. Les numéros inscrits sur le chromatogramme correspondent aux différentes molécules (celles marquées d'une astérisque (*) sont utilisées comme étalon interne) : 1 = éthanal ( $t_R = 2,546$ min) ; 2 = acétate d'éthyle ( $t_R = 3,598$ min) ; 3 = 1,1-diéthoxyéthane ( $t_R = 3,633$ min) ; 4 = méthanol ( $t_R = 3,960$ min) ; 6 = butan-2-ol ( $t_R = 6,731$ min) ; 7 = 2-méthylpropan-1-ol ( $t_R = 7,119$ min) ; 8 = propan-1-ol ( $t_R = 8,881$ min) ; 9 = butan-1-ol ( $t_R = 10,838$ min) ; 10 = *4-méthylpentan-2-ol ( $t_R = 11,496$ min) ; 11 = 2-méthylbutan-1-ol ( $t_R = 12,772$ min) ; 12 = 3-méthylbutan-1-ol ( $t_R = 12,875$ min). Le composé n°5 ( $t_R = 4,738$ min) correspond à l'éthanol qui sert ici de repère mais n'est pas dosé par cette méthode. Chromatogramme (b) du 2-phényléthanol (13 ; $t_R = 20,921$ min) .....	101

Figure 27 : Effet de l'éthanol sur la croissance mycélienne de différents isolats de <i>B. cinerea</i> . Figure (a), effet direct de l'éthanol sur l'isolat P. Figure (b), effet direct de l'éthanol sur la souche i. Figure (c), effet direct de l'éthanol sur l'isolat V. Figure (d), effet vapeur de l'éthanol sur l'isolat P. Figure (e), effet vapeur de l'éthanol sur la souche i. Figure (f), effet vapeur de l'éthanol sur l'isolat V. la modalité H <sub>2</sub> O correspond au témoin, c'est-à-dire à une concentration nulle en éthanol. Le nombre de jours ap. inoc. représente le nombre de jours après inoculation des isolats de <i>B. cinerea</i> . La ligne horizontale en pointillés noirs présente sur chaque graphique représente la croissance maximale possible (liée aux dimensions de la boîte de Petri) .....	114
Figure 28 : Contribution des facteurs à l'inhibition de croissance pour le plan d'expériences mis en œuvre. Pour faciliter la lecture, seuls les facteurs dont la p-value est inférieure au risque $\alpha$ de 0,01 apparaissent en couleur franche. Les autres facteurs apparaissent avec des couleurs atténuées .....	119
Figure 29 : Boîtes à moustaches représentant les inhibitions de croissance en fonction des différents modes d'application (MOD) de l'eugénol (étalement, fumigation et intégration). Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque $\alpha$ de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées .....	120
Figure 30 : Interactions entre les facteurs EUG et MOD pour l'inhibition de croissance .....	121
Figure 31 : Boîtes à moustaches représentant les inhibitions de croissance propres à chaque isolat de <i>B. cinerea</i> . Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque $\alpha$ de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées .....	122
Figure 32 : Interactions entre les facteurs EUG et ISOL pour l'inhibition de croissance.....	123
Figure 33 : Concentrations en eugénol (exprimées en log <sub>10</sub> ppm) correspondant à 10, 50 et 100 % d'inhibition mycélienne des deux isolats de <i>B. cinerea</i> lors de l'étalement. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des points, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque $\alpha$ de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées .....	125
Figure 34 : Concentrations en eugénol (exprimées en log <sub>10</sub> ppm) correspondant à 10, 50 et 100 % d'inhibition mycélienne des deux isolats de <i>B. cinerea</i> lors de la fumigation. Les lettres	



minuscules noires, situées au-dessus des points, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5% et concernent la comparaison par CI des deux isolats. Les lettres minuscules rouges, situées sur le haut du graphique, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5% et concernent la comparaison des CI entre elles pour les deux isolats. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées .....126

Figure 35 : Répartition générale des différentes formes de l'eugénol dans plusieurs compartiments d'une baie de Baco blanc. Figure (a), répartition générale de l'eugénol dans une baie de Baco blanc. Figure (b), répartition générale des formes de l'eugénol dans les compartiments de la baie de Baco blanc. Figure (c), répartition de la concentration de plusieurs formes de l'eugénol (libre et lié) dans les pellicules et les pulpes de Baco blanc. Figure (d), répartition en proportion des différentes formes de l'eugénol (libre et lié) dans les pellicules et les pulpes de Baco blanc. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Les tests statistiques ont été réalisés par échantillon de Baco blanc. Des lettres différentes induisent des différences statistiques .....130

Figure 36 : Cinétique des concentrations en eugénol total, libre et lié, dans les pellicules, au cours du développement de la baie. Figure (a), cinétique de la concentration totale en eugénol au cours du développement de la baie de Baco blanc. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences statistiques. Figure (b), cinétiques des concentrations en eugénol libre et lié au cours du développement de la baie de Baco blanc. Les lettres minuscules rouges et noires, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5% et correspondent à la comparaison des stades phénologiques entre eux pour une forme de l'eugénol ..... 131

Figure 37 : Corrélation, entre l'Indice de Maturité Technologique et la concentration en eugénol total dans les pellicules de raisins de Baco blanc, sur le millésime 2022 et sur plusieurs sites (CONS32 et PREMS32), n = 288 ..... 133

Figure 38 : Sévérités du brunissement et de la sporulation de *B. cinerea* sur 4 variétés, évalués lors d'un biotest. Figure (a) sévérité de brunissement concernant les 4 variétés étudiées. Figure (b), sévérité de sporulation concernant les 4 variétés étudiées. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus de chaque boîte à moustache sont issues de tests de

Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences statistiques .....134

Figure 39 : Évaluation de différents symptômes de *B. cinerea* sur 6 clones de Baco blanc selon l'isolat utilisé durant le biotest. Les histogrammes en couleurs franches correspondent à l'échelle de gauche de chaque graphique tandis que les histogrammes en couleurs diluées correspondent à l'échelle de droite de chaque graphique. Figure (a), incidence et sévérité de brunissement causées par l'isolat P. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des histogrammes sont issues d'un test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%, les rouges correspondent à un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences significatives. Figure (b), incidence et sévérité de brunissement causées par la souche i. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des histogrammes sont issues d'un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%, les rouges correspondent à un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences significatives. Figure (c), sévérité de sporulation causée par l'isolat P. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des histogrammes sont issues d'un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%, les rouges correspondent à un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences significatives. Figure (d), sévérité de sporulation causée par la souche i. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des histogrammes sont issues d'un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%, les rouges correspondent à un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences significatives. Pour chaque clone et pour chaque analyse, n = 18 .....136

Figure 40 : Concentrations en eugénol libre et lié des 6 clones de Baco blanc dont le seul autorisé à ce jour (c1086). Les histogrammes en couleurs franches correspondent aux quantifications en eugénol libre tandis que les histogrammes en couleur diluées correspondent aux quantifications en eugénol lié. Les lettres minuscules noires et rouges, situées au-dessus des histogrammes sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences statistiques. Pour chaque clone et par analyse, n = 18 .....138

Figure 41 : Cinétique des concentrations en eugénol total, libre et lié, dans les pellicules, au cours du développement de la baie. Figure (a), cinétique de la concentration totale en eugénol au cours du développement de la baie de Baco blanc, en fonction du niveau d'effeuillage. Figure (b), cinétiques des concentrations en eugénol libre et lié au cours du

développement de la baie de Baco blanc, en fonction du niveau d'effeuillage. Les étoiles situées au-dessus de certains points représentent des différences significatives entre les modalités d'effeuillage à stade phénologique égal tandis que, les lettres « ns » indiquent une absence de différence significative. La significativité a été obtenue par un test Wilcoxon-Mann-Whitney au risque  $\alpha$  de 5%. À chaque stade et pour chaque modalité, n = 18. L'effeuillage a été réalisé à fermeture de grappe (377 DJC) ..... 141

Figure 42 : Évaluation de différents symptômes de *B. cinerea* en fonction du niveau d'effeuillage appliqué et selon l'isolat utilisé durant le biotest. Les histogrammes en couleurs franches correspondent à l'échelle de gauche de chaque graphique tandis que les histogrammes en couleurs diluées correspondent à l'échelle de droite de chaque graphique. Figure (a), incidence et sévérité de brunissement causées par l'isolat P. Figure (b), incidence et sévérité de brunissement causées par la souche i. Figure (c), incidence et sévérité de sporulation causées par l'isolat P. Figure (d), incidence et sévérité de sporulation causées par la souche i. Les segments horizontaux présents entre deux histogrammes représentent les tests de Student réalisés au risque  $\alpha$  de 5 %. Les lettres minuscules « ns » signifient qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités concernées.....143

Figure 43 : Évaluation de symptômes de *B. cinerea* aux champs en fonction du niveau d'effeuillage sur Baco blanc à vendange. Figure (a), sévérité de l'infection par *B. cinerea* en fonction du niveau d'effeuillage. Figure (b), incidence de l'infection par *B. cinerea* en fonction du niveau d'effeuillage. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences statistiques .....145

Figure 44 : Cinétique des concentrations en eugénol total, libre et lié, dans les pellicules, au cours du développement de la baie de Baco blanc, en fonction du niveau d'éclaircissage. Figure (a), cinétique de la concentration totale en eugénol. Figure (b), cinétiques des concentrations en eugénol libre et lié. Les lettres minuscules de couleur situées au-dessus de certains points représentent des différences significatives entre les différents stades phénologiques à modalité d'éclaircissage identique. La significativité a été testée grâce à des tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5 %. Pour chaque modalité et à chaque stade, n = 18. L'éclaircissage a été réalisé à fermeture de grappe (548,02 DJC) .....146

Figure 45 : Évaluation de développement de *B. cinerea* en fonction du niveau d'éclaircissage appliqué et selon l'isolat utilisé durant le biotest. Les histogrammes en couleurs franches

correspondent à l'échelle de gauche de chaque graphique tandis que les histogrammes en couleurs diluées correspondent à l'échelle de droite de chaque graphique. Figure (a), incidence et sévérité de brunissement causées par l'isolat P. Figure (b), incidence et sévérité de brunissement causées par la souche i. Figure (c), incidence et sévérité de sporulation causées par l'isolat P. Figure (d), incidence et sévérité de sporulation causées par la souche i. Les segments horizontaux présents entre deux histogrammes représentent les tests de Student réalisés au risque  $\alpha$  de 5 %. Les lettres minuscules « ns » signifient qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités concernées.....148

Figure 46 : Concentrations en eugénol dans les eaux-de-vie blanches du millésime 2022 produites à partir de 3 variétés, le Baco blanc, la Folle blanche et l'Ugni blanc. Les concentrations sont représentées par des diagrammes en violon permettant de représenter la variabilité intra-variétale, couplés à des boîtes à moustaches afin de compléter cette représentation. La ligne horizontale de chaque boîtes à moustache indique la concentration médiane tandis que le point de couleur indique la concentration moyenne. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des diagrammes, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Baco blanc n = 69, Folle blanche n = 39, Ugni blanc n = 30).....156

Figure 47 : Teneurs ( $\text{g}\cdot\text{hL}^{-1}$  AP) en méthanol des eaux-de-vie du millésime 2022 en fonction de la variété considérée. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des diagrammes en violon sont issues d'un test de Newman-Keuls au seuil de risque  $\alpha$  de 5 %. La ligne horizontale de chaque boîtes à moustache indique la concentration médiane tandis que le point de couleur indique la concentration moyenne. Des lettres différentes indiquent des différences significatives. La ligne horizontale rouge indique la teneur maximale autorisée en méthanol dans une eaux-de-vie de vin, fixée par le Règlement UE 2019/787. Baco blanc n = 69, Folle blanche n = 39, Ugni blanc n= 30 ..... 161

Figure 48 : Concentrations en acétate d'isoamyle dans les eaux-de-vie blanches du millésime 2022 produites à partir de 3 variétés, le Baco blanc, la Folle blanche et l'Ugni blanc. Les concentrations sont représentées par des diagrammes en violon permettant de représenter la variabilité intra-variétale, couplés à des boîtes à moustaches afin de compléter cette représentation. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des diagrammes, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent

à des différences significatives entre les modalités concernées. Baco blanc n= 69, Folle blanche n = 39, Ugni blanc = 30 .....	165
Figure 49 : Fiche d'analyse sensorielle propre aux eaux-de-vie blanches d'Armagnac permettant d'établir le profil sensoriel de ces dernières.....	172
Figure 50 : Exemples de cercles de corrélation issus d'ACP. Figure (a), exemple d'un descripteur non-consensuel. Figure (b), exemple d'un descripteur plutôt consensuel. Les étiquettes « jea » suivies d'un chiffres représentent les numéros d'anonymat des panélistes .....	174
Figure 51 : Intensités moyennes des descripteurs (uniquement consensuels) de la même eau-de-vie répétée deux fois et anonymisée avec deux nombres à 3 chiffres (216 et 719). Figure (a), intensités moyennes des descripteurs consensuels en olfaction. Figure (b), intensités moyennes des descripteurs consensuels en rétro-olfaction. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95 %. Les segments horizontaux présents entre deux histogrammes représentent les tests de Student réalisés au risque $\alpha$ de 5 %. Les lettres minuscules « ns » signifient qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités concernées. Les noms A et AA pour les eaux-de-vie ne correspondent pas aux numéros donnés aux panélistes mais sont présentés ici sous cette forme par lisibilité. Pour chaque descripteur et pour chaque eau-de-vie, n = 22 .....	175
Figure 52 : Intensité moyenne des descripteurs (uniquement consensuels) des mêmes eaux-de-vie, anonymisées différemment, dégustées à 2 séances différentes et uniquement en bouche. L'ANOVA réalisée n'a montré aucune significativité pour l'interaction descripteur-séance (p-value = 0,24). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95 %. Les segments horizontaux présents entre deux histogrammes représentent les tests de Student réalisés au risque $\alpha$ de 5 %. Les lettres minuscules « ns » signifient qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités concernées. La double étoile représente une différence signification dont la p-value est inférieure à 0,01. Les lettres minuscules noires sont issues de tests de Newman-Keuls au seuil de risque $\alpha$ de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des groupes statistiques significativement différents. Afin de faciliter la lecture, les eaux-de-vie comparées entre elles sont représentées par des couleurs similaires et nuancées. L'ensemble des comparaisons (couple d'eaux-de-vie) est résumé dans le Tableau 29. Pour chaque descripteur et pour chaque eau-de-vie, n = 22 .....	178

Figure 53 : Classification Ascendante Hiérarchique des eaux-de-vie blanches dégustées au cours de la séance C et générée uniquement pour les descripteurs consensuels (« Beurré », « Empyreumatique », « Fruit confit », « Fruit cuit », « Fruit du verger », « Fruit exotique », « Végétal frais ») et pour l'analyse par olfaction uniquement. Les eaux-de-vie A et AA sont en fait la même eau-de-vie anonymisée de deux manières différentes. Les différentes couleurs représentent les groupes formés par la CAH.....179

Figure 54 : Classification Ascendante Hiérarchique des eaux-de-vie blanches dégustées au cours de la séance C. CAH générée uniquement pour les descripteurs consensuels (« Beurré », « Fruit confit », « Fruit du verger », « Fruit exotique », « Végétal frais ») et pour l'analyse par rétro-olfaction uniquement. Les eaux-de-vie A et AA sont en fait la même eau-de-vie anonymisée de deux manières différentes. Les différentes couleurs représentent les groupes formés par la CAH.....180

Figure 55 : Fréquences d'occurrence des descripteurs générés lors d'une description libre d'eaux-de-vie blanches de Baco blanc et d'Ugni blanc. Figure (a), fréquence d'occurrence des descripteurs générés lors de la dégustation olfactive et rétro-olfactive de 3 eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Figure (b), fréquence d'occurrence des descripteurs générés lors de la dégustation olfactive et rétro-olfactive de 3 eaux-de-vie blanches d'Ugni blanc. Les descripteurs dont la fréquence d'occurrence était inférieure à 2 % ont été supprimés .....183

Figure 56 : Corrélation entre la note de typicité moyenne attribuée aux eaux-de-vie blanches (n=20) par le panel de professionnels du BNIA et leur concentration en eugénol .....186

Figure 57 : Intensités moyennes perçues des différentes solutions hydroalcooliques à 40 % contenant soit de l'eugénol, soit de l'acétate d'isoamyle, soit un mélange des deux. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque solution, n = 22 .....192

Figure 58 : Intensités moyennes perçues des différentes eaux-de-vie, réduites à 40 % d'éthanol (v/v), supplémentées soit en eugénol, soit en acétate d'isoamyle, soit un mélange des deux. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences

significatives entre les modalités concernées. Les tests statistiques ont été réalisés par descripteur. Pour chaque descripteur et chaque eau-de-vie, n = 22 .....194

Figure 59 : Typicité moyenne perçue des différentes eaux-de-vie, réduites à 40 % d'éthanol (v/v), supplémentées soit en eugénol, soit en acétate d'isoamyle, soit par un mélange des deux. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. . Pour chaque descripteur et chaque eau-de-vie, n = 22.....197

Figure 60 : Contribution des facteurs aux concentration en eugénol (libre et lié) dans les différents produits (vins et eaux-de-vie) pour le plan d'expériences  $2^5$  mis en œuvre. Pour faciliter la lecture, seuls les facteurs dont la p-value est inférieure au risque  $\alpha$  de 0,05 apparaissent en couleur franche. Les autres facteurs apparaissent avec des couleurs atténuées. Pour chaque variable réponse, n = 96..... 207

Figure 61 : Concentrations en eugénol (libre et lié) dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (d1 et d2) par le facteur maturité (MAT). Les boîtes à moustaches sont reliées par la valeur de p-value du test de Student au risque  $\alpha$  de 5 %, sauf pour la figure (b), pour laquelle un test de Wilcoxon a été réalisé. Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Les points autour des boîtes à moustaches correspondent à toutes les expérimentations concernées par les modalités attenantes. Pour chaque variable et par niveau pris, n = 48 ..... 208

Figure 62 : Concentrations en eugénol (libre et lié) dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (E et nE) par le facteur enzymage (ENZ). Les boîtes à moustaches sont reliées par la valeur de p-value du test de Student au risque  $\alpha$  de 5 %. Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Pour chaque variable et par niveau pris, n = 48 .. 209

Figure 63 : Interactions entre les facteurs MAT et ENZ pour les teneurs en eugénol. Figure (a), interaction des facteurs MAT et ENZ pour la teneur en eugénol libre des vins. Figure (b),

interaction des facteurs MAT et ENZ pour la teneur en eugénol pour les distillats. « E » correspond aux produits enzymés et « nE » aux produits non enzymés ..... 211

Figure 64 : Concentrations en eugénol dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (1m et 3m) par le facteur temps de conservation sur lies (TdC). Les boîtes à moustaches sont reliées par la valeur de p-value du test de Student au risque  $\alpha$  de 5%. Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Pour chaque variable et par niveau pris, n = 48 .....212

Figure 65 : Corrélation positive entre les concentrations en eugénol libre dans les vins et en eugénol dans les distillats de Baco blanc. Cette corrélation est issue de l'ensemble des vins et eaux-de-vie du plan d'expériences. Les points représentent l'ensemble des triplicatas analytiques des 32 expériences (soit n = 96) .....213

Figure 66 : Contribution des facteurs aux concentration en eugénol (libre et lié) dans les différents produits (vins et distillats) pour le plan d'expériences  $3^3$  mis en œuvre. Pour faciliter la lecture, seuls les facteurs dont la p-value est inférieure au risque  $\alpha$  de 0,05 apparaissent en couleur franche. Les autres facteurs apparaissent avec des couleurs atténuées. Pour chaque variable réponse, n = 81 ..... 220

Figure 67 : Concentrations en eugénol (libre et lié) dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (B1, B2 et R) par le facteur enzymes aromatiques (AROM). Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Les points autour des boîtes à moustaches correspondent à toutes les expérimentations concernées par les modalités attenantes. Pour chaque variable réponse et pour un niveau de facteur, n = 27 .....221

Figure 68 : Concentrations en eugénol libre dans les vins et en eugénol dans les distillats en fonction des niveaux pris (A1, A2 et R) par le facteur débouillage (DEB). Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Les points autour des boîtes à moustaches correspondent à toutes les



expérimentations concernées par les modalités attenantes. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque variable réponse et pour un niveau de facteur,  $n = 27$  ..... 223

Figure 69 : Concentrations en eugénol libre et lié dans les vins et en eugénol dans les distillats en fonction des niveaux pris (C1, C2 et R) par le facteur travail sur lies (LIES). Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Les points autour des boîtes à moustaches correspondent à toutes les expérimentations concernées par les modalités attenantes. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque variable réponse et pour un niveau de facteur,  $n = 27$  ..... 224

Figure 70 : Corrélations linéaires entre TAV de coulage et concentration en eugénol d'eaux-de-vie d'Armagnac élaborées avec la variété Baco blanc. En jaune foncé sont représentés les points correspondant aux triplicata analytiques de 17 eaux-de-vie récoltées (soit  $n = 51$ ) durant la campagne 2020-2021 (millésime a2020). En orange sont représentés les points correspondant aux triplicata analytiques de 14 eaux-de-vie blanches récoltées (soit  $n = 42$ ) durant la campagne de distillation 2021-2022 (millésime a2021). En noir apparaît la corrélation linéaire et ses intervalles de confiance à 95 % de l'ensemble des deux millésimes. Les corrélations linéaires (ligne en pointillés) et les intervalles de confiance à 95 % de ces dernières sont représentés avec la même couleur que les points correspondant. Pour chaque corrélation sont indiqués, en usant de la même couleur, l'équation de la droite de régression ainsi que le R de Pearson ..... 227

Figure 71 : Comportement de l'eugénol au cours d'une distillation double-chauffe. Figure (a), comportement de l'eugénol au cours de la chauffe du vin. Sa concentration est suivie grâce à la courbe orange tandis que le TAV du distillat est suivi grâce à la courbe grise. Figure (b), comportement de l'eugénol au cours de la chauffe du vin. Sa concentration est suivie grâce à la courbe orange tandis que le TAV du distillat est suivi grâce à la courbe grise. La concentration est ici exprimée en  $\text{g}\cdot\text{hL}^{-1}$  d'AP ..... 228

- Figure 72 : Concentrations en eugénol dans des eaux-de-vie obtenues à partir d'un même alambic continu et selon l'activation de plusieurs annexes de cet alambic. En blanc apparaissent les TAV propres à chaque eau-de-vie. La modalité « cœur bonne chauffe » est en fait issue des données de distillation double-chauffe (plus précisément de la chauffe du vin disponible en Figure 71). Pour chaque modalité,  $n = 3$  ..... 229
- Figure 73 : Volatilités de l'eugénol en fonction du TAV d'un binaire liquide eau/éthanol, obtenues avec le modèle thermodynamique défini. Figure (a) en orange, volatilité absolue de l'eugénol. Figure (b), volatilités relatives de l'eugénol par rapport à l'eau et par rapport à l'éthanol..... 231
- Figure 74 : Évolutions du débit du coulage, du TAV et de la concentration en eugénol d'une eau-de-vie blanche, établies par simulation numérique en fonction de la quantité de chaleur apportée au bouilleur. Figure (a), évolution du débit de coulage et du TAV de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution de la quantité de chaleur apportée au bouilleur. Figure (b), évolution de la concentration en eugénol de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution de la quantité de chaleur apportée au bouilleur ..... 233
- Figure 75 : Évolutions du débit du coulage, du TAV et de la concentration en eugénol d'une eau-de-vie blanche, établies par simulation numérique en fonction du débit d'alimentation en vin. Figure (a), évolution du débit de coulage et du TAV de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit d'alimentation en vin. Figure (b), évolution de la concentration en eugénol de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit d'alimentation en vin ..... 234
- Figure 76 : Évolutions du débit du coulage, du TAV et de la concentration en eugénol d'une eau-de-vie blanche, établies par simulation numérique en fonction du débit de queue. Figure (a), évolution du débit de coulage et du TAV de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit de queue. Figure (b), évolution de la concentration en eugénol de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit de queue..... 235
- Figure 77 : Diagrammes en violon des teneurs en cuivre dans les eaux-de-vie en fonction des différentes variétés. Dans chaque diagramme est représentée par un point de couleur la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Les points noirs à l'intérieur des violons représentent les triplicatas d'analyse. Enfin, au-dessus de chaque violon sont indiqués : la valeur maximale (max), la valeur moyenne (moy), la valeur minimale (min) et le nombre d'eaux-de-vie (n).  
..... 237

Figure 78 : Influence du cuivre sur le dosage de l'eugénol dans une matrice solution hydroalcoolique (SHA) à 10 % (v/v). Les lettres minuscules noires, oranges ou rouges, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 % ou de tests de Kruskal-Wallis en fonction des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des données. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Figure (a), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les aires des étalons internes utilisés, eugénol-d<sub>3</sub> et 4EP-d<sub>10</sub>, et sur le composé étudié, l'eugénol. Figure (b), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les concentrations en eugénol en fonction de l'étalon interne utilisé .....240

Figure 79 : Influence du cuivre sur le dosage de l'eugénol dans une matrice eau-de-vie de Baco blanc diluée au 1/5<sup>e</sup>. Les lettres minuscules noires, oranges ou rouges, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 % ou de tests de Kruskal-Wallis en fonction des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des données. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Figure (a), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les aires des étalons internes utilisés, eugénol-d<sub>3</sub> et 4EP-d<sub>10</sub>, et sur le composé étudié, l'eugénol. Figure (b), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les concentrations en eugénol en fonction de l'étalon interne utilisé. ....241

Figure 80 : Proposition de structure pour un complexe eugénol-cuivre de stœchiométrie 1:1 (Upadhyaya *et al.*, 2014)..... 243

Figure 81 : Proposition de structure pour un complexe eugénol-cuivre de stœchiométrie 2:1 (Siddiqui *et al.*, 2020) ..... 243

Figure 82 : Structures de l'EDTA. Figure (a), structure plane de l'EDTA sous forme tétraacide. Figure (b), structure de l'EDTA en tant que chélatant et formant une pince autour d'un élément métallique (M rouge) ..... 245

Figure 83 : Influence du cuivre sur le dosage de l'eugénol dans des matrices solutions hydroalcooliques (SHA) à 10 % (v/v) et eaux-de-vie de Baco blanc additionnées d'EDTA. Les lettres minuscules noires, oranges ou rouges, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 % ou de tests de Kruskal-Wallis en fonction des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des données. Des lettres

différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Figure (a), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les aires des étalons internes utilisés, eugénol-d<sub>3</sub> et 4EP-d<sub>10</sub>, et sur le composé étudié, l'eugénol dans des solutions hydroalcooliques. Figure (b), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les aires des étalons internes utilisés, eugénol-d<sub>3</sub> et 4EP-d<sub>10</sub>, et sur le composé étudié, l'eugénol, dans des eaux-de-vie. Figure (c), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les concentrations en eugénol en fonction de l'étalon interne utilisé dans des solutions hydroalcooliques. Figure (d), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les concentrations en eugénol en fonction de l'étalon interne utilisé dans des eaux-de-vie ..... 247

Figure 84 : Figure (a), histogrammes représentant les quantifications de l'eugénol selon les deux méthodes précédemment présentées, CLASS représente la méthode classique, EDTA représente la méthode utilisant l'EDTA disodique. De plus, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux méthodes par eau-de-vie (Test de Student au risque  $\alpha$  de 5 %). Figure (b), corrélation positive entre les quantifications d'eugénol selon les deux méthodes. Corrélation réalisée grâce aux 14 mêmes eaux-de-vie présentées à la figure (a). Les points noirs représentent les triplicatas pour chaque méthode ..... 248

Figure 85 : Concentrations moyennes en phénols volatils des eaux-de-vie de Baco blanc, de Folle blanche et d'Ugni blanc. Les lettres de couleur au-dessus des histogrammes correspondent à des tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5 %, sauf pour le 4VG pour lequel un test de Newman-Keuls Wallis au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives. Pour chaque composé, Baco blanc = 136 ; Folle blanche = 44 ; Ugni blanc = 60 ..... 252

Figure 86 : Biosynthèse des phénols volatils ..... 254

Figure 87 : Concentrations en 4VP dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (E et nE) par le facteur enzymage (ENZ). Figure (a), concentration en 4VP dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en 4VP dans les distillats (EdV). Les boîtes à moustaches sont reliées par la valeur de p-value du test de Student au risque  $\alpha$  de 5%. Pour chaque variable réponse et par niveau pris, n = 48. .... 258

- Figure 88 : Concentrations en 4VP dans les différents produits de Baco blanc (vins et eaux-de-vie) en fonction des niveaux pris (B1, B2 et R) par le facteur maturité (AROM). Figure (a), concentration en 4VP dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en 4VP dans les eaux-de-vie blanches (EdV). Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque variable réponse et par niveau pris,  $n = 27$  ..... 260
- Figure 89 : Volatilités du 4VP en fonction du TAV d'un binaire liquide eau/éthanol, obtenues avec le modèle thermodynamique défini. Figure (a) en orange, volatilité absolue du 4VP. Figure (b), volatilités relatives du 4VP par rapport à l'eau et par rapport à l'éthanol .... 261
- Figure 90 : Évolution de la concentration en 4VP de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution des paramètres opératoires considérés. Figure (a), évolution de la concentration en 4VP de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution de la quantité de chaleur apportée au bouilleur. Figure (b), évolution de la concentration en 4VP de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit de queue. Figure (c), évolution de la concentration en 4VP de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit d'alimentation en vin ..... 262
- Figure 91 : Schéma récapitulatif de la stratégie analytique d'identification des précurseurs de l'eugénol. Chaque étape a fait l'objet d'un paragraphe spécifique. La vérification de libération d'eugénol par HS-SPME-GC/MS a été réalisée à chaque étape..... 270
- Figure 92 : Rendements d'extraction de l'eugénol lié en fonction des fractions d'extraction (surnageant = extrait S/L, et culot). La poudre de pellicule représente le maximum d'eugénol à extraire soit 100 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque matrice,  $n = 2$  ..... 272
- Figure 93 : Rendements d'extraction de l'eugénol lié en fonction du gradient d'acétonitrile (ACN) appliqué. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Le segment pointillé permet de séparer les 2 types d'élutions comparés : une seule élution et 3 élutions successives. Pour chaque matrice,  $n = 2$  ..... 274

- Figure 94 : Rendement d'extraction de l'eugénol libérable en fonction des SPE par échange d'ions utilisées. La poudre de pellicule représente le maximum d'eugénol à extraire soit 100 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque matrice,  $n= 2$ .. 276
- Figure 95 : Chromatogrammes superposés HPLC-QqQ/MS en mode scan de l'extrait brut et des deux éluats après SPE par échange de cations et SPE par échange d'anions ..... 276
- Figure 96 : Comparaison entre la performance de libération des précurseurs de l'eugénol par une hydrolyse enzymatique (HyE) avec la performance de libération de ces mêmes précurseurs par une hydrolyse acide à chaud (HyAC). La p-value faisant le lien entre deux histogrammes est issue d'un test de Student au risque  $\alpha$  de 5%. Pour chaque matrice,  $n = 3$  ..... 277
- Figure 97 : Chromatogrammes obtenus par HS-SPME-GC/MS en mode SIM pour l'ion 164 (eugénol) sur les échantillons de fractions hydrolysées. Figure (a), chromatogrammes superposés des différentes fractions hydrolysées après le premier fractionnement par HPLC. Figure (b), chromatogrammes superposés des différentes fractions hydrolysées après le deuxième fractionnement par HPLC. Figure (c), chromatogrammes superposés des différentes fractions hydrolysées après le troisième et dernier fractionnement par HPLC..... 280
- Figure 98 : Chromatogrammes LC/MS en mode scan de différents extraits de l'échantillon de poudre de pellicules de Baco blanc. Figure (a), chromatogrammes LC/MS en mode scan de l'extrait de poudre de pellicules de Baco blanc après SPE XA. La durée de l'analyse est de 90 minutes. Figure (b), chromatogramme en mode scan des fractions 51, 52 et 53...281
- Figure 99 : Spectres en mode scan de la fraction 52. Figure (a), spectre obtenu en ESI+. Figure (b), spectre obtenu en ESI- ..... 282
- Figure 100 : Analyse UHPLC-HRMS du standard de géoside (a) et de la fraction 51 (b). Full scan (a2) et fragmentation MS/MS de l'ion avec le rapport  $m/z = 457,1724$  (a3) pour le standard de géoside. Full scan (b2) et fragmentation MS/MS de l'ion avec un rapport  $m/z = 457,1721$  (b3) pour le pic au temps de rétention 6,45 min dans la fraction 51 ..... 284
- Figure 101 : Structures des principaux oses susceptibles d'entrer dans la composition de plusieurs précurseurs de l'eugénol. Figure (a),  $\alpha$ -L-rhamnopyranose. Figure (b),  $\alpha$ -L-arabinofuranose. Figure (c),  $\beta$ -D-glucopyranose. Figure (d),  $\beta$ -D-apiofuranose ..... 285

Figure 102 : Structures moléculaires des potentiels précurseurs de l'eugénol retrouvés dans le Baco blanc. Le composé **1** correspond au géoside (eugényl-6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) et le standard est disponible. Le composé **2** est l'eugényl-6-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside qui a également pu être acheté dans le commerce. Le composé **3** correspond à l'eugényl-6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside qui n'est pas disponible à l'achat. Le composé **4** est la citrusine C (eugényl  $\beta$ -D-glucopyranoside), hétéroside simple de l'eugénol dont le standard commercial est disponible ..... 286

Figure 103 : Chromatogramme de la solution contenant les différents standards de précurseurs de l'eugénol : (1) géoside, (2) citrusine C, (3) premier pic de l'eugényl-6-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside et (4) second pic de l'eugényl-6-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside..... 289

Figure 104 : Calibrations des potentiels précurseurs de l'eugénol réalisées sur 11 jours (n=9). Figure (a), calibration du géoside. Figure (b), calibration de la citrusine C ..... 291

Figure 105 : Concentrations en précurseurs de l'eugénol quantifiables en fonction de la variété de vigne étudiée dans la région Armagnac. Figure (a), concentrations en géoside dans les différentes variétés de vignes étudiées. Figure (b), concentrations en citrusine C dans les différentes variétés de vignes étudiées. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Les histogrammes surmontés des lettres « nd » représentent des matrices où les concentrations en précurseurs de l'eugénol étaient inférieures à la LOD..... 294

Figure 106 : Concentrations molaires de l'eugénol lié et des précurseurs de l'eugénol identifiés dans les pellicules au cours du développement de la baie. Les cinétiques de concentrations sont exprimées en fonction du nombre de degré de jour de croissance (quantité de chaleur accumulée par la vigne depuis la floraison). Les stades phénologiques correspondants sont inscrits au-dessus des courbes. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des points, sont issues de test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Ces statistiques ont été réalisées afin de comparer les composés entre eux à un stade phénologique donné ..... 296

Figure 107 : Activités antifongiques des précurseurs de l'eugénol en fonction de la dose appliquée. Figure (a), effet antifongique du géoside en fonction des doses appliquées et des isolats de *B. cinerea* utilisés. Figure (b), effet antifongique de la citrusine C en fonction des doses appliquées et des isolats de *B. cinerea* utilisés. Les lettres minuscules bleues, oranges et vertes, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Ces statistiques ont été réalisées afin de comparer les doses appliquées d'un même produit en fonction d'un isolat de *B. cinerea* .....299





LISTE DES TABLEAUX.....	
Tableau 1: Caractéristiques analytiques réglementaires des vins destinés à la distillation .....	27
Tableau 2 : Composition chimique d'une eau-de-vie blanche d'Armagnac. Les teneurs sont exprimées en mg·L <sup>-1</sup> pour une eau-de-vie titrée à 60 % d'éthanol (v/v), sauf indication contraire, mais également en g·hL <sup>-1</sup> d'Alcool Pur. Il s'agit donc de la composition d'une eau-de-vie blanche brute et non commerciale. À chaque fois sont données les teneurs moyennes mais également les teneurs maximales retrouvées dans une eau-de-vie blanche .....	32
Tableau 3 : Caractérisation des produits de biocontrôle autorisés à l'utilisation pour la lutte contre <i>B. cinerea</i> en France. ( <i>Index acta biocontrôle</i> , 2023). SDP = Stimulation de Défense des Plantes .....	45
Tableau 4 : Caractéristiques des différents fongicides utilisés pour la lutte contre <i>B. cinerea</i> (Ajouz, 2009; Couteux <i>et al.</i> , 2008) et <a href="http://e-phy.agriculture.gouv.fr/">http://e-phy.agriculture.gouv.fr/</a> .....	46
Tableau 5 : Principales caractéristiques chimiques et physiques de l'eugénol.....	50
Tableau 6 : Répartition (non-exhaustive) de l'eugénol au sein du règne végétal (Raja <i>et al.</i> , 2015) .....	51
Tableau 7 : Caractéristiques des précurseurs hétérosidiques de l'eugénol. M désigne la masse molaire moléculaire des composés.....	56
Tableau 8 : Effets de la concentration en éthanol sur le seuil de détection de plusieurs composés aromatiques en µg·L <sup>-1</sup> (Ickes & Cadwallader, 2017). Les lettres minuscules en exposant font référence à de la littérature scientifique : a (Rychlik <i>et al.</i> , 1998), b (Guth, 1997), c (K.-Y. M. Lee <i>et al.</i> , 2000), d (Poisson & Schieberle, 2008), e (Uselmann & Schieberle, 2015), f (Willner <i>et al.</i> , 2013).....	60
Tableau 9 : Composés nécessaires à la mise en place des tests <i>in vitro</i> .....	71
Tableau 10 : Résumé des tests <i>in vitro</i> mis en œuvre. Les doses indiquées sont celles des produits testés et non pas des témoins.....	72
Tableau 11 : Caractéristiques professionnelles et personnelles des panélistes experts du BNIA sur l'ensemble des 3 années d'analyses sensorielles. Le paramètre profession a été divisé entre les professionnels directement liés à la production d'Armagnac et ceux travaillant plus largement dans la filière Armagnac (laboratoire d'analyse, interprofession etc.)....	86

Tableau 12 : Caractéristiques professionnelles et personnelles des panélistes experts de l'UMR ŒNOLOGIE pour l'année 2023 .....	86
Tableau 13 : Composés de référence utilisés pour la quantification des phénylpropènes et des phénols volatils. Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (*) .....	91
Tableau 14 : Conditions et caractéristiques de l'analyse par HS-SPME-GC/MS des phénylpropènes et phénols volatils. Durant l'adsorption sur la fibre SPME, l'agitation était divisée en plusieurs cycles de 60 s, entrecoupés de 10 s de pause. Après désorption et injection, la fibre était insérée dans le poste de conditionnement durant 5 min à 200 °C avant extraction de l'échantillon suivant. Concernant l'acquisition, pour chaque composé est présenté son temps de rétention ( $t_R$ ) ainsi que les ions sélectionnés pour le mode SIM (ion quantifieur en gras suivi des ions qualifieurs). Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (*) .....	95
Tableau 15 : Composés de référence utilisés pour la quantification des esters. Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (*) .....	96
Tableau 16 : Conditions et caractéristiques de l'analyse par HS-SPME-GC/MS des esters. Concernant l'acquisition, pour chaque composé est présenté son temps de rétention ( $t_R$ ) ainsi que les ions sélectionnés pour le mode SIM (ion quantifieur en gras suivi des ions qualifieurs). Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (*) .....	98
Tableau 17 : Composés de référence utilisés pour la quantification des alcools supérieurs, de l'éthanal, de l'acétate d'éthyle, du 1,1-diéthoxyéthane et du méthanol. Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (*) .....	99
Tableau 18 : Conditions et caractéristiques de l'analyse par LIQ-GC/FID des alcools supérieurs, de l'éthanal, de l'acétate d'éthyle et du méthanol. En orange, apparaissent les caractéristiques spécifiques d'analyse du 2-phényléthanol. En effet ce dernier a fait l'objet d'une injection séparée .....	100
Tableau 19 : Composés et solvants utilisés pour la quantification des précurseurs de l'eugénol .....	102
Tableau 20 : Gradient optimisé et retenu pour la séparation des différents standards .....	103
Tableau 21 : Paramètres des transitions ion parent vers ions fils .....	104

Tableau 22 : Vitesses moyennes de croissance des différents isolats de <i>B. cinerea</i> en fonction du mode d'application (direct ou vapeur) et de la concentration en éthanol, 7 jours après inoculation. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ écart-type. Les lettres minuscules indiquées en exposant après chaque résultat sont issues de test de Kruskal-Wallis au risque $\alpha$ de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées (ici les tests ont été réalisés par isolat mycélien et par mode d'application).....	115
Tableau 23 : Résumé des différentes modalités mises en œuvre dans le cas du plan d'expériences à niveau mixte .....	117
Tableau 24 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expérience mis en œuvre. Pour chaque facteurs étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou eaux-de-vie) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque $\alpha$ de 1 % sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs, les interactions entre eux sont indiquées par deux points .....	118
Tableau 25 : Résumé des Indices de Maturité Technologique des différentes modalités d'éclaircissage en fonction des stades phénologiques. Aucune différence significative n'a été décelée d'où l'absence de lettres de significativité. Des tests statistiques indépendants ont été réalisés à chaque stade phénologique .....	147
Tableau 26 : Concentrations en éthanal, acétal et alcools supérieurs des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, de Folle blanche et d'Ugni blanc. Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne $\pm$ écart-type. Les lettres minuscules en exposant, placées après l'écart-type sont issues des tests de Kruskal-Wallis au risque $\alpha$ de 5 %. Afin de faciliter la lecture, les teneurs en composés pour lesquels des différences significatives ont été détectées, apparaissent en police orange et gras .....	159
Tableau 27 : Concentrations en esters éthyliques des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, de Folle blanche et d'Ugni blanc. Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne $\pm$ écart-type. Les lettres minuscules en exposant, placées après l'écart-type sont issues des tests de Kruskal-Wallis au risque $\alpha$ de 5 %. Afin de faciliter la lecture, les concentrations des	

composés pour lesquels des différences significatives ont été détectées, les concentrations apparaissent en police orange et gras .....	163
Tableau 28 : Concentrations en acétates d'alcools supérieurs des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, de Folle blanche et d'Ugni blanc. Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne $\pm$ écart-type. Les lettres minuscules en exposant, placées après l'écart-type sont issues des tests de Kruskal-Wallis au risque $\alpha$ de 5 % (sauf pour l'acétate d'hexyle, pour lequel, un test de Newman-Keuls a été effectué au seuil de risque $\alpha$ de 5 %). Afin de faciliter la lecture, les composés pour lesquels des différences significatives ont été détectées, les concentrations apparaissent en police orange et gras.....	164
Tableau 29 : Résumé des comparaisons proposées entre les eaux-de-vie blanches dégustées d'une séance à l'autre. Les couleurs correspondent à celles utilisées dans la Figure 52 afin de faciliter la lecture. Pour chaque variété, une comparaison comprend 3 eaux-de-vie, anonymisées différemment, dégustées pour s'assurer de la répétabilité de la notation. Les noms données aux eaux-de-vie ne sont pas les numéros anonymisés donnés aux panélistes .....	177
Tableau 30 : Résumé des tests triangulaires réalisés afin de déterminer une potentielle influence gustative et/ou somesthésique de l'eugénol lors de la dégustation de matrices fortement alcoolisées. L'ensemble des présentations possibles pour un test triangulaire a été présenté au panel de professionnels du BNIA, de manière équilibrée .....	188
Tableau 31 : Concentrations testées pour la détermination des seuils de perception de l'acétate d'isoamyle en solution hydroalcoolique à 40 % (v/v) .....	189
Tableau 32 : Résumé des différentes solutions de référence utilisées pour la sensibilisation du panel. L'ensemble des préparations a été filtré. Les solutions, exceptée celle de bonbon à la banane, ont été ajoutées de SO <sub>2</sub> à 1 mg·L <sup>-1</sup> ainsi que d'acide ascorbique à 5 mg·L <sup>-1</sup> afin de les conserver sans altérer leurs qualités aromatiques. Le séchage des banane a été réalisé avec un déshydrateur alimentaire Fruit Jerky Steel 10 (Chal-Tec GmbH, Strasbourg, France) . Toutes les solutions ont été préparées à la veille de la séance de dégustation et conservées à 4 °C dans des bouteilles en verres de 75 cL, inertées au diazote .....	191
Tableau 33 : Séries d'eaux-de-vie de Baco blanc supplémentées en eugénol et en acétate d'isoamyle afin d'évaluer l'influence d'une molécule sur l'autre, pour la notation d'intensité perçue de certains descripteurs de banane.....	193

Tableau 34 : Séries d'eaux-de-vie de Baco blanc supplémentées en eugénol et en acétate d'isoamyle afin d'évaluer l'influence d'une molécule sur l'autre, pour la notation de la typicité.....	196
Tableau 35 : Résumé des différentes vinifications mises en œuvre dans le cas du plan d'expérience factoriel complet 2 <sup>5</sup> . Pour la maturité, d1 correspond à une date précoce de vendange (16 septembre 2021) tandis que d2 correspond à une date de récolte proche de ce qu'un vigneron armagnacais mettrait en place (5 octobre 2021). Pour le débouillage, D correspond à un débouillage strict, assisté par l'usage d'une préparation enzymatique pectolytique, pour atteindre 300 NTU et nD pour les moûts non-débouillés (> 1 000 NTU). Concernant l'enzymage, E représente les vins enzymés avec une préparation enrichie en activité $\beta$ -glucosidase, et ce en fin de FA tandis que nE représente les vins non enzymés. Pour le temps de conservations sur lies, 1m et 3m sont les durées de conservations, respectivement de 1 et 3 mois avant distillation des vins. Enfin pour le taux de lies, S regroupe les vins entièrement soutirés (lies fines conservées) et L, les vins laissés sur la totalité des lies.....	204
Tableau 36 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expériences 2 <sup>5</sup> . Pour chaque facteur étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou distillats) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les 2 niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque $\alpha$ de 5 % sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs ; les interactions entre eux sont indiquées par deux points. ....	206
Tableau 37 : Résumé des préparations enzymatiques utilisées durant la seconde expérimentation œnologique.....	216
Tableau 38 : Résumé des principales activités enzymatiques retrouvées en œnologie ainsi que leurs principales applications technologiques ( <a href="https://www.vignevin.com/publications/les-itineraires/">https://www.vignevin.com/publications/les-itineraires/</a> ).....	217
Tableau 39 : Résumé des différentes vinifications mises en œuvre dans le cas du plan d'expérience factoriel complet 3 <sup>3</sup> . Pour chaque facteur, le code de la préparation enzymatique, issu du Tableau 37, a été utilisé pour expliciter le niveau pris par le facteur. Le niveau R se retrouvant dans chaque facteur correspond au niveau « Rien », un niveau témoin pour lequel aucune préparation enzymatique n'a été utilisée. Dans ce cadre, pour	

le débourbage (DEB), la modalité R correspondait à un vin non débourbé (> 1 000 NTU)  
.....218

Tableau 40 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expériences  $3^3$  mis en œuvre. Pour chaque facteur étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou distillats) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les 3 niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque  $\alpha$  de 5 % sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs, les interactions entre eux sont indiquées par deux points .....219

Tableau 41 : Caractéristiques des 8 solutions hydroalcooliques à 10 % (v/v) préparées avec du sulfate de cuivre afin de déterminer l'influence du cuivre sur la quantification de la concentration en eugénol. La solution à  $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cuivre, est une solution témoin. Pour chaque solution, la masse molaire moléculaire du sulfate de cuivre pentahydraté a été prise en compte afin d'obtenir la concentration désirée en cuivre métal..... 239

Tableau 42 : Concentrations en acides *p*-coutarique et *p*-coumarique des vins de plusieurs variétés de vigne. 1 : Les valeurs sont issues des travaux de (Okamura & Watanabe, 1981)  
..... 255

Tableau 43 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expériences  $2^5$  mis en œuvre en 2021. Pour chaque facteur étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou distillats) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les 2 niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque  $\alpha$  de 5 % sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs, les interactions entre eux sont indiquées par deux points ..... 257

Tableau 44 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expériences  $3^3$  mis en œuvre. Pour chaque facteur étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou distillats) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les 3 niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque  $\alpha$  de 5% sont inscrites en gras et orange. Dans la

première colonne sont inscrits les facteurs, les interactions entre eux sont indiquées par deux points .....	259
Tableau 45 : Gradient utilisé pour les fractionnements successifs par HPLC de l'extrait purifié .....	278
Tableau 46 : Description des fractionnements successifs ayant permis la détermination des précurseurs de l'eugénol. Les fractions et intervalles apparaissant en orange correspondent aux fractions dont l'hydrolyse enzymatique a révélé la plus grande concentration en eugénol .....	280
Tableau 47 : Gradient utilisé pour les analyses en UHPLC/HRMS.....	283
Tableau 48 : Gradient optimisé et retenu pour la séparation des différents standards des glycosides d'intérêt .....	288
Tableau 49 : Paramètres des transitions ion parent – ion fils.....	289
Tableau 50 : Caractéristiques des gammes de calibrations (5 gammes répétées le même jour) et des limites de détection et de quantification pour le géoside et la citrusine C.....	290
Tableau 51 : Caractéristiques de la répétabilité et du recouvrement de la méthode de quantification des précurseurs de l'eugénol : géoside et citrusine C. $[\bar{x}]$ = concentration moyenne ; $\sigma$ = écart-type ; cv = coefficient de variation ; Rcv = recouvrement.....	292
Tableau 52 : Évolutions des concentrations en eugénol lié, en géoside et en citrusine C au cours du développement de la baie de Baco blanc. Sont présentées les valeurs moyennes (n = 3) $\pm$ leurs écarts-types. Entre parenthèse sont indiqués les pourcentages d'évolution de la concentration par rapport au stade phénologique précédent. Les valeurs exprimées en mg eug·kg <sup>-1</sup> correspondent aux concentrations en mg d'équivalent eugénol par kg de pellicule .....	297
Tableau 53 : Résumé des doses et des souches employées lors du test <i>in vitro</i> de la capacité antifongique des précurseurs de l'eugénol. La dose d0 correspond à un témoin ne contenant qu'une solution hydroalcoolique à 30 % (v/v).....	298
Tableau 54 : Équivalence des doses de précurseurs de l'eugénol appliquées, en eugénol potentiellement actif.....	299



LISTE DES ÉQUATIONS.....	
Équation 1 : Surface d'une ellipse où $\Phi_a$ est un premier diamètre et $\Phi_b$ un autre diamètre, orthogonal au premier) .....	73
Équation 2 : Inhibition de croissance de <i>B. cinerea</i> , exprimée en % où $S_C$ représente la surface mycélienne d'une boîte témoin, $S_0$ la surface initiale de l'implant mycélien et $S_s$ la surface mycélienne d'une modalité traitée .....	74
Équation 3 : Calcul du taux de contact entre grappes ( $\tau$ ) .....	83
Équation 4 : Concentration en eugénol lié obtenue après analyse HS-SPME-GC/MS d'échantillons hydrolysés et non hydrolysés .....	94
Équation 5 : Calcul du taux de recouvrement de l'eugénol. Les matrices desquelles sont issues les concentrations en eugénol sont indiquées en indice .....	94



LISTE DES ANNEXES.....	
Annexe 1 : Règles concernant les comptes d'âges des eaux-de-vie et correspondance avec les mentions de vieillissement présent sur l'étiquetage.....	352
Annexe 2 : Fiche de caractérisations professionnelle et personnelle.....	353
Annexe 3 : Fréquence de citation des 107 descripteurs retenus lors de la seconde étape de réduction du vocabulaire généré par les panélistes avant regroupement.....	356
Annexe 4 : Systématique de Noble représentée sous la forme d'une roue (Noble <i>et al.</i> , 1987). .....	357
Annexe 5 : Classifications Ascendantes Hiérarchiques obtenues après réponses aux questionnaires par les panélistes. Chaque CAH représente 1 questionnaire.....	358
Annexe 6 : Fiche complémentaire à la fiche de dégustation propre aux eaux-de-vie blanches. Elle reprend l'ensemble des descripteurs regroupés autour de ceux présents sur la fiche de dégustation. Ce complément devait servir d'aide aux panélistes.....	359
Annexe 7 : CAH pour la discrimination des eaux-de-vie blanches dégustées selon les descripteurs consensuels : pour la figure (a) = Agrumes, Beurré, Fruit cuit, Fruit surmûri, Fruit du verger, Fleur capiteuse, Végétal frais ; pour la figure (b) = Beurré, Fruit cuit, Fruit du verger ; pour la figure (c) = Fruit exotique, Confiserie, Végétal frais, Végétal sec, Anisé, Épicé ; pour la figure (d) = Fruit surmûri, Fruit cuit, Confiserie ; pour la figure (g) = Fruit exotique, Fruit surmûri, Confiserie ; et pour la figure (h) = Fruit exotique, Fruit surmûri, Confiserie, Fleur capiteuse, Épicé.....	360
Annexe 8 : Protocole de microdistillation double-chauffe utilisé pour les expérimentations œnologiques.....	361



LISTE DES ABRÉVIATIONS .....

<b>3MPE</b>	3-MercaptoPropionate d'Éthyle
<b>4EG</b>	4-ÉthylGaïacol
<b>4EP</b>	4-ÉthylPhénol
<b>4VG</b>	4-VinylGaïacol
<b>4VP</b>	4-VinylPhénol
<b>ACP</b>	Analyse en Composante Principale
<b>AI</b>	Acétate d'Isoamyle
<b>AM</b>	Anthranilate de Méthyle
<b>ANOVA</b>	ANalysis Of VAriance
<b>AOC</b>	Appellation d'Origine Contrôlée
<b>AOP</b>	Appellation d'Origine Protégée
<b>AP</b>	Alcool Pur
<b>AV</b>	Acidité Volatile
<b>Aw</b>	Activité de l'eau
<b>BB</b>	Baco blanc
<b>BBCH</b>	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHEmische Industrie
<b>BNIA</b>	Bureau National Interprofessionnel de l'Armagnac
<b>CAH</b>	Classification Ascendante Hiérarchique
<b>CAS</b>	Chemical Abstracts Service
<b>CE</b>	Communauté Européenne
<b>CE</b>	Conseil de l'Europe
<b>CEE</b>	Communauté Économique Européenne
<b>CI</b>	Concentration Inhibitrice
<b>CRINAO</b>	Comité Régional de l'Institut Nationale de l'Origine et de la Qualité
<b>CRITT</b>	Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>cv</b>	Cultivar
<b>DJC</b>	Degrès Jour de Croissance
<b>DoE</b>	Design of Experiments
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra Acétate
<b>edv</b>	eau-de-vie
<b>ENTAV</b>	Établissement National Technique pour l'Amélioration de la Viticulture
<b>EtOH</b>	Éthanol
<b>eug</b>	eugénol
<b>FA</b>	Fermentation Alcoolique
<b>FID</b>	Flame Ionisation Detector
<b>FML</b>	Fermentation MaloLactique
<b>GC</b>	Gas Chromatography
<b>GIE</b>	Groupement d'Intérêt Économique
<b>GPTE</b>	Génie des Procédés et Technologie Environnementale
<b>H<sub>2</sub>O</b>	eau
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Acide Sulfurique

<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HR</b>	Humidité Relative
<b>HRMS</b>	High Resolution Mass Spectrometry
<b>HS</b>	Head Space
<b>HyAC</b>	Hydrolyse Acide à Chaud
<b>HyE</b>	Hydrolyse Enzymatique
<b>IFV</b>	Institut Français de la Vigne et du Vin
<b>IGP</b>	Indication Géographique Protégée
<b>INAO</b>	Institut National de l'Origine et de la Qualité
<b>INRAE</b>	Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
<b>IRTF</b>	Infra Rouge à Transformée de Fourier
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>ISVV</b>	Institut Scientifique de la Vigne et du Vin
<b>LC</b>	Liquid Chromatography
<b>LOD</b>	Limit Of Detection
<b>LOQ</b>	Limit Of Quantification
<b>MA</b>	Malt-Agar
<b>MDS</b>	Multi Dimensionnal Scaling
<b>MS</b>	Mass Spectrométrie
<b>N<sub>2</sub></b>	diazote
<b>NaCl</b>	Chlorure de Sodium
<b>nd</b>	non déterminé
<b>NDVI</b>	Normalized Difference Vegetation Index
<b>NF</b>	Norme Française
<b><i>o</i>-AAP</b>	<i>ortho</i> -AminoAcétoPhénone
<b>ODG</b>	Organisme de Défense et de Gestion
<b>OIV</b>	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
<b>PDA</b>	Potatoe Dextrose Agar
<b>pH</b>	potentiel Hydrogène
<b>PTFE</b>	PolyTétraFluoroÉthylène
<b>QqQ</b>	Triple Quadripôle
<b>R&amp;D</b>	Recherche & Développement
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>SAVE</b>	Santé et Agroécologie du Vignoble
<b>SDP</b>	Stimulation de Défense des Plantes
<b>SHA</b>	Solution HydroAlcoolique
<b>SIM</b>	Single Ion Monitoring
<b>SLE</b>	Solid-Liqui Extraction
<b>SO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de soufre
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction
<b>SPME</b>	Solid Phase Micro Extraction
<b>TAV</b>	Titre Alcoolique Volumétrique
<b>UB</b>	Ugni Blanc

<b>UE</b>	Union Européenne
<b>UHPLC</b>	Ultra High Performance Liquid Chromatography
<b>UICPA</b>	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
<b>UMR</b>	Unité Mixte de Recherche
<b>var</b>	Variété
<b>XA</b>	Échange d'Anions
<b>XC</b>	Échange de Cations





---

# Introduction

---

*La seule chose que l'on puisse décider est quoi faire du temps qui nous est imparti*

John Ronald Reuel Tolkien



1898, Bélus dans les Landes, François Baco instituteur de son état, crée le Baco 22A. Cette variété de vigne hybride, initialement développée pour lutter contre la crise phylloxérique de la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, est issue du croisement entre le Piquepoult (la Folle Blanche) et le Noah. Il est aujourd'hui mieux connu sous le nom de Baco blanc. Son histoire tumultueuse est jalonnée d'une étrange alternance entre interdiction, tolérance, autorisation et sauvetage par quelques vigneron gascons irrésistiblement attachés à ce fleuron régional. Car le Baco blanc présente plus d'un intérêt : il produit facilement, sa reprise après les gelés est appréciable mais surtout, sa tolérance plus ou moins reconnue, le rend bien moins dépendant aux produits phytosanitaires. De plus, si le statut de variété de chaudière fait du Baco blanc une vigne définitivement armagnacaise, les eaux-de-vie produites à partir de son vin aux notes typiques sont paradoxalement, uniques mais difficiles à caractériser. L'Armagnac, non content d'être le spiritueux à pouvoir être produit à partir de l'unique variété hybride autorisée dans une AOC française, est élaboré par distillation continue. Dans une époque où la réduction de la consommation énergétique globale apparaît comme une absolue nécessité, les distillateurs armagnacais jouissent de cet alambic continu multi-étagé, bien plus intégré d'un point de vue thermodynamique que son homologue discontinu à repasse tant prisé des cognaçais. Si le terme précurseur ne doit pas être dévoyé, il est toujours difficile de déterminer quand l'intuition décriée devient fait admis, mais force est de constater que les vigneron et distillateurs armagnacais ont su faire les choix qui les désignent aujourd'hui comme, ce que la doxa nommerait, les précurseurs d'une viticulture plus durable et d'une industrie plus énergétiquement sobre. Ces « atypicités » de l'Armagnac sont au cœur de son identité, dont le Baco blanc reste le symbole que les vigneron veulent défendre et mettre en lumière.

Depuis les années 2000, le Bureau National Interprofessionnel de l'Armagnac (BNIA) s'est fait l'écho de cette volonté de mise en valeur du Baco blanc. Volonté non dénuée de curiosité puisque cette interprofession s'est donnée pour but d'instituer le Baco blanc comme objet de recherche scientifique. La demande initiale du BNIA s'est portée sur la caractérisation sensorielle des eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Et si les travaux préliminaires, menés en 2018-2019, n'ont pas permis de répondre à la question posée, l'eugénol est apparu de manière presque anecdotique comme un composé spécifiquement concentré dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc et dont l'origine était cette fois différente du bois de chêne. En comparant les matrices de Baco blanc aux autres variétés de l'Armagnac, notamment Folle blanche et Ugni blanc, sarments, feuilles et raisins se sont confirmés comme étant spécifiquement concentrés en eugénol. Plus encore, une méthode a été développée au laboratoire afin de déterminer la présence des formes précurseurs de l'eugénol. Là encore, les

produits de Baco blanc ont révélé une richesse potentielle importante en eugénol, libérée partiellement par des activités de type glucosidase. Mais qu'en est-il du rôle joué par l'eugénol dans l'aromatique des eaux-de-vie blanches de Baco blanc ? Constitue-t-il un potentiel marqueur de la typicité de ces eaux-de-vie ? Malgré un contexte sanitaire difficile de 2020. Il avait été montré que l'eugénol ne semblait pas jouer de rôle direct dans la caractérisation sensorielle de ces eaux-de-vie blanches mais le consensus restait insuffisant quant à leur spécificité organoleptique.

L'eugénol demeure cependant un marqueur chimique propre au Baco blanc. Cet eugénol semble être d'autant plus spécifique de cette variété qu'il est également retrouvé concentré dans ses organes végétatifs. Les nombreux dosages qui ont permis ces observations et conclusions ont récemment fait l'objet d'une publication scientifique (Franc *et al.*, 2023). La mise en évidence du potentiel en eugénol, encore inexploité, permet d'imaginer la modulation de paramètres techniques afin de révéler cette richesse. Enfin si le rôle de l'eugénol dans la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc n'était pas clairement défini, les perspectives en étaient grandes. Et de manière plus générale, la question initiale du BNIA demeure, quelles sont les caractéristiques organoleptiques des eaux-de-vie blanches de Baco blanc ? Un projet de recherche portant sur la

*« Contribution des phénylpropènes aux mécanismes de défense du cépage Baco blanc et aux caractéristiques organoleptiques des eaux-de-vie blanches d'Armagnac »*

est alors déposé, proposé à l'Université de Bordeaux (UMR Œnologie) et à l'INRAE (UMR SAVE), financé par la région Occitanie et le BNIA. Plusieurs partenaires se sont également joints au projet : l'antenne gersoise de l'Institut Français de la Vigne et du Vin ainsi que les Chambres d'Agriculture du Gers et des Landes.

Scientifiquement, ces travaux de thèse se sont appuyés sur la connaissance produite précédemment par les différents étudiants de master 2, ayant participé au projet, mais ont également exploré d'autres voies jusqu'alors peu étudiées. Le statut de variété hybride, les multiples interdictions auxquelles il a dû faire face, ainsi que la faible surface qu'il représente encore aujourd'hui (~ 800 ha), sont autant de raisons qui n'avaient pas plaidé pour une étude scientifique et approfondie du Baco blanc et peu de données sont accessibles dans la littérature. Si les viticulteurs de l'Armagnac assurent que le Baco blanc a des besoins bien moindres en produits phytosanitaires utilisés contre le mildiou et l'oïdium, les scientifiques ne lui reconnaissent qu'une tolérance à la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. C'est ce

champignon, bien trop connu des viticulteurs, qui a été choisi comme modèle afin de prouver que le Baco blanc y est tolérant. Plus encore, l'eugénol est depuis longtemps connu comme molécule antifongique. S'est donc posée la question d'un possible lien entre la tolérance du Baco blanc et sa forte concentration en eugénol.

Ce dernier est marqué par une forte odeur de clou de girofle. Dans la continuité de ce qui avait été initié, le rôle de l'eugénol dans la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc a donc été investigué. Si les premières dégustations, conduites avec un panel de professionnels de la filière Armagnac, n'ont pas permis de dégager un rôle clair de cet eugénol, ces résultats ont été mis sur le compte d'un manque d'entraînement du panel. C'est pourquoi pour les travaux de thèse, il a été envisagé une formation du panel à la dégustation d'eaux-de-vie blanches. Cette formation devait également servir, au-delà de la détermination du rôle de l'eugénol, à la caractérisation organoleptique des eaux-de-vie blanches. Avec l'hypothèse qu'une caractérisation fine permettrait de distinguer les marqueurs sensoriels propres au Baco blanc, permettant ainsi de le discriminer ainsi des autres variétés de chaudière que peuvent être la Folle blanche et l'Ugni blanc.

En posant l'hypothèse initiale que l'eugénol, plus qu'un marqueur chimique, est également un élément essentiel de la qualité des eaux-de-vie blanches, son comportement dans les vins puis dans les eaux-de-vie est apparu comme un axe de travail évident. Les premières observations avaient amené à penser que l'eugénol était d'autant plus concentré dans les eaux-de-vie blanches que le TAV était faible. Une partie du travail doctoral devait donc s'intéresser aussi aux paramètres de distillation. Plus encore, la grande variabilité de concentration en eugénol rencontrées dans les eaux-de-vie mais également dans les vins, militait pour s'intéresser aux conditions de vinifications qui permettraient de favoriser la teneur en eugénol des produits dans l'idée de favoriser un élément clef de leur typicité.

Enfin, le potentiel en eugénol ayant été rapidement détecté, l'hypothèse de l'existence d'un ou de plusieurs composés précurseurs de l'eugénol a pu être posée. Cet aspect plus fondamental de la thèse devait répondre à la question de l'origine de l'eugénol chez le Baco blanc mais également, de proposer des voies de valorisation de l'eugénol à travers l'hydrolyse dirigée de ces formes précurseurs.



---

# État de l'art

---

*Nanos gigantum umeris insidentes*

Bernard de Chartres





# Chapitre 1 : Le Baco blanc, l'exemple d'une vigne hybride résiliente

## I. La lutte contre la crise phylloxérique, la voie de l'hybridation

### I.1. Le genre *Vitis* et le concept de cépage

La famille des *Vitaceae* regroupe différents genres dont le genre *Vitis*. Le botaniste français Jules Émile Planchon (1823 – 1888) en proposa une intéressante partition. En effet, il prit le parti de diviser le genre *Vitis* en deux sections : *Muscadinia* d'un côté et *Euvitis* de l'autre (Planchon, 1878). Planchon, en choisissant d'accoler le préfixe grec « eu », signifiant « vraie » ou « parfait », voulut théoriser un simple fait, la section *Euvitis* regroupait environ 95 % des espèces de *Vitis*. Plus encore, il voulait marteler une réalité botanique, le croisement entre *Euvitis* et *Muscadinia* était particulièrement compliqué à mettre en œuvre (Galet, 2015). Cependant l'histoire botanique a retenu une systématique antérieure, celle proposée par le naturaliste suédois Carl von Linné (1707 – 1778) qui aujourd'hui efface complètement la section *Euvitis*, et conserve la sobre section *Vitis* (Linné, 1753). Les hybrides qui seront mentionnés dans la suite de ce manuscrit de thèse, correspondent à des croisements interspécifiques dans la seule section *Vitis* (*Euvitis* de Planchon). Cette dernière est divisée en 4 sous-sections qui font référence aux origines géographiques (Amérique, Asie, Europe), la quatrième sous-section étant un agrégat de vignes d'Asie et du continent américain (Galet, 2015; Péros *et al.*, 2011). Ces précisions historiques permettent de mieux appréhender les problématiques historique, scientifique et d'adaptabilité de l'hybridation viticole.

Le Baco blanc sera désigné dans ce travail, comme les autres hybrides interspécifiques cultivés dont il pourrait être fait mention, par le terme variété de vigne ou cultivar et non pas, par le terme cépage. En effet, en 1999 Boursiquot et This ont défini le cépage comme :

« *Le cépage, unité taxonomique propre à *Vitis vinifera* L., est le produit d'un semis ou d'un individu unique au départ, multiplié par voie végétative. Au cours des cycles de multiplication, des variations peuvent se produire et être fixées.* ».

Les auteurs poursuivent en indiquant que le cépage peut également être défini comme l'ensemble des clones qui le compose, si ces mêmes clones sont suffisamment apparentés au cépage pour être confondus avec ce dernier.

Les auteurs concluent sur l'apparition d'une variation telle qu'elle induirait des modifications technologiques de l'individu, le rendant ainsi distinct de son cépage d'origine (This & Boursiquot, 1999).

Avec cette définition, les hybrides interspécifiques ne peuvent pas être assimilés à des cépages. Ils restent des variétés (botaniques) du genre *Vitis*.

## **I.2. Hybridation intentionnelle de la seconde moitié du XIX<sup>e</sup> siècle au début du XX<sup>e</sup> siècle**

L'hybridation intentionnelle de la vigne est une pratique vieille d'environ deux siècles et qui perdure encore aujourd'hui. Cependant, les raisons qui poussent scientifiques ou profanes à effectuer des croisements aussi bien intra qu'interspécifiques, restent diversifiées (Teissedre, 2018; Yobrégat, 2018). Ces motivations sont dépendantes de facteurs civilisationnels et historiques. En effet, les essais d'hybridation de la vigne ne poursuivent pas le même but en fonction de la région du monde et de l'époque (Camargo & Ritschel, 2008 ; De la Fuente Lloreda, 2018). Les premiers croisements interspécifiques intentionnels de vignes ont certainement eu lieu au début du XIX<sup>e</sup> siècle sur le continent américain par des colons européens, avec pour objectif, une amélioration variétale des plants alors en place (facilitation de la conduite des vignes, meilleure adéquation aux climats locaux, etc.). Un des premiers hybrideur à donner son nom à ses créations fut William Pond (qui croisait des variétés de prunes), une habitude entretenue par la suite par d'autres hybrideurs (Siebel, Courdercq ou encore Baco). Au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle en Europe, les essais d'hybridation se sont concentrés sur le développement de vignes résistantes aux nouvelles maladies d'origine américaines : mildiou (*Plasmopara viticola*), oïdium (*Erysiphe necator*), phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), black rot, ou pourriture maculée (*Guignardia bidwellii*). Le paradoxe ici est que les échanges entre vignes de différentes espèces ont conduit au développement d'une crise viticole mondiale débouchant elle-même sur une intensification des croisements interspécifiques. En France notamment, de nombreux hybrideurs croisèrent des vignes d'origine américaine avec des vignes d'origine européenne (Garrier, 1989). La fin du XIX<sup>e</sup> siècle en Europe fut une période d'intenses recherches scientifiques mais également techniques. Le but essentiel a été de trouver un moyen de lutter contre le phylloxera et d'autres maladies cryptogamiques. Deux approches furent menées à la fois en parallèle mais aussi en opposition en France. D'un côté, certains scientifiques ou techniciens préférèrent greffer les variétés de vignes européennes sur des variété de vignes non-européennes (asiatiques ou américaines) ou sur des variétés hybrides de vignes non-européennes.

D'un autre côté, d'autres décidèrent d'hybrider des espèces de vignes différentes. Toutefois, si les deux techniques semblèrent effectives pour l'obtention de vignes résistantes aux maladies fongiques, les variétés hybrides furent progressivement abandonnées à cause de la piètre qualité des vins produits à partir d'elles (Pouget, 2015). Malgré cette course effrénée au développement d'une vigne résistante, la qualité des vins, qui en seraient issus, est restée l'objectif principal de toute création variétale. Cependant, ce n'est certainement pas le seul argument qui a guidé l'abandon des vignes hybrides. Prises séparément, chaque accession obtenue par hybridation interspécifique présentait une résistance à une maladie. Mais les hybrideurs échouèrent à créer un cultivar résistant à l'ensemble des maladies de la vigne, tout du moins à une majorité d'entre elles (Yobrégat, 2018). Si la qualité globale des vins issus de variétés hybrides était considérée comme mauvaise, ce fut à cause de leurs notes dites « foxées », souvent présentes, et de leur teneur supposée importante en méthanol (Griset & Laborie, 2017). Certaines personnalités du monde viti-vinicole avancent d'autres arguments quant à l'interdiction de ces variétés hybrides. Il est toutefois difficile de trouver une littérature scientifique étayée allant dans leur sens. À ce propos, s'il est vrai que les vins issus de vignes non-européennes concentrent plus de méthanol que les vins issus de *V. vinifera*, à cause d'une concentration en pectines plus importante des raisins (C. Y. Lee *et al.*, 1975), les méthodes de vinifications actuelles ne permettent ni d'atteindre des teneurs en méthanol dangereuses pour la santé humaine (Skrzydłowska, 2003), ni de dépasser les seuils recommandés par l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) pour ce composé.

Toutefois, l'État français finira par interdire l'utilisation de 6 de ces vignes hybrides : le Noah, le Clinton, l'Isabella, le Jacquez, l'Othello et l'Herbemont par la promulgation d'une liste d'interdiction au Journal Officiel le 18 Janvier 1935 où ils y figurent (Loi du 24 décembre 1934 tendant à réaliser l'assainissement du marché des vins, 1934). Cette interdiction perdure à ce jour pour l'Union Européenne (Règlement (UE) n ° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil du 17 décembre 2013 portant organisation commune des marchés des produits agricoles et abrogeant les règlements (CEE) n ° 922/72, (CEE) n ° 234/79, (CE) n ° 1037/2001 et (CE) n ° 1234/2007 du Conseil, 2013).

## II. La caractéristique aromatique des vignes hybrides

### II.1. Les molécules impliquées dans l'aromatique « foxée » des vins

#### II.1.1. L'anthranilate de méthyle, l'arôme « foxé » originel

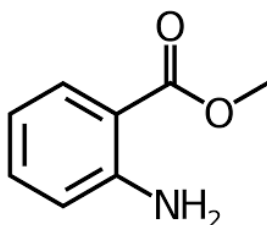


Figure 1 : Structure chimique de l'anthranilate de méthyle

L'anthranilate de méthyle (AM), présenté à la Figure 1, (Méthyl-2-aminobenzoate ; n° CAS 134-20-3) est une molécule très répandue dans le milieu naturel. Elle a été observée pour la première fois dans l'huile essentielle de néroli (*Citrus aurantium*) par Walbaum et collaborateurs en 1895 (Gildemeister & Hoffmann, 1899). L'AM est par ailleurs très utilisé dans l'industrie agro-alimentaire pour apporter des arômes de raisin aux préparations (Fenaroli *et al.*, 1975).

En œnologie, l'AM est bien connu pour son association directe avec le caractère « foxé » de certains vins. Caractérisé par son arôme de « raisin », il est particulièrement honni des dégustateurs de vins (Amerine & Singleton, 1965). Le seuil de perception de l'AM a été déterminé dans le vin autour de  $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Rapp & Versini, 1996). Pendant longtemps, cette molécule a été considérée comme la seule responsable du caractère « foxé » des vins issus de *V. labrusca* et de ses vignes hybrides. Plus encore, certains auteurs iront jusqu'à montrer que l'AM est uniquement produit par des vignes de *V. labrusca* et ses hybrides, dans des concentrations très larges, allant de traces à  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Nelson *et al.*, 1977; Rapp & Versini, 1996). D'autres auteurs encore ont montré que dans le cas de la variété Concord (*V. labrusca* x *V. vinifera*), la concentration en AM augmente au cours de la maturation des raisins. La véraison semble être un stade phénologique particulièrement important dans la formation de l'AM (Shure & Acree, 1994). Toutefois, il ne semblerait pas que l'anthranilate de méthyle et le caractère « foxé » des vins soient si pleinement corrélés. En effet des vins issus de *V. rotundifolia*, présentant l'anthranilate de méthyle dans des concentrations indétectables, ont été

jugés par un panel de jurés expérimentés comme étant plus « foxés » que des vins de *V. labrusca* qui présentaient eux des concentrations notables en anthranilate de méthyle (de l'état de trace à  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Nelson *et al.*, 1977).

### II.1.2. L'*o*-aminoacétophénone, la molécule cachée du « foxé »

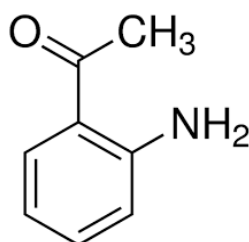


Figure 2 : Structure chimique de l'*o*-aminoacétophénone

L'*ortho*-aminoacétophénone (*o*AAP), présentée à la Figure 2, (1-(2-aminophényl)éthanone ; n° CAS 551-93-9) est chimiquement et organoleptiquement très proche de l'AM, le groupement ester ayant été remplacé par un groupement cétone (Mason *et al.*, 1991). L'*o*AAP est naturellement concentré dans l'huile essentielle de *Castanopsis cuspidata*, un arbustre proche du chêne (Yamaguchi & Shibamoto, 1979). C'est également le marqueur aromatique du lait périmé mais aussi d'un arôme faisant penser au raisin (Parks *et al.*, 1964). De manière générale, l'*o*AAP est considéré dans de nombreux produits alimentaires comme une odeur indésirable : lait concentré (Arnold & Lindsay, 1969), galette de maïs (Buttery & Ling, 1995), bière (Palamand & Grigsby, 1974) et protéine du lait (Walker & Manning, 1976).

Dans les vins de *V. vinifera*, l'*o*AAP est associé à une aromatique « atypique et défectueuse de vieillissement », décrit par des notes de naphthalène et/ou d'hybrides (Rapp *et al.*, 1993). De manière plus intéressante, des auteurs ont découvert de manière sérendipienne que l'*o*AAP pouvait être un contributeur au caractère « foxé » des vins de *V. labrusca*, ne présentant pas de concentrations notables en AM (Acree *et al.*, 1990). De plus, l'*o*AAP a également été identifié comme l'arôme prédominant du jus de raisin de Muscadine, une *V. rotundifolia* (Baek *et al.*, 1997). Plus encore, l'*o*AAP a été décrit comme sentant le « foxé » ou l'urine de chat. Un seuil de présentation pour le vin a été établi à  $10,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Perry & Hayes, 2016). L'*o*AAP n'a cependant pas été détecté par GC-O dans des vins de *V. riparia* et de *V. cinerea* (Sun, Gates, *et al.*, 2011). Les concentrations en *o*AAP dans les vins de vignes non *V. vinifera* peuvent varier de  $1,0$  à  $10,0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Pinho, 1994).

### II.1.3. Le furanéol®, la note de sur-mûri dans le « foxé »

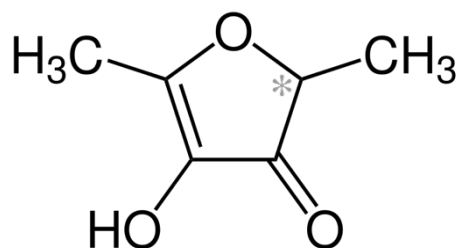


Figure 3 : Structure chimique du furanéol®.  
L'étoile sur l'un des carbones indique le caractère asymétrique de ce dernier

Le furanéol®, nommé de manière officielle comme la 4-hydroxy-2,5-diméthylfuran-3(2H)-one (Figure 3 ; n°CAS 3658-77-3), a été identifié dans diverses matrices. Plusieurs travaux rapportent son occurrence naturelle dans la fraise (Ohloff, 1969; Pickenhagen *et al.*, 1981), l'ananas (Pickenhagen *et al.*, 1981; Rodin *et al.*, 1965), les framboises arctiques (*Rubus arcticus*) (Kallio, 1976) et bien sûr les raisins de vignes hybrides (Kobayashi *et al.*, 2013; Prudêncio Dutra *et al.*, 2018; Rapp *et al.*, 1980). Dans les jus d'orange, le furanéol® est considéré comme un défaut organoleptique (Tatum *et al.*, 1975). Enfin le furanéol® est souvent associé à des procédés agro-alimentaires tels que la cuisson et la fermentation. En effet, il a été retrouvé dans des aliments comme le bouillon de bœuf (Tonsbeek *et al.*, 1968), l'aveline grillée (Sheldon *et al.*, 1972), l'amande grillée (Takei & Yamanishi, 1974), le café (Tressl & Bahri, 1978) et la sauce soja (Ishiguro & Sugawara, 1978).

Au vu de cette liste, il apparaît évident que le furanéol® est une molécule très répandue dans plusieurs matières premières comme dans des produits transformés. Mais le furanéol® est également un contributeur important du caractère « foxé » des vins issus de variétés non *V. vinifera* (Shure & Acree, 1994). Plus encore, il pourrait être le marqueur chimique de certains de ces vins, avec des concentrations variant de 0,013 à 3,5 mg·L<sup>-1</sup> (Pinho, 1994). Par exemple, le furanéol® est particulièrement concentré dans la variété Muscat Bailey A (*V. labrusca* x *V. vinifera*), notamment lorsque les raisins sont récoltés tardivement. Sa concentration dans les vins pouvant ainsi atteindre jusqu'à 3,1 mg·L<sup>-1</sup> (Kobayashi *et al.*, 2013). D'autres études ont montré la présence du furanéol® dans d'autres espèces de *Vitis* et leurs hybrides (Prudêncio Dutra *et al.*, 2018) : comme *V. rotundifoliae* (Baek *et al.*, 1997), *V. labrusca* mais pas chez *V. riparia* (Rapp *et al.*, 1980). Le seuil de perception du furanéol® a été étudiée en solution hydroalcoolique uniquement et ce dernier varie entre 5 et 37 µg·L<sup>-1</sup> (Allamy, 2015).

Cependant, (Kotseridis, 1999) a retrouvé des concentrations faibles dans les cépages de *V. vinifera* et notamment dans le Merlot.

## II.2. Le rôle particulier des composés soufrés

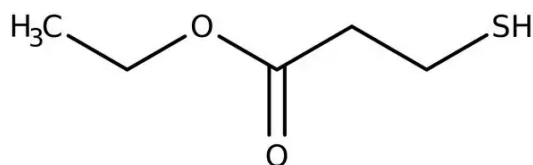


Figure 4 : Structure chimique du 3-mercaptopropionate d'éthyle

Le 3-mercaptopropionate d'éthyle (3MPE ; 3-sulfanylpropanoate d'éthyle ; n° CAS 5466-06-8), est un ester comprenant une fonction thiol (Figure 4). Si le 3MPE a été identifié dans certains fromages (Sourabié *et al.*, 2008), c'est bien dans les vins qu'il a été le plus décrit. En effet, le 3MPE a d'abord été identifié comme une composante majeure de l'arôme des raisins de Concord (*V. labrusca*) (Kolor, 1983). Pur, ce composé est décrit comme sentant la moufette (famille des *Mephitidae*) mais à des concentrations plus faibles comme celles retrouvées dans les raisins de Concord (quelques ppm), le 3MPE est caractérisé par des descripteurs fruités et de raisin frais (Kolor, 1983). Il est également retrouvé dans le bouquet de vieillissement des champagnes avec deux tendances qui semblent contradictoires : sa diminution au cours des premiers mois de vieillissement, de 0 à 18 mois (Charnock *et al.*, 2023), et son augmentation sur des vieillissement plus long, de 5 à 30 ans (Tominaga *et al.*, 2003).

Le 3MPE est relativement peu étudié en œnologie et ce, même dans le cas de vins issus de vignes hybrides ou américaines. Cependant, il entre dans la composition d'une solution aromatique, représentant au mieux l'arôme « foxé » des vins issus d'hybrides, utilisée en enseignement à l'ISVV (mélange d'AM, de furanéol® et de 3MPE).

Deux autres composés soufrés ont été identifiés comme participant à l'aromatiques des vins issus de vignes non *V. vinifera*. En effet le 2-mercптоéthanol (Figure 5a) et le 4-mercпто-2,5-diméthyltiophén-3-one (Figure 5b) semblent participer à un profil soufré « lourd » dans les vins issus de vignes non *V. vinifera* ou hybrides, les rendant tout à fait différents des profils soufrés de certains vins de *V. vinifera* (Guedes de Pinho, 1994).

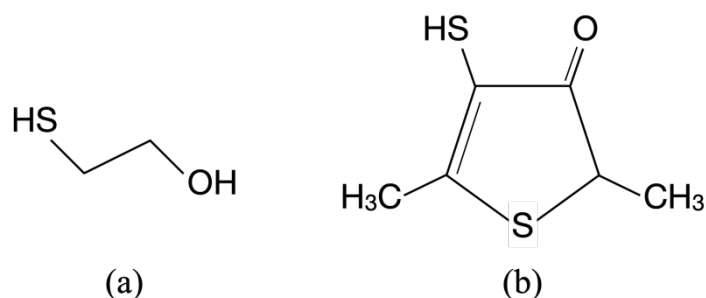


Figure 5 : Composés soufrés impliqués dans l'aromatique des vins issus de vignes non *V. vinifera* et hybrides. Figure (a), 2-mercaptoéthanol. Figure (b), 4-mercapto-2,5-diméthylthiophén-3-one

Le 2-mercaptoéthanol (Figure 5a) présente un arôme décrit comme odeur de « basse-cour » (Rapp *et al.*, 1985). Tandis qu'il a été identifié dans des vins de *V. vinifera* à des concentrations inférieures à  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , le 2-mercaptoéthanol peut atteindre des concentrations moyennes de  $328 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans des vins issus de *Vitis non vinifera* et d'hybrides (Pinho, 1994). Son ajout, dans des concentrations proches de son seuil de perception dans les vins blancs ( $450 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), à des vins de *V. vinifera* peut permettre de les confondre avec des vins issus de vignes non *vinifera* et/ou d'hybrides (Pinho, 1994). Toutefois, au-delà de cette concentration, le 2-mercaptoéthanol peut paraître comme un défaut des vins contribuant à la note de réduction.

De son côté, le 4-mercapto-2,5-diméthylthiophén-3-one (Figure 5b) est un dérivé soufré du furanéol®, pouvant être obtenu par la réaction de ce dernier avec le sulfure d'hydrogène et son odeur est décrite comme proche de la noisette (Van Den Ouweland & Peer, 1975). Sa concentration moyenne dans les vins de *V. vinifera* est de  $6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  tandis qu'elle peut atteindre  $24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les vins issus de non-*vinifera*. Plus encore, le 4-mercapto-2,5-diméthylthiophén-3-one est décrit comme spécifique des vins issus de vignes non *vinifera*, en particulier des hybrides de première génération (Guedes de Pinho *et al.*, 1997).

### II.3. Arôme « foxé » et arôme des vignes américaines : synonymes ou idiosyncrasie ?

Il existe pourtant bien une confusion entre l'arôme « foxé » des vins, dont les molécules impliquées dans la construction de cette note aromatique ont été présentées précédemment et l'arôme des vins issus de vignes américaines. Afin de tenter de déconstruire cette confusion, il est important de préciser certains termes et d'en donner l'historicité.

Plusieurs théories co-existent quant à l'utilisation du mot « foxé », adjectif anglo-saxon traduisible en français par « renardé ». Quatre de ces théories sont généralement retenues



(Pinney, 1989). Première théorie, « renardé » serait une mauvaise interprétation de « foxé », qui serait lui-même une distorsion du français « faux ». L'idée sous-entendue serait que « foxé » désignerait en fait un faux goût de raisins. Toutefois, les preuves qui appuieraient cette théorie font défaut. La deuxième théorie se base sur l'apparence des feuilles des *V. labrusca* qui, à en croire certains observateurs, ressembleraient à l'empreinte d'une patte de renard. Encore une fois, aucune preuve n'est disponible pour appuyer cette hypothèse. La troisième théorie avance que « foxé » permet de désigner les vignes qui attirent de petits mammifères dont les renards. C'est peut-être l'hypothèse la plus intéressante puisqu'il est possible de rapprocher cette observation de vigneron d'une réalité chimique. En effet l'AM et l'oAAP sont connus pour être des repoussoirs à oiseaux. C'est-à-dire, que les raisins contenant ces deux molécules sont soigneusement évités des volatils (Keller, 2020; Mason *et al.*, 1991). Fait appuyant un peu plus cette théorie, l'oAAP est naturellement concentré dans le sac anal d'une belette japonaise (*Mustela itasi*) et projeté par ce mammifère sur les oiseaux afin de les repousser (Acree *et al.*, 1990). La quatrième théorie présentée par Pinney dans son ouvrage est plus floue : en effet « fox » se référerait simplement à l'arôme des raisins. Les auteurs cités par Pinney évoquent l'importance de la maturation des raisins sur le développement de cet arôme « foxé » (Beverley *et al.*, 2014; Willich & Mease, 1803). De manière plus intéressante et confirmant cette confusion entretenue entre arôme « foxé » et arômes de vignes américaines, Pinney rappelle la temporalité et la régionalité d'emploi de ce terme « fox ». En effet aux États-Unis, dans les États du nord, le terme « fox grapes » (raisins foxés) était usuellement utilisé pour désigner les raisins de *V. labrusca* tandis que dans les États du sud, cette même locution désignait les raisins de *V. rotundifolia*. Pinney précise qu'aujourd'hui, « fox grape » désigne généralement les raisins de *V. labrusca*.

Le terme « foxé » et ses dérivés anglais comme « fox », « foxy » ou encore « foxiness » se réfèrent donc aux raisins, et par extension, aux vins issus de *V. labrusca*. Comme mentionné précédemment, l'AM, molécule contributrice majeure au caractère « foxé », est uniquement produite par les vignes de *V. labrusca* et ses hybrides. Cependant ces notes « foxées » ne sont pas l'apanage des seules vignes de *V. labrusca* mais sont également rencontrées dans des raisins et des vins issus d'autres espèces du genre *Vitis*. En particulier chez les espèces classées comme américaines (Galet, 2015; Péros *et al.*, 2011). Factuellement, la confusion présentée au début de ce paragraphe, et qui a constitué le fil rouge de ce dernier, est en fait une figure de métonymie : tous les raisins « foxés » sont issus de vignes américaines mais toutes les vignes américaines ne développent pas ce caractère « foxé ». Cette nuance linguistique, avec des implications concrètes pour la filière viti-vinicole, est défendue par les travaux de Sun et ses

collaborateurs (Sun, Gates, *et al.*, 2011). Cependant, les habitudes ont souvent la vie dure, preuve en est dans les lignes d'une publication portant sur le développement d'une méthode rapide de quantification de l'AM, au cours desquelles les auteurs entretiennent la confusion entre arôme « foxé » et arôme des vignes américaines (Prudêncio Dutra *et al.*, 2018).

### **III. François Baco et le développement du Baco 22A**

Au cours de cette thèse, une recherche bibliographique et historique sur le développement du Baco blanc par François Baco a été menée en parallèle par Christelle Boisbineuf, actuellement doctorante en histoire contemporaine à l'Université Bordeaux Montaigne, sous la direction du professeure Corinne Marache (Boisbineuf, 2020). Christelle Boisbineuf a, par le passé, travaillé pour eRcane (Groupement d'Intérêt Économique (GIE) menant des recherches sur la création variétale de cannes à sucre) en tant que technicienne hybridation. Elle avait donc cette double compétence pour mener à bien cette bibliographie historique. Une partie des documents et/ou le contact de certaines personnes ressources durant cette recherche ont été fournis par Marie-Claude Ségur, responsable qualité, R&D et développement durable du BNIA, qui a également fourni un état des lieux de l'évolution réglementaire de l'AOC Armagnac. La présente partie de ce manuscrit est le résultat condensé de ces recherches historiques et de références juridiques.

#### **III.1. La vie de François Baco et l'école du greffage**

François Baco naît en 1865 à Peyrehorade (Landes, France) et, après des études à l'École Normale de Dax (Landes, France), devient instituteur. De 1885 à 1893, date à laquelle il prend son dernier poste à Bélus (Landes, France), François Baco change plusieurs fois d'écoles et de villages, tout en restant dans ses Landes natales. Autodidacte, il ne possède pas de terre et n'est pas viticulteur. Il devra attendre sa retraite pour enfin devenir propriétaire de sa propre exploitation. Le savoir de François Baco en matière de greffage et d'hybridation de la vigne semble donc essentiellement dû à ses lectures scientifiques. Il a également pu s'inspirer de vulgarisateurs scientifiques mais également de praticiens s'essayant à cette nouvelle science qu'était alors la création variétale (Cabanne, 1954; Matabos, s. d., 2016).

Si François Baco naît après la crise de l'oïdium apparue vers 1850, il est le témoin des ravages du mildiou, du black rot et du phylloxéra dans sa région (1882-1887). Il va alors s'impliquer dans la lutte contre la crise viticole en créant, en 1896, une école de greffage sur vignes

américaines avec pour but de reconstituer le vignoble. Il s'en sert également de laboratoire d'observation et d'expérimentations (Baco, 1909a, 1911, 1936a). Il partagera le fruit de ses recherches à travers la publication de courts articles publiés dans *La petite Gironde* (quotidien du Sud-Ouest et du Midi de la France créé en 1872). Il y explique les principes du greffage et comment le mettre en œuvre (Baco, 1899a, 1899b, 1902). Il parle aussi d'hybridation en concluant sur l'efficacité de la greffe dans la lutte contre les maladies tout en attendant « "l'oiseau bleu" rêvé par les infatigables hybrideurs ». Il faudra tout de même attendre 1909 pour que François Baco fasse ouvertement part de ses travaux d'hybridations (Baco, 1909b).

## **III.2. La création du Baco 22A**

### **III.2.1. Choix et origines des géniteurs**

Le Baco blanc ou Baco 22A est le résultat du croisement entre la Folle blanche (*Vitis vinifera*) et le Noah (*Vitis labrusca* x *Vitis riparia*). Le choix des géniteurs du Baco blanc est très lié à la volonté de François Baco d'aider une paysannerie locale très tournée vers la polyculture. Mais également sur deux critères fondamentaux pour l'instituteur, la préservation d'une qualité organoleptique et la résistance aux maladies cryptogamiques et au phylloxera. L'objectif de Baco, devenu hybrideur, était de créer « *de bons cépages franco-américains résistants aux maladies cryptogamiques et au phylloxera* » (Baco, 1936b). Toujours dans son idée de défendre une viticulture locale, il identifie la nécessité d'obtenir au moins une variété rouge et une variété blanche. Avant l'obtention de ses hybrides, François Baco déconseillait l'utilisation du Piquepoult (la Folle blanche) car trop sensible au black rot. Cependant, il n'arrivera jamais à encourager son arrachage. En effet François Baco était très sensible à la crise de l'eau-de-vie d'Armagnac, alors très tournée vers l'utilisation du Piquepoult pour assurer une production de qualité.

François Baco choisit donc le Noah et le Piquepoult comme géniteurs pour ses essais d'hybridation. Le Noah, seule vigne américaine dont Baco réussit à se fournir en pollen, pour la résistance aux maladies cryptogamiques et au phylloxera. François Baco eut également cette volonté de « sauver » le Piquepoult en le renforçant par l'hybridation. À partir de 1898, François Baco réalise ses premières hybridations ; il sème les pépins obtenus et sélectionne les souches au faciès (qualité du feuillage et vigueur). En 1900, il obtient 118 souches dont 24 issues du croisement Folle blanche x Noah (Darrigan, 1924). Le 22<sup>e</sup> plant du rang A lui sembla particulièrement intéressant, il deviendra le Baco 22A, plus tard nommé Baco blanc.

Sa parenté avec le Piquepoult (la Folle blanche) poussera les producteurs de l'Armagnac à donner un autre nom au Baco blanc, le « Piquepoult du Pays ».

### **III.2.2. Les critères et conditions de sélections**

Les critères de sélection de François Baco concernant ses propres hybrides étaient multiples mais sa ligne directrice était d'obtenir des variétés hybrides résistantes aux maladies et possédant également une certaine qualité organoleptique. Pour la résistance, il sélectionne ses pieds sur des sols particulièrement « phylloxérés » et dans des zones où les maladies cryptogamiques sont intenses. Initialement partisan du greffage et étant arrivé tardivement à l'hybridation, François Baco commence par conseiller le greffage de ses propres hybrides, notamment pour l'adaptation aux sols calcaires, sols sur lesquels le Baco blanc ne peut se développer. Dans l'un de ses ouvrages, François Baco décrit la manière dont il avait mis à l'épreuve ses hybrides avant de définitivement les sélectionner (Baco, 1925). C'est ainsi que le Baco 22A sera commercialisé en 1912 après 14 années de sélection.

### **III.2.3. La résistance du Baco 22A aux maladies de la vigne**

François Baco décrivait la résistance du Baco 22A aux maladies. En étant résistant à l'oïdium, à la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), mais il aurait été sensible au mildiou et au black rot. Enfin le Baco serait suffisamment résistant au phylloxera. François Baco proposait de le greffer afin de confirmer sa résistance au puceron mais également de le rendre cultivable dans les sols calcaires (Baco, 1904, 1925).

Cependant des chercheurs (André *et al.*, 2020) avancent que le Baco blanc ne serait pas résistant au phylloxéra, en dehors des sols hostiles au puceron, ainsi qu'à la chlorose et à la flavescence dorée (*Candidatus phytoplasma vitis*). Le Baco blanc présenterait une faible résistance au mildiou et à l'oïdium. Par contre, il serait peu sensible à la pourriture grise (*Baco blanc*, s. d.). ce dernier point semble se retrouver dans toutes les observations.

### **III.3. Les résultats œnologiques du Baco blanc**

D'après les observations de François Baco, le Baco blanc débourre plus tôt que le Noah (aujourd'hui, le Baco blanc est reconnu comme débouillant 6 jours avant le Chasselas) et arrive à maturité 5 jours après la Folle blanche (aujourd'hui, 4 semaines après le Chasselas). Un flou perdure dans les écrits de Baco quant aux arômes développés par les raisins de Baco blanc.

Quand il est consommé en raisin de table, le caractère « foxé » est absent des raisins, par contre dans le cas d'une surmaturité, cette typicité des raisins d'hybrides resurgit chez le Baco blanc. Toujours est-il que François Baco vanta les prétendus mérites de sa variété hybride, le comparant qualitativement à la Folle blanche, au Sauvignon blanc ou à la Muscadelle (Baco, 1925).

Durant 24 ans (1910-1934), Baco participe avec succès aux concours des vins d'hybride de Toulouse. Il sera également récompensé dans d'autres villes (Lyon, Mâcon, Villefranche-en-Beaujolais, Nîmes, Dax, Poitiers, Perpignan). Le Baco blanc est qualifié de « *très gros producteur de vin de coupage* » (comprendre ici vin d'assemblage), les raisins envoyés en 1912 à la station œnologique de Toulouse étaient issus d'une vendange avec un rendement de 95 hL·ha<sup>-1</sup>. Enfin, le Baco blanc semble être apprécié pour les qualités qu'il exprime une fois son vin distillé (Baco, 1925).

## **IV. L'évolution du Baco blanc, au XX<sup>e</sup> et XXI<sup>e</sup> siècle**

### **IV.1. Une histoire chaotique liée à la réglementation**

En sa qualité de variété hybride interspécifique, le Baco blanc va se voir contester sa légitimité au sein de l'AOC Armagnac. L'histoire de cette dernière commence d'ailleurs en 1909 avec la promulgation du décret Fallières qui délimite la zone de production des eaux-de-vie d'Armagnac (Décret n° 2014-1642 du 26 décembre 2014 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », 2014). La loi du 17 juillet 1927 n'augurait pourtant rien de bon quant au devenir du Baco blanc. En effet elle bannissait de toute appellation d'origine, l'utilisation d'hybrides interspécifiques de vignes (Loi du 22 juillet 1927 modifie la loi du 6 mai 1919 - (Protection des Appellations d'Origine), 1927). La loi de 1934, donnait une liste d'exclusion de 6 variétés hybrides dont le Baco blanc ne faisait pas partie. En 1936 le décret concernant les eaux-de-vie d'Armagnac (Décret du 6 août 1936 - Définition - Appellation Contrôlée concernant les eaux-de-vie, 1936) intègre le Piquepoult du Pays (synonyme local du Baco blanc) mais le Baco n'est pas cité en tant que tel et il est précisé qu'un délai de 10 ans est accordé pour faire disparaître les autres cépages. Après la Seconde Guerre Mondiale, deux séries d'expérimentations suivies par l'INAO aboutissent à l'inscription officielle du Baco 22A dans le décret AOC de 1958. En 1987, conforté par un règlement européen (Règlement (CEE) N° 823/87 Du Conseil Du 16 Mars 1987 Établissant Des Dispositions Particulières Relatives Aux Vins de Qualité Produits Dans Des Régions Déterminées, 1987), la revendication d'une AOC devenait impossible si la propriété possédait des variétés hybrides (Décret n°87-854 du

22 octobre 1987 relatif à l'encépagement et au rendement des vignobles dans les exploitations produisant des vins, vins doux naturels et vins de liqueur à appellation d'origine, 1987). Ce texte qui ne touchait pas juridiquement le Baco en Armagnac puisque les productions d'eau-de-vie AOC n'étaient pas dans le spectre du décret a toutefois rajouté une pression supplémentaire à la filière et le Comité Régional de l'INAO (CRINAO) décida finalement de l'exclusion du Baco à partir du millésime 2010 (Décret du 2 octobre 1992 relatif aux appellations d'origine contrôlées de l'Armagnac). Cependant en 2001, à l'occasion de la refonte complète du décret d'appellation, les professionnels de la filière armagnacaise déposèrent une demande de maintien du Baco blanc auprès de l'INAO. Ils ont argué de l'importance de cette variété dans la typicité des Armagnacs, ont défendu sa tolérance aux maladies cryptogamiques et ont dû démontrer que le vin et l'eau-de-vie de Baco n'avaient pas une teneur en méthanol supérieure à celle des produits de l'appellation issus de *V. vinifera*. Acte ultime de résistance qui débouchera en 2005 sur un nouveau décret de l'AOC Armagnac incluant le Baco blanc sans limite de temps (Décret du 27 mai 2005 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », 2005). En 2008, le Baco blanc gagna définitivement sa place dans la liste officielle des variétés autorisées en France, mettant ainsi fin à une controverse de près d'un siècle (Arrêté du 18 avril 2008 relatif au Catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France (plants de vigne), 2008). Ce classement lui permettra de rentrer en 2010 dans la liste des cépages éligibles à la restructuration du vignoble français permettant depuis lors d'assurer le renouvellement des vieilles parcelles. Il reste à ce jour, l'unique variété hybride productrice directe autorisée dans une AOC, bien que cela soit dans le cadre d'une production d'eau-de-vie.

#### **IV.2. L'évolution du parcellaire de Baco blanc en France**

Les chiffres présentés ici sont ceux donnés par l'Organisme de Défense et de Gestion (ODG) Armagnac ainsi que ceux des bureaux de la Direction Générale des Douanes et des Droits Indirects (DGDDI) du Gers et des Landes.

Si le Baco blanc a connu un fort engouement durant la première moitié du XX<sup>e</sup> siècle, sa surface atteignait plus de 16 000 ha en 1958, il est possible d'avancer que les difficultés réglementaires auxquelles il a fait face et l'évolution du vignoble vers une production d'IGP Gascogne, peuvent expliquer une forte diminution durant la seconde moitié de ce XX<sup>e</sup> siècle (Figure 6a), en 2000, le Baco blanc n'occupait plus que 2 000 ha environ. Avec le nouveau décret de 2005, qui l'entérine comme variété disponible pour la production d'eau-de-vie d'Armagnac et les aides à la restructuration qui ont suivies, le Baco blanc a vu sa surface se stabiliser autour de 700 ha

(Figure 6b). Il est essentiellement destiné à la production d'eau-de-vie d'Armagnac. Toutefois, quelques zones de production l'autorisent en tant que variété accessoire (notamment des IGP du Languedoc-Roussillon).

### IV.3. État des lieux du Baco blanc en 2023

Les chiffres présentés par la suite sont ceux issus d'un rapport d'activité 2022 de l'ODG Armagnac.

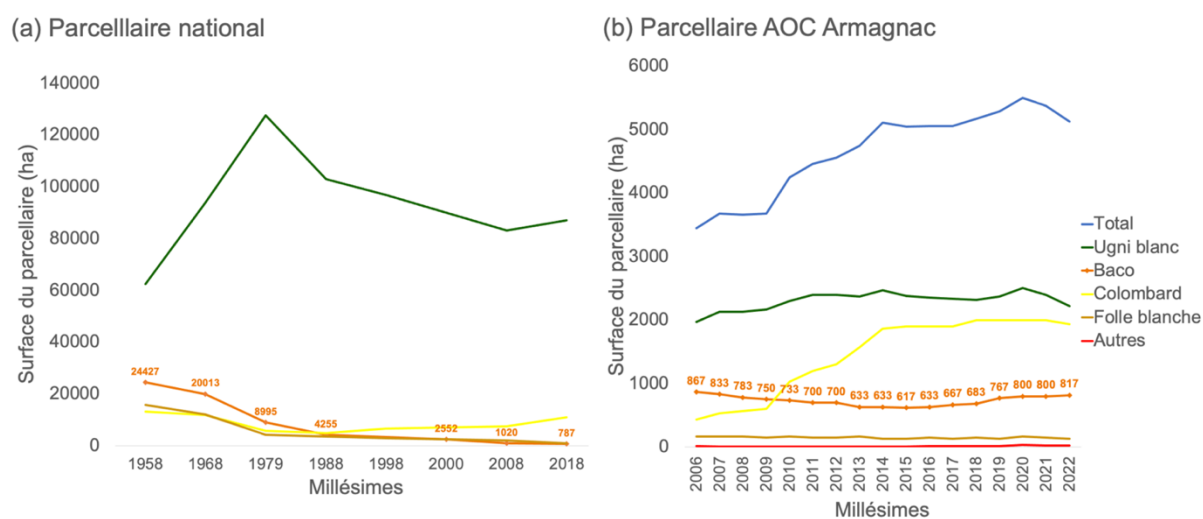


Figure 6 : Évolutions des parcelles, national et de l'Armagnac. Figure (a) évolution du parcellaire français, entre 1958 et 2018, des variétés principales de l'Armagnac. Les surfaces annuelles de Baco blanc sont indiquées par les étiquettes de données présentes sur le graphique. La source de ces données est disponible sur le site PI@ntGrape (<https://plantgrape.plantnet-project.org/fr/>). Figure (b), évolution du parcellaire, entre 2006 et 2022, affecté à l'AOC Armagnac et pour ses principales variétés. Les surfaces annuelles de Baco blanc sont indiquées par les étiquettes de données présentes sur le graphique

Le Baco blanc représente en 2022 environ 47 % de la surface (817 ha) et 48 % du volume de production d'Armagnac (5 515 hL d'alcool pur). La caractérisation des vignes de Baco blanc a beaucoup évolué durant la période de 12 ans séparant les millésimes 2009 et 2022. En effet, si en 2009, 41 % des 750 ha de vignes de Baco blanc étaient âgées de 40 à 50 ans, cette classe d'âge ne représentait plus que 4 % des 817 ha de 2022. C'est le résultat de la restructuration de cette variété. En 2022 une très importante part des vignes de Baco blanc (47 %) sont âgées de 1 à 10 ans. Toutefois, une part non négligeable de très vieilles vignes perdure (encore 32 % des plants ont plus de 50 ans) (Figure 7) Ces parcelles des années 60 ou avant sont du reste plantées franc de pied.

Enfin le Baco blanc est la variété emblématique des Landes et de l'est du Gers, pour des raisons d'adaptation aux sols de sable fauve et boulbènes, il n'est donc pas étonnant qu'il se retrouve à 92 % dans la dénomination géographique du Bas-Armagnac, vient ensuite l'Armagnac-Ténarèze (7 %) et le Haut-Armagnac.

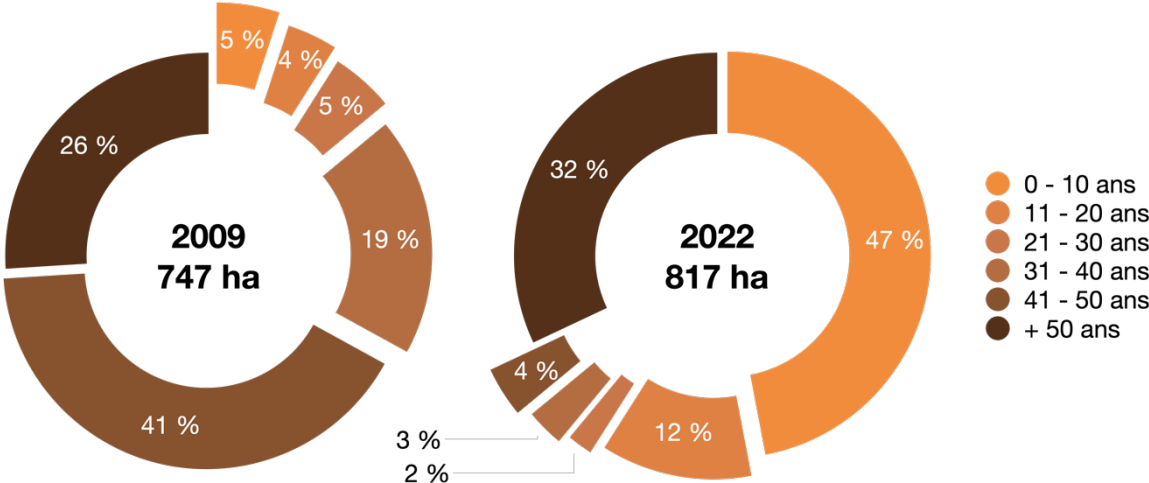


Figure 7 : Évolution du parcellaire de Baco blanc au cours de la dernière décennie (rapport d'activité ODG Armagnac)



## **Chapitre 2 : Les eaux-de-vie de vins d'Armagnac**

Concernant l'orthographe des mots « armagnac » et « Armagnac » : le premier est utilisé pour désigner l'eau-de-vie et le second pour désigner la région gasconne.

### **I. La plus ancienne eau-de-vie française**

Si la distillation se développe à Cognac au XV<sup>e</sup> siècle, essentiellement pour améliorer la conservation des vins charentais lors de leur transport par bateau (Faith & Guillard, 2016) la production d'aygue ardente (eau ardente qui donnera plus tard eau-de-vie) est déjà connue en Armagnac au XIV<sup>e</sup> siècle. Elle se développe progressivement au XVI<sup>e</sup> siècle grâce au commerce avec les néerlandais. Après le phylloxéra, l'appellation Armagnac est délimitée dès 1909 et les autres conditions de productions inscrites pour la première fois dans le décret de 1936.

Aujourd'hui, la production d'Armagnac est encadrée par deux textes : le règlement (UE) 2019/787 du 17 avril 2019 concernant la définition, la désignation, la présentation et l'étiquetage des boissons spiritueuses, l'utilisation des noms de boissons spiritueuses dans la présentation et l'étiquetage d'autres denrées alimentaires, la protection des indications géographiques relatives aux boissons spiritueuses, ainsi que l'utilisation de l'alcool éthylique et des distillats d'origine agricole dans les boissons alcoolisées, où l'Armagnac est classé dans la catégorie « Eau-de-vie de vin », et le Décret du 14 ° 2014-1642 du 26 décembre 2014 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », 2014 qui homologue son cahier des charges.

### **II. La terre, les vignes et le vin d'Armagnac**

Le vignoble d'Armagnac est implanté sur une zone viticole d'environ 20 000 ha dont 5200 ha sont identifiés auprès de l'INAO pour l'Armagnac et environ 2000 ha réellement affectés annuellement à la production d'eau-de-vie (rapport d'activité 2022 du BNIA) . Il est situé sur 3 départements (Gers, Landes et Lot-et-Garonne) et 2 régions (Occitanie et Nouvelle-Aquitaine). Le vignoble se partage entre la production des vins des Côtes de Gascogne et de l'eau-de-vie d'Armagnac qui se structure en 3 zones (Figure 8). D'abord le Bas-Armagnac, à l'Ouest de l'aire d'appellation : elle couvre une partie des départements du Gers et des Landes et a fait d'Eauze sa capitale. Le Bas-Armagnac représente environ les 2/3 de la surface de l'appellation. Ses sols sont caractérisés par du sable et des limons, dits sables fauves. Ensuite, l'Armagnac-Ténarèze, autour de Condom, au nord du Gers et au Sud du Lot-et-Garonne,

représente environ 30 % des surfaces avec des sols argilo-calcaires et boubènes. Enfin le Haut-Armagnac ou Armagnac blanc en raison des sols particulièrement calcaires. La viticulture s’y est beaucoup développée au XIX<sup>e</sup> siècle mais demeure plus modeste aujourd’hui. Quelques producteurs y perpétuent encore la tradition armagnacaise. Ces 3 zones correspondent à des milieux naturels distincts pouvant être mis en avant par les producteurs, sous la forme de dénomination géographique complémentaires.

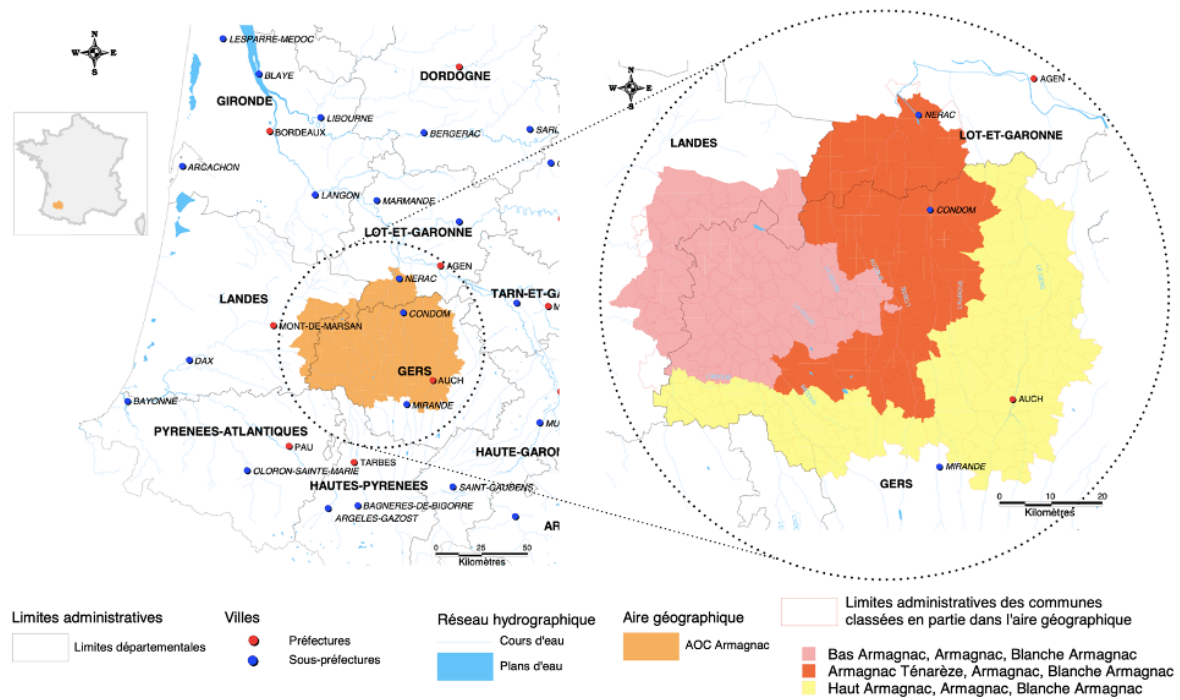


Figure 8 : Cartes de l'aire d'appellation Armagnac (BDcarto-IGN, MAPINFO, INAO, 07/2008 et 06 : 2008)

L'appellation d'origine contrôlée (AOC) Armagnac (Décret n° 2014-1642 du 26 décembre 2014 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », 2014) autorise à ce jour 10 cépages et variétés de vignes pour la production de l'eau-de-vie : Baco blanc B, Blanc dame B, Colombard B, Folle blanche B, Graisse B, Jurançon B, Mauzac B, Mauzac rose Rs, Meslier Saint-François B et Ugni blanc B. Comme dans toute AOC, des règles de conduite de la vigne sont imposées aux viticulteurs, parmi lesquelles : une densité de plantation minimale de 2200 pieds·ha<sup>-1</sup>, un écartement inter-rang maximal de 3,5 m et trois tailles de la vigne autorisées (le Guyot simple ou double, et le cordon). Le rendement maximal des vignes en production est fixé à 120 hL·ha<sup>-1</sup>, pour un vin de référence titrant 10 % vol.alc (v/v), soit un équivalent de 12 hl AP·ha<sup>-1</sup> pour tous les TAV du vin autorisés.

Les vins blancs destinés à la distillation sont produits de manière relativement classique. La vendange est souvent mécanique et le pressurage des raisins est historiquement réalisé grâce à un pressoir continu avec aujourd'hui une évolution vers des pressoirs pneumatiques. La Fermentation Alcoolique (FA) peut se déclencher de manière naturelle, tout comme la fermentation malolactique (FML) qui n'est pas maîtrisée dans ce type de vin. L'interdiction par décret de l'utilisation du dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) peut expliquer une gestion parfois complexe des microorganismes. Toutefois, un vin blanc qui doit subir une distillation doit présenter certaines caractéristiques analytiques résumées dans le

Tableau 1. La chaptalisation des vins de distillation est interdite. Enfin les vins doivent contenir une certaine proportion de lies. Aucun pourcentage n'est donné par le décret, il est seulement précisé : « *Les vins sont distillés sans lies grossières, mais ils doivent contenir des lies fines.* ».

Tableau 1: Caractéristiques analytiques réglementaires des vins destinés à la distillation

Analyses	Valeur minimale	Valeur maximale
Titre Alcoométrique Volumique (TAV) (% (v/v))	7,5	12
Acidité Volatile (AV) (g d'H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·L <sup>-1</sup> )		0,7
SO <sub>2</sub> total (mg·L <sup>-1</sup> )		20

### III. La distillation

D'un point de vue réglementaire (Décret n° 2014-1642 du 26 décembre 2014 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », 2014), la distillation des vins doit être réalisée durant la période comprise entre la fin des vendanges et le 31 mars de l'année suivante. La distillation peut être de deux types : distillation continue multi-étagée avec reflux, au moyen d'alambics dits « armagnacais » de type principal ou distillation discontinue simple à repasse, au moyen d'alambics de type accessoire. Dans chaque atelier de distillation doit fonctionner au moins un alambic de type principal. Dans la pratique, 95 % de la production annuelle d'Armagnac est réalisée au moyen de l'alambic continu armagnacais. Selon l'alambic, les TAV minimal et maximal des distillats sont réglementairement définies : alambic continu : de 52 % (v/v) à 72,4 % (v/v) dans le récipient journalier, alambic à repasse (ou double-chauffe) : de 65 % (v/v) à 72,4 % (v/v) pour les « bonnes chauffes ».

### III.1. L'alambic à repasse ou double-chauffe (distillation discontinue)

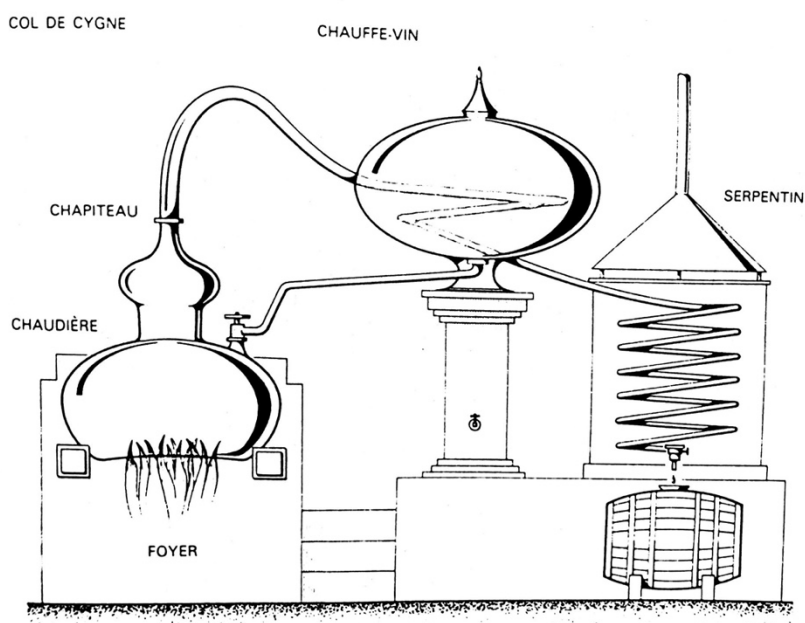


Figure 9 : Alambic à repasse de type charentais (Caumeil, 1983)

L'alambic à repasse est utilisé à 100 % pour la production du Cognac. De ce fait, il a été largement décrit et étudié dans le contexte cognaçais d'où sa qualification locale de « type charentais ». Il a été intégré dans le cahier des charges de l'AOC Armagnac depuis 1972 seulement puis qualifié de type « secondaire » depuis le décret de 2005.

Un alambic à repasse est composé des éléments principaux suivants : une chaudière (permettant de chauffer le vin), un chapiteau (où se concentrent les vapeurs), un col de cygne (transportant les vapeurs), un chauffe-vin (optionnel) et un serpentin (dans lequel les vapeurs se liquéfient) plongeant dans un réfrigérant à l'eau (Figure 9).

L'alambic à repasse est entièrement composé de cuivre et ce pour plusieurs raisons (Cantagrel *et al.*, 1991) :

- La malléabilité du métal pour faciliter la fabrication de l'alambic
- La conduction thermique intéressante du cuivre
- La faible corrosivité du cuivre
- Le rôle catalytique du cuivre sur certains composés de faible qualité organoleptique.

Lors d'une distillation à repasse, le vin est grossièrement soutiré puis introduit dans la chaudière pour y être distillé (Cantagrel *et al.*, 1991). Le liquide alcoolique incolore alors obtenu est appelé *brouillis*, ayant un TAV compris entre 27 et 30 % (v/v) selon le TAV initial du vin. Ce brouillis représente environ 1/3 du volume de vin de départ.

La production de la chauffe du vin peut être divisée en plusieurs fractions selon le déroulé de la distillation : les têtes (les premières fractions liquides obtenues), le cœur du brouillis (partie la plus importante) et enfin les queues (fractions de fin de distillation). Le vin épuisé en alcool restant dans la chaudière, est appelé *vinasse de vin*. La seconde chauffe ou repasse consiste en la distillation du brouillis, c'est la *bonne chauffe*. Le distillat de la bonne chauffe est généralement divisé en quatre fractions : têtes, cœur, secondes puis queues.. Le cœur est mis en élevage et constituera la production d'armagnac (en Armagnac) ou de cognac (à Cognac). La coupe (TAV auquel le cœur est séparé des secondes) ainsi que les différents modes de recyclage des fractions de tête et de queues sont des facteurs de différenciation des différentes méthodes d'utilisation de l'alambic double chauffe. Ils influencent également la composition finale du cœur (TAV et composition volatile), le distillat mis en vieillissement.. Le résidu de liquide présent dans la chaudière (vinasse de bonne chauffe) représente entre les 2/3 et les 3/5 du volume de brouillis initial.

### III.2. L'alambic continu de type armagnacais

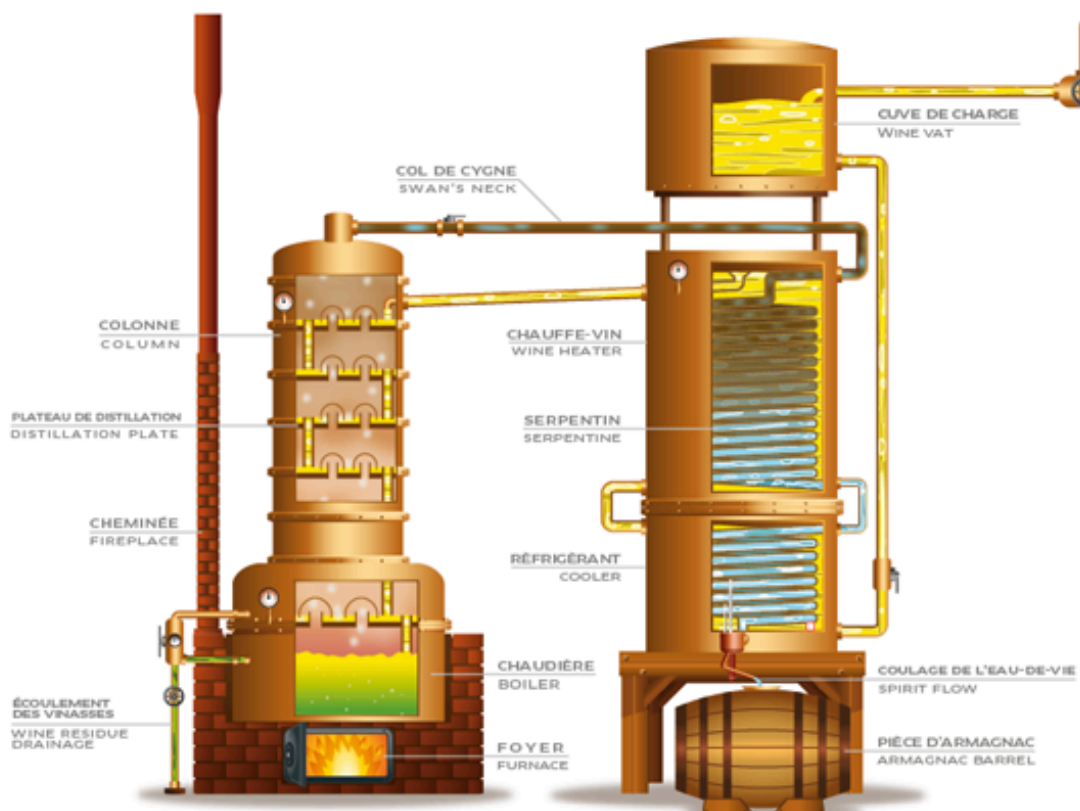
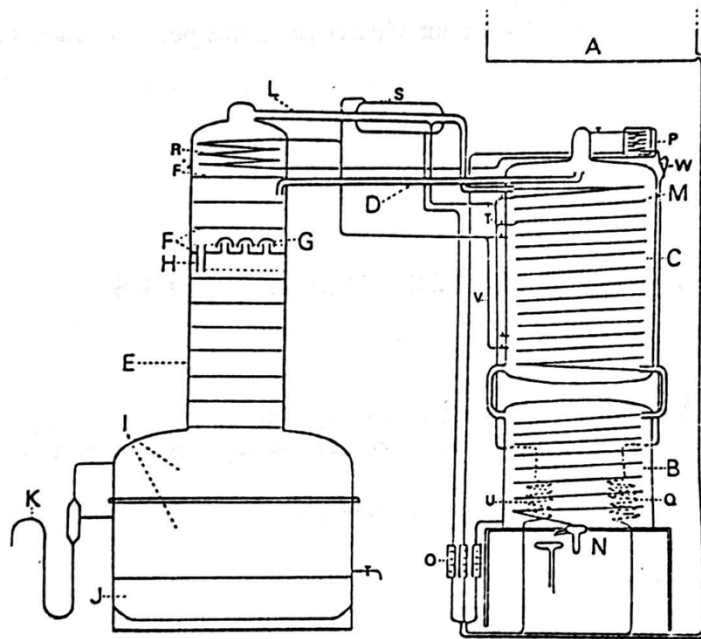


Figure 10 : Alambic armagnacais pour la distillation continue (BNIA - <http://www.armagnac.fr/distillation-et-vieillessement>)

L'alambic armagnacais, a contrario de son homologue charentais, est moins décrit dans la littérature scientifique. Introduit au début du XIX<sup>e</sup> siècle en Armagnac, il s'est imposé au cours du temps comme le mode de distillation exclusif confirmé par le 1<sup>er</sup> décret AOC de 1936 puis principal depuis 1972 où la double-chauffe a été autorisée en Armagnac. Il permet de distiller en continu du vin grâce à une petite colonne à plateaux dont le nombre est limité de 5 à 15 (Figure 10). Grâce à des calottes de barbotage, les plateaux permettent, à chaque étage de la colonne, un échange de matière et de chaleur entre le vin liquide descendant dans la colonne jusqu'à la chaudière et les vapeurs montantes depuis la chaudière jusqu'au col de cygne. Ainsi, au fur et à mesure de sa descente dans la colonne, le vin s'épuise en éthanol et en composés volatils et au contraire, au fur et à mesure de leur montée dans la colonne, les vapeurs s'enrichissent en éthanol et en composés aromatiques. La liquéfaction des vapeurs est assurée dans un long serpentín intégré dans la cuve chauffe-vin servant par la même de réfrigérant. En effet le vin froid est préchauffé dans cet ensemble : il entre par le bas de la cuve et joue alors le rôle de réfrigérant pour les vapeurs à liquéfier et ces dernières font office de chauffe-vin (Bertrand & Ségur, 1991). Ainsi construit l'alambic armagnacais est un modèle thermodynamique très intégré : l'échange thermique ayant lieu au niveau du serpentín (calories cédées par les vapeurs et frigories cédées par le vin entrant) permet de réduire les coûts énergétiques. C'est ainsi 3,5 à 4 fois moins de gaz propane, ou autre, consommé grâce à une distillation continue comparée à une distillation à repasse (Bureau National Interprofessionnel de l'Armagnac, 2010). Une économie d'eau est également réalisée en se servant du vin entrant comme réfrigérant. Comme l'alambic double-chauffe, l'alambic armagnacais est entièrement constitué de cuivre pour les mêmes raisons.

Sur le schéma présenté en Figure 11, les différentes annexes possibles sont ajoutées sur la structure de base (Bertrand & Ségur, 1991). Elles ont pour but de moduler le TAV de coulage et améliorer la qualité des eaux-de-vie puisqu'aucun fractionnement n'est possible lors d'une distillation continue. Les produits les plus volatils (têtes) peuvent être isolés en haut du chauffe-vin puis condensés avec ou sans réfrigérant extérieur (Figure 13 – Q). Les produits les moins volatils (queues) peuvent être prélevés au niveau du condenseur (Figure 11 - S) ou au niveau des premières spires du serpentín (Figure 11 - T). Les queues sont les produits les plus à même d'être corrigés par la présence d'annexe. Leur TAV varie de 12 à 35 % (v/v) en fonction des réglages de l'alambic.



#### Eléments principaux

A :	Cuve de charge
B :	Réfrigérant
C :	Chauffe-vin
D :	Tubulure de transport du vin dans la colonne
E :	Colonne
F :	Plateau de distillation
G :	Barboteur
H :	Trop-plein
I :	Chaudière
J :	Foyer
K :	Evacuation des vinasses
L :	Col de cygne
M :	Serpentin
N :	Coulase et porte-alcoomètre.

#### Annexes

F :	Plateau sec
O :	Débimètre
P :	Condensateur de têtes
Q :	Réfrigérant de têtes
R :	Réfrigérant en tête de colonne
S :	Condenseur (de queues)
T :	Tirage et recyclage de queues
U :	Réfrigérant de queues
V :	Recyclage de vin chaud
W :	Dégazeur

Figure 11 : Schéma d'un alambic armagnacais équipé de toutes les annexes possibles (Bertrand & Ségur, 1991)

Deux autres dispositifs permettent de réduire la teneur en composés de queues et d'augmenter parallèlement le TAV de l'eau-de-vie :

- L'existence de plateaux secs (Figure 11 – F'), limitant le passage des composés les moins volatils vers le serpentin ;
- L'alimentation en tête de colonne (Figure 11 - R) par du vin froid induit un refroidissement de la colonne et donc reflux avec liquéfaction des queues qui ne peuvent plus traverser le col de cygne.

L'utilisation de l'ensemble de ces dispositifs (piquage de queues au condenseur ou au premières spires du serpentin, refroidissement de la tête de colonne) ont tous pour fonction d'augmenter

le TAV de coulage ce qui a pour conséquence la diminution de la teneurs des produits de queue dans le coulage (Bertrand & Ségur, 1991).

### III.3. Blanche d'Armagnac et vieillissement des armagnacs

Une eau-de-vie prétendant à l'appellation « Blanche d'Armagnac » devra être maturée au minimum 3 mois dans un contenant inerte (pas en barrique) et ne devra présenter aucune coloration. Est donc donnée ici la composition chimique, plutôt exhaustive, d'une eau-de-vie blanche d'Armagnac indépendamment de la variété utilisée, des procédés de vinification et du type de distillation. Le spectre de TAV retrouvées dans une eau-de-vie en sortie d'alambic varie de 52 à 72,4 % (v/v). Ces résultats sont issus de plusieurs années de recherche et de quantification, au sein du laboratoire, pour les différents composés présentés (Tableau 2). Ces éléments de composition donnent un panorama général et chimique des constituants d'une eau-de-vie blanche d'Armagnac tout en restant une image moyenne des compositions retrouvées. Ces résultats sont corroborés par les valeurs disponibles dans la littérature scientifique (Bertrand, 2003; Bertsch, 1992).

Tableau 2 : Composition chimique d'une eau-de-vie blanche d'Armagnac. Les teneurs sont exprimées en mg·L<sup>-1</sup> pour une eau-de-vie titrée à 60 % d'éthanol (v/v), sauf indication contraire, mais également en g·hL<sup>-1</sup> d'Alcool Pur. Il s'agit donc de la composition d'une eau-de-vie blanche brute et non commerciale. À chaque fois sont données les teneurs moyennes mais également les teneurs maximales retrouvées dans une eau-de-vie blanche

Groupes de composés	Composés	Teneur (mg/L) à 60 % (v/v)		Teneur (g/hL AP)	
		Maximum	Moyenne	Maximum	Moyenne
Alcools supérieurs	Propan-1-ol	220,00	130,00	36,67	21,67
	2-méthylpropan-1-ol	600,00	400,00	100,00	66,67
	2-méthylbutan-1-ol	500,00	300,00	83,33	50,00
	3-méthylbutan-1-ol	2000,00	1200,00	333,33	200,00
	Butan-1-ol	5,00	3,50	0,83	0,58
	Butan-2-ol	5,00	1,00	0,83	0,17
Autres alcools	Méthanol	360,00	230,00	60,00	38,33
	Hexanol-1	16,00	10,00	2,67	1,67
	Hexen-3-ol-1	0,30	0,10	0,05	0,02
	2-Phényl éthanol	60,00	20,00	10,00	3,33
Acides volatils	Acide acétique	220,00	100,00	36,67	16,67
	Acide isobutyrique	5,00	2,00	0,83	0,33
	Acide butyrique	6,00	2,00	1,00	0,33
	Acide isovalérianique	5,00	2,00	0,83	0,33
	Acide hexanoïque	15,00	5,00	2,50	0,83
	Acide octanoïque	50,00	12,00	8,33	2,00
	Acide décanoïque	30,00	7,00	5,00	1,17
	Acide dodécanoïque	5,00	2,00	0,83	0,33



Groupes de composés	Composés	Teneur (mg/L) à 60 % (v/v)		Teneur (g/hL AP)	
		Maximum	Moyenne	Maximum	Moyenne
Acides gras	Acide myristique	1,00	0,30	0,17	0,05
	Acide palmitique	2,50	1,50	0,42	0,25
	Acide palmitoléique	0,40	0,20	0,07	0,03
	Acide stéarique	0,40	0,25	0,07	0,04
	Acide oléique	0,40	0,30	0,07	0,05
	Acide linoléique	0,30	0,30	0,05	0,05
	Acide linoléique	0,10	0,05	0,02	0,01
Acétates d'alcools supérieurs	Acétate d'isoamyle	30,00	5 - 20	5,00	1 - 3
	Acétate de 2-phényléthyle	5,00	1,00	0,83	0,17
	Acétate d'hexyle	2,00	0,50	0,33	0,08
Esters éthyliques d'acides gras	Butyrate d'éthyle	3,50	1,00	0,58	0,17
	Hexanoate d'éthyle	10,00	3,00	1,67	0,50
	Octanoate d'éthyle	25,00	8,00	4,17	1,33
	Décanoate d'éthyle	12,00	5,00	2,00	0,83
	Dodécanoate d'éthyle	6,00	3,00	1,00	0,50
	Myristate d'éthyle	1,00	0,70	0,17	0,12
	Palmitate d'éthyle	2,00	1,00	0,33	0,17
	Palmitoléate d'éthyle	0,50	0,30	0,08	0,05
	Stéarate d'éthyle	0,50	0,30	0,08	0,05
	Oléate d'éthyle	nd	0,70	nd	0,12
	Linoléate d'éthyle	4,00	2,00	0,67	0,33
	Linoléate d'éthyle	1,00	0,50	0,17	0,08
	Esters divers	Acétate d'éthyle	350,00	200,00	58,33
Lactate d'éthyle		300,00	30 - 150	50,00	5 - 25
Succinate de diéthyle		5,00	1,00	0,83	0,17
Composés carbonylés	Ethanal	100,00	40,00	16,67	6,67
	Propanal	1,00	0,20	0,17	0,03
	2-méthylpropanal	6,00	2,50	1,00	0,42
	2-méthylbutanal	1,00	0,50	0,17	0,08
	3-méthylbutanal	1,00	0,50	0,17	0,08
	Hexanal	0,50	0,20	0,08	0,03
	Heptanal	0,10	0,05	0,02	0,01
	Octanal	0,02	0,01	0,00	0,00
	Benzaldéhyde	2,00	0,50	0,33	0,08
	Non-2-énal	0,01	0,00	0,00	0,00
	Nonan-2-one	0,05	0,02	0,01	0,00
	Glyoxal	2,00	1,00	0,33	0,17
	Méthylglyoxal	2,00	1,00	0,33	0,17
	Phénols volatils	4-Vinylgaïacol	100,00		16,67
4-Vinylphénol		300,00		50,00	
4-Ethylgaïacol		0,50		0,08	
4-Ethylphénol		1,50		0,25	
Substances diverses	Acétal	30,00	10,00	5,00	1,67
	Acétoïne	2,00	1,00	0,33	0,17
	Diacétyle	4,00	1,00	0,67	0,17
	β- Damascénone	0,25	0,10	0,04	0,02
	TDN	0,20	0,50	0,03	0,08

Groupes de composés	Composés	Teneur (mg/L) à 60 % (v/v)		Teneur (g/hL AP)	
		Maximum	Moyenne	Maximum	Moyenne
Composés soufrés volatils ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Hydrogène sulfuré	5,00		0,83	
	Méthanethiol	3,00		0,50	
	Éthanethiol	nd	nd	nd	nd
	Sulfure de diméthyle	120,00	50,00	20,00	8,33
	Disulfure de carbone	60,00	10,00	10,00	1,67
	Disulfure de diméthyle	10,00	5,00	1,67	0,83

Les eaux-de-vie d'Armagnac, en tant que produits d'AOC, sont soumises à une réglementation stricte en ce qui concerne leur élevage. Il faut alors distinguer la maturation du vieillissement. La maturation est réservée à une eau-de-vie d'Armagnac qui sera qualifiée de « Blanche Armagnac ». Un tel spiritueux devra être mûri, durant 3 mois à compter de la distillation, dans un récipient inerte pour la couleur et ne devra présenter aucune coloration. Ce type d'Armagnac est AOC depuis 2005 seulement ouvrant la voie de la filière au marché des alcools blancs. Il représente aujourd'hui 1 à 2 % des ventes d'Armagnac et est en progression. Le vieillissement concerne les eaux-de-vie destinées à vieillir en fût de chêne sessile (*Quercus peatrae*), pédonculé (*Q. robur*) ou leur croisement). Les armagnacs, complétés ou non des dénominations géographiques complémentaires, sont conservés durant une période minimale d'1 année, décomptée à partir du 1<sup>er</sup> avril suivant la mise en vieillissement en bois de chêne (Décret n° 2014-1642 du 26 décembre 2014 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », 2014). Ils vieillissent sous contenant de bois de chêne pendant un nombre d'années variable selon l'âge auquel l'eau-de-vie est vendue. Ils sont travaillés, éventuellement assemblés par les maitre de chais. Les Armagnacs sont vendus en assemblage ou en millésime et les mentions de vieillissement indiquées sur l'étiquetage sont régies selon le compte d'âge de l'eau-de-vie, c'est-à-dire le nombre d'années de vieillissement de l'Armagnac le plus jeune intégré dans l'assemblage. Une description plus précise de cette correspondance est disponible à l'Annexe 1.

## Chapitre 3 : *Botrytis cinerea*, la pourriture grise de la vigne

Étymologiquement *Botrytis* est issu du grec ancien βῆρυξ signifiant littéralement grappe de raisin. *Botrytis cinerea* est un champignon redouté des professionnels de la vigne et du vin pour les dégâts qu'il peut causer. Plus connu sous le nom d'un symptôme observé, la pourriture grise (Figure 12c), *Botrytis cinerea* est un problème mondial dû aux importantes pertes économiques qu'il peut engendrer (Romanazzi & Droby, 2016). De manière opposée, le champignon peut être à l'origine d'une transformation qualitative des baies de raisin, la pourriture noble, et être ainsi permettre la production de certains vins blancs liquoreux.

### I. Biologie de *Botrytis cinerea*

*B. cinerea* est la forme asexuée du champignon *Botrytinia fuckeliana*. En 1886, le professeur de botanique Heinrich Anton de Bary (1831 – 1888) décrit cette forme asexuée comme une apothécie pédicellée de couleur brunâtre, prenant naissance sur un sclérote (De Bary, 1886 ; Dubos, 2002). Toutefois cette forme reste très rare dans le milieu naturel, probablement à cause de la fugacité d'existence des apothécies (Giraud *et al.*, 1998).

Concernant la forme *B. cinerea*, celui-ci possède plusieurs moyens de se développer et de se disséminer (Dubos, 2002):

- **Le mycélium** (Figure 12a et Figure 12b), de couleur brun-olivâtre, régulièrement cloisonné en forme de ruban et mesurant de 11 à 23  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
- **Les conidiophores** (Figure 12e et Figure 12f), de couleur foncée, se divisent en plusieurs branches qui se terminent en une cellule apicale élargie portant des bouquets de conidies (spores asexuées (Figure 12d)). Les conidiophores mesurent 1 à 3 mm de long et portent donc des conidies, cellules ovoïdes ou globuleuses, et lisses mesurant 10 à 12  $\mu\text{m}$  de long et 6 à 8  $\mu\text{m}$  de large ;
- **Les microconidies** sont produites à partir de phyalides issues de mycélium âgé. Les microconidies sont hyalines, unicellulaires et mesurent de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- **Les sclérotés** sont davantage des structures de conservation de *B. cinerea*. Constitués d'une médulla, un enchevêtrement de mycélium et de cellules corticales mélanisées, les sclérotés sont donc noirs, discoïdes et s'attachent fermement au substrat sur lequel ils se sont formés. Ils mesurent 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre.

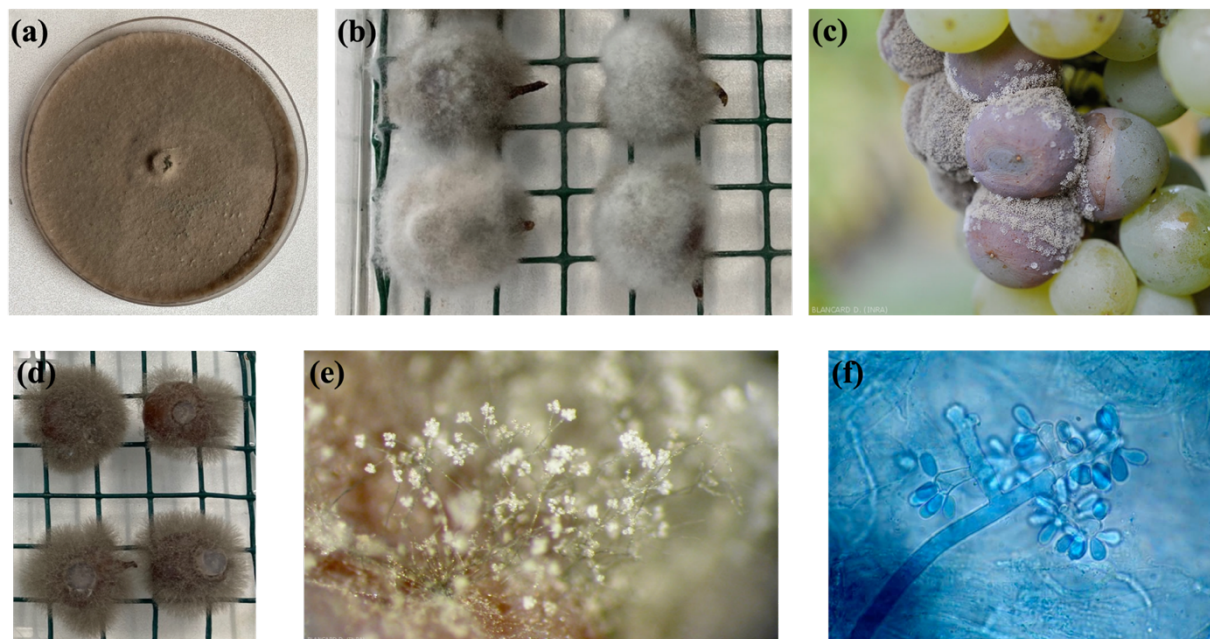


Figure 12 : Différentes formes de *B. cinerea*. (a) Mycélium sur boîte de Petri, cultivé à partir d'un implant du champignon et sur milieu malt-agar (crédit personnel). (b) Mycélium observable sur baie, colonisant la totalité de cette dernière (crédit personnel). (c) Pourriture grise observable sur grappe de raisin blanc, directement au vignoble (<http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes>). (d) Spores asexuées observable sur baie, colonisant la totalité de cette dernière (crédit personnel). (e) Conidiophores portant des conidies à la surface d'une baie infectée par le champignon (<http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes>). (f) Conidiophores portant des conidies (<http://ephytia.inra.fr/fr/C/6988/Vigne-Description-du-champignon>)

### I.1. Cycle de développement de la pourriture grise

*B. cinerea* est un champignon phytopathogène saprophyte capable d'infecter un très grand nombre d'hôtes, plus de 1 400 espèces de plantes cultivées, dont la vigne, y sont sensibles (Fillinger & Yigal, 2016). Un résumé graphique du cycle biologique de *B. cinerea* est disponible dans la Figure 13.

Les conidies, produites, à la fin de l'hiver ou en début de printemps, sur un mycélium âgé ou à partir de sclérotés à la surface du sol, représentent la plus importante source d'inoculum primaire pour une infection par *B. cinerea* (Elmer, 2007). À la sortie de l'hiver, *B. cinerea* se développe sur les débris végétaux (capuchons floraux, rafles, vrilles, pétioles de feuilles et débris de sarments) restés au sol (Seyb *et al.*, 2000). Les conidies alors produites sont disséminées par le vent et la pluie. La floraison de la vigne est notamment le stade clef dans une étude épidémiologique et écologique de *B. cinerea*, dont les modes d'infections de la fleur jusqu'au fruit sont bien connus (Elmer, 2007) :

- Infection conidienne **du style et des ovules** : les conidies infectent le style avant de se développer en hyphes mycéliens pour atteindre les ovules. À partir de là, le champignon rentre dans une forme de quiescence et se développera lorsque les défenses de l'hôte seront plus faibles, induisant un brunissement des raisins.
- Infection conidienne **des étamines et des pétales** : qui se poursuit en une croissance hyphale dans les tissus floraux jusqu'au réceptacle. Il en résulte une infection quiescente qui deviendra agressive dès que le fruit sera mûr. Des études histologiques ont montré que cette infection du fruit partirait du pédicelle pour ensuite se propager aux restes des tissus (Pezet & Pont, 1992).
- Infection **du fruit par le pédicelle** : des études ont permis d'identifier le pédicelle de la baie, dans les premiers stades de développement de cette dernière, comme une zone sensible à l'infection par *B. cinerea* (Holz *et al.*, 1997). Toutefois, au cours de la saison, la résistance ontogénique à *B. cinerea* du pédicelle augmente (Holz, 2001).
- Infection conidienne et colonisation extensive **des débris végétaux dans les grappes** : suivie d'une phase saprophyte à partir de ces tissus végétaux piégés dans la grappe. Les dégâts sur baies que pourrait occasionner le développement de cette infection sur ces dernières, sont relativement faibles, en raison de leur résistance mécanique au début de leur maturation.
- Accumulation **de conidies à l'intérieur de la grappe en formation** : de manière similaire à précédemment, *B. cinerea* entre dans une phase saprophytique et si les conditions lui sont favorables, une forte production de conidies va alors contaminer la surface externe des baies en maturation. Les défenses mécaniques des baies permettent de ralentir l'infection jusqu'à un stade de maturité plus avancé. Leurs exsudats représentent des stimuli suffisant pour une infection par les conidies, induisant un brunissement des raisins.
- Infection conidienne **des baies mûres**. Leurs défenses diminuant, des symptômes apparaissent à la surface des baies, une nouvelle production de conidies est enclenchée et un nouveau cycle d'infection peut commencer.

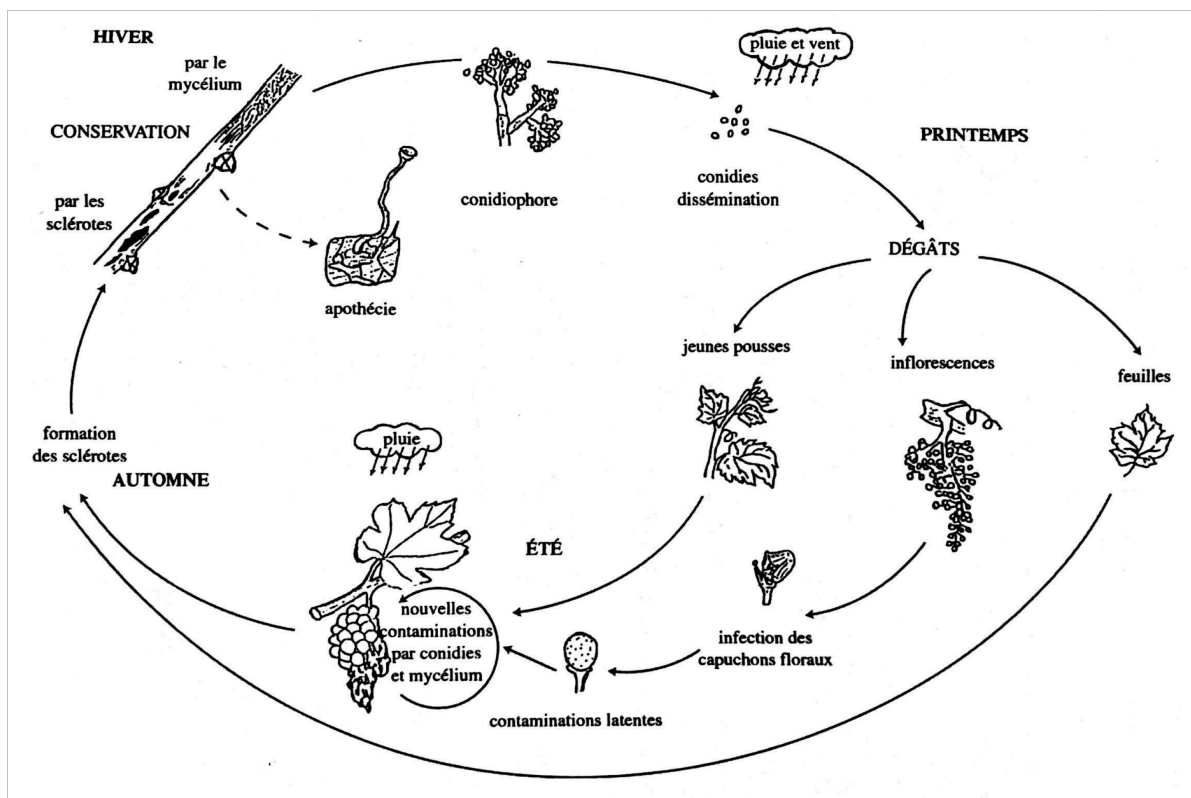


Figure 13 : Cycle biologique de *Botrytis cinerea* (Dubos, 2002)

## I.2. Quiescence du champignon

La quiescence de *B. cinerea* a été mise en évidence pour la première fois en 1973 (McClellan & Hewitt, 1973). Cette latence du champignon dans l'infection est encore décrite comme « *un aspect énigmatique de l'écologie de B. cinerea* » (Coley-Smith *et al.*, 1980) puisque son rôle exacte dans l'épidémiologie de la pourriture grise et son implication dans la perte de rendement sont encore mal connus. Toutefois, il semblerait que le champignon pénètre dans la baie de raisin par les blessures d'abscission des pièces florales et certainement par les stomates déjà fonctionnels de la baie et ce avant la fermeture de la grappe (Dubos, 2002). Trois étapes sont toujours identifiées dans ce phénomène : 1) l'établissement du champignon, 2) son confinement et l'arrêt de sa croissance et 3) sa reprise de croissance active également appelée phase de fuite (Latunde-Dada, 2001; Wade & Cruickshank, 1992a). Toutefois, peu de ces infections quiescentes, ayant lieu tôt dans la saison (floraison), deviennent agressives lorsque la baie mûrit. À l'inverse des infections quiescentes post-véraison qui sont beaucoup plus susceptibles d'induire d'importants taux de brunissement et de pourriture dès que la baie mûrit (Wade & Cruickshank, 1992a, 1992b).

### **I.3. Facteurs de sensibilité au champignon**

La moindre blessure des tissus végétaux peut favoriser le développement de *B. cinerea*. Les raisins peuvent donc être endommagés par des facteurs abiotiques tels que le gel, grêle, le vent ou le soleil (Nair & Hill, 1992) ; ainsi que par des facteurs biotiques comme les insectes, qui sont connus pour être de potentiels vecteurs de maladies (Fermaud, 1990; Webber & Givvs, 2012), escargots, oiseaux, le gonflement des fruits, la compression des baies (grappes compactes) et lésions causées par d'autres maladies (comme l'oïdium) (Jarvis, 1977).

#### **I.3.1. Intégrité de la pellicule**

La structure et l'épaisseur de la cuticule ainsi que des couches épidermiques font partie des facteurs majeurs de résistance de la baie de raisin à *B. cinerea* (Commenil *et al.*, 1997). Ainsi un taux de contact élevé, entre les baies d'une grappe, est un facteur de sensibilité au champignon (Marois *et al.*, 1986 ; Rosenquist & Morrison, 1989). De la même manière, des grappes pignées favorisent l'infection par *B. cinerea* (Vail *et al.*, 1998; Vail & Marois, 1991).

#### **I.3.2. Insectes et invertébrés vecteurs de *B. cinerea***

Plusieurs insectes et/ou invertébrés peuvent être vecteurs de *B. cinerea*. Notamment les tordeuses de la grappe (*Lobesia botrana*) mais également les thrips (*Thrips obscuratus*), les pyrales brunes de la pomme (*Epiphyas postvittana*) et les drosophiles (*Drosophila* spp) (Bailey *et al.*, 1997; Bulit & Verdu, 1973; Capy *et al.*, 1987; Fermaud & Gaunt, 1995; Fermaud & Giboulot, 1992; Fermaud & Le Menn, 1992). Concernant les drosophiles, leur potentiel rôle de vecteur de *B. cinerea* reste encore à préciser (Louis *et al.*, 1996).

Les blessures, occasionnées sur baies par les oiseaux, constituent d'excellents sites d'entrées pour le champignon (Chambers, 1993). Enfin, il semblerait que les trainées de bave laissées par les escargots puissent favoriser la germination des conidies de *B. cinerea* (Michailides & Morgan, 1996).

#### **I.3.3. Nutrition de la plante hôte**

Les apports en azote et en calcium ont été les phyto-nutriments les plus étudiés. Cependant leur influence sur l'épidémiologie de *B. cinerea* présente des résultats contradictoires (Elad *et al.*, 2007; Elad & Shtienberg, 1995). Concernant spécifiquement l'azote, une forte alimentation azotée peut induire un retard dans l'arrêt de croissance des sarments, retard délétère pour la synthèse des composés phénoliques de la baie (Delas, 2000).

Cette vigueur excessive peut également entraîner la formation d'un trop grand nombre de baies, qui constitueront elles-mêmes des grappes trop compactes. Tous ces facteurs sont connus pour augmenter le risque d'une infection par *B. cinerea* (Delas, 2000; Keller *et al.*, 2001). La diminution contrôlée de la nutrition de la vigne est donc un objectif souhaitable (Valdès Gomez, 2007).

## II. Les interactions vigne-*B. cinerea*

### II.1. Les variétés résistantes et tolérantes au champignon

#### II.1.1. L'effet variétal

La nature de la variété de vigne est sans doute le facteur le plus prépondérant dans la sensibilité à *B. cinerea*. Plusieurs classements existent afin de comparer les variétés entre elles quant à leur sensibilité au champignon (Gabler *et al.*, 2003; Galet, 1993). Le rapport de force existant entre une variété de vigne et *B. cinerea* est dépendant de plusieurs facteurs :

- **L'architecture de la grappe de raisin** et notamment son état de compacité influence la sensibilité de la variété concernée aux infections par *B. cinerea*. Étant entendu que des grappes compactes et de grosses baies favorisent ces infections (Fermaud, Limiñana, *et al.*, 2001a).
- **Les barrières physiques de la baie de raisin** jouent également un rôle important dans ce rapport de force. Elles sont de plusieurs ordres :
  - Le nombre de pores à la surface de la baie : plus la porosité de cette dernière est importante, plus la baie sera sensible à *B. cinerea* (Blaich *et al.*, 1984; Eibach, 1994).
  - La quantité de pruine à la surface des baies : en quantité importante, elle permettrait une meilleure résistance à *B. cinerea* en augmentant l'hydrophobicité de la surface du raisin, diminuant ainsi l'adhésion du champignon (Marois *et al.*, 1986; Percival *et al.*, 1993).
  - L'épaisseur de la cuticule constitue la première barrière physique contre *B. cinerea* (Hill *et al.*, 1981). Il est à noter que les vignes américaines présentent des épaisseurs de cuticule plus importantes (de 4 à 10 µm) que les vignes européennes (de 1,5 à 3,8 µm) et sont plus résistantes à *B. cinerea* (Hill *et al.*, 1981).



- **Les barrières chimiques de la baie de raisin**, feront l'objet d'un paragraphe spécifique (page 42)
- **Les facteurs externes et internes à la variété de vigne**. Il faut entendre ici, les facteurs environnementaux, les pratiques culturales (fertilisation, irrigation), la vigueur végétative et les caractéristiques des vignes (porte-greffe, âge). Tous ces facteurs pouvant influencer les autres, présentés précédemment au cours de ce paragraphe (Pañitruir-De la Fuente *et al.*, 2020).

Il est intéressant de noter qu'il existe une variabilité intra-variétale quant à la sensibilité à *B. cinerea* (Vail *et al.*, 1998).

### II.1.2. L'effet porte-greffe

L'influence du porte-greffe sur l'infection par *B. cinerea* a été très étudiée (Cristinzio *et al.*, 2000; Delas *et al.*, 1984; Egger *et al.*, 1979; J. H. S. Ferreira & Marais, 1987). De par sa nature même, le porte-greffe présente une influence qui est plus indirecte : il joue sur la vigueur du greffon et la compacité des grappes (J. H. S. Ferreira & Marais, 1987). Le porte-greffe influence également la structure rhizomique des vignes. Plus ces dernières ont un enracinement profond, moins elles semblent sensibles à la pourriture grise (Ribéraud-Gayon *et al.*, 1980).

## II.2. Résistance ontogénique des organes fructifères

### II.2.1. Relation entre maturité des baies et sensibilité à *B. cinerea*

En préambule, il est nécessaire de définir deux termes : maturité et maturation. La maturation est le développement de la baie à partir de la véraison (BBCH code 81) jusqu'à la maturité définie par le producteur. La maturation se caractérise par une accumulation, dans la baie, de différents solutés : acides organiques, sucres, polyphénols, composés aromatiques (Boss *et al.*, 1996). La maturité est le stade qui définit artificiellement un ensemble de caractéristiques physico-chimiques décrivant un raisin comme étant prêt à être vendangé. En œnologie, plusieurs maturités co-existent : maturité technologique (rapport sucre/acide optimal), maturité phénolique (concentration maximale en composés polyphénoliques), maturité phénologique (40 à 50 jours après véraison), maturité aromatique (concentration maximale en composés aromatiques variétaux) et maturité physiologique (pépins prêts à germer) (Torregrosa *et al.*, 2020). Il appartient alors à chaque producteur de définir une maturité dite œnologique, selon ses propres critères, et qui serait le compromis entre toutes les maturités, préalablement définies, afin d'atteindre un objectif produit.

La relation entre maturité des baies et sensibilité à *B. cinerea* a été étudiée par de nombreux auteurs. L'état de maturité des baies est souvent associé à leur concentration en sucres.

Les conclusions de plusieurs études montrent une corrélation positive entre la concentration en sucres des baies et leur sensibilité à *B. cinerea* (Deytieux-Belleau *et al.*, 2009; Gabler *et al.*, 2003; Kretschmer *et al.*, 2007; Mundy & Beresford, 2007). Toutefois la concentration en sucres n'est pas le seul paramètre déterminant la sensibilité au champignon. De plus, cet effet maturité peut être contrebalancé par des vignobles très vigoureux, caractérisés par des niveaux de maturité très bas. Ces conditions microclimatiques d'une canopée dense favorisent également la colonisation par le champignon (Valdés-Gómez *et al.*, 2008). Enfin l'effet maturité décrit dans ce paragraphe contribue, si les conditions climatiques le permettent, aux infections conidiennes post-véraison décrite au paragraphe I.1 de ce chapitre.

### **II.2.2. Résistance pelliculaire : variation de la composition liée à la sensibilité**

La résistance des baies de raisins est essentiellement déterminée par la première barrière physique que constitue la pellicule. La composition chimique de cette dernière ainsi que sa structure définissent la résistance à *B. cinerea*.

Certains acides organiques (tartrique, malique, glycolique), très concentrés dans les baies immatures, ont montré leur toxicité envers *B. cinerea* (Doneche, 1986; Pezet *et al.*, 2005; Vercesi *et al.*, 1997).

La quantité d'eau libre, ou activité de l'eau ( $A_w$ ) est également un paramètre important dans la sensibilité à *B. cinerea*. En effet, la maturation des baies se caractérise par de profondes modifications de la structure pelliculaire, engendrant probablement une plus grande perméabilité de la pellicule et donc une évaporation de l'eau pelliculaire ainsi qu'une concentration des sucres. Cette diminution de l' $A_w$ , se traduit alors par une sensibilité accrue au champignon (Deytieux-Belleau *et al.*, 2009; Fermaud *et al.*, 2011).

Plus spécifiquement, la résistance ontogénique des baies à *B. cinerea* est liée à la présence de molécules antifongiques en concentrations suffisantes (Pezet *et al.*, 2005). Parmi elles, les composés phénoliques de la pellicule figurent comme très liés à une sensibilité moindre à *B. cinerea* (Dubos & Roudet, 2003; Sarig *et al.*, 1996). Plus précisément, les tanins pelliculaires sont négativement corrélés à la présence de pourriture grise sur les baies (Deytieux-Belleau *et al.*, 2009; Pañitrur-De la Fuente *et al.*, 2020). Étant entendu que des baies immatures sont plus concentrées en tanins pelliculaires. Les stilbènes sont également considérés comme des composés à pouvoir antifongique.

Il semblerait exister une corrélation négative entre la teneur en resvératrol des feuilles et la sensibilité à *B. cinerea* (Langcake & McCarthy, 1979). Concernant les baies, la production de resvératrol serait liée à une infection par *B. cinerea* (Jeandet *et al.*, 1995). La production induite du resvératrol et autres stilbènes ( $\epsilon$ -viniférine,  $\alpha$ -viniférine et ptérostilbène) serait alors suffisante pour inhiber la croissance de *B. cinerea*. Plus exactement, ces composés pourraient inhiber les activités enzymatiques, en particulier les hydrolases du champignon (Langcake, 1981).

### **II.3. Gestion de la canopée et de la vigueur**

#### **II.3.1. Systèmes de conduite**

Les raisins d'une vigne (très) vigoureuse, se développent au milieu d'une canopée qui conserve fortement l'humidité des pluies, les rendant ainsi plus sensibles à une infection par *B. cinerea* (Steel, 2001). Les différents systèmes de palissage induisent ainsi des sensibilités différenciées au champignon. Les vignes conduites en pergola semblent être les plus favorables, tandis que les vignes conduites en Guyot le sont nettement moins (Cargnello *et al.*, 1991). De la même manière, un système en cordon permet une exposition au soleil plus importante (que dans les autres systèmes), induisant ainsi une sensibilité moindre à *B. cinerea* (Redl, 1988).

#### **II.3.2. Taille de la vigne**

Les différentes techniques de taille hivernale de la vigne influencent également la sensibilité de la plante au champignon. Ainsi, le fait d'augmenter le nombre de bourgeons du pied de vigne permet une production de grappes plus aérées et donc de diminuer la sensibilité (Christensen, 1981). Proche de cette idée, le fait de tailler moins sévèrement la vigne permet de modifier la structure de la grappe, pouvant diminuer sa compacité et donc sa sensibilité à *B. cinerea* (Fermaud, Limiñana, *et al.*, 2001; Fermaud, Pieri, *et al.*, 2001; Martin, 1990; Vail & Marois, 1991). Toutefois la taille de la vigne et son système de conduite restent dépendant de la variété cultivée ainsi que d'autres facteurs non exposés ici.

### **III. Moyens de lutte contre *B. cinerea***

#### **III.1. Prophylaxies**

##### **III.1.1. Avancement de la date de récolte**

La date de récolte est un moyen simple de limiter les pertes de rendement causées par une infection de *B. cinerea*. En effet, en avançant la date de récolte, la fenêtre de sensibilité des baies – due à la diminution de leur résistance ontogénique – devient plus réduite (Nair & Parker, 1985).

##### **III.1.2. Effeuillage**

L'effeuillage de la vigne consiste à réduire la surface foliaire (partiellement ou totalement), dans la zone fructifère, à un stade phénologique donné, généralement autour de la nouaison. Son effet sur la diminution de l'apparition de la pourriture grise, quel que soit la zone géographique concernée, est très bien documenté (Elmer & Reglinski, 2006; Gubler *et al.*, 1987; Latorre *et al.*, 2015; Percival *et al.*, 1994; Zoecklein *et al.*, 1992). L'effeuillage modifie le microclimat de la zone fructifère : température, humidité, déficit de la pression de vapeur (transpiration de la plante) et vitesse du vent. Cette dernière favorise les phénomènes d'évaporation à la surface de la baie (English *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1988). L'effeuillage a pour autre conséquence d'exposer un peu plus la zone fructifère aux rayonnements solaires (Fermaud, Limiñana, *et al.*, 2001; Keller, 2020; Langcake, 1981; Percival *et al.*, 1993; Pieri & Fermaud, 2005). Enfin l'effeuillage peut induire des molécules antifongiques, comme les tanins (Pañitrur-De la Fuente *et al.*, 2020).

##### **III.1.3. Gestion des sources d'inocula**

Réduire préventivement les sources d'inocula peut permettre de réduire les dégâts causés par la pourriture grise. Par exemple, supprimer les tissus floraux sénescents ainsi que les baies avortées, grâce à de l'air comprimé, par exemple, permet de réduire d'un tiers les dégâts causés par la pourriture grise (Jermini *et al.*, 1986). Toutefois, cette réduction de substrats favorables à *B. cinerea* ne fonctionne pas de manière systématique, mettant en avant le rôle des autres facteurs (Wolf *et al.*, 1997).

### III.2. Produits de biocontrôle

Le biocontrôle est défini comme : « un ensemble de méthodes de protection des cultures basées sur l'utilisation d'organismes vivants ou de substances naturelles : les macro-organismes (principalement insectes, nématodes, acariens...), les microorganismes (virus, bactéries, champignons...), les médiateurs chimiques tels que les phéromones et enfin, les substances naturelles d'origine minérale, végétale ou animale. » (Malausà et al., 2018).

En se basant sur cette définition, plusieurs produits de biocontrôle sont aujourd'hui disponibles (Tableau 3) pour lutter contre la pourriture grise, à base de :

- **Microorganismes** : notamment *Bacillus subtilis* et *Aureobasidium pullulans* ;
- **Substances naturelles minérales** : hydrogénocarbonate de potassium ;
- **Substances naturelles végétales** : notamment des huiles essentielles contenant des substances actives telles que le thymol, le géraniol ou encore l'eugénol (Fedele et al., 2020).

Tableau 3 : Caractérisation des produits de biocontrôle autorisés à l'utilisation pour la lutte contre *B. cinerea* en France. (Index acta biocontrôle, 2023). SDP = Stimulation de Défense des Plantes

Types de substances	Matières actives	Mode d'action
Microorganismes	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibiose, SDP
	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibiose, SDP
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Compétition, antibiose, SDP
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Compétition, antibiose, SDP
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Compétition, antibiose, SDP
	<i>Trichoderma atroviride</i>	Compétition
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Compétition
	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Compétition, antibiose, SDP
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Compétition
Substances naturelles	Bicarbonate de potassium	Effet pH, choc osmotique
	Eugénol, Thymol, Géraniol	Fongicide
	Acide gibbérélique	Substance de croissance, élongation des grappes
	Acide gibbérélique	Substance de croissance, élongation des grappes

L'utilisation de composés, issus d'huiles essentielles de certaines plantes, a montré son efficacité quant à la réduction de *B. cinerea*. Ainsi des molécules comme l'eugénol (Combrinck et al., 2011), le thymol (Tsao & Zhou, 2000; J. Zhang et al., 2019) ou encore le géraniol (Tsao & Zhou, 2000) ont montré leur capacité à enrayer le développement de *B. cinerea*. Le thymol et l'eugénol, de par leur lipophilie, se dispersent dans les couches des membranes cellulaires fongiques, modifiant ainsi leur perméabilité et perturbant alors leur croissance (Pina-Vaz et al.,

2004; Sikkema *et al.*, 1995). C'est ainsi, qu'en se basant sur l'action unitaire de ces trois composés, un produit phytosanitaire de biocontrôle a été développé, en mélangeant l'eugénol, le thymol et le géraniol, puis testé aux champs (Fedele *et al.*, 2020).

Plus généralement, l'intérêt des produits de biocontrôle réside dans l'absence de résistance de la part de *B. cinerea*. De plus, les délais avant récoltes sont très faibles (*Index acta biocontrôle*, 2023).

### III.3. Lutte chimique

À l'inverse du biocontrôle, l'utilisation de produits phytosanitaires de synthèse représente un autre moyen de lutte contre la pourriture grise. Il existe de nombreuses substances actives disponibles dont les actions sur la biologie de *B. cinerea* sont diverses (Tableau 4). Toutefois, les politiques publiques et les consommateurs finaux tendent à réduire par les professionnels le recours à ces produits phytosanitaires de synthèse, qui représentent un danger potentiel pour la santé humaine et le milieu naturel. De plus, ces produits deviennent de moins en moins efficaces, par des effets de résistances induites, contre les champignons envers lesquels ils sont censés être actifs (Fenner *et al.*, 2013).

Tableau 4 : Caractéristiques des différents fongicides utilisés pour la lutte contre *B. cinerea* (Ajouz, 2009; Couteux *et al.*, 2008) et <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>

Famille de fongicides	Matières actives	Effets	Cibles
Sulfamides	Dichlorofluanide	Contact	Multi-sites
Phénylpyrroles	Fludioxonil	Contact	Polyols et osmorégulation: histidine, protéine kinase
Anilino-pyrimidines	Pyrimethanil Cyprodinil	Contact + Vapeur + Activité translaminaire	Biosynthèse des acides aminés ou des protéines
Hydroxyanilides	Fenhexamid	Contact	Biosynthèse de stérole, inhibition de la 3-cétaréductase (C4-déméthylase)
Dicarboximides	Iprodione	Contact	Polyols et osmorégulation: histidine, protéine kinase
Carboximides	Boscalide	Contact et systémique	Inhibition de la succinate ubiquinone réductase, arrêt de la respiration et de la production d'énergie
Strobilurines	Azoxystrobine	Contact et systémique	Blocage de la respiration + arrêt de la production d'énergie

Famille de fongicides	Matières actives	Effets	Cibles
Chlorothalonil	Chloronitriles	Contact	Réactions enzymatiques chez les spores
Cyproconazole + Chlorothalonil	Triazoles+ Chloronitriles	Contact	Réactions enzymatiques chez les spores





# Chapitre 4 : L'eugénol, une molécule aux multiples propriétés

## I. Vision d'ensemble de l'eugénol

### I.1. Panorama historique du giroflier

Le clou de girofle est une épice bien connue en cuisine comme en pharmacologie (soins dentaires). Il s'agit en fait des boutons de fleur du giroflier (*Syzygium aromaticum* L.). Leur forme de clou a naturellement conduit à leur dénomination vernaculaire dans plusieurs langues. Le giroflier est un arbre endémique de l'archipel des Moluques (*Maluku* en indonésien) situé dans l'est de l'Indonésie (Kamatou *et al.*, 2012). Les clous issus des girofliers furent l'objet d'un intense commerce mondial, dès l'époque médiévale où ils étaient utilisés à des fins médicales ou culinaires.

Depuis plus de 2000 ans, les clous de girofle sont utilisés en Chine comme épice et comme parfum. En 1640, pour la première fois en France, le médecin montpelliérain Lazare Rivière (1589 – 1655) décrit, dans sa *Praxis medica*, l'huile de clou comme un remède à la rage de dent (Rivière, 1640). En médecine traditionnelle chinoise l'huile de clou est réputée : carminative (expulsion des gaz intestinaux), antispasmodique (apaisement des convulsions, des spasmes et des contractures), antibactérienne et antiparasite, tandis que les bourgeons permettent de traiter la dyspepsie (trouble digestif), la gastrite aiguë chronique et la diarrhée (Barceloux, 2008; Harborne *et al.*, 1999). La composition de l'huile de clou de girofle fut étudiée par deux chimistes français. Jean-François Bonastre (1783 – 1856) nomma *eugénine*, la substance extraite de l'huile de girofle après ses premières expériences. Jean-Baptiste Dumas (1800 – 1884) identifia l'*acide eugénique* qu'il décrit lui-même comme un isomère de l'*eugénine* (Bonastre, 1834; Dumas, 1844). Il semblerait que c'est bien l'*acide eugénique* qui correspond à l'eugénol connu aujourd'hui (Avenas, 2022).

L'eugénol est donc très lié à l'histoire du giroflier et tire son nom de l'ancienne terminologie du giroflier : *Eugenia caryophyllata* Thunb. Le genre *Eugenia* fut, pour le botaniste florentin Pier Antonio Micheli (Florence 1679 – Florence 1737), l'occasion de rendre hommage à Eugène de Savoie-Carignan, général de l'armée Habsbourg.

## I.2. Chimie et propriétés pharmacologiques de l'eugénol

### I.2.1. Généralités

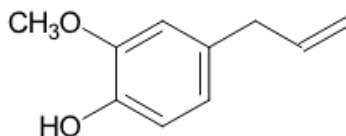


Figure 14 : Structure de l'eugénol

De manière plus rigoureuse, l'eugénol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) est nommé en français par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (UICPA) comme le 2-méthoxy-4-(2-propényl)-phénol et porte le numéro CAS 97-53-0. L'eugénol est un composé phénylpropanoïque (Figure 14) dérivé du gaïacol par la substitution d'une chaîne allyl. Certaines des caractéristiques de l'eugénol sont résumées dans le Tableau 5. L'eugénol se présente sous la forme d'un liquide d'apparence huileuse, de couleur claire à jaune pâle. Il se caractérise par son arôme typique de clou de girofle.

Tableau 5 : Principales caractéristiques chimiques et physiques de l'eugénol

Caractéristiques		Références
Masse molaire	164,2 g·mol <sup>-1</sup>	
Température d'ébullition	253,2 °C	(O'Neil <i>et al.</i> , 2006)
Masse volumique	1,066 kg·m <sup>-3</sup> (20 °C)	(National Toxicology Program, 1992)
Solubilité	2,463 g·L <sup>-1</sup> (eau, 25 °C) Soluble dans l'éthanol	(He <i>et al.</i> , 2010; O'Neil <i>et al.</i> , 2006)

### I.2.2. Répartition dans le règne végétal

L'eugénol est communément obtenu à partir d'huiles essentielles naturelles de plantes des familles *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* et *Myristicaceae* (Tableau 6). Il est largement réparti dans le règne végétal (Raja *et al.*, 2015). C'est bien dans l'huile essentielle de clou de girofle (*S. aromaticum*) que l'eugénol est le plus concentré (Ulanowska & Olas, 2021).

Tableau 6 : Répartition (non-exhaustive) de l'eugénol au sein du règne végétal (Raja *et al.*, 2015)

Plante	Genre espèce	Partie de la plante
Giroflier/Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	fleur/feuille/rafle
Piment de Jamaïque	<i>Pimenta dioica</i>	fruit
Bétel	<i>Piper betle</i> L.	feuille
Carotte	<i>Daucus carota</i>	pépin
Basilic sacré	<i>Ocimum tenuiflorum</i>	feuille
Cannelier de Ceylan	<i>Cinnamomum verum</i>	écorce
Curcuma	<i>Curcuma longa</i>	feuille/huile essentielle
Laurier sauce	<i>Laurus nobilis</i>	feuille
Gingembre sauvage d'Asie	<i>Asarum splendens</i>	racine
Noix de muscade	<i>Myristica fragrans</i>	pépin
Origan à petites feuilles	<i>Origanum microphyllum</i>	bois

### I.2.3. Propriétés antifongiques

De nombreuses propriétés pharmacologiques d'huiles essentielles sont dues principalement à l'eugénol. La présente bibliographie se concentre sur l'action antifongique (notamment les champignons phytopathogènes) de l'eugénol, ainsi que sur ses mécanismes d'action.

L'eugénol, de par sa nature lipophile, peut facilement se disperser entre les chaînes d'acides gras composant les bicouches des membranes cellulaires fongiques. Il en modifie ainsi la perméabilité et la fluidité, perturbant alors la croissance et la morphogénèse de l'enveloppe cellulaire (Pina-Vaz *et al.*, 2004; Sikkema *et al.*, 1995). De manière très intéressante, l'eugénol présente des effets toxiques contre plusieurs espèces des genres fongiques *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* (Gayoso *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007). Plus proche des problématiques viticoles, l'eugénol est capable d'inhiber la production d'ochratoxine A par *A. ochraceus* (Mak *et al.*, 2019). Enfin, d'un intérêt tout particulier pour la filière viti-vinicole, l'eugénol a plusieurs fois démontré une activité antifongique, *in vitro*, mais également *in vivo*, contre *B. cinerea* (Amiri *et al.*, 2008; Olea *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2010). Le transport de l'eugénol dans les cellules de *B. cinerea* est assuré par la protéine BcartB, régulée par un gène éponyme. Ce mécanisme peut être enrayé par des doses suffisamment élevées d'eugénol, et donc toxiques, pour le champignon (Schoonbeek *et al.*, 2003). En outre, l'eugénol est capable d'entraver le transport de biomolécules clefs (acides aminées et glucose) et d'induire ainsi une intensification des réactions d'oxydation en produisant des dérivés réactif de l'oxygène (Zhao *et al.*, 2021). De plus l'eugénol présente une dualité d'actions : son action antifongique peut s'exprimer s'il est en contact direct avec le champignon mais également s'il est présent sous forme de vapeur (Amiri *et al.*, 2008, 2020; Velázquez-Nuñez *et al.*, 2013).

Enfin l'eugénol entre dans la composition d'anti-*Botrytis* qui sont des produits de biocontrôle, preuve supplémentaire de son intérêt pour toute une filière agro-industrielle (Fedele *et al.*, 2020).

## II. L'eugénol en œnologie

### II.1. L'eugénol du bois de chêne

L'eugénol est connu en œnologie pour être une molécule apportée au vin, ou à l'eau-de-vie, par contact avec le bois de chêne. La teneur en eugénol des vins élevés en barriques dépend de plusieurs facteurs (Chatonnet, 1995), dont :

- L'essence de chêne utilisée. Le chêne sessile serait en capacité de céder plus d'eugénol (jusqu'à  $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que le chêne pédonculé ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ou que le chêne blanc américain, *Q. alba* (jusqu'à  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ;
- Le type de séchage appliqué au bois. Le séchage naturel à l'air libre semble mieux conserver l'eugénol (entre 2 et  $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que le séchage artificiel (à l'étuve) qui ne conserverait qu'entre 0,3 et  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ;
- Le bousinage du bois (chauffé de conditionnement qualitatif d'une barrique) qui implique plusieurs intensités de chaleur (température et temps de chauffe) pouvant être appliquées aux barriques. L'incidence sur des composés volatils tels que l'eugénol est variable en fonction de l'intensité appliquée, une chauffe forte apportant plus d'eugénol (jusqu'à  $71 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Toutefois, si le brûlage est trop intense, une partie de cet eugénol sera dégradé (passant ainsi de 71 à  $44 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Apporter un caractère boisé aux vins est également possible en utilisant des moyens moins onéreux que l'utilisation d'une barrique, l'influence sur l'apport de molécules telles que l'eugénol diffère en fonction de ces pratiques. Il est donc possible d'ajouter des préparations commerciales à base de bois de chêne (buchettes, douelles, « chips », granulés, copeaux ou encore boisé liquide). D'après Alain Bertrand, qui a contribué à la compréhension des phénomènes de transfert des molécules du bois vers le vin, l'utilisation de bûchettes chauffées permet un apport conséquent d'eugénol à un vin rouge (Bertrand *et al.*, 1997).

### II.2. Sa présence atypique dans les vins et les eaux-de-vie d'hybrides

Si l'eugénol est essentiellement apporté par le contact des vins, issus de *V. vinifera*, avec le bois de chêne, il peut être naturellement présent dans des produits (vins et/ou eaux-de-vie blanches) issus de variétés hybrides. Klaus Bertsch fut le premier à noter la présence atypique de l'eugénol

dans des eaux-de-vie blanches d'Armagnac, issues de la variété Baco blanc (Bertsch, 1992). Il indiqua toutefois, que l'eugénol n'était présent qu'à l'état de trace ( $\sim 20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Plus récemment, quatre années de recherche ont permis de définir l'eugénol comme composé variétal des vins et des eaux-de-vie blanches de Baco blanc (Franc *et al.*, 2023; Monsant, 2020; Noiville, 2019; Pelonnier-Magimel, 2018). Il est retrouvé dans les compartiments végétaux aériens du Baco blanc (feuilles, sarments, rafle, raisins) comme dans les phases liquides (moûts, vins, eaux-de-vie blanches). Concernant les vins, les concentrations varient de 10 à  $72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , tandis que pour les eaux-de-vie ces concentrations varient de 31 à  $175 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . De même, l'eugénol est également retrouvé dans des vins issus de la variété Maréchal Foch (jusqu'à  $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et des accessions de *V. riparia* jusqu'à  $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , et de *V. cinerea* jusqu'à  $328 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Sun, Gates, *et al.*, 2011; Sun, Sacks, *et al.*, 2011).

### II.3. L'influence sensorielle

#### II.3.1. Influence sur l'aromatique des vins

Si l'eugénol entre dans la sphère aromatique boisée des vins, sa contribution en tant que composé seul est relativement peu documentée. De plus, son seuil de perception dans des matrices peu alcoolisées (12 % (v/v)) est proche de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Cameleyre, 2017). Ce seuil est plus élevé et variable dans des matrices très alcoolisées : de 12 à  $58 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour des solutions hydroalcooliques de 40 à 58 % (v/v) et jusqu'à  $606 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour une eau-de-vie blanche à 40 % (v/v) (Monsant, 2020).

Dans les vins rouges, l'eugénol influence de manière significative la perception du caractère fruité. Il augmente l'intensité générale perçue et particulièrement les notes de « fruits frais » et d' « épice » (Cameleyre, 2017). Dans les vins liquoreux de Bordeaux, l'eugénol a été identifié comme partie prenante d'une interaction perceptive constituant l'arôme d' « orange sur-mûrie » (Stamatopoulos *et al.*, 2014).

L'eugénol, de par son importante distribution dans le règne végétal, est également retrouvé dans la banane (*Musa acuminata*). Plus encore, sa concentration dans ce fruit est liée au stade de maturité de ce dernier, si les variations et les valeurs pouvant dépendre des variétés de banane, la concentration en eugénol peut atteindre  $3,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de chair fraîche (Brat *et al.*, 2004). Mais l'importance de l'eugénol dans la banane réside dans son apport à l'aromatique de cette dernière. En effet, l'eugénol apporterait des notes corsées et moelleuses aux bananes mûres (Miranda *et al.*, 2001). En parfumerie, l'eugénol est également employé pour donner aux arômes artificiels de banane, une touche plus naturelle.

### **II.3.2. Influence somesthésique**

L'eugénol est connu depuis longtemps pour ses propriétés analgésiques (qui suppriment la sensibilité à la douleur) et anesthésiantes (qui rendent insensible à toute perception). C'est pourquoi il est encore utilisé dans les soins dentaires (Kamatou *et al.*, 2012). L'eugénol est également décrit comme une molécule irritante. En le dissolvant dans une solution hydroalcoolique à 4 % (v/v), les effets inductibles sur la langue de plusieurs participants ont pu être observés (Klein *et al.*, 2013). L'eugénol a montré un pouvoir irritant, paradoxalement inhibé par ce même eugénol après plusieurs applications répétées. L'eugénol a également insensibilisé la langue des participants contre la capsaïcine, molécule active de la plupart des piments et responsable de la sensation de fausse chaleur. Enfin il a été demandé aux panélistes de décrire cette sensation imprécise d'irritation. L'engourdissement, les sensations de picotement et de réchauffement ont été les plus cités (Klein *et al.*, 2013). Enfin, l'eugénol provoque également une âcreté, sensation elle aussi imprécise, décrite par des sensations identiques à l'irritation, avec pour même descriptif principal, l'engourdissement (Cliff & Heymann, 1992).

### **III. Les formes précurseurs de l'eugénol**

L'eugénol constitue un élément aromatique du bois œnologique à l'identique d'autres molécules aromatiques boisées. Slaghenaufi a proposé un précurseur potentiel de l'eugénol sous la forme d'un dérivé galate d'eugénol dissaccharide. Il s'agirait d'un enchaînement eugénol-hexose-pentose estérifié par l'acide gallique (Slaghenaufi, 2012). Toutefois, l'analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) n'a pas pu être effectuée pour confirmer cette structure.

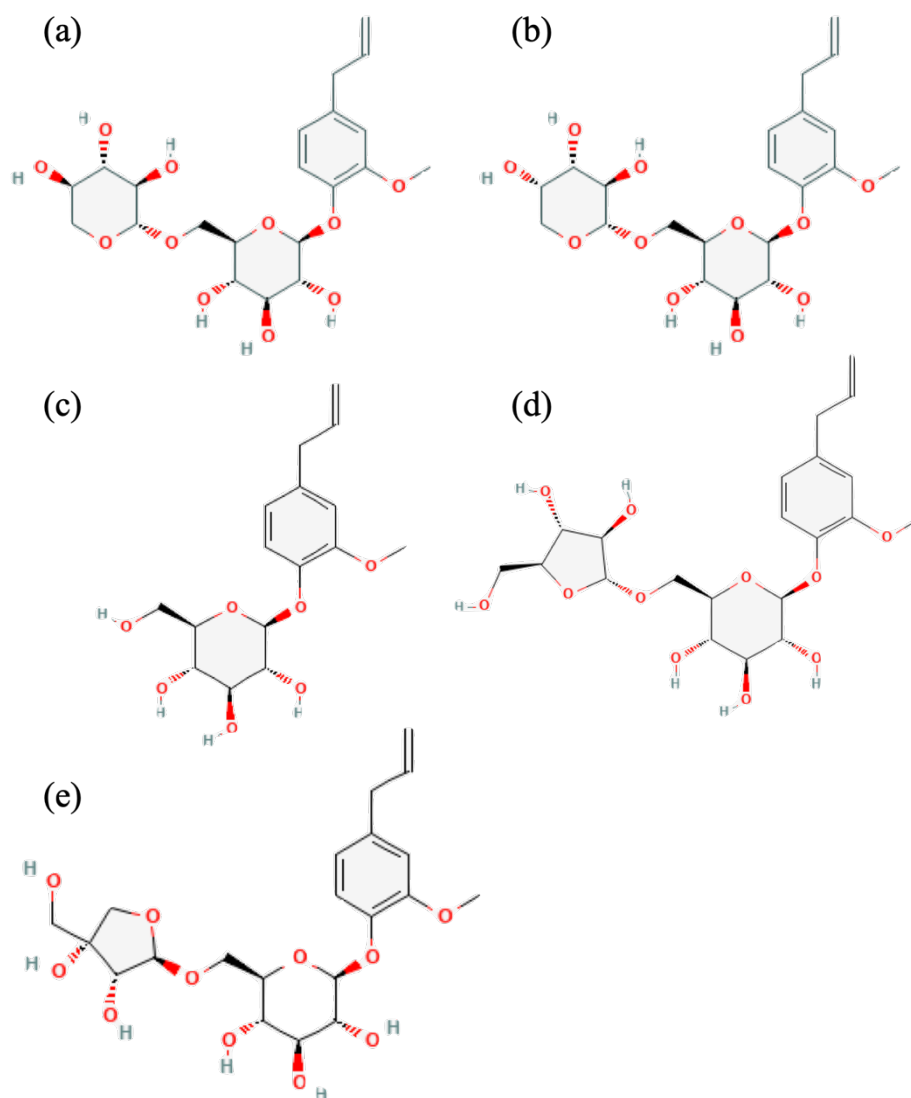


Figure 15 : Divers précurseurs de l'eugénol, extraits naturellement à partir de différents végétaux. (a) géoside, (b) sasanquine, (c) citrusine C, (d) 4-allyl-2-méthoxyphényl-6-*O*- $\beta$ -D-apiosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucoside, (e) 2-méthoxy-4-(2-propèn-1-yl)phényl 6-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside

Les précurseurs de l'eugénol, à l'instar du composé volatil qu'ils libèrent, sont également assez répandus dans le règne végétal. Dès 1925, Henri Hérissé (1873 – 1959) et Jean Cheymol (1896 – 1988) parvinrent à extraire de la benoîte commune (*Geum urbanum*) un hétéroside (aglycone lié à un ou plusieurs oses) de l'eugénol qu'ils nomment géoside (Figure 15a) (Hérissé & Cheymol, 1925). En 1967, un autre hétéroside de l'eugénol, la sasanquine (Figure 15b), sera isolée par une équipe japonaise (Yamada *et al.*, 1967) à partir du camélia d'automne Thunberg (*Camellia sasanqua*). En 1988, la citrusine C (Figure 15c) est extraite de la mélisse officinale (*Melissa officinalis*). Il s'agit d'un hétéroside simple de l'eugénol (Mulken & Kapetanidis, 1988). En 1991, le 4-allyl-2-méthoxyphényl-6-*O*- $\beta$ -D-apiosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucoside (Figure

15d) fut extrait de la viorne à large panicules (*Viburnum dilatatum*) (Machida *et al.*, 1991). En 1999, trois nouveaux hétérosides de l'eugénol sont identifiés dans la rose (*Rosa damascena*) dont le géoside, sasanquine et une molécule proche du géoside : le 2-méthoxy-4-(2-propen-1-yl)phényl 6-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (Figure 15e), qui ne diffère du géoside que par la forme de l'arabinose (pyrane pour géoside et furane pour le nouvel hétéroside) (Straubinger *et al.*, 1999). D'autres hétérosides de l'eugénol seront encore extraits de la tomate (*Solanum lycopersicum*) et du tremble (*Populus tumula*) mais sans identification précise. Dans le cas de la tomate, les auteurs de l'étude proposent un enchaînement eugénol-hexose-pentose tandis que dans le cas du tremble, les composés identifiés sont comparés à la sasanquine, en tant que standard, mais sans résultats probants (Koeduka *et al.*, 2013; Tikunov *et al.*, 2009). Différentes informations propres aux précurseurs de l'eugénol sont disponibles dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Caractéristiques des précurseurs hétérosidiques de l'eugénol. M désigne la masse molaire moléculaire des composés

Nom	Formule	n° CAS	M (g·mol <sup>-1</sup> )	Oses	Référence
Géoside, Gein, Eugenyl vicianoside	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	585-90-0	458,5	Arabinose Glucose	(Hérissey & Cheymol, 1925)
Sasanquine, Eugenyl- $\beta$ -primeveroside	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	18604-51-1	458,5	Xylose Glucose	(Yamada <i>et al.</i> , 1967)
Citrusine C, Eugenyl glucose	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	18604-50-7	326,3	Glucose	(Mulkens & Kapetanidis, 1988)
4-allyl-2-méthoxyphényl- 6- <i>O</i> - $\beta$ -D-apiosyl(1→6)- $\beta$ -D-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	136083-96-0	458,5	Apiose Glucose	(Machida <i>et al.</i> , 1991)
2-méthoxy-4-(2-propen- 1-yl)phényl 6- <i>O</i> - $\alpha$ -L- arabinofuranosyl- $\beta$ -D- glucopyranoside	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	229333-98-6	458,5	Arabinose Glucose	(Straubinger <i>et al.</i> , 1999)



# Chapitre 5 : Du sensoriel à la dégustation

## I. La dégustation des eaux-de-vie

### I.1. De la manière de déguster une eau-de-vie

De par la présence importante de l'éthanol, les eaux-de-vie doivent être dégustées différemment des vins (Louw & Lambrechts, 2012). Depuis longtemps les maîtres assembleurs de l'industrie du whisky ont pour habitude de diluer leurs échantillons, jusqu'à 23 % (v/v), avant de les déguster. Cette idée a été reprise par plusieurs équipes de recherche afin de limiter la fatigue sensorielle (Du Plessis *et al.*, 2002; Peña y Lillo *et al.*, 2005) mais aussi l'irritation provoquée par de fortes concentrations en éthanol (Burtles, 1990). Cependant, la réduction d'une boisson spiritueuse induit une réaction exothermique entre l'eau et l'éthanol du mélange. Il convient donc, après dilution, d'attendre un certain temps avant de servir l'eau-de-vie ainsi diluée (Jack, 2003). Toutefois, une dilution change les équilibres de certaines substances aromatiques, les rendant parfois moins disponibles pour leur perception. C'est pourquoi, certains chercheurs ont décidé de présenter, au contraire, les échantillons de spiritueux à plein degrés, c'est-à-dire sans dilution (Quady & Guymon, 1973). D'autres encore se sont proposés de comparer, des eaux-de-vie de Cognac identiques ramenées à deux TAV différents (40 et 60 % (v/v)) et dégustées au nez et en bouche. Afin d'étudier l'effet du TAV sur la description et une meilleure discrimination des produits (Gadrat *et al.*, 2022). Il s'est avéré que ce sont les eaux-de-vie à 40 % (v/v) qui ont été les mieux décrites. D'autres auteurs, travaillant sur l'analyse sensorielle des Cognacs, ont proposé une méthodologie consistant à faire analyser les mêmes eaux-de-vie, de manière olfactive uniquement, à deux TAV différents (70 % puis 40 % (v/v)) avant d'en faire une description (Ferrari *et al.*, 2004). Cependant ces auteurs questionnent l'influence de cette double dégustation sur la performance du panel.

Une étude menée sur le Pisco (eau-de-vie de raisin produite au Pérou et au Chili) a montré une corrélation très forte entre les perceptions orthonasale et rétronasale. Les auteurs ont donc proposé de ne déguster les eaux-de-vie qu'au nez, permettant ainsi de réduire la fatigue sensorielle (Peña y Lillo *et al.*, 2005). Une analyse uniquement au nez ignorerait complètement les caractéristiques gustatives et rétronasales des spiritueux.

Toutefois les mêmes problématiques de fatigue sensorielle et d'influence de l'échantillon sont toujours existantes, c'est pourquoi plusieurs auteurs proposent d'utiliser des « nettoyeurs » de palais tels que l'eau pétillante ou des biscuits (Peña y Lillo *et al.*, 2005) et plus simplement de l'eau (Caldeira *et al.*, 2010).

Enfin, le nombre maximal d'échantillons d'eaux-de-vie à faire déguster est complexe à déterminer. En effet, il dépend du panel et de son niveau d'entraînement mais également de l'objectif de la dégustation. Par exemple, dans le cas d'une analyse descriptive, ce nombre peut varier de 4 à 12 échantillons d'eaux-de-vie, dilués ou non (Caldeira *et al.*, 2002, 2006, 2010; Deneulin *et al.*, 2020; Du Plessis *et al.*, 2002; Janáčová *et al.*, 2008; Van Jaarsveld, Hattingh, & Minnaar, 2009; Van Jaarsveld, Hattingh, Minnaar, *et al.*, 2009). Du Plessis et son équipe ont présenté à leurs panélistes jusqu'à 12 tests triangulaires d'eaux-de-vie réduites à 23 % (v/v), équivalent donc à 36 eaux-de-vie analysées (Du Plessis *et al.*, 2002).

## **I.2. L'important rôle de l'éthanol**

### **I.2.1. Effets physicochimiques**

Dans un mélange eau-éthanol, lorsque ce dernier est présent en faible concentration, les molécules d'éthanol sont dispersées dans la solution aqueuse. Elles sont en fait, individuellement, enfermées dans une cage de molécules d'eau, formant ainsi un clathrate (Conner *et al.*, 1998; D'Angelo *et al.*, 1994b, 1994a). Cette structuration du mélange eau-éthanol est valable jusqu'à 15 % (v/v) d'éthanol. Au-delà, les molécules d'éthanol s'agrègent pour former des micelles. La formation de ces dernières est visible lorsque la quasi-totalité des molécules d'eau sont impliquées dans un clathrate (Cipiciani *et al.*, 1988; D'Angelo *et al.*, 1994a; Onori & Santucci, 1996). À partir de 57 % (v/v) d'éthanol, une dernière structure se dessine pour le mélange eau-éthanol, les molécules d'eau perdent leur maillage de liaisons hydrogènes pour se retrouver dispersées dans la solution (D'Angelo *et al.*, 1994a). Les différentes structures d'un mélange eau-éthanol en fonction de la teneur en éthanol sont visibles à la Figure 16.

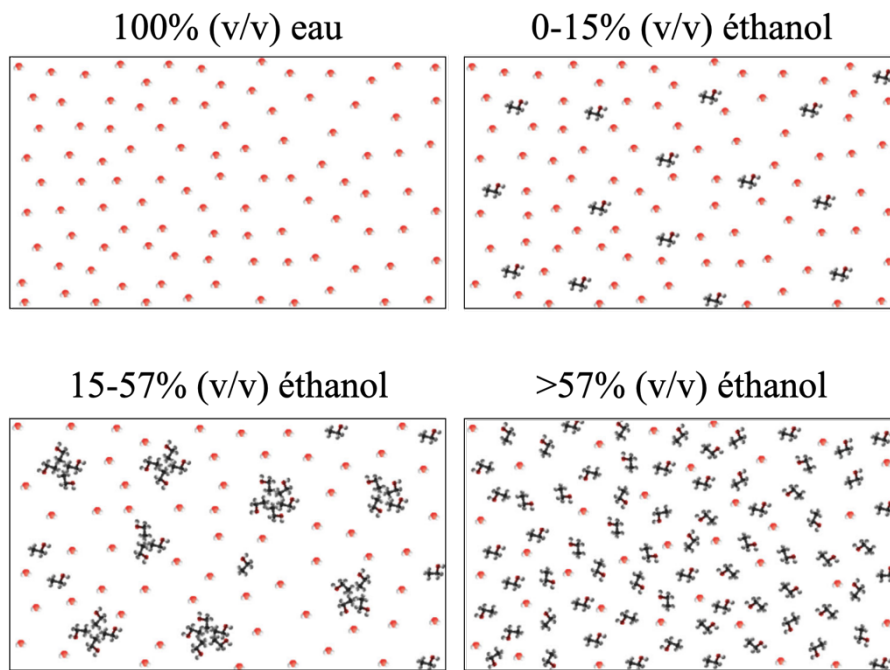


Figure 16 : Différentes organisations moléculaires d'un mélange eau-éthanol en fonction de la teneur en éthanol (v/v) (Ickes & Cadwallader, 2017)

Ces organisations possibles d'un mélange eau-éthanol ne sont pas sans conséquence sur les molécules aromatiques de boissons tels que les spiritueux. En effet la présence d'éthanol dans ce genre de produits les soumet à l'effet Marangoni. Il s'agit d'une diminution de la tension de surface d'une solution, due à l'éthanol. En s'évaporant, l'éthanol crée des zones de hautes tensions à la surface du liquide. Le déséquilibre ainsi mis en place doit être corrigé grâce au déplacement de molécules d'éthanol vers la surface du liquide (Marangoni, 1865). Elles entraînent avec elles, des molécules aromatiques qui deviennent plus facilement libérables dans l'espace gazeux. De plus, l'évaporation des molécules d'éthanol entraîne une diminution de la température à la surface du liquide. Ce différentiel thermique induit une convection de Rayleigh-Bernard : la surface devenue plus froide plonge dans le liquide vers le fond du mélange, tandis que la solution plus chaude monte vers la surface (Rayleigh, 1916). Les deux mouvements entraînent ainsi une agitation constante du mélange, amenant continuellement à la surface des molécules aromatiques qui seront évaporées (Taylor *et al.*, 2010; Tsachaki *et al.*, 2005, 2006).

## I.2.2. Effets sensoriels

Les effets sensoriels de l'éthanol dans des produits telles que les eaux-de-vie peuvent être de plusieurs ordres.

L'éthanol a tout d'abord un effet sur la perception aromatique. La première étude sur l'influence de l'éthanol dans les boissons alcoolisées date de 1972. Les auteurs ont sensoriellement comparé du vin, du cidre, vin fortifié, vin effervescent et whisky avec leur pendant complètement désalcoolisés. Étonnamment, c'est le whisky désalcoolisé qui a été ressenti comme étant le plus similaire à son pendant alcoolisé (Williams, 1972). Mais peu d'études se sont concentrées sur la perception de l'éthanol dans les spiritueux. Il a surtout été déterminé le seuil de perceptions de produits à forte teneur en éthanol (Tableau 8). Il apparaît clairement que l'éthanol, selon sa concentration dans un produit, joue un rôle ambivalent, à la fois masque de certains composés et support aromatique pour d'autres. Il est à noter que le Tableau 8 est une simple illustration du double effet sur certains composés aromatiques. Il est issu d'une compilation de données de la littérature scientifique. Ce qui implique, premièrement un effet manipulateur dans les différentes données pour un même composé. Deuxièmement, l'écart de temps entre les publications peut induire des différences d'acuité méthodologique. Et troisièmement, les techniques analytiques ne sont pas nécessairement identiques, ce qui peut ajouter à une certaine variabilité dans les données présentées.

Tableau 8 : Effets de la concentration en éthanol sur le seuil de détection de plusieurs composés aromatiques en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Ickes & Cadwallader, 2017). Les lettres minuscules en exposant font référence à de la littérature scientifique : a (Rychlik *et al.*, 1998), b (Guth, 1997), c (K.-Y. M. Lee *et al.*, 2000), d (Poisson & Schieberle, 2008), e (Uselmann & Schieberle, 2015), f (Willner *et al.*, 2013)

Composé	Eau	10 %	23 %	40 %
1-1-diéthoxyéthane	25 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>		719 <sup>d</sup>
Acétate de 2-phényléthyl	356 <sup>a</sup>	250 <sup>b</sup>		108 <sup>d</sup>
2-phényléthanol	1000 <sup>a</sup>	10000 <sup>b</sup>	8000 <sup>c</sup>	2600 <sup>d</sup>
3-méthylbutanol	1000 <sup>a</sup>	30000 <sup>b</sup>		56100 <sup>d</sup>
4-vinylgaïacol	100 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	700 <sup>c</sup>	7,1 <sup>e</sup>
Acétaldéhyde	25 <sup>a</sup>	500 <sup>b</sup>	2800 <sup>c</sup>	19200 <sup>c</sup>
Acide acétique	180000 <sup>a</sup>	200000 <sup>b</sup>	28000 <sup>c</sup>	75521 <sup>d</sup>
Butanoate d'éthyle	1 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	9,5 <sup>d</sup>
Hexanoate d'éthyle	5 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	70 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>
Octanoate d'éthyle	70 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>		147 <sup>d</sup>
Géraniol	3,2 <sup>a</sup>	30 <sup>b</sup>	30 <sup>c</sup>	
Gaïacol	2,5 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	90 <sup>c</sup>	9,2 <sup>d</sup>
Linalol	0,14 <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>		23 <sup>f</sup>
Vanilline	4,9 <sup>a</sup>	200 <sup>b</sup>	600 <sup>c</sup>	22 <sup>d</sup>
$\beta$ -Damascenone	0,0004 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>		0,1 <sup>d</sup>

L'influence de l'éthanol ne se limite pas à la perception des arômes, il peut également modifier les caractéristiques gustatives d'un produit. Ainsi en forte concentration, l'éthanol renforcerait la perception de l'amertume (Fontoin *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008; Nolden & Hayes, 2015) mais diminuerait au contraire l'aigreur (Zamora *et al.*, 2006) et l'acidité (Demiglio & Pickering, 2008; Guth, 1997). Toutefois, l'action de l'éthanol sur la sucrosité est plus sujette à débat. Pour certains chercheurs, il diminuerait la perception de cette sucrosité (Hoopman *et al.*, 1993), pour d'autres son influence serait parfaitement opposée (Nurgel & Pickering, 2006; Zamora *et al.*, 2006). Enfin l'éthanol peut induire une sensation d'irritation, tant au nez qu'en bouche. Sensation qui peut facilement intervenir lors d'une dégustation d'eau-de-vie. Plus la concentration en éthanol est importante plus cette irritation somesthésique serait perçue (Burtles, 1990; Withers *et al.*, 1995).

## **II. Le système de perception**

Dans cette partie, la perception visuelle ne sera pas abordée. Dans ces travaux de thèse, seules des eaux-de-vie blanches ont été dégustées. De plus, la plupart des tests ont été réalisés en verre noir si les solutions présentaient une diversité visuelle ou étaient colorées.

### **II.1. Olfaction**

L'odorat est le sens permettant la détection puis la perception de molécules volatiles (Figure 17). Il fait intervenir des récepteurs situés dans la fosse nasale. D'abord par une voie directe dite orthonasale : les molécules volatiles transitent par les narines durant l'inspiration (Shepherd, 2006). Et ensuite par une voie indirecte dite rétronasale, les sensations perçues proviendraient alors de la bouche lors de l'expiration ou durant la mastication des aliments. Concernant cette dernière possibilité, elle expliquerait la confusion, entretenue par les novices, entre goût et odorat (Meierhenrich, 2006; Murphy *et al.*, 1977; Murphy & Cain, 1980).

Olfaction ou rétroolfaction, quelle que soit la voie empruntée par les composés volatils pour accéder à la fosse nasale et à l'épithélium olfactif, ces derniers doivent présenter certaines caractéristiques pour pouvoir déclencher une sensation. Leur volatilité doit être suffisante pour atteindre en nombre l'épithélium olfactif et déclencher la sensation mais ces composés volatils doivent également être suffisamment hydrophiles pour pénétrer la muqueuse olfactive, composée principalement d'eau (Carr *et al.*, 1990).

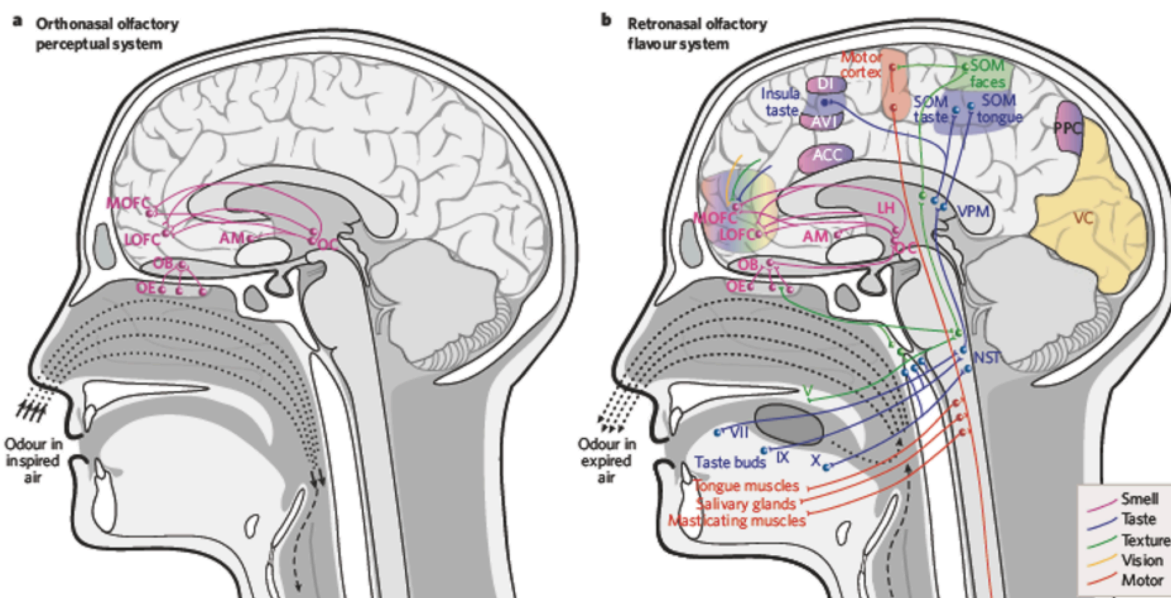


Figure 17 : Représentation des voies de stimulation orthonasale (a ; *orthonasal olfactory perceptual system* : système de perception olfactif orthonasal, figure de gauche) et rétronasale (b ; *retronasal olfactory flavour system* : système de perception rétro-olfactif, figure de droite) ainsi que de la structure du système nerveux impliquée dans la perception (d'après Sheperd, 2006). Les flux d'air sont représentés par des lignes en pointillés. ACC, accumbens ; AM, amygdale ; AVI, cortex insulaire ventral antérieur ; DI, cortex insulaire dorsal ; LH, hypothalamus latéral ; LOFC, cortex orbitofrontal latéral ; MOFC, cortex orbitofrontal médial ; NST, noyaux du tractus solitaire ; OB, bulbe olfactif ; OC, cortex olfactif ; OE, épithélium olfactif ; PPC, cortex pariétal postérieur ; SOM, cortex somatosensoriel ; V, VII, IX, X, nerfs crâniens ; VC, cortex primeur visuel ; VPM, noyaux thalamique ventral postéromédial

## II.2. Gustation

La gustation ne sera pas étudiée dans le cadre des dégustations d'eaux-de-vie d'Armagnac de cette thèse, ce sujet sera donc très peu développé.

Le ou les goûts sont perçus lorsque des composés à caractère sapide sont dissous dans la salive. Ils sont alors détectés par plusieurs récepteurs situés à la surface des cellules gustatives. Ces dernières se retrouvent dans l'ensemble de la cavité buccale mais elles se concentrent en particulier sur la langue (Adler *et al.*, 2000). Les papilles gustatives, qui constituent le système gustatif, contiennent des bourgeons du goût constitués, eux, de cellules sensorielles. Ces dernières portent les récepteurs des molécules sapides et transforment le signal chimique en signal nerveux (Scott, 2005). Ils permettent de percevoir 5 goûts élémentaires : le sucré, l'acide, le salé, l'amer et l'umami – terme japonais généralement traduit par « savoureux » – (Lindemann, 1996; Y. Zhang *et al.*, 2003). Également, certaines de ces papilles gustatives possèdent des cellules sensorielles sensibles au toucher (Bajec & Pickering, 2008).

### **II.3. Somesthésie**

L'étymologie même du mot « somesthésie » renseigne sur sa signification. Composé de σώμα (le corps) et de αίσθησις (la sensation), la somesthésie désigne ainsi la sensibilité du corps, ce qui inclue les sensations tactiles, thermiques, kinesthésiques (sensations sur la position et le déplacement des parties du corps), proprioceptives (perception de son propre corps) et de douleur et exclue l'odorat, le goût, la vue et l'ouïe. La sensation de chaleur, ou pseudo-chaleur, provoquée par la mastication d'un piment est un exemple de sensation somesthésique thermique.

Dans le vin, l'astringence est certainement la sensation somesthésique la plus connue. Elle se décrit comme une sensation tactile (Breslin *et al.*, 1993), et se caractérise par un assèchement de la cavité buccale. L'éthanol a également un rôle somesthésique : il contribue entièrement à la perception de chaleur durant la dégustation des vins (Gawel *et al.*, 2007). Les sensations somesthésiques se retrouvent également dans les eaux-de-vie, mais le plus souvent étudiées par rapport à l'apport du bois. Récemment, Gadrat *et al.* (2022) montrent un effet du temps de bousinage de la barrique sur la sensation thermique d'une eau-de-vie de Cognac.

## **III. L'analyse sensorielle**

### **III.1. Les différents types de perception**

La perception est le résultat de l'activation d'un récepteur sensoriel, induisant un influx nerveux quasi-instantané. Dans le cadre de l'olfaction et de la gustation, 3 mécanismes de perception d'un composé peuvent être définis :

- Quantitatif, qui correspond à l'intensité de la perception ;
- Qualitatif, qui correspond à l'identification de la perception ;
- Hédonique, qui indique si la perception est agréable ou désagréable.

Ces 3 types de perceptions ne sont pas indépendants les uns des autres : quantitatif et qualitatif influençant l'hédonique (Distel *et al.*, 1999).

#### **III.1.1. La perception quantitative**

Si la perception est liée à l'intensité des stimuli perçus, elle n'y est pas directement proportionnelle. La perception quantitative est divisée en plusieurs zones dépendantes de l'intensité des stimuli (Figure 18) (Depledge, 2013).

Dans la filière agroalimentaire, le seuil est une notion très utilisée pour déterminer la perception, ou non, d'un composé chimique. La détermination des deux seuils principaux, que sont le seuil de détection (ou apparition ou perception) et le seuil de reconnaissance (ou identification), est encadrée par la norme NF ISO 13301:2002. Le seuil de détection se définit comme la valeur minimale du stimulus sensoriel nécessaire à l'éveil d'une sensation. Tandis que le seuil de reconnaissance se définit comme la valeur minimale du stimulus sensoriel suffisamment intense pour être identifié.

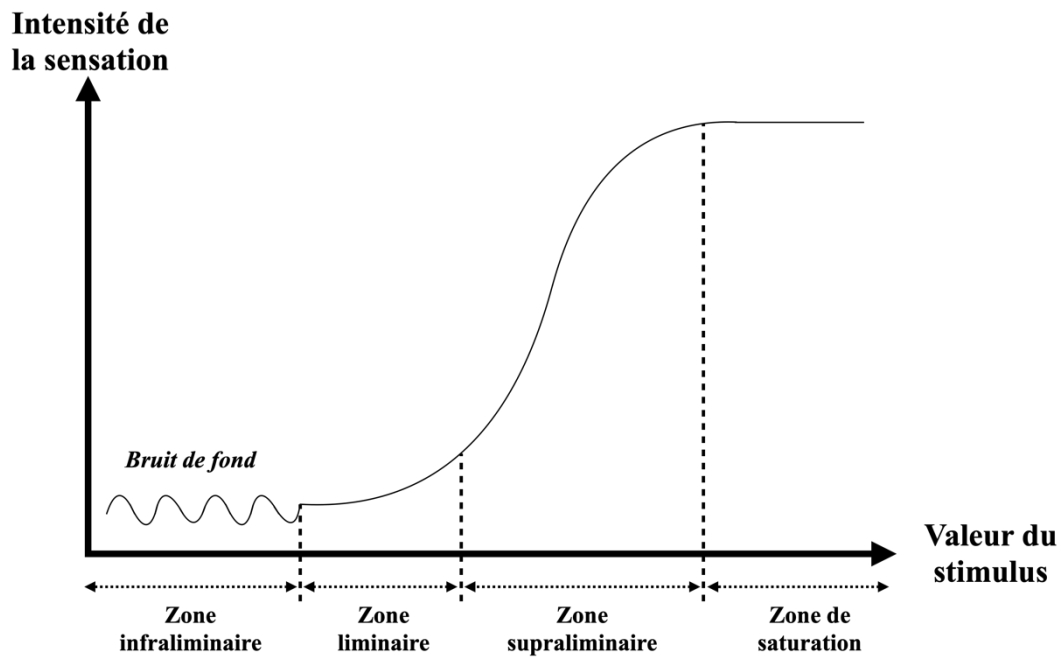


Figure 18 : Évolution de l'intensité perçue en fonction de la concentration du stimulus (Depledge, 2013)

### III.1.2. La perception qualitative

La reconnaissance et l'identification d'un stimulus sont très associées à la perception qualitative. La reconnaissance est dépendante de la mémorisation de divers stimuli, tandis que l'identification est en fait la capacité d'un dégustateur à nommer le stimulus perçu, en faisant appel à sa mémoire sémantique. Le rôle du langage est essentiel à la description d'un stimulus (Richardson & Zucco, 1989).

### III.2. Les interactions perceptives

L'être humain n'est capable d'identifier que 3 ou 4 molécules à partir d'un mélange complexe (Laing & Francis, 1989; Laing & Livermore, 1992; Livermore & Laing, 1998b, 1998a).



Cependant les composés non-perçus ne sont pas dénués d'intérêt, car ils peuvent participer à la perception globale du mélange. C'est la génération d'interactions perceptives (V. Ferreira, 2012a, 2012b). Ces interactions interviennent, soit sur la perception quantitative soit sur la perception qualitative, à différentes étapes de la perception : au niveau pré-sensoriel, au niveau sensoriel périphérique, au niveau neurophysiologique et enfin au niveau central (Berglund *et al.*, 1976).

### III.2.1. Modification de la perception quantitative

Les interactions perceptives interviennent sur la perception quantitative lorsqu'elles influencent l'intensité de cette perception. L'intensité olfactive ( $\psi$ ) d'un mélange ( $\gamma$ ) n'est pas nécessairement égale à la somme des intensités des constituants ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de ce mélange. Autrement dit l'intensité de ce mélange comparée à la somme des intensités des constituants du mélange (Atanasova *et al.*, 2005; Chaput *et al.*, 2012). Les définitions de deux types de mélanges découlent de cette théorie. Un mélange hétérogène se définit par la rémanence des odeurs propres des deux éléments constituants ce mélange. À l'inverse, un mélange est dit homogène lorsque l'odeur propre à chaque constituant est imperceptible de l'odeur du mélange (Berglund *et al.*, 1976). Dans le cadre des analyses sensorielles abordées dans cette thèse, seuls des mélanges hétérogènes ont été étudiés. Dans ce cas, diverses interactions perceptives peuvent alors être définies (Berglund *et al.*, 1976; Cain & Drexler, 1974) (Figure 19) :

- Synergie ( $\psi_{\alpha}$  en mélange  $>$   $\psi_{\alpha}$  en dehors du mélange ou  $\psi_{\beta}$  en mélange  $>$   $\psi_{\beta}$  en dehors du mélange) : l'intensité d'un composé dans le mélange est supérieure à son intensité hors du mélange ;
- Indépendance ( $\psi_{\alpha}$  en mélange =  $\psi_{\alpha}$  en dehors du mélange ou  $\psi_{\beta}$  en mélange =  $\psi_{\beta}$  en dehors du mélange) : l'intensité d'un composant dans le mélange est égale à son intensité en dehors du mélange ;
- Antagonisme ( $\psi_{\alpha}$  en mélange  $<$   $\psi_{\alpha}$  en dehors du mélange ou  $\psi_{\beta}$  en mélange  $<$   $\psi_{\beta}$  en dehors du mélange) : l'intensité d'un composant dans le mélange est inférieure à son intensité en dehors du mélange.

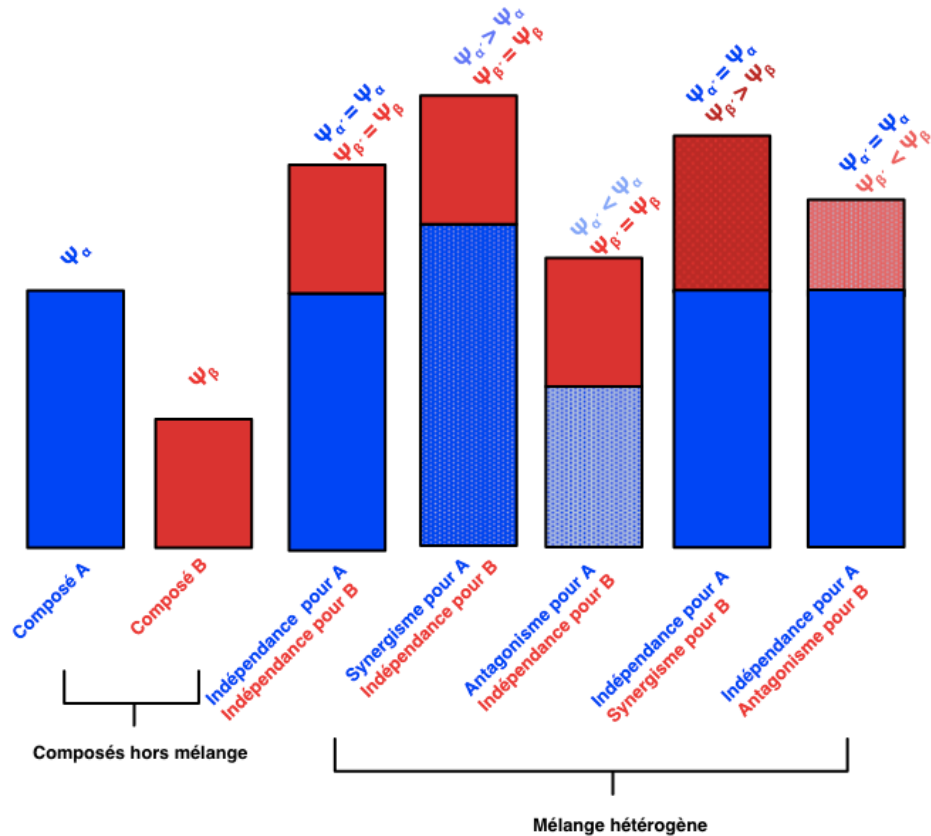


Figure 19 : Représentation pour les mélanges binaires hétérogènes des effets quantitatifs (Lytra, 2012) d'après (Thomas-Danguin, 1997).  $\psi_\gamma$  : intensité du mélange ;  $\psi_\alpha$  : intensité du composé A ;  $\psi_\beta$  : intensité du composé B

### III.2.2. Modification de la perception qualitative

Dans le cadre de mélanges hétérogènes, une perte partielle, ou totale, de la qualité d'une des deux composantes est possible. Il s'agit du phénomène de masquage ou de suppression (Cain & Drexler, 1974). La qualité perçue d'un mélange, où un des deux composants est majoritaire, sera définie par la qualité de ce composant majoritaire. Tandis que, pour un mélange de deux composés iso-intenses (de même intensité), la qualité perçue sera celle des deux composants (Olsson, 1998). Cependant, il est également possible que dans le cas d'un mélange hétérogène de composés iso-intenses, la perception soit déséquilibrée, la qualité d'un des composants prenant le pas sur l'autre (Atanasova *et al.*, 2005; Brossard *et al.*, 2007).

### III.3. Le rôle de l'expertise

Un expert est défini, selon la norme NF ISO 5492, comme une « *personne qui, par ses connaissances et son expérience, a la compétence requise pour fournir un avis dans les domaines sur lesquels elle est consultée.* ». L'expert a également la capacité à catégoriser et nommer les objets appartenant à son domaine d'expertise (Johnson & Mervis, 1997). À ce titre, les professionnels du vin sont considérés comme des experts de ce domaine puisqu'ils ont participé à de nombreuses dégustations (Ballester *et al.*, 2008; Parr *et al.*, 2002).

Dans le cas de la typicité d'un produit, les experts sembleraient s'accorder sur le concept d'un vin typique (Ballester *et al.*, 2008). Leur représentation mentale serait basée sur un système de classement correspondant à des modèles dont le cépage serait une caractéristique tangible (Solomon, 1997). Dans certaines études, les experts se baseraient sur des concepts sensoriels liés à différents vins variétaux, c'est-à-dire représentatifs de la typicité de certains cépages (Ballester *et al.*, 2005, 2008). En revanche, d'autres auteurs notent le caractère prototypique (modèle, exemplaire) des champs lexicaux employés et par extension la représentation mentale des vins (Brochet, 2000).

De plus, les experts semblent utiliser un vocabulaire plus précis et plus technique que celui employé par les novices, pour décrire les vins (Hughson & Boakes, 2002; Solomon, 1990; Valentin *et al.*, 2007). Le vocable utilisé par les experts est compris par d'autres experts (Solomon, 1990). Les experts semblent développer leurs capacités sémantiques et sensorielles de manière conjointe.

Si les experts ont des capacités de reconnaissances supérieures à celles des novices, ils ne présentent pas, en revanche, de meilleures capacités de perceptions que ces mêmes novices (Bende & Nordin, 1997; Parr *et al.*, 2002, 2004). Ces résultats peuvent indiquer que la tâche de reconnaissance n'implique pas la sensibilité. Cela induirait que les experts ont la capacité cognitive de se focaliser sur des traits précis d'un mélange complexe. D'autre part, les experts auraient développé la capacité à se représenter mentalement les odeurs (Parr *et al.*, 2002). En résumé, les experts auraient développé des capacités cognitives augmentant leurs performances sensorielles (Tempère, 2010).

La recherche de consensus est un des objectifs les plus complexes dans la description d'un vin. Malgré la concordance des experts autour de modèles œnologiques, il demeure de larges variations inter-individuelles dans leurs descriptions des vins (Brochet, 2000; Lawless, 1984).



---

# Matériel et Méthodes

---

*C'est une belle harmonie quand le faire et le dire vont ensemble*

Michel de Montaigne



# Chapitre 1 : Tests microbiologique et agronomique

## I. Tests *in vitro*

### I.1. Matériel fongique utilisé

Différents isolats de *B. cinerea* ont été utilisés:

- La souche monosporee « i » de la collection de l'UMR SAVE et isolée d'une feuille de vigne en 1998 (souche 213) (Martinez *et al.*, 2003) ;
- La souche monosporee « j » issue de la souche « i », artificiellement inoculée puis réisolée, en 2021, à partir de matériel végétal de Baco blanc ;
- L'isolat populationnel « P », isolé à partir d'une baie infectée par *B. cinerea* récoltée sur la parcelle PREMS32 du Château de Mons (page 76) ;
- L'isolat populationnel « V », isolé à partir d'une baie infectée par *B. cinerea* récoltée sur la parcelle de la Grande Ferrade (Villenave d'Ornon, France) ;
- L'isolat « K », isolé à partie d'une baie infectée par *B. cinerea* récoltée sur la parcelle CONS32 du Château de Mons (page 76).

### I.2. Composés chimiques utilisés

La liste des composés chimiques, et les informations relatives, utilisés dans les tests *in vitro* sont rassemblés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Composés nécessaires à la mise en place des tests *in vitro*

Composés	CAS	Pureté	Fournisseur
Extrait de malt	x	x	Biokar Diagnostics (Allone, France)
Agar-agar	x	x	Setexam (Kénitra, Maroc)
Gélose dextrose à la pomme de terre (PDA)	x	x	Biokar Diagnostics (Allone, France)
Eugénol	97-53-0	98 %	Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France)
Éthanol	64-17-5	>99 %	VWR International (Rosny-sous-Bois, France)

Plusieurs solutions ont été préparées, notamment des solutions d'eugénol de concentrations allant de 1 à 10 000 ppm ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). L'eugénol a été dissout dans une solution hydroalcoolique à 30 % (v/v), elle-même préparée avec de l'éthanol et de l' $\text{H}_2\text{O}$  distillée.

### I.3. Préparation des tests

Différents milieux de culture ont été préparés selon les modalités des différents tests.

- milieu malt-agar (MA) a été préparé en dissolvant 15 g·L<sup>-1</sup> d'extrait de malt (Biokar Diagnostics, Allone, France) et 20 g·L<sup>-1</sup> d'agar-agar (Setexam, Kénitra, Maroc) dans de l'H<sub>2</sub>O distillée. Après homogénéisation, le milieu liquide a été stérilisé en autoclave par chaleur humide à 125 °C et 1 bar pendant 20 min (MCS, Saint-Médard-en-Jalles, France), puis conservé liquide (surfusion) à 55 °C dans une étuve avant d'être coulé. Les tests, dits avec « intégration » ont nécessité la dissolution de composés chimiques dans le milieu encore liquide en surfusion. Après dissolution de ces composés, le milieu liquide a été de nouveau homogénéisé manuellement durant quelques minutes. Le milieu a ensuite été coulé, à raison de 15 mL dans des boîtes de Petri de diamètre 85 mm, grâce à une pompe péristaltique DOSE IT (INTEGRA Biosciences SAS, Cergy Pontoise, France).
- milieu PDA (Biokar Diagnostics, Allone, France) préparé en dissolvant 39 mg·L<sup>-1</sup> de PDA. Comme pour le milieu (MA), le milieu PDA a été stérilisé et conservé à 55 °C, et si besoin des composés y ont été dissous.

Tableau 10 : Résumé des tests *in vitro* mis en œuvre. Les doses indiquées sont celles des produits testés et non pas des témoins

Tests <i>in vitro</i>		Test 1	Test 2	Test 3
Nombre de boîtes de Petri		84	162	50
Matériel fongique		P, i, V	P, i, V	j, P
Milieu gélosé		MA	MA, PDA	MA
Température d'incubation		23 °C		
Produit testé	Produits	EtOH, témoin H <sub>2</sub> O	Eugénol, témoin EtOH 30 % (v/v)	Eugénol, témoin EtOH 30 % (v/v)
	Doses (ppm)	30 % (v/v), 100 % (v/v)	150 / 300	1 / 10 / 100 / 1 000 / 10 000
Modalité d'application		Étalement, Fumigation	Étalement, Fumigation, Intégration	Étalement, Fumigation

Un résumé des tests menés durant ces travaux de thèse est disponible au Tableau 10. Pour l'ensemble des tests, l'implant de *B. cinerea* était de 4 mm de diamètre et âgé de 6 jours (après culture sur milieu malt-agar à 15 g·L<sup>-1</sup> et incubation à 23 °C). Toutes les boîtes de Petri ont finalement été scellées avec un film étirable en polychlorure de vinyle Scel-O-Frais® (Bolton Group, Milan, Italie). Tous les tests ont été préparés sous un Poste de Sécurité Microbiologique classe II Airstream® (Esco Micro Pte. Ltd, Singapour, Singapour).



Pour des tests **d'étalement**, (Figure 20a), 500  $\mu\text{L}$  de solution du composé à tester (eugénol ou solution hydroalcoolique à 30 %) ont été déposés, dans la boîte de Petri, sur la gélose puis étalés avec un râteau sur l'ensemble de la surface. L'implant d'isolat de *B. cinerea* a ensuite été déposé au centre de la gélose, puis la boîte fermée avec son couvercle et scellée.

Pour les tests de **fumigation** (Figure 20b), l'implant de *B. cinerea* a été déposé au centre de la gélose, la boîte de Petri a ensuite été retournée. Puis 500  $\mu\text{L}$  de solution du composé à tester ont été déposés sur le couvercle de la boîte de Petri. La boîte retournée a été placée sur le couvercle puis scellée.

Pour les **tests d'intégration** (Figure 20c), l'implant de *B. cinerea* a été placé au centre de la gélose puis la boîte a été scellée avec son couvercle.

Quel que soit le type de test mis en place, les boîtes ont ensuite été mises à incubation dans le noir à 23 °C (d'autres températures d'incubation ont pu être appliquées en fonction des objectifs des tests). Pour chaque tests, des boîtes témoins ont été préparées avec une solution hydroalcoolique à 30 %.

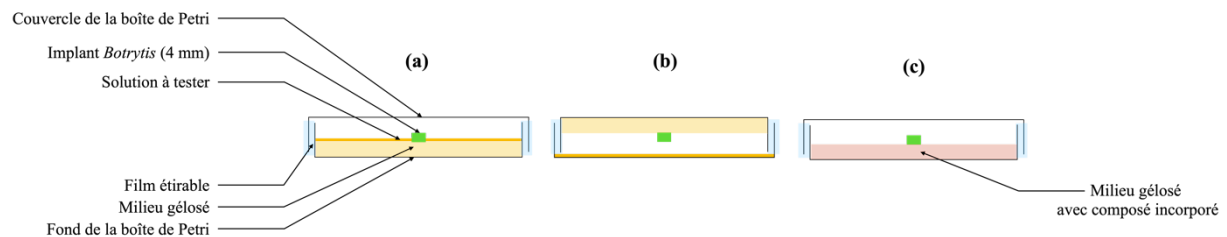


Figure 20 : Dispositifs expérimentaux des différents tests *in vitro* : figure A description schématique d'un test d'étalement, figure B d'un test de fumigation et la figure C d'un test d'intégration

#### I.4. Évaluation du développement de *B. cinerea* et calcul des concentrations inhibitrices

Après 4 jours d'incubation, deux diamètres orthogonaux ont été mesurés de chaque colonie mycélienne de *B. cinerea*. L'aire mycélienne a alors été calculée selon l'équation de l'aire d'une ellipse, soit (Équation 1) :

$$S_{ellipse} = \pi \times \left( \frac{\Phi a \times \Phi b}{4} \right)$$

Équation 1 : Surface d'une ellipse où  $\Phi a$  est un premier diamètre et  $\Phi b$  un autre diamètre, orthogonal au premier)

Les Concentrations Inhibitrices (CI) ont été obtenues en calculant les inhibitions de croissance, selon l'Équation 2 en se basant sur une méthodologie pré-établie (Olea *et al.*, 2019). L'inhibition de croissance du champignon par les solutions à tester a été calculée pour chaque boîte de Petri.

$$\text{inhibition de croissance (\%)} = \frac{(S_C - S_0) - (S_S - S_0)}{(S_C - S_0)} \times 100$$

Équation 2 : Inhibition de croissance de *B. cinerea*, exprimée en % où  $S_C$  représente la surface mycélienne d'une boîte témoin,  $S_0$  la surface initiale de l'implant mycélien et  $S_S$  la surface mycélienne d'une modalité traitée

Les inhibitions de croissance ont ensuite été corrélées avec les doses appliquées du composé à tester. Les différentes valeurs de CI ont été obtenues à partir de la régression linéaire (équation) obtenue.

## II. Tests *in vivo*

### II.1. Échantillonnage et préparation des baies

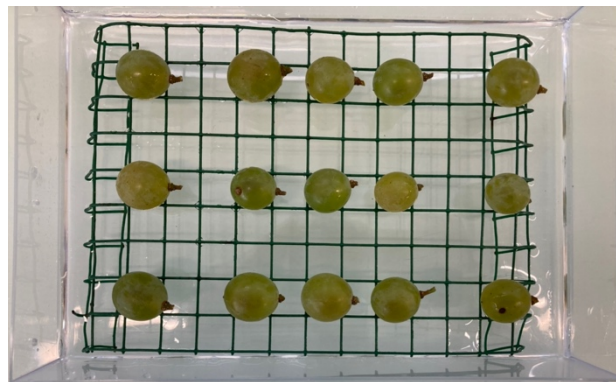


Figure 21 : Dispositif expérimental d'un test *in vivo*. Par convention, la baie située en haut à gauche de la grille (première ligne et première colonne) est considérée comme la première baie. La numérotation se poursuit de gauche à droite et ligne par ligne. Un morceau d'adhésif rouge a été utilisé comme repère sur l'une des arrêtes de la boîte de pathogénie afin de toujours identifier la baie n°1

Seules des grappes de rang un ou deux, localisées à la base des rameaux, ont été récoltées sur les différentes parcelles d'expérimentations et à un même stade phénologique précis (Chapitre 1 :III). Les grappes entières ont été rincées deux fois durant 10 minutes avec de l'eau du robinet supplémentée avec quelques gouttes de Tween® 80 (Croda International plc, Snaith, Royaume-Uni) dans un volume d'eau suffisant pour recouvrir la totalité des grappes. Elles ont ensuite été

désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium ( $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH ajusté à 7 avec de l'acide acétique), puis rincées deux fois avec de l'eau stérile. Puis entre 500 et 1000 baies, intègres et uniformes en taille et couleur, ont été sélectionnées avec leur pédicelle toujours attaché. Des boîtes de pathogénies, utilisées en tant que chambre humide, en plastique ( $19 \text{ cm} \times 13 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ ) ont été préparées en disposant 15 baies (pédicelle parallèle au fond de la boîte) sur une grille en métal plastifié déposée au fond des boîtes. Dans ces boîtes, 100 % d'HR ont été maintenus en introduisant dans le fond 100 mL d'eau stérile et en refermant les boîtes avec leur couvercle plastique adapté. Chaque baie a été inoculée avec un implant de *B. cinerea*, âgé de 6 jours (après culture sur milieu malt-agar à  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  et incubation à  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ), placé au niveau de l'équateur de la baie. L'implant gélosé était directement en contact avec la pellicule de la baie (Figure 21). L'ensemble des boîtes a été incubée à  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  dans le noir.

## **II.2. Évaluation du développement de *B. cinerea***

Durant 7 jours, l'incidence et la sévérité, du brunissement et de la sporulation, ont été quotidiennement évaluées de manière visuelle. L'incidence d'un symptôme est définie ici comme la proportion des baies présentant un symptôme typique d'infection par *B. cinerea* exprimée en %. La sévérité est ici assimilée à la proportion de la surface de la baie présentant un symptôme typique d'infection par *B. cinerea* exprimée en %. Chaque baie d'une boîte représente une répétition de la modalité concernée (autrement dit 15 répétitions de la même modalité par boîte).

## **II.3. Quantification du nombre de spores de *B. cinerea***

Après 14 jours d'incubation, seules les baies entièrement botrytisées (présentant une sévérité de 100 % de brunissement et/ou de sporulation) ont été placées dans un Erlenmeyer contenant déjà 50 mL d'eau stérile et 2 gouttes de Tween® 80. Après une agitation de 5 min à 350 rpm sur un agitateur orbital PSU-10i (Grant Instruments, Cambridge, Royaume-Uni), la phase liquide a été filtrée grâce à un filtre Falcon® 100  $\mu\text{m}$  en nylon (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France), puis récupérée dans des contenants de 40 mL et conservée à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ces suspensions de spores ont été filtrées sous vide grâce à un filtre 20  $\mu\text{m}$  afin d'éliminer une partie des particules dont la taille est supérieure à celle des spores ( $\sim >10 \text{ } \mu\text{m}$ ) (Merck Millipore, Guyancourt, France). Les suspensions ont ensuite été diluées au demi avec de l'Isoton™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique).

La quantification des spores a été effectuée avec un compteur cellulaire Scepter™ 2.0 Cell Counter (Merck Millipore, Guyancourt, France).

### III. Études au vignoble

#### III.1. Parcelles tests

Ci-après la liste des parcelles et sites étudiées :

- Sur le Domaine d'Ognoas, situé sur la commune d'Arthez-d'Armagnac (Landes, Nouvelle-Aquitaine, France), la parcelle CLONES40 (43 °53'34"N, 0 °15'41"O) est une collection d'étude de la variété Baco blanc. Plantée en 2013 sur porte-greffe Gravesac, cette parcelle comprend 6 clones de Baco blanc, disposés en carré latin et orientés Nord-Sud. Les rangs étaient situés sur une pente à 3,5 % environ. Un seul des clones est autorisé dans le catalogue français des plants de vignes, le clone 1086 (*Catalogue officiel des variétés de vigne | FranceAgriMer - établissement national des produits de l'agriculture et de la mer, s. d.*). Cette parcelle ayant été suivie en 2021 dans le cadre d'essais portant sur la sensibilité de la variété Baco blanc à *B. cinerea*, aucun traitement fongicide permettant de lutter contre ce champignon n'a été appliqué sur l'ensemble de la campagne durant cette même année. Durant l'année 2022, un épisode de grêle survenu au début du mois de Juin a détruit les inflorescences, réduisant trop fortement la production des vignes. Aucune observation n'a été prise en compte cette année-là.
- Sur le domaine du Château de Mons, situé sur la commune de Caussens (Gers, Occitanie, France), deux parcelles ont été étudiées:
  - La parcelle CONS32 (43 °56'37"N, 0 °26'41"E), qui est un conservatoire de cépages et variétés comprenant la Folle blanche, l'Ugni blanc et le Baco blanc et d'une surface de 4,7 ha, plantée entre 1994 et 1998 sur des sols argilo-calcaires . Les rangs étaient orientés Nord-Ouest / Sud-Est. La parcelle et les rangs des variétés concernées étaient sur une légère pente à 2 %.
  - La parcelle PREMS32 (43 °56'20"N, 0 °27'07"E), qui est une parcelle de pré-multiplication végétative comprenant un rang de Baco blanc et un rang d'Ugni blanc, tous deux étudiés durant ces essais et orientés Nord-Est / Sud-Ouest. Les rangs étudiés étaient situés sur une pente d'environ 13 %. Cette parcelle de 1,37 ha a été plantée en 2016 sur des sols argilo-calcaires.

## III.2. Dispositifs expérimentaux

### III.2.1. Effeuillement total et contrôlé en 2021

En 2021, une expérimentation d'effeuillage contrôlé a été menée sur la parcelle PREMS32 (Figure 22). Les rangs de Baco blanc et d'Ugni blanc ont été divisés en 3 blocs. Chaque bloc comprenait 7 plants de vignes contrôles non-effeuillés suivis de 8 plants de vignes complètement effeuillés au niveau de la zone des grappes. Dans chaque bloc l'alternance plant de vignes contrôles, plant de vignes effeuillés a été déterminée au hasard. Chaque bloc était séparé du suivant par un zone tampon (exclu de l'essai) de 5 plants de vignes consécutifs. Les bordures de chaque rang ont également été exclus du dispositif. Différentes mesures et prélèvements (détaillées dans le paragraphe page 81) ont été effectués à 4 stades phénologiques, déterminés avec des Degrés Jour de Croissance (DJC) accumulés depuis la floraison de la vigne (chute de 50 % des capuchons floraux) et en prenant en compte une température seuil de la vigne de 10 °C, en date calendaire du 2 juin 2021 (Eichhorn & Lorenz, 1977; Hack *et al.*, 1992; Lorenz *et al.*, 1995). L'effeuillage a été réalisé manuellement le 7 Juillet 2023 (soit à 377 DJC). Ces 4 stades ont été définis comme étant :

- fermeture de la grappe (7 Juillet 2021 ; 377 DJC ; BBCH code 77) ;
- la véraison (10 Août 2021 ; 719,3 DJC ; BBCH code 81) ;
- la vendange (23 Septembre 2021 ; 1199,9 DJC ; BBCH code 89) ;
- et la post-vendange (29 Septembre 2021 ; 1253,3 DJC ; BBCH code 91) représentant une sur-maturité des raisins.

## Nombre de pieds

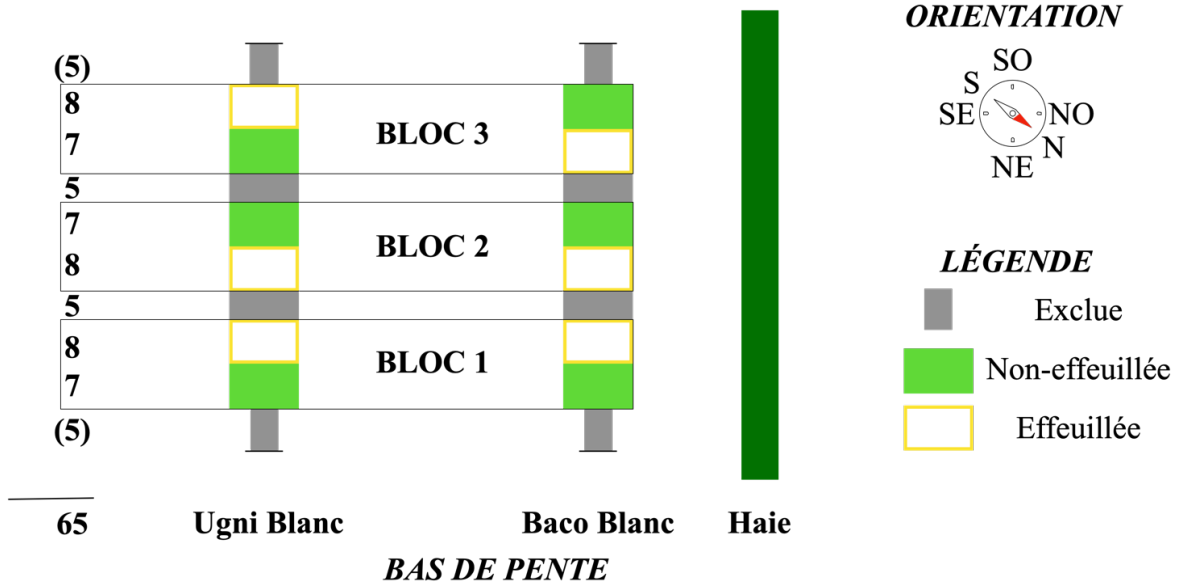


Figure 22 : Dispositif expérimental de l'essai d'effeuillage total et contrôlé, mis en œuvre en 2021 sur la parcelle PREMS32 du Château de Mons

### III.2.2. Suivi des clones de Baco blanc en 2021

En 2021, les 6 clones de Baco blanc de la parcelle CLONES40 ont été suivis (Figure 23). Plusieurs prélèvements et mesures ont été effectués sur cette parcelle construite en carré latin. Chaque modalité (clone) est représenté par 10 plants de vignes consécutifs par placette unitaire. Différentes mesures ont été effectuées le 11 Août 2021 et le 8 Septembre 2021 (respectivement 760,7 DJC et 1084,7 DJC). Des grappes ont été prélevées le 8 Septembre 2021 (1084,7 DJC).



Figure 23 : Dispositif expérimental en carré latin de la parcelle CLONES40. Le seul clone autorisé de Baco blanc porte le code c1086. Les autres clones portent un code ENTAV-INRA donné en 2006 lorsqu'un travail sur les clones de Baco blanc a été engagé. Les couleurs choisies ici pour représenter chaque accession font référence aux marquages réalisés sur le terrain pour des questions de praticité et seront reprises dans les graphiques de données traitant des clones

### III.2.3. Éclaircissage partiel en 2022

En 2022, une expérimentation d'éclaircissage de différentes intensités a été menée sur la parcelle PREMS32 (Figure 24). Seul le rang de Baco blanc a été considéré qui a été divisé en 4 blocs. Les 3 premiers blocs ont été subdivisés en 3 zones de 5 pieds de vigne consécutifs. Ces zones étaient caractérisées par des intensités d'éclaircissage d'intensité différentes : aucune grappe retirées, 25 % de grappes retirées et 50 % de grappes retirées. Les grappes retirées étaient de rang 1 et/ou 2. L'ordre d'intensité d'éclaircissage le long du bloc a été déterminée au hasard. Le 4<sup>e</sup> bloc a été subdivisé en 2 zones de 5 pieds de vigne consécutifs, une totalement effeuillée au niveau de la zone des grappes et une autre non -effeuillée. Chaque bloc était séparé du suivant par une zone tampon composée de 5 pieds de vigne consécutifs. Les bordures du rang ont été exclues du dispositif. Les éclaircissages et l'effeuillage ont été réalisés le même jour calendaire soit le 11 Juillet 2022, correspondant au stade fermeture de grappe (548 DJC ; BBCH code 77).

Des mesures et prélèvements de grappes (page 81) ont été effectués à 4 stades phénologiques :

- fermeture de la grappe (11 Juillet 2022 ; 548 DJC ; BBCH code 77) ;
- véraison (8 Août 2022 ; 971,4 DJC ; BBCH code 81) ;
- vendange (6 Septembre 2022 ; 1381,8 DJC ; BBCH code 89) ;
- et post-vendange (26 Septembre 2022 ; 1573,2 DJC ; BBCH code 91).

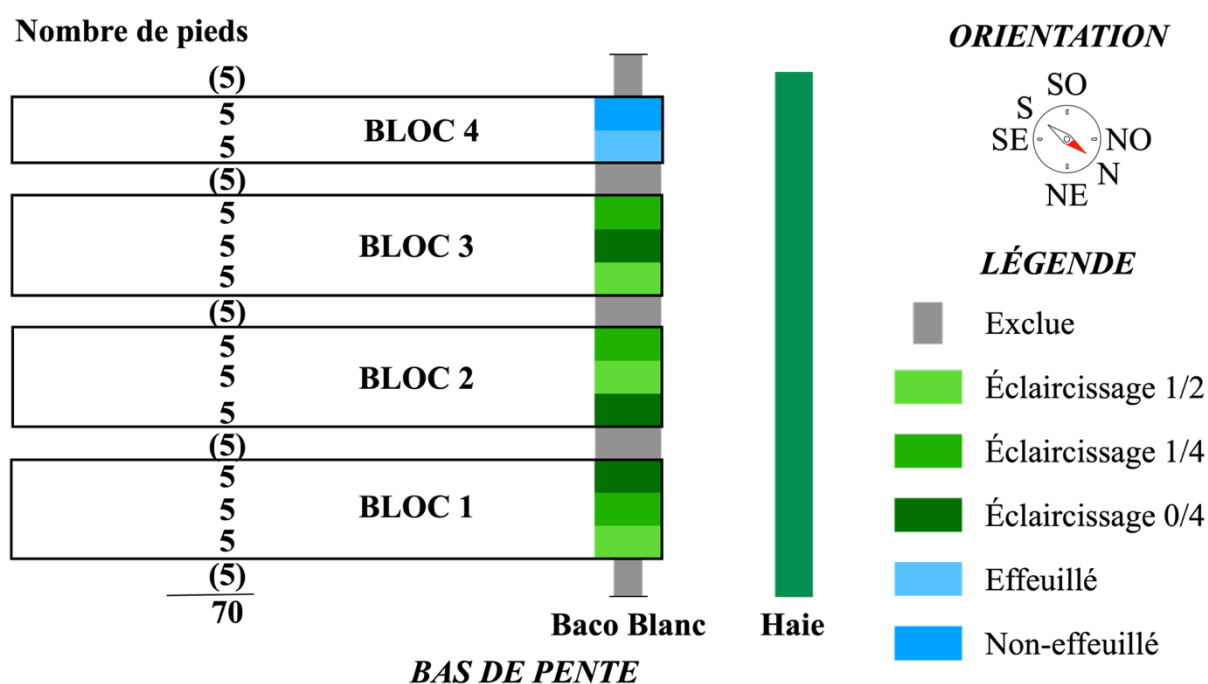


Figure 24 : Dispositif expérimental de l'essai d'éclaircissages, mis en œuvre en 2022 sur la parcelle PREMS32 du Château de Mons

### III.2.4. Suivi du rang de Baco blanc de la parcelle CONS32 en 2022

En 2022, le rang de Baco blanc de la parcelle CONS32 a été l'objet de mesures et prélèvements (décrits au paragraphe page 81) effectués à plusieurs stades phénologiques :

- fermeture de la grappe (11 Juillet 2022 ; 548 DJC ; BBCH code 77) ;
- la véraison (8 Août 2022 ; 971,4 DJC ; BBCH code 81) ;
- la vendange (6 Septembre 2022 ; 1381,8 DJC ; BBCH code 89) ;
- et la post-vendange (26 Septembre 2022 ; 1573,2 DJC ; BBCH code 91).



### **III.3. Mesures et prélèvements**

#### **III.3.1. Prélèvements pour quantification d'eugénol et pour tests microbiologiques**

Des prélèvements de grappes ont été effectués à raison de 6 ou 12 grappes par modalité et par face de rang. Ces prélèvements ont été effectués sur les différentes parcelles d'expérimentations (décrites au paragraphe page 76) et à stades phénologiques précis. Seules des grappes de rang 1 et/ou 2 ont été sélectionnées sur toute la longueur de la modalité concernée. Les prélèvements ont été réalisés avec précaution en utilisant un sécateur pour récolter les grappes en prenant garde à ne pas détruire les feuilles et/ou les rameaux dans la zone de prélèvement. Puis, les grappes ont été placées dans des sacs congélation conservés dans une glacière électrique (~6 °C), branchée dans la voiture le temps du transport jusqu'au laboratoire. Les prélèvements ont ensuite été placés à -25 °C.

#### **III.3.2. Mesure de la vigueur végétative**

En viticulture, la vigueur végétative peut être assimilée à l'indice de surface foliaire, Leaf Area Index en anglais (Drissi *et al.*, 2009). Autrement dit la vigueur végétative de la vigne peut être représenté par la surface cumulée des feuilles d'un cep de vigne. Ce dernier peut être quantitativement évalué grâce à la mesure de l'indice de végétation de différence normalisée ou Normalized Difference Vegetation Index (NDVI), en prenant en compte les espaces vides pouvant exister dans la canopée mesurée (Drissi *et al.*, 2009; Pañitrur-De la Fuente *et al.*, 2020). Le NDVI a été mesuré sur les parcelles considérées grâce à un appareil manuel GreenSeeker® (Trimble, Sunnyvale, CA, USA) de la manière décrite par Pañitrur-De la Fuente *et al.* en 2020 ;

Figure 25). La mesure du NDVI a nécessité quelques précautions afin d'obtenir des valeurs exploitables. Le NDVI prend en compte la quantité de lumière renvoyée et/ou absorbée par la surface foliaire. Afin de limiter les interférences, dues aux autres rangs de vignes (environnement direct des pieds de vigne concernés par la mesure), la mise en place d'un écran blanc (NDVI = 0) derrière les ceps évalués a été nécessaire. Si des symptômes foliaires de maladie cryptogamiques, ou d'autres dégâts, avaient été observés, il aurait fallu prendre en compte leur intensité car ils interfèrent avec le NDVI. De plus, une mesure de NDVI est impossible si la canopée est mouillée, l'eau ayant sa propre capacité à renvoyer et/ou absorber la lumière émise par l'appareil.

Enfin cette mesure du NDVI a permis de rendre compte de la bonne réalisation des effeuillages, mais également de s'assurer d'une certaine homogénéité des différentes modalités mises en place.

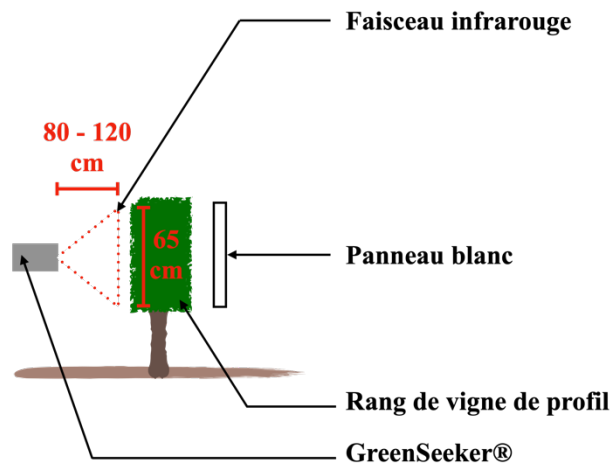


Figure 25 : Mise en œuvre d'une mesure de NDVI grâce à un GreenSeeker®. Ce dernier et le le panneau blanc ont été portés par deux opérateurs différents, placés de chaque côté du rang

### III.3.3. Charge de la vigne

Quelle que soit l'expérimentation et quelle que soit la modalité considérée, la charge d'un cep de vigne a été évaluée suivant le protocole OIV numéro 153 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2014). La charge de la vigne de chaque modalité a été divisée par le nombre de ceps de vigne afin d'obtenir la charge par pied.

### III.3.4. Compacité des grappes

Quelle que soit l'expérimentation et quelle que soit la modalité considérée, la compacité des grappes a été visuellement évaluée suivant le protocole OIV numéro 204 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2014). Ce protocole a été amélioré grâce à l'utilisation de photographies propres à chaque variété étudiée, ainsi qu'à une simplification des classes de compacité (1-2-3-4-5 au lieu de 1-3-5-7-9).

### III.3.5. Taux de contact entre grappes ( $\tau$ )

Quelle que soit l'expérimentation et quelle que soit la modalité considérée, le nombre de grappes isolées, *i.e.* une grappe n'étant pas en contact avec une autre, a été dénombré. Le calcul du taux de contact entre grappe est défini par l'Équation 3 :

$$\tau = 1 - \frac{\text{nombre de grappes isolées}}{\text{charge de la vigne}}$$

Équation 3 : Calcul du taux de contact entre grappes ( $\tau$ )

### III.3.6. Évaluation visuelle de l'infection par *B. cinerea*

L'infection par *B. cinerea* a été visuellement évaluée en %, selon deux critères : l'incidence et la sévérité des symptômes du champignon (essentiellement brunissement et sporulation). La méthode employée est celle de (Pañitur-De la Fuente *et al.*, 2020). Sur l'ensemble des grappes d'une modalité, l'incidence a été évaluée comme le rapport du nombre de grappes affectées sur le nombre de grappes total. La sévérité a été évaluée sur chaque grappe comme le pourcentage de la surface visible de la grappe (considérant l'ensemble de la grappe) occupée par un ou plusieurs des symptômes typiques de Pourriture grise.



## **Chapitre 2 : Analyses sensorielles**

### **I. Les participants**

Les différentes analyses sensorielles ont été conduites grâce à la participation de deux groupes distincts d'experts de la filière viti-vinicole. Ces deux groupes ont été considérés comme experts selon la littérature scientifique (Parr *et al.*, 2002, 2004; Tempère, 2010). Autrement dit, ces groupes étaient constitués soit de vigneron, de négociants en vins et eaux-de-vie, de responsables technique d'interprofession viti-vinicole, de responsables de laboratoire œnologique, d'œnologues-conseil, soit de chercheurs et d'étudiants en œnologie. Chaque panéliste a complété un formulaire anonyme portant sur les principaux facteurs pouvant influencer ses capacités sensorielles : âge, sexe, tabagisme, état de santé, profession et formation (ces deux dernières caractéristiques ont bien été séparées, la profession exercée n'étant pas nécessairement liée au niveau de formation acquis). Tous les participants ont fourni un consentement éclairé et écrit ainsi qu'une fiche de caractérisations professionnelle et personnelle, disponible à l'Annexe 2.

#### **I.1. Panel d'experts BNIA**

Le panel d'expert du BNIA a participé durant 3 années (2021, 2022, et 2023) aux analyses sensorielles présentées dans cette thèse. De par la nature des panélistes, des professionnels de la filière viti-vinicole, le panel a évolué chaque année, tout en gardant un important socle commun. Les variables professionnelles et personnelles des participants présents au cours des 3 années sont regroupées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques professionnelles et personnelles des panélistes experts du BNIA sur l'ensemble des 3 années d'analyses sensorielles. Le paramètre profession a été divisé entre les professionnels directement liés à la production d'Armagnac et ceux travaillant plus largement dans la filière Armagnac (laboratoire d'analyse, interprofession etc.)

Paramètres	Catégories	2021	2022	2023
Nombre de panélistes		19	18	19
Âge		46 ± 11 ans	45 ± 12 ans	46 ± 12 ans
Diplôme de dégustation : DNO ou DUAD		47 %	50 %	53 %
Profession	Production	68 %	72 %	68 %
	Autre	32 %	28 %	32 %
Femme		37 %	32 %	35 %
Homme		63 %	68 %	65 %

## I.2. Panel d'experts de l'ISVV

Le panel expert de l'ISVV est constitué de 27 personnes : étudiant(e)s, doctorant(e)s, post-doctorant(e)s et chercheurs(ses), membres de l'UMR ŒNOLOGIE. Ce sont des panélistes qualifiés, *id est* habitués à la réalisation de tests sensoriels, mais pour la plupart non habitués à la dégustation d'eaux-de-vie. Ce panel n'a été utilisé que pour l'année 2023. Les principales caractéristiques de ce panel sont résumées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Caractéristiques professionnelles et personnelles des panélistes experts de l'UMR ŒNOLOGIE pour l'année 2023

Paramètres	Catégories	2023
Statut	Étudiant(e)	26 %
	Doctorant(e)	33 %
	Post-doctorant(e)	22 %
	Autr(e)	19 %
Âge		30 ± 8 ans
Diplôme ou habitude de dégustation	DNO	19 %
	Eau-de-vie	70 %
	Autres	11 %
Femme		70 %
Homme		30 %

## **II. Environnement et matériels**

### **II.1. Salles d'analyse sensorielle**

Les séances d'analyses sensorielles ont été effectuées dans la salle de dégustation de l'Unité Mixte de Recherche ŒNOLOGIE (UMR1366, Villenave d'Ornon, France) et dans la salle de dégustation de la Maison du Vignoble Gascogne Armagnac (Eauze, France). La première salle est conçue telle que les perturbation éventuelles, notamment phoniques, sont atténuées. Une température constante et régulée ainsi que des postes isolés (ISO 8589 : 2010) garantissent des dégustations isolées et indépendantes. La seconde salle a assuré une température constante et régulée, ainsi que le moyen de mettre en place des postes isolés. Reste qu'il ne s'agit pas d'une salle d'analyse sensorielle normalisée.

### **II.2. Matériel et produits dégustés**

Les verres utilisées pour ces dégustations ont été de 3 types :

- Verres transparents ISO 3591 : 1977 ;
- Verres opaques noirs ISO 8589 : 2010 ;
- Verres tulipes eaux-de-vie 15 (Lehmann, Reims, France).

Les produits dégustés ont été de 2 types :

- Des eaux-de-vie blanches, récoltées juste après distillation continue en alambic armagnacais par la responsable Qualité, R&D et Développement durable du BNIA en la personne de Marie-Claude SÉGUR. Ces eaux-de-vie étaient issues de 3 variétés (Ugni blanc, Folle blanche et Baco blanc ; sans assemblage) autorisée dans le décret de l'Appellation d'Origine Contrôlée de l'Armagnac (Décret n° 2014-1642 du 26 décembre 2014 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », 2014) et conformes à ce même décret, les échantillons à défaut ayant été écartés pendant et après le prélèvement. Chaque échantillon d'eau-de-vie a été conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante dans des bouteilles en verres de 70 cL. Pour les dégustations, les eaux-de-vie ont été réduites, si nécessaire et en fonction des besoins de l'exercice proposé, à des TAV de 20 % (v/v), 40 % (v/v) ou 50 % (v/v), au moins 1 semaine avant le jour de la dégustation.
- Des solutions hydroalcooliques (TAV allant de 10 à 50 % (v/v)), supplémentées de molécules d'intérêt sensoriel préparées la veille de la dégustation.

### **III. Les épreuves d'analyse sensorielle**

Pour chaque épreuve, 20 mL de chaque échantillon ont été servis dans des verres opaques noirs ISO 8589 : 2010 ou dans des verres transparents ISO 3591 : 1977. De plus chaque échantillon a été anonymisé grâce à des nombres à 3 chiffres aléatoirement générés. Le déroulement de la plupart des tests décrits dans cette partie est normalisée (Association française de normalisation, 2007).

#### **III.1. Épreuves discriminatives**

Les épreuves discriminatives permettent d'évaluer l'existence, ou non, d'une différence sensorielle entre deux produits. De manière générale, les produits évalués sont relativement proches. Les dégustateurs ne sont pas informés des différences existantes entre les produits et l'expérimentateur n'a pas d'informations sur les caractéristiques sensorielles des produits évalués.

##### **III.1.1. Test par paire**

Le test par paire ou essai de comparaison par paires est un mode opératoire encadré par la norme ISO 5495 : 2007. Il permet de déterminer l'existence, ou non, d'une différence sensorielle perceptible ou d'une similitude entre deux produits, sur l'intensité d'une caractéristique sensorielle. Les échantillons sont présentés de manière équilibrée (échantillon A et B à discriminer) : AB et BA.

La question posée aux dégustateurs, inscrite sur une feuille reprenant les codes associés aux échantillons ainsi que différentes informations associées à la séance en cours, était : « *Quel échantillon est le plus représentatif d'une des caractéristiques aromatiques essentielles d'une eau-de-vie blanche de Baco blanc ?* ». Les dégustateurs ont eu l'obligation de faire un choix, après dégustation olfactive et/ou gustative et ce, même s'ils n'étaient pas certains de leur choix. Le traitement des données récoltées pour un test par paire dépend du niveau d'information a priori de l'expérimentateur : un test unilatéral sera appliqué si l'expérimentateur a une idée du sens de la différence, un test bilatéral s'il n'a pas cette connaissance a priori.

##### **III.1.2. Test triangulaire**

Le test triangulaire est un mode opératoire encadré par la norme ISO 4120 : 2021. Il permet de déterminer l'existence, ou non, d'une différence sensorielle perceptible ou d'une similitude



entre deux produits, sur l'intensité d'une caractéristique sensorielle. Il s'agit d'une méthode à choix forcé. Le principe de ce test est de présenter 3 échantillons (2 identiques et 1 différent) aux dégustateurs dans un ordre aléatoire pour chaque dégustateur. Six combinaisons sont possibles (échantillon A et B à discriminer) : AAB, ABA, BAA, BBA, BAB, ABB. Chaque dégustateur a effectué un test triangulaire avec l'échantillon unique A et un test triangulaire avec l'échantillon B. Toutes les présentations possibles ont été proposées aux panélistes.

La question posée aux dégustateurs était : « *Parmi les 3 échantillons, lequel est différent ?* ». Les dégustateurs ont eu l'obligation de faire un choix, après dégustation olfactive et/ou gustative et ce, même s'ils n'étaient pas certains de leur choix. Le traitement des données récoltées pour un test triangulaire est réalisé en se référant à la loi binomiale. Le nombre de dégustateurs nécessaires dépend de l'objectif du test : recherche d'une similitude (besoin minimal de 48 dégustateurs) ou recherche d'une différence (besoin minimal de 24 dégustateurs).

### **III.2. Profil sensoriel**

Plusieurs profils sensoriels ont été réalisés avec le panel expert BNIA à l'aide d'une fiche de dégustation établie avec le même panel (page 85). Ces profils ont été réalisés en utilisant des verres « tulipes » transparents eaux-de-vie 15 (Lehmann, Reims, France), verres les plus adaptés à la dégustation d'eaux-de-vie dans le cadre dans l'interprofession.

### **III.3. Évaluation de la typicité**

La typicité d'un produit est un concept sensoriel telle qu'elle nécessite à la fois l'utilisation de tests discriminatifs et de tests descriptifs. Plusieurs recherches se sont intéressées au concept de typicité (Ballester *et al.*, 2005; Parr *et al.*, 2011; Pelonnier-Magimel, 2021; Picard *et al.*, 2015; Tempère *et al.*, 2014). Généralement, 3 étapes sont reconnues dans l'évaluation de la typicité d'un produit : la définition de la typicité d'un produit, son évaluation quantitative et enfin la description de produit typique. L'évaluation de la typicité n'a été menée qu'avec le panel expert du BNIA.

### **III.3.1. Imagerie mentale des dégustateurs**

C'est la première étape possible dans l'évaluation de la typicité d'un produit (Barbe *et al.*, 2021).

Sans échantillons du dit produit, ni dégustation, une discussion a été engagée avec les professionnels et/ou les experts d'eaux-de-vie d'Armagnac afin d'aborder la représentation mentale du concept de typicité des eaux-de-vie blanches. Cette étape a été répétée chaque année lors de la première séance.

### **III.3.2. Épreuves sensorielles d'association et de notation**

Des épreuves d'association de type tâche de tri libre ont été menées. Une épreuve de tâche de tri libre consiste à présenter aux dégustateurs, de manière aléatoire et équilibrée, un certain nombre d'échantillons. Les dégustateurs, après avoir dégusté au nez et en bouche autant de fois que désiré, ont dû grouper les échantillons selon certaines règles : aucun échantillon ne devait se retrouver seul et il était impossible de créer autant de groupe que d'échantillon. 20 mL des échantillons ont été présentés, aléatoirement et de manière équilibrée, dans des verres « tulipes » transparents eaux-de-vie 15 (Lehmann, Reims, France) et anonymisés grâce à des nombres à 3 chiffres aléatoirement générés. S'agissant d'eaux-de-vie blanches, l'utilisation de verres transparents ne posait pas de problème. Le traitement des données d'une tâche de tri libre consiste en l'établissement d'une matrice de similarités, analysée ensuite par positionnement multidimensionnel (MDS) et par CAH afin d'obtenir une vision globale du tri effectué par les panélistes.

Des approches par notation ont également été menées. L'approche de notation consiste à positionner des échantillons de représentativité sensorielle (Candelon *et al.*, 2004). La typicité d'un produit est alors noté selon sa proximité par rapport à un idéotype. Une échelle continue de 10 cm a alors été utilisée allant de mauvais exemple à bon exemple afin de positionner chaque échantillon selon la question : « *Cette solution présente-t-elle l'une des caractéristiques aromatiques essentielles d'un Armagnac de Baco blanc ?* ». Cette question a préférentiellement été utilisée car le mot et le concept de typicité a pu, par le passé, gêner les panélistes experts du BNIA. . 20 mL des échantillons ont été présentés, aléatoirement et de manière équilibrée, dans des verres « tulipes » transparents eaux-de-vie 15 (Lehmann, Reims, France) et anonymisés grâce à des nombres à 3 chiffres aléatoirement générés.

## Chapitre 3 : Analyses par chromatographie en phases gazeuse et liquide

Après échantillonnage sur le terrain, les baies étaient conservées dans des sacs de congélation à -25 °C. Les moûts et les vins étaient conservés à -25 °C dans des bouteilles PET 125 mL, scellées par des bouchons plastiques à vis. Les eaux-de-vie, brouillis et vinasses étaient conservés à 20 °C dans des bouteilles en verre, obturées par des bouchons plastiques.

### I. Analyses par HS-SPME-GC/MS

#### I.1. Phénylpropènes et phénols volatils

Chaque analyse décrite ci-après a été réalisée en triplicata. La méthode présentée ici est une adaptation de la méthode développée par Franc *et al.* (Franc *et al.*, 2023). Pour effectuer ces analyses plusieurs composés de référence ont été nécessaires. Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Composés de référence utilisés pour la quantification des phénylpropènes et des phénols volatils. Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (\*)

Composés	CAS	Pureté	Fournisseur
*eugénol-d <sub>3</sub>	1335401-17-6	95 %	Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, USA)
*4-éthylphénol-d <sub>10</sub>	352431-18-6	99 %	Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France)
eugénol	97-53-0	98 %	
4-éthylphénol	123-07-9	>98 %	
4-éthylgalaïacol	2785-89-9	98 %	Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France)
4-vinylphénol	2628-17-3	10 %	
4-vinylgalaïacol	7786-61-0	97 %	

#### I.1.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est dépendante de la matrice à analyser. Les moûts et les vins ne nécessitent aucune préparation préalable. Dix millilitres de chaque échantillon ont alors été placés dans un vial en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl. Les eaux-de-vie, brouillis et vinasses ont été préalablement dilués 5 fois avec de l'H<sub>2</sub>O milli-Q. Dix millilitres de chaque échantillon dilué ont alors été introduits dans un vial en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl.

Approximativement 50 baies congelées ont été pelées. Les pellicules ainsi obtenues ont été séchées sur papier absorbant, et conservées dans des tubes Falcon® 50 mL au congélateur à -25 °C, avant broyage au N<sub>2</sub> liquide durant 30 s à 30 Hz avec un broyeur à billes Retsch MM400 (Retsch France, Verder S.A.R.L., Eragny sur Oise, France). La fine poudre blanchâtre ainsi obtenue était conservée dans des tubes Falcon® 50 mL, plongés dans le N<sub>2</sub> liquide. Ensuite 250 mg de cette poudre ont été pesés dans un tube Falcon® 15 mL. Puis 10 mL d'H<sub>2</sub>O milli-Q ont été ajoutés dans les tubes.

Les pulpes correspondantes aux mêmes 50 baies ont été épépinées et broyées durant 1 min à 4000 rpm avec un Ultraturrax® T25 basic d'IKA (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France). Un gramme du broyat obtenu a été pesé dans un tube Falcon® 15 mL. Puis 10 mL d'H<sub>2</sub>O milli-Q ont été ajoutés dans les tubes.

L'ensemble des tubes Falcon® a été alors placé sur une table agitante IKA HS 501 (VWR International S.A. S, Fontenay-sous-Bois, France) durant 24 h à 250 rpm. Les tubes ont été ensuite centrifugés durant 5 min à 5000 rpm avec une centrifugeuse, High-Speed Refrigerated Centrifuge Himac CR22N (Hitachi Life-Sci, Tokyo, Japan) équipée d'un rotor à angle fixe 15A. Seuls les surnageants ont été récupérés et transvasés dans des vials en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl.

### **I.1.2. Hydrolyse enzymatique**

À partir d'une même masse de poudre de pellicule et d'une même masse de broyat de pulpe (Chapitre 3 :I.1.1), une hydrolyse enzymatique à chaud a été effectuée (Gunata *et al.*, 1993), en ajoutant dans les tubes, 10 mL d'un tampon citrate-phosphate (0,1 M ; pH 5) ainsi que 300 µL d'une préparation enzymatique riche en β-glucosidase, la Rapidase® Revelation Aroma (Oenobrand SAS, Montferrier-sur-Lez, France), dissoute à 120 g·L<sup>-1</sup> dans d'H<sub>2</sub>O ultra-pure. Les tubes contenant le mélange ont été mis à l'incubation pour 24 h à 150 rpm et 40 °C dans un bain d'eau SW22 (Julabo GmbH, Seelbach, Germany). Les tubes ont été ensuite centrifugés durant 5 min à 5000 rpm avec une centrifugeuse, High-Speed Refrigerated Centrifuge Himac CR22N (Hitachi Life-Sci, Tokyo, Japan) équipée d'un rotor à angle fixe 15A. Seuls les surnageants ont été récupérés et transvasés dans des vials en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl.

Concernant les moûts, les vins et les vinasses, 35 mL d'échantillons ont été introduits dans des flacons bruns de 60 mL contenant 375 mg d'hydrogénophosphate de sodium et 175 mg d'acide citrique. Après l'ajout de 900 µL de la préparation enzymatique riche en β-glucosidase, les falcons bruns ont été incubés durant 24 h à 150 rpm et 40 °C dans le bain d'eau SW22. Dix millilitres de chaque échantillon ont été ensuite placés dans des vials en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl.

Une méthode adaptée aux très petits volumes (10 µL) a également été développée. Les 10 µL, précédemment cités, ont été introduits dans un tube Falcon® de 15 mL. Du tampon citrate-phosphate (0,1 M ; pH 5) a été ajouté, dans le tube Falcon®, en quantité suffisante pour atteindre 10 mL exactement. Enfin, 300 µL d'une préparation Rapidase® Revelation Aroma ont été ajoutés. Le mélange a été homogénéisé par vortexation puis placés à l'incubation pour 24 h à 150 rpm et 40 °C dans un bain d'eau SW22. Le liquide de chaque tube a ensuite été transvasé dans un vial en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl.

### **I.1.3. Spécificité de dosage pour les eaux-de-vie riches en cuivre**

Certaines eaux-de-vie, brouillis et vinasses sont particulièrement riches en cuivre. Cette problématique ayant été identifiée au cours de ces travaux de thèse, toutes les eaux-de-vie ont été analysées avec la méthode présentement détaillée.

Les échantillons d'eaux-de-vie, de brouillis ou de vinasses étaient dilués par 5. Pour cela, 10 mL d'échantillons ont été introduits dans une fiole jaugée de 50 mL. Une quantité suffisante d'un tampon citrate-phosphate (0,15 M, pH 5) contenant  $5,5 \times 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> d'EDTA disodique (Biosolve Chimie SARL, Dieuze, France) a été ajouté afin d'atteindre le trait de jauge de la fiole. Le mélange a été homogénéisé. Dix millilitres de chaque échantillon ainsi dilués ont été ensuite placés dans des vials en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl.

### **I.1.4. Analyse par HS-SPME-GC-MS**

Quel que soit le type d'échantillon préparé, 20 µL d'eugénol deutéré (eugénol d<sub>3</sub> à 50 mg·L<sup>-1</sup> dissout dans de l'éthanol) et 20 µL de 4-éthylphénol deutéré (4-éthylphénol d<sub>10</sub> à 56 mg·L<sup>-1</sup> dissout dans de l'éthanol) ont été ajoutés en tant qu'étalons internes dans les vials. Ces derniers ont été finalement scellés avec des capsules à vis munis de septum en silicone/PTFE (Chromoptic, Courtaboeuf, France). Tous les vials ont été homogénéisés sur vortex avant analyse.

Concernant spécifiquement la concentration d'eugénole liée est obtenue en soustrayant la concentration en eugénole libre, obtenue par l'injection des échantillons sans hydrolyse enzymatique, à la concentration totale en eugénole, elle obtenue après l'hydrolyse enzymatique Équation 4.

$$[\text{eugénole liée}] = [\text{eugénole totale}] - [\text{eugénole libre}]$$

Équation 4 : Concentration en eugénole liée obtenue après analyse HS-SPME-GC/MS d'échantillons hydrolysés et non hydrolysés

De plus, à partir des concentrations en eugénole libre dans les vins et les eaux-de-vie correspondantes, il est possible de calculer le taux de recouvrement de l'eugénole. Ce taux représente le pourcentage d'eugénole passant du vin à l'eau-de-vie, à TAV constant afin de correctement évaluer la relation unissant les deux produits (Équation 5).

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{\frac{[\text{eugénole}]_{EdV}}{TAV_{EdV}}}{\frac{[\text{eugénole}]_{Vin}}{TAV_{Vin}}}$$

Équation 5 : Calcul du taux de recouvrement de l'eugénole. Les matrices desquelles sont issues les concentrations en eugénole sont indiquées en indice

L'extraction HS-SPME des composés analysés ici a été réalisée avec une fibre polyacrylate 85 µm (Merck – Sigma-Aldrich Chimie, Saint-Quentin Fallavier, France). L'analyse GC-MS a été effectuée par un système de chromatographie en phase gazeuse Agilent 7890 (Agilent Technologies, Les Ulis, France), couplé à un spectromètre de masse simple quadropôle Agilent 5975C (Agilent Technologies, Les Ulis, France) et équipé d'un échantillonneur automatique Gerstel (Müllheim an der Ruhr, Germany). La colonne chromatographique utilisée était une colonne capillaire BP-21 (SGE, Courtabœuf, France). Le gaz vecteur utilisée était de l'hélium N55 (Messer France S.A.S, Suresnes, France). Enfin, l'analyse a été menée en mode SIM (Single Ion Monitoring).

Les conditions d'extraction par HS-SPME, de la chromatographie en phase gazeuse et de la détection par spectrométrie de masse sont précisément détaillés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Conditions et caractéristiques de l'analyse par HS-SPME-GC/MS des phénylpropènes et phénols volatils. Durant l'adsorption sur la fibre SPME, l'agitation était divisée en plusieurs cycles de 60 s, entrecoupés de 10 s de pause. Après désorption et injection, la fibre était insérée dans le poste de conditionnement durant 5 min à 200 °C avant extraction de l'échantillon suivant. Concernant l'acquisition, pour chaque composé est présenté son temps de rétention ( $t_R$ ) ainsi que les ions sélectionnés pour le mode SIM (ion quantifieur en gras suivi des ions qualifieurs). Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (\*)

<b>Agilent 7890A x Agilent 5975C (Agilent Technologies)</b>		
<b>HS-SPME</b>	<i>Adsorption</i>	Fibre 85 µm polyacrylate Incubation = 2 min à 40 °C Extraction = 30 min à 40 °C sous agitation à 500 rpm
	<i>Désorption</i>	250 °C pendant 6 min
	<i>Injection</i>	Mode splitless Débit de purge = 15 mL·min <sup>-1</sup> après 0,2 min Pression en tête de colonne = 3,35 psi
	<i>Colonne chromatographique</i>	Colonne capillaire BP-21 ; 50 m (L) × 0,32 mm (di), 0,25 µm (ef) 60 °C durant 1 min
	<i>Rampe de température</i>	Montée jusqu'à 220 °C à 4 °C·min <sup>-1</sup> Maintien à 220 °C pendant 30 min
	<i>Débit du gaz vecteur</i>	Hélium à 1 mL·min <sup>-1</sup>
<b>GC-MS</b>	<i>Détection</i>	Ligne de transfert = 280 °C Ionisation par impact électronique = 70 eV Source = 230 °C Quadropole = 150 °C
	<i>Acquisition</i>	Mode d'acquisition : SIM *eugénol-d <sub>3</sub> ( $t_R$ = 34,10 min ; <b>167</b> ,140,168) eugénol ( $t_R$ = 34,15 min ; <b>164</b> ,165) *4EP-d <sub>10</sub> ( $t_R$ = 34,11 min ; <b>113</b> ,131) 4EP ( $t_R$ = 34,26 min ; <b>107</b> ,122) 4EG ( $t_R$ = 30,87min ; <b>137</b> ,152) 4VP ( $t_R$ = 39,12 min ; <b>120</b> ,91,119) 4VG ( $t_R$ = 34,85 min ; <b>150</b> ,135,107)

## I.2. Quantification des esters

Chaque analyse décrite ci-après a été réalisée en triplicata. La méthode présentée ici est celle développée par (Antalick *et al.*, 2010). Pour effectuer ces analyses plusieurs composés de référence ont été nécessaires. Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Composés de référence utilisés pour la quantification des esters. Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (\*)

Composés	CAS	Pureté	Fournisseur
*4,4,4-butanoate d'éthyle-d <sub>3</sub> (C <sub>4</sub> C <sub>2</sub> -d <sub>3</sub> )	113435-99-7	≥ 99 %	Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France)
*Hexanoate d'éthyle-d <sub>11</sub> (C <sub>6</sub> C <sub>2</sub> -d <sub>11</sub> )	2159-19-5	≥ 99 %	
*Octanoate d'éthyle-d <sub>15</sub> (C <sub>8</sub> C <sub>2</sub> -d <sub>15</sub> )	1219798-38-5	≥ 99 %	
* <i>t</i> -cinnamate d'éthyle-d <sub>5</sub> (C <sub>9</sub> C <sub>2</sub> -d <sub>5</sub> )	856765-68-9	≥ 99 %	
Propanoate d'éthyle (C <sub>3</sub> C <sub>2</sub> )	105-37-3	≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France)
Isobutyrate d'éthyle (iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub> )	97-62-1	≥ 99 %	
Acétate de propyle (C <sub>2</sub> C <sub>3</sub> )	109-60-4	≥ 99,7 %	
Acétate d'isobutyle (C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub> )	110-19-0	≥ 99 %	
Butyrate de méthyle (C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> )	623-42-7	≥ 98 %	
Acétate de butyle (C <sub>2</sub> C <sub>4</sub> )	123-86-4	≥ 98,5 %	
Butyrate d'éthyle (C <sub>4</sub> C <sub>2</sub> )	105-54-4	≥ 99 %	
Acétate d'isoamyle (C <sub>2</sub> iC <sub>5</sub> )	123-92-2	≥ 98 %	
Hexanoate d'éthyle (C <sub>6</sub> C <sub>2</sub> )	123-66-0	≥ 99 %	
Octanoate d'éthyle (C <sub>8</sub> C <sub>2</sub> )	106-32-1	≥ 99 %	
Decanoate d'éthyle (C <sub>10</sub> C <sub>2</sub> )	110-38-3	≥ 99 %	
Valérate d'éthyle (C <sub>5</sub> C <sub>2</sub> )	539-82-2	≥ 99 %	
Hexanoate de méthyle (C <sub>6</sub> C <sub>1</sub> )	106-70-7	≥ 99 %	
Butyrate d'isoamyle (C <sub>4</sub> iC <sub>5</sub> )	106-27-4	≥ 98 %	
Heptanoate d'éthyle (C <sub>7</sub> C <sub>2</sub> )	106-30-9	≥ 98 %	
Ethyl trans 2-hexanoate (HexC <sub>2</sub> )	27829-72-7	≥ 98 %	
Hexanoate d'isobutyle (C <sub>6</sub> iC <sub>4</sub> )	105-79-3	≥ 98 %	
Octanoate de méthyle (C <sub>8</sub> C <sub>1</sub> )	111-11-5	≥ 99 %	
Hexanoate d'isoamyle (C <sub>6</sub> iC <sub>5</sub> )	2198-61-0	≥ 99 %	
Acétate d'octyle (C <sub>2</sub> C <sub>8</sub> )	112-14-1	≥ 99 %	
Nonanoate d'éthyle (C <sub>9</sub> C <sub>2</sub> )	123-29-5	≥ 98 %	
Decanoate de méthyle (C <sub>10</sub> C <sub>1</sub> )	110-42-9	≥ 99 %	
Octanoate d'isoamyle (C <sub>8</sub> iC <sub>5</sub> )	2035-99-6	≥ 98 %	
Méthyl- <i>trans</i> -geranate (GerC <sub>1</sub> )	1189-09-9	≥ 94 %	
2-méthylbutyrate d'éthyle (2-mC <sub>4</sub> C <sub>2</sub> )	231-225-4	≥ 99 %	
Isovalérate d'éthyle (iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub> )	108-64-5	≥ 98 %	
Acétate d'hexyle (C <sub>2</sub> C <sub>6</sub> )	142-92-7	≥ 99 %	
Dodecanoate d'éthyle (C <sub>12</sub> C <sub>2</sub> )	106-33-2	≥ 99 %	
Phénylacétate d'éthyle (PheC <sub>2</sub> C <sub>2</sub> )	101-97-3	≥ 67 %	
Acétate de phényléthyle (C <sub>2</sub> PheC <sub>2</sub> )	103-45-7	≥ 99 %	
Dihydrocinnamate d'éthyle (DhCinnC <sub>2</sub> )	2021-28-5	≥ 99 %	
Cinnamate d'éthyle (CinnC <sub>2</sub> )	103-36-6	≥ 99 %	



### **I.2.1. Préparation des échantillons**

La préparation des échantillons est dépendante de la matrice à analyser.

Les moûts et les vins ne nécessitent aucune préparation préalable. Dix millilitres de chaque échantillon ont alors été placés dans un vial en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl.

Les eaux-de-vie, brouillis et vinasses ont été préalablement dilués 5 fois avec de l'H<sub>2</sub>O milli-Q. Dix millilitres de chaque échantillon dilué ont alors été introduits dans un vial en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl.

### **I.2.2. Analyse par HS-SPME-GC-MS**

Quel que soit le type d'échantillon préparé, 25  $\mu$ L d'une solution d'éthanol contenant du 4,4,4-butyrate d'éthyle-d<sub>3</sub> (238 mg·L<sup>-1</sup>), de l'hexanoate d'éthyle-d<sub>11</sub> (201 mg·L<sup>-1</sup>), de l'octanoate d'éthyle-d<sub>15</sub> (212 mg·L<sup>-1</sup>) et du *trans*-cinnamate d'éthyle-d<sub>5</sub> (284 mg·L<sup>-1</sup>) ont été ajoutés en tant qu'étalon interne dans les vials. Ces derniers ont été finalement scellés avec des capsules à vis munies de septum en silicone/PTFE. Tous les vials ont été homogénéisés sur vortex avant analyse.

L'extraction HS-SPME des composés analysés ici a été réalisée avec une fibre PDMS 100  $\mu$ m (Merck – Sigma-Aldrich Chimie, Saint-Quentin Fallavier, France). L'analyse GC-MS a été effectuée par système de chromatographie en phase gazeuse Agilent 7890 (Agilent Technologies, Les Ulis, France), couplé à un spectromètre de masse simple quadrupôle Agilent 5975C (Agilent Technologies, Les Ulis, France) et équipé d'un échantillonneur automatique Gerstel (Müllheim an der Ruhr, Germany). La colonne chromatographique utilisée était une colonne capillaire BP-21 (SGE, Courtabœuf, France). Le gaz vecteur utilisée était de l'hélium N55 (Messer France S.A.S, Suresnes, France). Enfin l'analyse a été menée en mode SIM.

Les conditions d'extraction par HS-SPME, de la chromatographie en phase gazeuse et de la détection par spectrométrie de masse sont précisément détaillés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Conditions et caractéristiques de l'analyse par HS-SPME-GC/MS des esters. Concernant l'acquisition, pour chaque composé est présenté son temps de rétention ( $t_R$ ) ainsi que les ions sélectionnés pour le mode SIM (ion quantifieur en gras suivi des ions qualifieurs). Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (\*)

<b>Agilent 7890A x Agilent 5975C (Agilent Technologies)</b>		
<b>HS-SPME</b>	<i>Adsorption</i>	Fibre 100 $\mu$ m PDMS Incubation = 2 min à 40 °C Extraction = 30 min à 40 °C sous agitation à 500 rpm
	<i>Désorption</i>	250 °C pendant 15 min
	<i>Injection</i>	Mode split/splitless (45 s) Pression en tête de colonne = 4,05 psi
<b>GC-MS</b>	<i>Colonne chromatographique</i>	Colonne capillaire BP-21 ; 50 m (L) $\times$ 0,32 mm (di), 0,25 $\mu$ m (ef) 40 °C durant 5 min
	<i>Rampe de température</i>	Montée jusqu'à 200 °C à 3 °C $\cdot$ min <sup>-1</sup> Montée jusqu'à 235 °C à 8 °C $\cdot$ min <sup>-1</sup> Maintien à 235 °C pendant 10 min
	<i>Débit du gaz vecteur</i>	Hélium à 1,2 mL $\cdot$ min <sup>-1</sup>
	<i>Détection</i>	Ligne de transfert = 280 °C Ionisation par impact électronique = 70 eV Source = 280 °C Quadrupôle = 150 °C
	<i>Acquisition</i>	Mode d'acquisition : SIM *C <sub>4</sub> C <sub>2</sub> -d <sub>3</sub> ( $t_R$ = 8,44 min ; <b>74</b> , 89) C <sub>3</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 6,28 min ; <b>102</b> , 57) iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 6,47 min ; <b>116</b> , 88, 71) C <sub>2</sub> C <sub>3</sub> ( $t_R$ = 6,70 min ; <b>61</b> , 43) C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub> ( $t_R$ = 7,76 min ; <b>56</b> , 43) C <sub>4</sub> C <sub>1</sub> ( $t_R$ = 6,98 min ; <b>74</b> , 87, 71) C <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 8,52 min ; <b>88</b> , 71, 60) 2m-C <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 9,05 min ; <b>102</b> , 57, 85) iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 9,63 min ; <b>88</b> , 85, 67) C <sub>2</sub> C <sub>4</sub> ( $t_R$ = 9,81 min ; <b>56</b> , 43) C <sub>2</sub> iC <sub>5</sub> ( $t_R$ = 11,84 min ; <b>70</b> , 55, 43) C <sub>5</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 12,35 min ; <b>85</b> , 88, 101) *C <sub>6</sub> C <sub>2</sub> -d <sub>11</sub> ( $t_R$ = 16,38 min ; <b>91</b> , 110) C <sub>6</sub> C <sub>1</sub> ( $t_R$ = 14,63 min ; <b>74</b> , 87, 99) C <sub>6</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 16,81 min ; <b>88</b> , 99, 106) C <sub>4</sub> iC <sub>5</sub> ( $t_R$ = 18,19 min ; <b>71</b> , 70, 55) C <sub>2</sub> C <sub>6</sub> ( $t_R$ = 18,55 min ; <b>56</b> , 43) C <sub>7</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 21,29 min ; <b>88</b> , 101) HexC <sub>2</sub> ( $t_R$ = 21,77 min ; <b>99</b> , 97, 55) C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub> ( $t_R$ = 22,14 min ; <b>99</b> , 56, 71) C <sub>8</sub> C <sub>1</sub> ( $t_R$ = 23,77 min ; <b>74</b> , 87, 127) *C <sub>8</sub> C <sub>2</sub> -d <sub>15</sub> ( $t_R$ = 25,26 min ; <b>91</b> , 142) C <sub>8</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 25,89 min ; <b>88</b> , 101, 127) C <sub>6</sub> iC <sub>5</sub> ( $t_R$ = 26,75 min ; <b>99</b> , 70) C <sub>2</sub> C <sub>8</sub> ( $t_R$ = 27,47 min ; <b>56</b> , 43) C <sub>9</sub> C <sub>2</sub> ( $t_R$ = 29,97 min ; <b>88</b> , 101) C <sub>10</sub> C <sub>1</sub> ( $t_R$ = 32,33 min ; <b>74</b> , 87)

---

C<sub>10</sub>C<sub>2</sub> (t<sub>R</sub> = 34,25 min ; **88**, 101)  
 C<sub>8i</sub>C<sub>5</sub> (t<sub>R</sub> = 34,83 min ; **127**, 70)  
 GerC<sub>1</sub> (t<sub>R</sub> = 36,16 min ; **114**, 69)  
 C<sub>12</sub>C<sub>2</sub> (t<sub>R</sub> = 41,59 min ; **88**, 101)  
 \*CinC<sub>2</sub>-d<sub>5</sub> (t<sub>R</sub> = 50,96 min ; **91**, 142)  
 PheC<sub>2</sub>C<sub>2</sub> (t<sub>R</sub> = 39,52 min ; **91**, 105)  
 C<sub>2</sub>PheC<sub>2</sub> (t<sub>R</sub> = 40,56 min ; **104**, 91, 43)  
 dhCinC<sub>2</sub> (t<sub>R</sub> = 42,94 min ; **104**, 91, 178)  
 CinC<sub>2</sub> (t<sub>R</sub> = 50,98 min ; **176**, 131)

---

## II. Analyses par GC/FID

### II.1. Les alcools supérieurs, l'éthanal, l'acétate d'éthyle, le 1,1-diéthoxyéthane et le méthanol

Chaque analyse décrite ci-après a été réalisée en triplicata. Ces analyses ont été réalisées selon le mode opératoire mis au point par (Bertrand, 1988). Pour effectuer ces analyses plusieurs composés de référence ont été nécessaires. Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Composés de référence utilisés pour la quantification des alcools supérieurs, de l'éthanal, de l'acétate d'éthyle, du 1,1-diéthoxyéthane et du méthanol. Les composés servant d'étalons internes sont marqués par une astérisque (\*)

Composés	CAS	Pureté	Fournisseur
*4-méthylpentan-2-ol	108-11-2	99 %	
éthanal	75-07-0	99 %	Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France)
acétate d'éthyle	141-78-6	99,8 %	
1,1-diéthoxyéthane	105-57-7	99 %	
butan-2-ol	78-92-2	99 %	Lancaster Synthesis Limited (Bischheim, France)
2-méthylpropan-1-ol	78-83-1	99 %	
propan-1-ol	71-23-8	99 %	
butan-1-ol	71-36-3	99 %	Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France)
2-méthylbutan-1-ol	137-32-6	98 %	
3-méthylbutan-1-ol	123-51-3	99 %	
2-phényléthanol	60-12-8	>99 %	

## II.2. Préparation des échantillons

Les moûts, les vins, les eaux-de-vie, les brouillis et les vinasses ont été préparés tels que : 5 mL d'échantillon sont introduits dans un pilulier blanc 20 mL et supplémentés de 50 µL de 4-méthylpentan-2-ol (14,08 g·L<sup>-1</sup>) dissout dans l'éthanol. Les piluliers ont été homogénéisés sur vortex. Une partie de ce mélange a été prélevé et introduit dans un vial 1,5 mL avec une pipette pasteur. Les vials ont finalement été sertis avec un bouchon en aluminium munis d'un septum en silicone/PTFE.

## II.3. Analyse par GC/FID

Les vials préparés ont été disposés sur le passeur d'échantillons d'un chromatographe HP 5890 (Hewlet Packard France SAS, Puteaux, France). Ce dernier était couplé à un détecteur par ionisation de flamme (FID). La colonne chromatographique utilisée était une colonne capillaire CP Wax 57 CB<sup>R</sup> (Hamilton, Reno, Etats-Unis d'Amérique). Le gaz vecteur utilisée était de l'hydrogène U (Air Liquide, Paris, France).

Les conditions de la chromatographie en phase gazeuse et de la détection par ionisation de flamme sont précisément détaillés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Conditions et caractéristiques de l'analyse par LIQ-GC/FID des alcools supérieurs, de l'éthanal, de l'acétate d'éthyle et du méthanol. En orange, apparaissent les caractéristiques spécifiques d'analyse du 2-phényléthanol. En effet ce dernier a fait l'objet d'une injection séparée

Hewlet Packard 5890 x Ionisation de Flamme		
LIQ	Injection	Mode split
		Température = 220 °C Division = 60 mL·min <sup>-1</sup> Volume injecté = 0,5 µL
	Colonne chromatographique	Colonne capillaire Wax 57 CB <sup>R</sup> ; 50 m (L) × 0,25 mm (di), 0,20 µm (ef)
	Rampe de température	40 °C durant 5 min / Montée de 40 °C à 170 °C, à 6 °C·min <sup>-1</sup> Montée jusqu'à 200 °C à 3 °C·min <sup>-1</sup> / Montée à 225 °C, à 12 °C·min <sup>-1</sup> Maintien à 200 °C pendant 20 min / Maintien à 225 °C pendant 4 min
GC-FID	Débit du gaz vecteur	Hydrogène U à 2 mL·min <sup>-1</sup> 58 kPa
		Détection
		Ionisation de Flamme (FID) Température = 250 °C Pression air = 150 kPa ; Débit = 180 mL·min <sup>-1</sup> Pression hydrogène = 100 kPa ; Débit = 30 mL·min <sup>-1</sup> Gaz auxiliaire = Azote R (Air Liquide, Paris, France) Pression hydrogène = 400 kPa ; Débit = 30 mL·min <sup>-1</sup>

Le premier chromatogramme (Figure 26a) correspond à l'injection des molécules standards dont les caractéristiques sont condensées dans le Tableau 17. Le second chromatogramme correspond à l'injection séparée du 2-phényléthanol (Figure 26b).

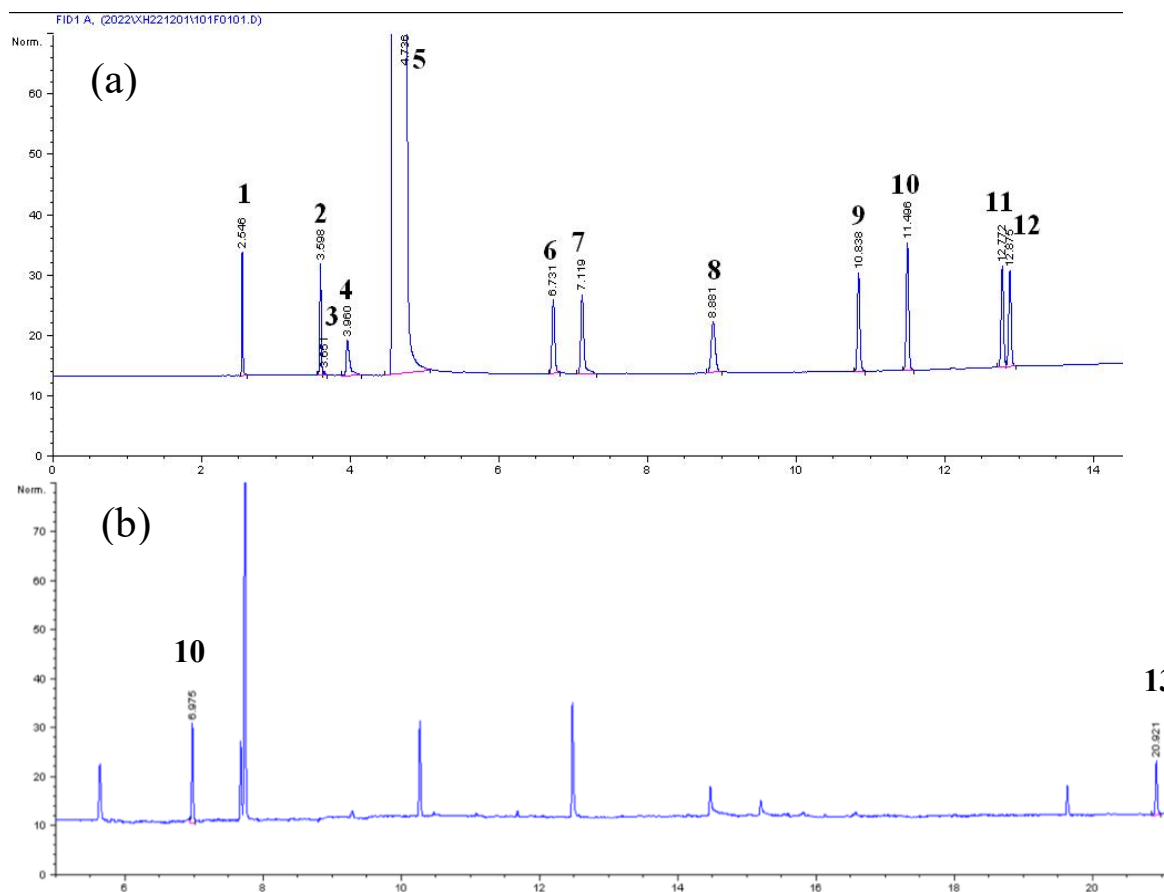


Figure 26 : Chromatogramme (a) des alcools supérieurs, de l'éthanal, de l'acétate d'éthyle et du méthanol. Les numéros inscrits sur le chromatogramme correspondent aux différentes molécules (celles marquées d'une astérisque (\*) sont utilisées comme étalon interne) : 1 = éthanal ( $t_R = 2,546$  min) ; 2 = acétate d'éthyle ( $t_R = 3,598$  min) ; 3 = 1,1-diéthoxyéthane ( $t_R = 3,633$  min) ; 4 = méthanol ( $t_R = 3,960$  min) ; 6 = butan-2-ol ( $t_R = 6,731$  min) ; 7 = 2-méthylpropan-1-ol ( $t_R = 7,119$  min) ; 8 = propan-1-ol ( $t_R = 8,881$  min) ; 9 = butan-1-ol ( $t_R = 10,838$  min) ; 10 = \*4-méthylpentan-2-ol ( $t_R = 11,496$  min) ; 11 = 2-méthylbutan-1-ol ( $t_R = 12,772$  min) ; 12 = 3-méthylbutan-1-ol ( $t_R = 12,875$  min). Le composé n°5 ( $t_R = 4,738$  min) correspond à l'éthanol qui sert ici de repère mais n'est pas dosé par cette méthode. Chromatogramme (b) du 2-phényléthanol (13 ;  $t_R = 20,921$  min)

### III. Analyses par HPLC-QqQ/MS des précurseurs de l'eugénol présents dans la pellicule de raisin

#### III.1. Le géoside et la citrusine C

Chaque analyse décrite ci-après a été réalisée en triplicata. Ces analyses ont été conduites selon le protocole établi au cours de cette thèse (page 287). Pour effectuer ces analyses plusieurs composés de référence et solvants ont été nécessaires. Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 19 :

Tableau 19 : Composés et solvants utilisés pour la quantification des précurseurs de l'eugénol

	Composés	CAS	Pureté	Fournisseur
Solvants	Acétate d'ammonium	631-61-8	98 %	Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France)
	Acide formique	64-18-6	>99 %	Fluka Chemie AG (Buchs, Suisse)
	Dichlorométhane	75-09-2	99,8 %	VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France)
	Formiate d'ammonium	540-69-2	98,1 %	
	Acétonitrile (qualité LC-MS)	75-05-8	99,9 %	Merck Chimie S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, France)
	Éthanol (qualité LC-MS)	64-17-5	99,9 %	
Composés	Géoside	585-90-0	90 %	Glentham Life Sciences Ltd (Corsham, Royaume-Uni.)
	Citrusine C	18604-50-7	>95 %	MuseChem (Fairfield, New Jersey, Etats-Unis)

#### III.2. Préparation des échantillons

La quantification des précurseurs de l'eugénol se faisant sur les pellicules de raisins, les échantillons sont préparés pour obtenir de la poudre de pellicule. Une masse de 250 mg de cette dernière a été placée dans un tube Eppendorf® de 2 mL. Trois extraction solide-liquide (SLE) utilisant successivement 800, 400 et 400 µL d'un mélange acétone/eau : 1/1 sous agitation à 250 rpm sur table agitante IKA HS 501 (VWR International S.A. S, Fontenaysous-Bois, France) durant 1 h a été effectuée sur la poudre de pellicule. Chaque extraction a été suivie d'une centrifugation de 1 à min à 3 000 g , réalisée grâce à une centrifugeuse Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 8 Small Benchtop Centrifuge, équipée d'un rotor angulaire MicroClick© pour microtubes (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). L'ensemble des surnageants ainsi

récupérés, a été rassemblé et centrifugé de nouveau dans un tube Eppendorf® de 2 mL durant 10 min à 3 000 g. L'extrait ainsi obtenu (~1,6 mL) a été dilué de l'eau milli-Q jusqu'à obtenir 5 mL puis a ensuite été vortexé.

### III.3. Quantification des précurseurs de l'eugénol

Pour chaque échantillon, obtenu tel que décrit au paragraphe Chapitre 3 :III.2, 10 µL ont été injectés sur une colonne Kinetex Polar C18 (150 mm (L) × 2,1 mm (di) ; 2.6 µm de taille de particules) de Phenomenex (Le Pecq, France). La phase mobile A était constituée de 0,05 % (m/v) de formiate d'ammonium et de 0,01 % (v/v) d'acide formique dans de l'eau ultrapure, tandis que la phase mobile B était constituée de 0,05 % (m/v) de formiate d'ammonium, de 5 % (v/v) d'eau ultrapure et de 0,01 % (v/v) d'acide formique dans l'acétonitrile. Le débit utilisé était de 0,3 mL·min<sup>-1</sup> et le gradient de phases mobiles est résumé dans le Tableau 48. Avant l'injection de l'échantillon suivant, un temps d'équilibrage de la colonne de 6 min a été maintenu. Tout ceci pour une durée totale d'exécution de 39 min.

Tableau 20 : Gradient optimisé et retenu pour la séparation des différents standards

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	90	10
1	90	10
17	85	15
18	85	15
23	0	100
28	0	100
33	90	10

La détection a été réalisée en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). La tension électrique du fragmenteur a été optimisée pour chaque ion parent. L'énergie de collision a été optimisée pour chaque transition ion parent - ion fils. La tension électrique d'accélération dans la cellule de collision a été fixée à 5 V. Le temps d'analyse de chaque transition (dwell time) a été fixé à 20 ms. Les caractéristiques des transitions recherchées sont condensées dans le Tableau 49.

Les temps de rétention sont 15,6 min pour le géoside et 16,1 min pour la citrusine C.

Tableau 21 : Paramètres des transitions ion parent vers ions fils

<b>Ion parent (m/z)</b>	<b>Ion fils (m/z)</b>	<b>Tension du fragmenteur (V)</b>	<b>Energie de collision (eV)</b>	<b>Polarité</b>
344	165	82	4	Positif
349	349	130	0	Positif
349	185	130	16	Positif
476	295	120	5	Positif
476	165	120	18	Positif
476	163	120	10	Positif
476	133	120	10	Positif
481	481	200	0	Positif
503	457	120	4	Négatif
503	293	120	6	Négatif



## **Chapitre 4 : Analyses œnologiques**

### **I. Analyses de contrôle de la maturité des raisins**

#### **I.1. Concentration en sucres par réfractométrie**

Pour analyser la concentration en sucres (basé sur la méthode OIV-MA-AS2-02), 100 baies ont été manuellement pressées pour obtenir le jus. Quelques gouttes ont été déposées sur la lentille d'un réfractomètre digital MA871 (Milwaukee Instruments, Rocky Mount, Caroline du Nord, États-Unis d'Amérique) calibré sur la loi de Snell-Descartes. Le résultat est exprimé en degrés Brix (°B) puis convertit en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2014). Grâce à la mesure du volume de jus récolté, il est possible d'exprimer la concentration en sucres par baie. Cette conversion permet de s'affranchir du volume des baies et ainsi éliminer la variabilité due aux précipitations et à l'irrigation (Deloire, 2011).

#### **I.2. Acidité Totale et pH**

L'acidité totale est conventionnellement utilisée pour suivre la maturation des raisins et correspond à l'acidité titrable des raisins. Le dosage de l'acidité (méthode OIV-MA-AS313-01) totale est basé sur la neutralisation des fonctions acides de la matrice étudiée grâce à une solution alcaline, en présence d'un indicateur coloré, le bleu de bromothymol. La couleur de ce dernier, jaune à pH acide, devient bleu-canard à pH neutre (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2014). L'acidité totale est généralement exprimée en  $\text{g d}'\text{H}_2\text{SO}_4\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### **I.3. Indice de maturité technologique**

La maturité technologie, via son indice, est définie comme le rapport de la concentration en sucres (exprimée en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sur l'acidité totale (exprimée en  $\text{g d}'\text{H}_2\text{SO}_4\cdot\text{L}^{-1}$ ).

#### **I.4. Quantification des tanins condensés de la pellicule de raisins**

##### **I.4.1. Préparation de poudre de pellicules**

Les tanins contenus dans la pellicule de raisins, étant des composés photo et thermosensibles, des baies de raisins congelées ont été pellicées, dans un bol refroidi par du diazote liquide, jusqu'à obtenir 1,5 g de pellicules fraîches.

Les pellicules ont été conservées à -20 °C avant d'être broyées grâce à un cryobroyeur Freezer Mill 6875D (SPEX SamplePrep, Metuchen, New Jersey, États-Unis d'Amérique). La poudre ainsi obtenue a été conservée à -20C avant extraction.

#### **I.4.2. Extraction et quantification des tanins condensés de la pellicule**

Le principe de la quantification est basé sur une réaction de Bate-Smith : dans une matrice acide, les tanins (chaînes flavanol ou les procyanidines) sont partiellement transformés en cyanidines par chauffage qui sont alors quantitativement mesurées grâce à un spectrophotomètre (Ribéreau-Gayon & Stonestreet, 1965). Ce présent protocole a été adapté et consolidé (Gagné, 2007; Pañitrur-De la Fuente *et al.*, 2020).

## **II. Analyses œnologiques par Infra Rouge à Transformées de Fourier (IRTF)**

Lors des différentes expérimentations œnologiques, des analyses classiques ont été réalisées sur l'ensemble des vins et des eaux-de-vie produits. Ces analyses ont été effectuées par le Laboratoire Œnologique de Gascogne (Gondrin, France). Les paramètres étudiées étaient : les TAV (% vol.alc) des vins, eaux-de-vie et brouillis, la concentrations en sucres réducteurs (g/L), l'acidité volatile (g d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·L<sup>-1</sup>), l'acidité totale (g d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·L<sup>-1</sup>), le pH, la concentration en acide tartrique (g·L<sup>-1</sup>) et la concentration en acide malique (g·L<sup>-1</sup>).

## **Chapitre 5 : Analyses statistiques et traitement des données récoltées**

Ce chapitre s'est grandement inspiré des travaux importants de compilation et de référencements effectué par Sara Windholtz et d'Édouard Pelonnier-Magimel (Pelonnier-Magimel, 2021; Windholtz, 2020).

### **I. Traitement des données**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Rstudio version 2023.03.0+386 (Posit Software, PBC, Boston, Etats-Unis d'Amérique). La mise en forme des données sous forme de graphiques a été réalisée grâce au package « ggplot2 » (Wickham, 2009). Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés, deux packages R ont été utilisés : « car » (Fox & Weisberg, 2018) et « agricolae » (De Mendiburu Delgado, 2009). À chaque fois que des résultats seront présentés dans cette thèse, les tests statistiques seront précisés.

### **II. Tests de la normalité des données et de leur homoscédasticité**

La normalité dans la distribution des résidus de données est une condition préalable à l'application de tests dits paramétriques. Elle permet d'assimiler la distribution des résidus de données aux paramètres caractérisant la loi normale. Le test de Shapiro-Wilk permet d'observer ou non la normalité des résidus (Shapiro & Wilk, 1965). L'hypothèse par défaut de ce test, est de considérer normale la distribution des résidus de données au risque  $\alpha$  de 0,05. Si la *p-value* du test est supérieure à ce risque alors, la normalité de distribution des résidus est confirmée. Dans le cas contraire, l'hypothèse alternative de non-normalité sera confirmée.

L'homoscédasticité ou homogénéité des variances est l'autre condition préalable à l'utilisation de tests paramétriques. Le test de Levene permet d'observer ou non cette homogénéité (Brown & Forsythe, 1974). L'hypothèse par défaut de ce test est de considérer comme homogènes les variances de plusieurs distributions au risque  $\alpha$  de 0,05. Si la *p-value* du test est supérieure à ce risque alors, l'homoscédasticité est confirmée. Dans le cas contraire, l'hypothèse alternative d'hétérogénéité des variances sera confirmée.

### **III. Tests statistiques univariés réalisés pour les variables quantitatives**

#### **III.1. Test de Student (paramétrique) et test de Wilcoxon (non-paramétrique)**

Le test de Student permet la comparaison de moyennes de deux groupes d'individus que les échantillons soient appariés ou non. L'hypothèse par défaut de ce test est que les moyennes sont égales. Si la valeur du  $t$  de Student est supérieure à la valeur critique alors la différence entre les moyennes est significative selon le degré de significativité ( $p$ -value) à 0,05.

Le test de Wilcoxon permet également la comparaison des moyennes de deux groupes d'individus que les échantillons soient appariés ou non. L'hypothèse par défaut de ce test est que les moyennes sont égales.

#### **III.2. ANOVA univariée et test *post hoc* de Newman-Keuls**

L'ANOVA univariée est une comparaison de moyennes de plusieurs groupes d'individus et ce, pour une variable donnée. L'hypothèse par défaut est de considérer comme étant égales les moyennes des différents groupes au risque  $\alpha$  de 0,05. Si la  $p$ -value de l'ANOVA est inférieure à  $\alpha$ , cela signifie qu'au moins une des moyennes est significativement différente des autres.

Dans les cas où l'ANOVA a présenté une  $p$ -value inférieure au risque  $\alpha$ , un test *post hoc* de Newman-Keuls a été effectué. Le test de Newman-Keuls est une comparaison par paire de l'ensemble des moyennes, avec pour hypothèse par défaut qu'elles sont égales. La matrice de  $p$ -value alors créée a permis de déterminer les groupes de significativité.

#### **III.3. Test de Kruskal-Wallis et *post hoc* de Wilcoxon-Mann-Whitney ; test de Friedman et *post hoc* de Nemenyi**

Le test de Kruskal-Wallis le pendant non-paramétrique de l'ANOVA univariée. Comme elle, le test de Kruskal-Wallis prend comme hypothèse par défaut, une égalité des moyennes comparées au risque  $\alpha$  de 0,05. L'hypothèse alternative (cas d'une  $p$ -value  $< 0,05$ ) étant l'existence d'au moins une moyenne significativement différente.

Dans le cas d'un Kruskal-Wallis avec une *p-value* inférieure à 0,05, un test de Wilcoxon-Mann-Whitney a été effectué afin de déterminer les moyennes significativement différentes entre elles. Les test de Kruskal-Wallis et de Wilcoxon-Mann-Whitney imposent des échantillons indépendants.

Dans le cas d'échantillons appariés, un test de Friedman suivi d'un test *post hoc* de Nemenyi ont été effectués.

#### **IV. Tests statistiques bivariés réalisés pour les variables quantitatives**

De la même manière que pour les tests univariés, les tests bivariés répondent aux mêmes exigences de normalité et d'homoscédasticité (test de Shapiro-Wilk et test de Levene multivarié). Pour ce qui est donc des tests paramétriques, une ANOVA multivariée a été effectuée. Elle repose sur les mêmes principes que l'ANOVA univariée, à ceci près qu'elle permet la comparaison de moyennes des groupes d'individus pour plusieurs variables. L'ANOVA multivariée significative (*p-value* < 0,05) a été suivie d'un test *post hoc* de Newman-Keuls.

Pour ce qui est des données ne remplissant pas les conditions de normalité et d'homoscédasticité, un test de Friedman suivi d'un test *post hoc* de comparaison par paire ont été effectués.

#### **V. Test statistique univarié du $\chi^2$ pour variables qualitatives**

Le test du  $\chi^2$  est un test univarié d'appariement permettant la proximité entre des produits. Il permet de comparer et d'estimer une différence qualitative entre des échantillons selon la loi du  $\chi^2$ .

#### **VI. Tests statistiques et graphiques multivariés**

##### **VI.1. Le Multi Dimensional Scaling (MDS)**

Le MDS est la représentation graphique d'une matrice de proximité (de similarités ou de dissimilarités). Pour les données de cette thèse, le traitement par MDS a permis de générer un espace à 2 dimensions dans lequel sont positionnés les échantillons les uns par rapport aux autres selon les résultat de la matrice de proximité (Cox & Cox, 2000).

## **VI.2. L'Analyse en Composante Principale (ACP)**

L'ACP est une approche statistique et graphique d'un jeu de données où les échantillons sont décrits par plusieurs variables quantitatives. Le principe de l'ACP réside dans la génération de composantes principales, inférieures au nombre de variables d'origine, combinant par linéarité plusieurs de ces variables originelles. L'ACP vise également à représenter un maximum de la variance des données sur les composantes principales. L'ACP est donc la représentation d'un maximum de variance en un minimum de dimensions, généralement réduites à 2 pour une certaine lisibilité.

Issu des calculs nécessaires à l'établissement d'une ACP, le  $\cos^2$  définit la qualité de représentation d'une variable sur un des axes de l'ACP. Le  $\cos^2$  correspondant au carré du coefficient de corrélation d'une variable avec un des axes de l'ACP, il permet d'identifier les variables contribuant le plus à la construction d'un axe de l'ACP.

## **VI.3. La classification ascendante hiérarchique (CAH)**

La CAH repose sur l'établissement d'une matrice de dissimilarité concernant les individus étudiés. Les dissimilarités établies permettent d'effectuer des regroupements d'individus, diminuant ainsi leur critère d'agrégation et créant alors des classes contenant les individus. Les regroupements successifs entraînent la formation d'un arbre binaire. Cette représentation permet une hiérarchisation des classes.

---

# PARTIE 1 : L'eugénoïl, marqueur de la résistance ontogénique du Baco blanc

---

*Ce sont les cadets de Gascogne [...]*

*De gloire, leur âme est ivrogne !*

Cyrano de Bergerac, Acte II – Scène VII, Edmond Rostand





# Chapitre 1 : L'effet intrinsèque de l'eugénol face à *B. cinerea*

## I. Mise au point méthodologique

### I.1. Effet de l'éthanol sur la croissance de *B. cinerea*

De par sa nature hydrophobe, l'eugénol est difficilement dissout dans l'eau. Il est, par contre, plus facile de le dissoudre dans l'éthanol. Cependant, ce dernier est connu pour son pouvoir antifongique (Daifas *et al.*, 2000), en particulier lorsqu'il est mis en contact direct avec les communautés microbiennes (Lichter *et al.*, 2002). Afin d'évaluer correctement l'effet antifongique de l'eugénol dissout dans une solution hydroalcoolique, il a fallu tester l'effet de plusieurs concentrations en éthanol (v/v) sur la croissance de *B. cinerea* (0 %, 30 % et 100 %). La concentration de 30 % (v/v) d'éthanol a été choisie car elle correspond à une dissolution totale de l'eugénol dans une solution hydroalcoolique à un tel degré. La concentration de 100 % (v/v) a été choisie en posant l'hypothèse qu'elle permettrait une inhibition totale du champignon. Pour ces tests, les différentes concentrations d'éthanol ont été appliquées par contact direct et par effet de vapeur sur 3 isolats de *B. cinerea* : isolats P et V ainsi que la souche i.

La Figure 27 est donnée en guise d'illustration des effets de l'éthanol sur la croissance mycélienne de *B. cinerea*. Si l'isolat P (Figure 27a et Figure 27d) est peu sensible à une concentration de 30 % d'éthanol, que ce soit par effet direct ou par effet de vapeur. De plus, comparativement à l'eau, un léger retard est observé durant les premiers jours de croissance pour cette même concentration en éthanol. Dans les deux cas, 100 % d'éthanol a permis une inhibition complète du champignon. La souche i est, quant à elle, plus sensible à la concentration de 30 % d'éthanol. En effet, par contact direct (Figure 27b), 6 jours après inoculation, la modalité témoin avait déjà colonisé la totalité de la boîte tandis que la souche subissant 30 % d'éthanol colonisait à peine à 50 % de la surface de la boîte. Toutefois, la vitesse de croissance de cette même souche laisse supposer qu'il ne s'agit que d'un retard et non d'une inhibition de croissance. Il en allait de même pour l'effet de vapeur (Figure 27e). Cependant, l'effet vapeur de 100 % éthanol n'a pas inhibé le champignon. En effet, si la croissance atteint à peine 20 % de la surface de la boîte colonisée après 10 jours, la souche i arrive à se développer. Enfin, à l'instar de la souche i, l'isolat V a présenté, dans les deux cas (Figure 27c et Figure 27f), un retard de croissance quand elle était soumise à 30 % d'éthanol, si comparaison est faite avec le témoin eau. Toutefois, ce retard était moins conséquent car 7 jours après inoculation, le

témoin eau avait quasiment colonisé toute la boîte, la modalité 30 % colonisait environ 70 % de la surface de la boîte en contact direct (Figure 27c) et 80 % de la surface de la boîte par effet de vapeur (Figure 27f). Il est important de noter que dans les deux cas, la modalité 100 % éthanol, loin de provoquer une inhibition, a toute de même permis le développement de l'isolat V. En particulier dans des conditions de vapeur où l'éthanol 100% a stimulé la croissance du champignon. Ce phénomène de favorisation de la croissance mycélienne en présence d'éthanol concentrée en phase vapeur a déjà été observé. Il semblerait que *B. cinerea* utilise l'éthanol comme source nutritive carbonée (Lagopodi *et al.*, 2009).

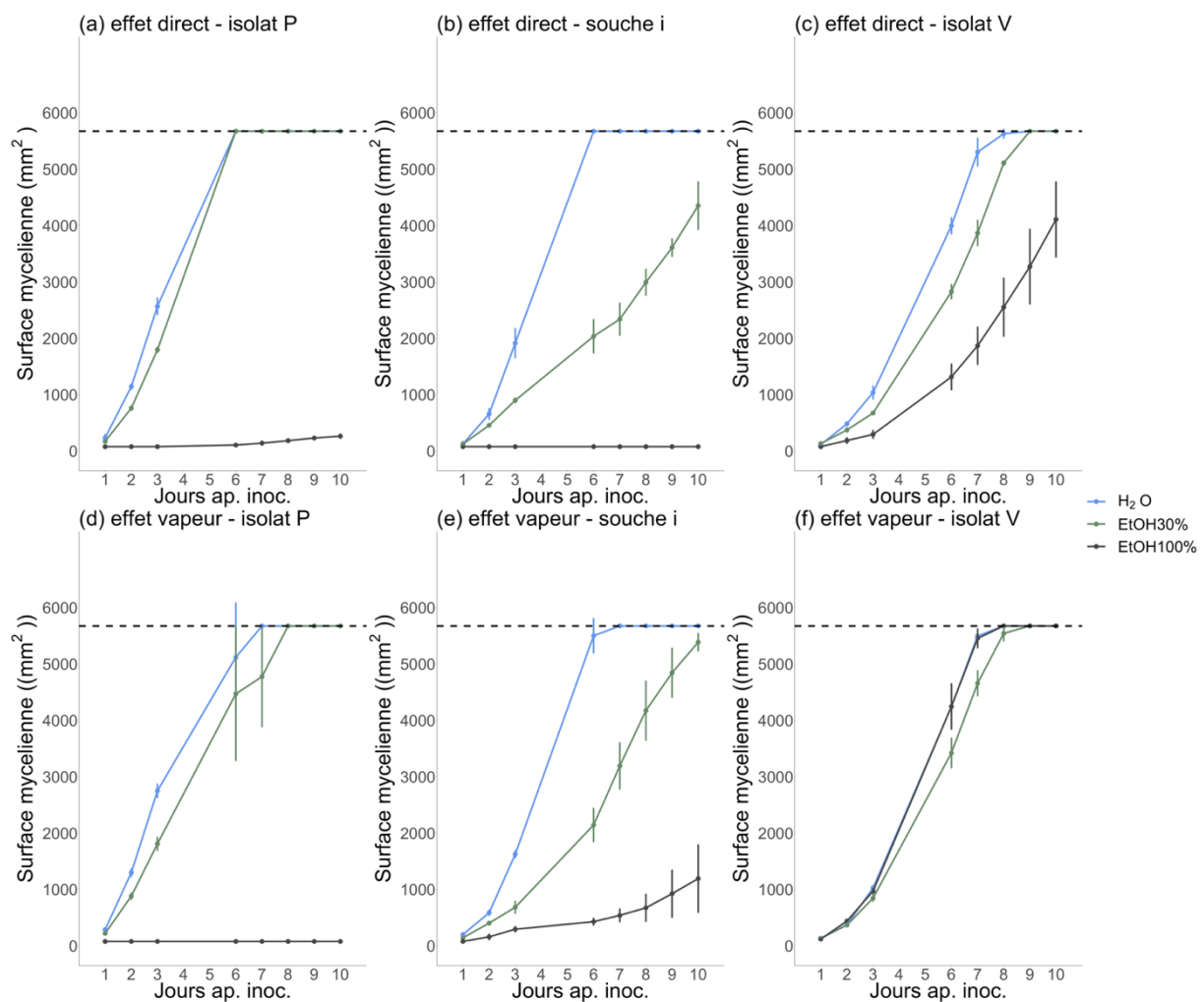


Figure 27 : Effet de l'éthanol sur la croissance mycélienne de différents isolats de *B. cinerea*. Figure (a), effet direct de l'éthanol sur l'isolat P. Figure (b), effet direct de l'éthanol sur la souche i. Figure (c), effet direct de l'éthanol sur l'isolat V. Figure (d), effet vapeur de l'éthanol sur l'isolat P. Figure (e), effet vapeur de l'éthanol sur la souche i. Figure (f), effet vapeur de l'éthanol sur l'isolat V. la modalité H<sub>2</sub>O correspond au témoin, c'est-à-dire à une concentration nulle en éthanol. Le nombre de jours ap. inoc. représente le nombre de jours après inoculation des isolats de *B. cinerea*. La ligne horizontale en pointillés noirs présente sur chaque graphique représente la croissance maximale possible (liée aux dimensions de la boîte de Petri)

Ces résultats ont permis une observation qualitative de l'effet de l'éthanol. Afin d'observer un effet quantifiable de l'éthanol sur la croissance de mycélienne de *B. cinerea*, le choix a été fait de calculer une vitesse moyenne de croissance à 7 jours après inoculation (Tableau 22). Temps d'incubation minimale nécessaire pour que les témoins eau aient colonisé la totalité de la boîte de Petri.

Tableau 22 : Vitesses moyennes de croissance des différents isolats de *B. cinerea* en fonction du mode d'application (direct ou vapeur) et de la concentration en éthanol, 7 jours après inoculation. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Les lettres minuscules indiquées en exposant après chaque résultat sont issues de test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées (ici les tests ont été réalisés par isolat mycélien et par mode d'application)

	Modalité	Vitesse ( $\text{mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ )		
		Isolat P	Souche i	Isolat V
Effet direct	H <sub>2</sub> O	810,6 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	810,6 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	757,7 $\pm$ 34,7 <sup>a</sup>
	EtOH 30 %	810,6 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	334,2 $\pm$ 40,2 <sup>b</sup>	552,5 $\pm$ 31,5 <sup>b</sup>
	EtOH 100 %	20,1 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	11,2 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	267,0 $\pm$ 46,3 <sup>c</sup>
Effet vapeur	H <sub>2</sub> O	810,6 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	810,6 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	785,3 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>
	EtOH 30 %	682,2 $\pm$ 126,6 <sup>a</sup>	456,0 $\pm$ 58,2 <sup>b</sup>	665,5 $\pm$ 31,3 <sup>b</sup>
	EtOH 100 %	11,2 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	77,2 $\pm$ 15,7 <sup>c</sup>	779,2 $\pm$ 23,5 <sup>a</sup>

L'analyse des vitesses de croissance (Tableau 22) indique, concernant l'effet direct, que l'isolat P est celle qui a été la moins influencée par une concentration de 30 % d'éthanol (v/v). Sa vitesse de croissance ( $810,6 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ) n'était pas significativement différente de son témoin eau ( $810,6 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ). La modalité 100 % éthanol a présenté une très faible vitesse de croissance ( $20,1 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ), significativement différente des deux autres. Pour ce qui est des autres isolats, souche i et isolat V, les 3 modalités ont présenté des vitesses de croissance significativement différentes entre elles. L'isolat V a présenté, en tendance, une vitesse de croissance plus importante ( $552,5 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ) pour la modalité 30 % éthanol que la souche i ( $334,2 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ). Bien que la vitesse de croissance de la modalité 100 % éthanol pour l'isolat V ( $267,0 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ) soit significativement plus faible que la modalité témoin ( $757,7 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ) et que la modalité 30 % éthanol ( $552,5 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ), il n'y pas d'inhibition de la croissance avec 100 % d'éthanol. Concernant l'effet vapeur de l'éthanol, les mêmes tendances que pour l'effet direct ont été observées. Plus encore, pour l'isolat V, la vitesse de croissance de la modalité 100 % éthanol ( $779,2 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ) n'était significativement pas différente de la modalité témoin ( $785,3 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ). Cette concentration de 100 % éthanol a significativement favorisé la croissance du champignon, à l'inverse de la modalité 30 % qui a retardé la croissance ( $665,5 \text{ mm}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ).

Au vu de ces résultats, l'utilisation de solutions hydroalcooliques à 30 d'éthanol (v/v) peuvent permettre de mesurer le pouvoir d'inhibition d'un composé tel que l'eugéno. Toutefois étant donné le comportement propre à chaque isolat face à l'éthanol 30 %, le calcul du pouvoir inhibiteur devra se faire par rapport à un témoin qui serait une solution hydroalcoolique à 30 %.

## **I.2. Effets de différents facteurs sur la croissance de *B. cinerea* et le pouvoir antifongique de l'eugéno**

Afin d'optimiser les tests *in vitro* permettant de mesurer la capacité antifongique de l'eugéno, un plan d'expériences a été mené pour évaluer l'effet de plusieurs facteurs :

- Isolats de *B. cinerea* (tolérance différenciées des différents isolats face à l'eugéno) : **ISOL** ;
- Modes d'application de l'eugéno (lequel permet une inhibition mycélienne optimisée): **MOD** ;
- Milieu de culture (celui qui permet la meilleure nutrition de *B. cinerea* et diminue ainsi le pouvoir antifongique de l'eugéno) : **MIL** ;
- Doses d'eugéno (afin d'observer le rôle des autres facteurs sur le pouvoir antifongique de l'eugéno) : **EUG**.

À chacun de ces facteurs ont été attribués plusieurs niveaux. Dans le cas du facteur EUG, deux doses ( $d_1 = 150$  ppm et  $d_2 = 300$  ppm) ont été choisies en fonction de la littérature scientifique. En effet  $d_1$  correspond à la  $CI_{50}$  de l'eugéno, établie dans des conditions similaires (Olea *et al.*, 2019), la dose  $d_2$  a été établie en doublant simplement la dose  $d_1$ . La troisième dose,  $d_0$ , correspond à une dose témoin contenant seulement une solution hydroalcoolique à 30 % d'éthanol (v/v). Pour le facteur MIL, deux milieux de culture couramment utilisés, le milieu malt-agar (MA) et un milieu gélosé à partir de dextrose de pomme de terre (PDA). Le facteur MOD correspond donc à plusieurs manières de mettre en contact les isolats de *B. cinerea* avec l'eugéno. Au cours de tests préliminaires (non montrés dans cette thèse), deux méthodologies basées sur l'étalement de l'eugéno ont été mises au point (page 72), soit directement sur la gélose pour un contact direct avec le champignon, soit dans le couvercle de la boîte de Petri pour une diffusion passive de l'eugéno en phase gazeuse et évaluer ainsi un effet vapeur de l'eugéno. Ces deux méthodologies ont été comparées, dans ce plan d'expériences, à une méthode plus souvent utilisée pour ce genre de test et qui est l'intégration du produit directement dans le milieu gélosé. Enfin, à l'instar des test sur l'effet de l'éthanol, différents isolats de *B. cinerea* ont été testés lors de ce plan d'expériences : l'isolat P, la souche i et l'isolat

V. Au vu de l'ensemble de ces caractéristiques, le plan d'expériences mis en œuvre était donc un plan à niveaux mixtes dont la variable réponse a été l'inhibition de croissance mycélienne, 7 jours après inoculation des implants (Tableau 23). Il a représenté 54 expériences différentes, chacune réalisée en triplicata et selon la méthodologie *in vitro* décrite au paragraphe, 162 boîtes de Petri ont donc été préparées.

Tableau 23 : Résumé des différentes modalités mises en œuvre dans le cas du plan d'expériences à niveau mixte

N° d'expé	EUG	ISOL	MOD	MIL	N° d'expé	EUG	ISOL	MOD	MIL
1	d0	P	étalement	MA	28	d1	i	étalement	MA
2	d0	P	fumigation	MA	29	d1	i	fumigation	MA
3	d0	P	intégration	MA	30	d1	i	intégration	MA
4	d0	P	étalement	PDA	31	d2	i	étalement	PDA
5	d0	P	fumigation	PDA	32	d2	i	fumigation	PDA
6	d0	P	intégration	PDA	33	d2	i	intégration	PDA
7	d1	P	étalement	MA	34	d2	i	étalement	MA
8	d1	P	fumigation	MA	35	d2	i	fumigation	MA
9	d1	P	intégration	MA	36	d2	i	intégration	MA
10	d1	P	étalement	PDA	37	d0	V	étalement	PDA
11	d1	P	fumigation	PDA	38	d0	V	fumigation	PDA
12	d1	P	intégration	PDA	39	d0	V	intégration	PDA
13	d2	P	étalement	MA	40	d0	V	étalement	MA
14	d2	P	fumigation	MA	41	d0	V	fumigation	MA
15	d2	P	intégration	MA	42	d0	V	intégration	MA
16	d2	P	étalement	PDA	43	d1	V	étalement	PDA
17	d2	P	fumigation	PDA	44	d1	V	fumigation	PDA
18	d2	P	intégration	PDA	45	d1	V	intégration	PDA
19	d0	i	étalement	MA	46	d1	V	étalement	MA
20	d0	i	fumigation	MA	47	d1	V	fumigation	MA
21	d0	i	intégration	MA	48	d1	V	intégration	MA
22	d0	i	étalement	PDA	49	d2	V	étalement	PDA
23	d0	i	fumigation	PDA	50	d2	V	fumigation	PDA
24	d0	i	intégration	PDA	51	d2	V	intégration	PDA
25	d1	i	étalement	MA	52	d2	V	étalement	MA
26	d1	i	fumigation	MA	53	d2	V	fumigation	MA
27	d1	i	intégration	MA	54	d2	V	intégration	MA

Les résultats de ce plan d'expériences ont été traités grâce à une ANOVA, sur l'ensemble des données, afin de déterminer les facteurs principaux influençant principalement l'inhibition de croissance mycélienne. Le Tableau 24 résume l'ensemble des contributions des facteurs sur cette dernière mais également les facteurs pour lesquels des différences significatives ont été détectées. Tandis que la Figure 28 permet une lecture graphique de ces mêmes résultats.

Tableau 24 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expérience mis en œuvre. Pour chaque facteurs étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou eaux-de-vie) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque  $\alpha$  de 1 % sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs, les interactions entre eux sont indiquées par deux points

**Inhibition de croissance mycélienne (%)**  
n = 162

	Contrib. (%)	p-value
EUG	41,4	<b>8,0E-33</b>
ISOL	4,9	<b>7,2E-07</b>
MOD	14,9	<b>1,6E-16</b>
MIL	1,0	1,3E-02
EUG:ISOL	2,8	<b>1,7E-03</b>
EUG:MOD	10,9	<b>1,1E-11</b>
EUG:MIL	0,5	2,0E-01
ISOL:MOD	1,4	6,1E-02
ISOL:MIL	0,2	4,7E-01
MOD:MIL	0,9	6,5E-02
Residuals	21,1	nd

De l'analyse des contributions des facteurs à l'inhibition de croissance mycélienne (Tableau 24 et la Figure 28), il ressort que la concentration en eugénol est le facteur qui a le plus influencé cette inhibition (41,1 % de la variabilité expliquée). Cette influence forte de la dose d'eugénol sera traitée ultérieurement, dans un paragraphe dédié aux calculs de concentrations inhibitrices (page 124).

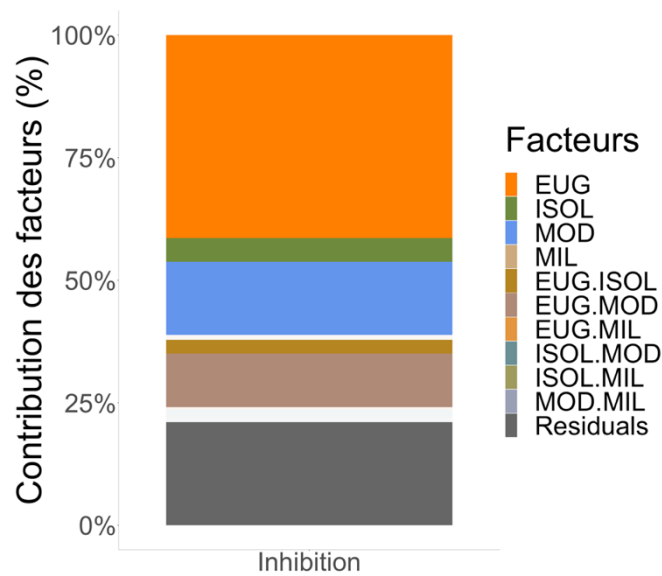


Figure 28 : Contribution des facteurs à l'inhibition de croissance pour le plan d'expériences mis en œuvre. Pour faciliter la lecture, seuls les facteurs dont la p-value est inférieure au risque  $\alpha$  de 0,01 apparaissent en couleur franche. Les autres facteurs apparaissent avec des couleurs atténuées. Ici n = 162

### I.2.1. Les modes d'application de l'eugénol

Du Tableau 24 et la Figure 28, le deuxième facteur influençant le plus l'inhibition de croissance est le mode d'application de l'eugénol (MOD) avec 14,9 % de la variabilité expliquée. Il a fallu observer en détail comme chaque niveau de ce facteur a influencé l'inhibition de croissance. Pour cela des tests *post hoc* de Newman-Keuls ont donc été effectués pour évaluer les différents modes d'application de l'eugénol permettant d'optimiser l'inhibition mycélienne (Figure 29).

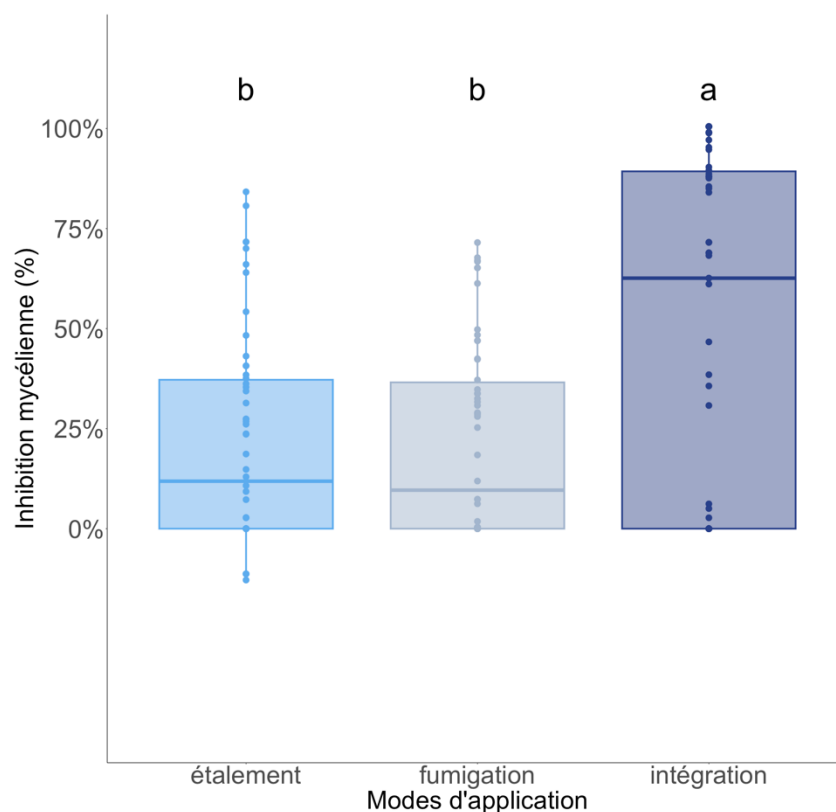


Figure 29 : Boîtes à moustaches représentant les inhibitions de croissance en fonction des différents modes d'application (MOD) de l'eugénol (étalement, fumigation et intégration). Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Par modalité  $n = 54$

Les différents modes d'application de l'eugénol présentent des différences significatives entre eux. En effet, l'étalement de l'eugénol sur la gélose et sur le couvercle de la boîte (fumigation) présentent des inhibitions de croissance moyennes respectives de 21,0 et 21,7 %, significativement différentes de l'inhibition de croissance obtenue par intégration, soit 49,5 %. Intégrer l'eugénol directement à la gélose permet donc une meilleure inhibition de *B. cinerea*. Cependant, l'avantage d'étaler l'eugénol sur la gélose et sur le couvercle de la boîte (fumigation) permet d'observer le comportement double de l'eugénol : par contact direct et par effet de vapeur. De plus, l'étalement permet également d'imiter les défenses pelliculaires d'une baie de raisin. Autrement dit le champignon doit faire face à un composé antifongique avant de pouvoir accéder à une source de nutrition. Enfin les modes d'application par étalement permettent d'envisager des hypothèses de détoxification de l'eugénol par *B. cinerea*. Hypothèses qui n'ont pas été testées dans ces travaux.



L'interaction entre les deux facteurs principaux, EUG:MOD (Figure 30), a également présenté une contribution plutôt importante (10,9 %) quant à l'inhibition de croissance (Tableau 24 et Figure 28).

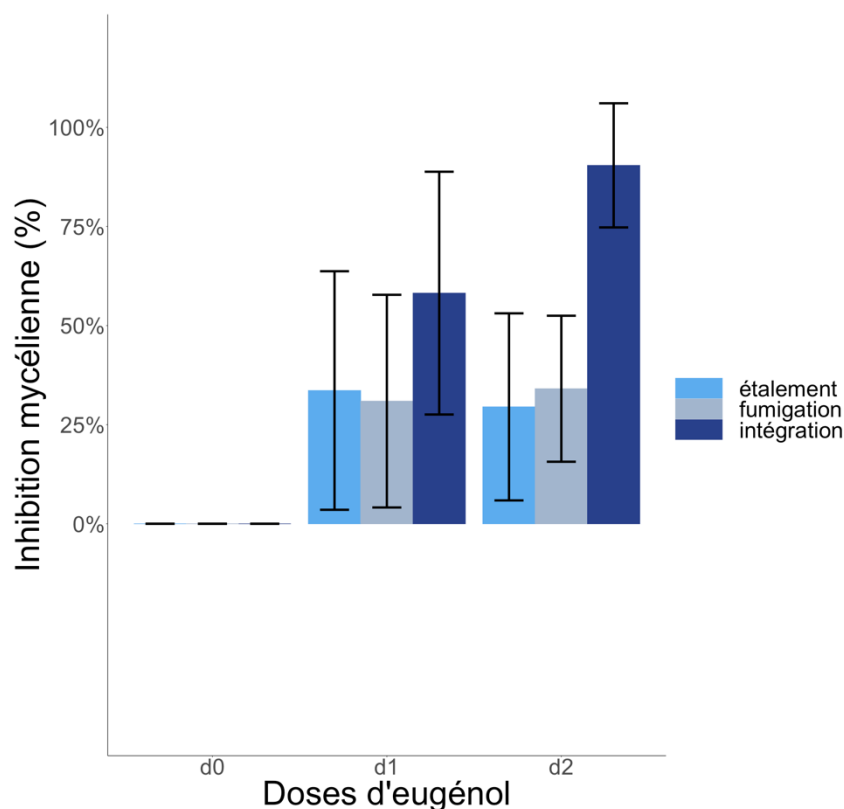


Figure 30 : Interactions entre les facteurs EUG et MOD pour l'inhibition de croissance. Par modalité et par dose, n= 18

L'analyse de cette interaction a montré que la meilleure inhibition observée en intégration était d'autant plus forte que la concentration en eugéno

Tout d'abord, l'observation d'une gamme plus large de doses d'eugéno

### I.2.2. Les isolats de *B. cinerea*

Le choix de l'isolat de *B. cinerea* utilisé (ISOL) pour évaluer la capacité antifongique de l'eugénol a été un des facteurs important dans ce plan d'expériences. En effet, le facteur ISOL a représenté 4,9 % de la contribution à la variabilité de l'inhibition de croissance (Tableau 24 et Figure 28). De la même manière que pour le facteur MOD, des tests *post hoc* ont été réalisés afin de savoir quel isolat de *B. cinerea* est le plus sensible à l'eugénol (Figure 31).

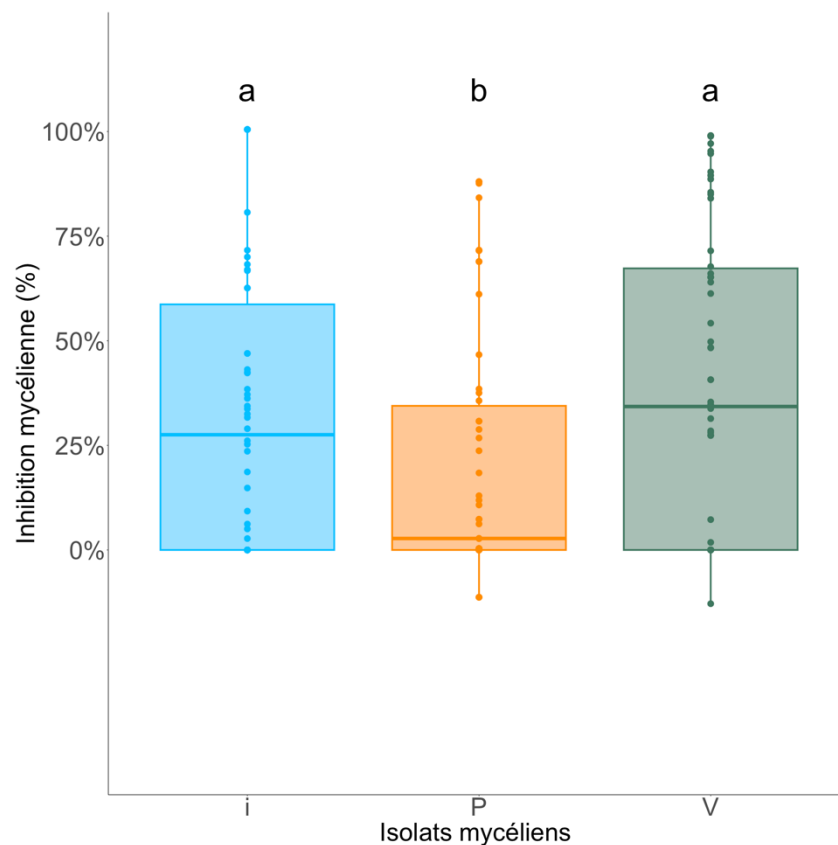


Figure 31 : Boîtes à moustaches représentant les inhibitions de croissance propres à chaque isolat de *B. cinerea*. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées.  
Par modalité n = 54

Il apparaît clairement sur la Figure 31 que la souche i et l'isolat V présente des inhibitions de croissance statistiquement équivalentes de, respectivement, 32,9 % et 38,8 % en moyenne. L'isolat P est statistiquement moins inhibé (20,5 %) que les deux autres. Cette variabilité entre isolats sera particulièrement intéressante à observer lors de calcul de concentrations inhibitrices

de l'eugénol. Ces dernières devront donc être modulées en fonction de l'isolat concerné. D'autre part, cette variabilité peut s'expliquer par la nature même des isolats. En effet P et V sont des isolats populationnels issus de vignobles tandis que i est une souche monosporee issue d'une collection de laboratoire. Ces différences d'origine peuvent expliquer leur différence d'agressivité fongique, de croissance mycélienne et donc de réponse à une molécule antifongique telle que l'eugénol.

L'analyse de l'interaction entre le facteur EUG et le facteur ISOL a également été effectuée . Cette interaction, si elle ne contribue qu'à hauteur de 2,8 % à la variabilité de l'inhibition de croissance (Tableau 24 et Figure 28) a tout de même permis d'observer le comportement des isolats en fonction des doses d'eugénol appliquées.

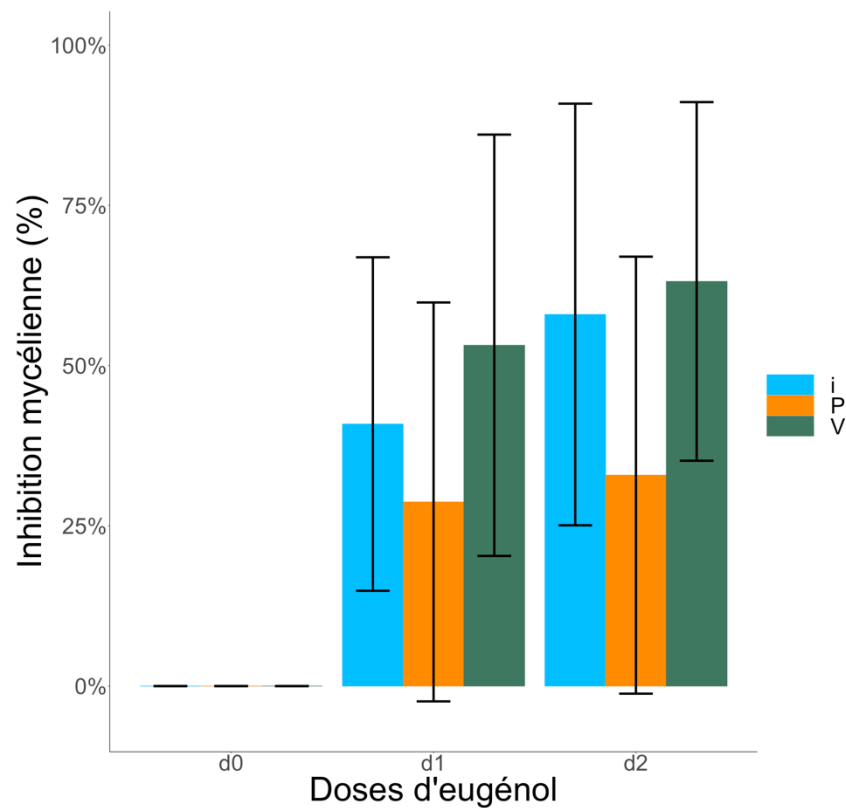


Figure 32 : Interactions entre les facteurs EUG et ISOL pour l'inhibition de croissance. Par modalité et par dose, n = 18

L'interaction entre les facteurs EUG et ISOL a montré que les 3 isolats étaient bien plus inhibés avec des doses d'eugénol croissant. Cependant leur augmentation de sensibilité à l'eugénol

avec l'augmentation des doses n'a pas suivi la même évolution. En effet la souche i et l'isolat V ont été plus fortement inhibés lorsque la dose d'eugénol a augmenté : entre d1 et d2, la souche i a vu son inhibition évoluer de 40,9 % à 58,0 %, et pour l'isolat V, l'inhibition a évolué de 53,2 % à 63,1 %. Tandis qu'entre les mêmes doses, l'isolat P a vu son inhibition évoluer de 28,7 % à 32,9 %. Ces différences, entre les isolats, d'évolution tendent à conforter l'idée de prendre en compte cette variabilité inter-isolats dans le calcul des concentrations inhibitrices.

## II. Détermination des $CI_{50}$ de l'eugénol *in vitro*

Au vue des différents paramètres étudiés avec le plan d'expériences à niveaux mixtes (Chapitre 1 :I.2), la détermination des  $CI_{50}$  de l'eugénol a été réalisée *in vitro* selon plusieurs critères :

- Le milieu de culture choisi a été un milieu MA. En effet le plan d'expériences à niveaux mixtes n'a pas permis de dégager de différences significatives entre les deux milieux étudiés (MA et PDA). De plus la contribution de ce facteur était très faible (1 %) quant à l'inhibition de croissance (Tableau 24). Le choix s'est donc porté sur le milieu MA, couramment utilisé au laboratoire.
- Les modes d'applications sélectionnés ont été l'étalement et la fumigation afin d'observer les deux modes d'actions de l'eugénol sur *B. cinerea*.
- Les isolats sélectionnés pour la détermination ont été la souche j et l'isolat P. La souche j est une dérivée de la souche i, qui a présenté l'avantage d'être une souche monosporee connue dans la littérature scientifique (Martinez *et al.*, 2003; Vignault *et al.*, 2020). L'isolat P est un isolat populationnel issu du vignoble armagnacais et isolé à partir de matériel végétal de Baco blanc. Il a donc paru intéressant de le tester face à l'eugénol, auquel il a déjà dû faire face aux champs. L'isolat V n'a pas été conservé pour son affinité particulière avec l'éthanol (page 113).
- Une gamme de doses d'eugénol plus large a été choisie afin de pouvoir déterminer la  $CI_{50}$  en fonction de l'isolat et du mode d'application. Pour cela une gamme de type logarithmique (de 1 à 10 000 ppm) a été mise en œuvre.

L'ensemble des tests réalisés en triplicata pour déterminer les  $CI_{50}$  de l'eugénol ont suivi le protocole décrit au paragraphe (page 72).

### II.1. Effet direct de l'eugénol

Le test *in vitro* concernant l'étalement de l'eugénol à la surface du milieu gélosé a confirmé l'efficacité de l'eugénol contre les deux isolats de *B. cinerea* (Figure 33).

En comparant par paire les CI des deux isolats étudiés ici, elles n'ont pas présenté de différences significatives. En effet pour la souche j, les concentrations inhibant 10, 50 et 100 % du mycélium étaient respectivement de 0,5 log<sub>10</sub> ppm (soit 3,0 mg·kg<sup>-1</sup>), 2,4 (263,0 mg·kg<sup>-1</sup>) et 4,9 (77 624,7 mg·kg<sup>-1</sup>). Pour l'isolat P ces mêmes concentrations étaient de 0,5 (3 mg·kg<sup>-1</sup>), 2,4 (239,9 mg·kg<sup>-1</sup>) et 4,8 (61 659,5 mg·kg<sup>-1</sup>). Cependant une augmentation de la concentration en eugénol a montré une inhibition significativement plus importante. Autrement dit, il existe une différence significative entre les CI (10, 50 et 100 %) et ce pour les deux isolats. De plus aucune interaction, entre le facteur isolat et le facteur CI, n'a été détectée. C'est pourquoi une seule régression linéaire, permettant de calculer n'importe quelle CI entre 10 et 100 % d'inhibition a pu être calculée en prenant la valeur moyenne de chaque CI pour les deux isolats. Les paramètres de cette régression étaient une équation  $y = 0,048x$  et un coefficient de corrélation de  $R^2 = 0,99$ .

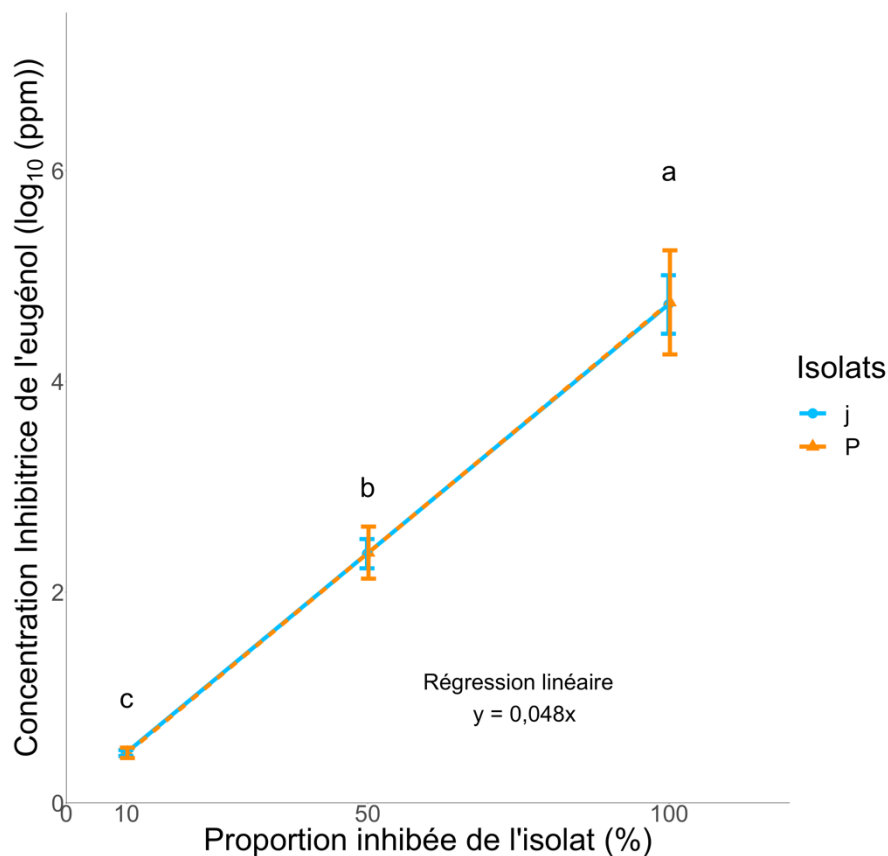


Figure 33 : Concentrations en eugénol (exprimées en log<sub>10</sub> ppm) correspondant à 10, 50 et 100 % d'inhibition mycélienne des deux isolats de *B. cinerea* lors de l'étalement. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des points, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées

## II.2. L'effet vapeur de l'eugénol

De la même manière que pour l'effet direct, le test *in vitro* concernant la fumigation de l'eugénol a confirmé l'efficacité de l'eugénol contre les deux isolats de *B. cinerea* mais cette fois-ci avec des niveaux différents Figure 34.

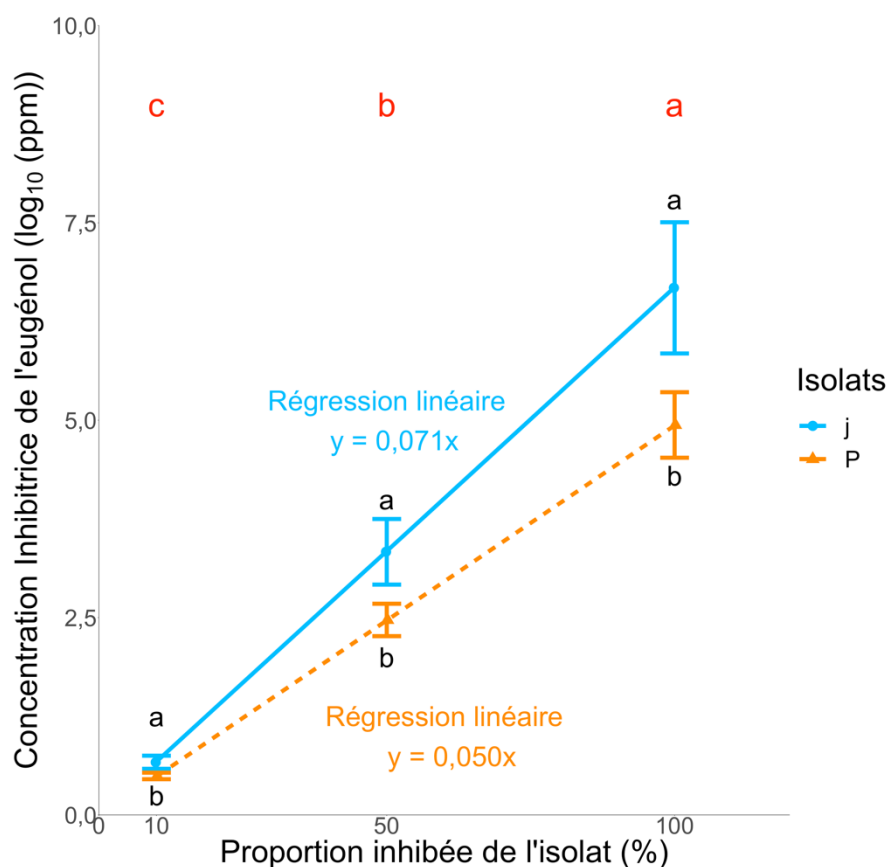


Figure 34 : Concentrations en eugénol (exprimées en log<sub>10</sub> ppm) correspondant à 10, 50 et 100 % d'inhibition mycélienne des deux isolats de *B. cinerea* lors de la fumigation. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des points, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5% et concernent la comparaison par CI des deux isolats. Les lettres minuscules rouges, situées sur le haut du graphique, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5% et concernent la comparaison des CI entre elles pour les deux isolats. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées

Pour l'isolat P, les CI 10, 50 et 100 % étaient respectivement de 0,5 (3,2 mg·kg<sup>-1</sup>), 2,5 (316,2 mg·kg<sup>-1</sup>) et 5,1 log<sub>10</sub> ppm (114 815,5 mg·kg<sup>-1</sup>). Elles ont permis d'en déduire une régression linéaire, résumée avec les paramètres suivants :  $y = 0,05x$  et  $R^2 = 0,99$ .

Pour la souche j, les mêmes CI étaient respectivement de 0,7 (4,7 mg·kg<sup>-1</sup>),

3,5 (2 884,0 mg·kg<sup>-1</sup>) et 7,1 (12 882 495,5 mg·kg<sup>-1</sup>) qui ont permis d'en déduire une régression linéaire, elle aussi résumée avec les paramètres suivant :  $y = 0,071x$  et  $R^2 = 0,99$ . Ces résultats ont mis en évidence une différence significative entre les CI, d'un même niveau, des deux isolats. La souche j présentant systématiquement une CI supérieure à celle de l'isolat P. De plus, à l'instar de l'effet direct, pour les deux isolats, les CI 10, 50 et 100 % ont présenté des différences significatives entre elles. Enfin, là encore, aucune interaction significative n'a pu être décelée entre les facteurs isolats et concentration en eugénol.

### III. Conclusions et discussion

Au cours de ces différents tests *in vitro*, il s'est avéré que l'eugénol liquide a montré une antibiose significative et marquée contre *B. cinerea*. Plus encore, le mode d'application par étalement sur la gélose et sur le couvercle de la boîte de Petri, a permis de comprendre que ce qui a été identifié comme un contact direct incluait également l'effet vapeur de l'eugénol. En effet, la solution déposée sur la gélose s'évapore partiellement dans l'espace gazeux de la boîte de Petri scellée.

Les CI<sub>50</sub> déterminées, pour l'effet direct, au cours des expérimentations menées ici n'ont pas présentées de différences significatives entre les isolats utilisées : 240 mg·kg<sup>-1</sup> pour l'isolat P et 263 mg·kg<sup>-1</sup> pour la souche j. Ces CI<sub>50</sub> étaient du même ordre de grandeur que celle de (Olea *et al.*, 2019) soit 149 mg·kg<sup>-1</sup>. La différence d'une centaine de mg·kg<sup>-1</sup> peut s'expliquer par les différences de conditions dans lesquelles ces concentrations inhibitrices ont été déterminées (isolats de *B. cinerea* et eugénol directement incorporé à la gélose). Cependant d'autres CI<sub>50</sub> pour l'eugénol ont pu être déterminées. D'autres auteurs ont calculés une CI<sub>50</sub> de 39 mg·kg<sup>-1</sup> sous des conditions très différentes de celles choisies ici : l'implant mycélien était préalablement séché, l'eugénol était incorporé à un milieu gélosée PDA et une température d'incubation de 25 °C (Wang *et al.*, 2010). De la même manière, une autre étude a déterminé une CI<sub>50</sub> de l'eugénol à 1 000 mg·kg<sup>-1</sup> qui correspond, selon l'équation de régression linéaire déterminée pour l'effet direct, à 4 000 mg·kg<sup>-1</sup> (Amiri *et al.*, 2008). Cette importante différence peut s'expliquer, là encore, pas des écarts important dans les conditions de détermination. En effet, les auteurs de la dernière étude citée, ont opté pour une durée d'incubation anormalement très longue (21 jours)

Pour ce qui est de l'effet vapeur de l'eugénol, testé avec une méthodologie adaptée, les valeurs de  $CI_{50}$  déterminées ont été différentes. Par exemple, avec la régression linéaire calculée pour l'isolat P, une inhibition de 77 % du champignon correspond à une dose d'eugénol de 7 080  $mg \cdot kg^{-1}$ . Or, pour atteindre ce même taux d'inhibition par action de vapeur, d'autres auteurs n'ont eu besoin que d'une dose de 50  $mg \cdot kg^{-1}$  (Amiri *et al.*, 2008). Cependant, ces derniers ont eu recours à l'utilisation d'une huile essentielle contenant de l'eugénol. La composition complexe d'une telle huile, peut expliquer la dose moindre employée pour atteindre la même inhibition avec un produit pur. Il est important de noter que les résultats présentés dans cette partie tendent à confirmer que l'effet vapeur est plus efficace, en terme de pouvoir antifongique, que l'action direct, fait déjà cité dans la littérature (Amiri *et al.*, 2020; Velázquez-Nuñez *et al.*, 2013). En effet, l'isolat P a montré des régressions linéaires similaires entre effet de vapeur et effet direct.

Au cours des différents tests menés ici, il est apparu que le facteur isolat était de prime importance dans la détermination de concentration inhibitrice. Si la différence n'est pas toujours évidente avec l'action directe de l'eugénol, l'effet vapeur semble permettre de distinguer quel isolat est plus sensible à l'eugénol. Cette sensibilité différenciée semble avoir été prise en compte dans le développement de produit de biocontrôle contenant plusieurs composés dont l'eugénol (Fedele *et al.*, 2020).

Enfin, l'eugénol semble capable d'enrayer le développement de *B. cinerea* à très faibles concentrations. En effet les  $CI_{10}$  de l'eugénol calculées dans ces travaux, quel que soit le mode d'action et l'isolat considérés, étaient comprises entre 2,9 et 4,7  $mg \cdot kg^{-1}$ . Ces concentrations inhibitrices de l'eugénol correspondent aux valeurs des teneurs en eugénol dans les pellicules de Baco blanc, qui seront décrites dans la suite de ce manuscrit.



## Chapitre 2 : L'eugénol dans le développement de la baie de Baco blanc

### I. L'eugénol, composé pelliculaire de la baie

#### I.1. Répartition de l'eugénol dans les tissus de la baie de raisin

Les résultats du Chapitre 1 : ont montré que l'eugénol avait un rôle antifongique intéressant face à *B. cinerea*. Si l'eugénol est particulièrement concentré dans les baies de Baco blanc, par rapport à *V. vinifera*, des tests préliminaires ont permis de déterminer quel compartiment de la baie présentait la plus importante concentration en eugénol. Ces premiers tests ont permis de définir la forme de l'eugénol prédominante dans la baie de Baco blanc. Concrètement ces tests ont consisté en l'analyse d'une dizaine d'échantillons de raisins de Baco blanc issus de la parcelle CLONES40 au cours du millésime 2020. Une centaine de baies de chaque échantillon (grappes de chaque clone de Baco blanc) a été pelée. L'eugénol libre et l'eugénol lié des pellicules et des pulpes de l'ensemble des échantillons ont été quantifiés permettant ainsi de connaître dans quel compartiment de la baie, l'eugénol se concentre le plus mais également, sous quelle forme il est retrouvé (Figure 35).

De manière générale (Figure 35a), la pellicule représente 91 % de la concentration en eugénol, ne laissant que 9 % à la pulpe. La forme liée de l'eugénol dans les pellicules représente 63 % de la concentration globale, alors qu'elle n'est que de 7 % dans la pulpe. La forme libre de l'eugénol dans les pellicules représente en moyenne 28 % de la concentration totale, pour 2 % dans la pulpe (Figure 35b). En détail, l'eugénol se concentre principalement de manière significative dans les pellicules des baies de Baco blanc, en particulier sous forme liée (Figure 35c). Pour les 11 échantillons de Baco blanc analysés, c'est bien la forme liée de l'eugénol qui se concentre le plus dans les pellicules. Il existe une certaine variabilité dans ces concentrations : de 1,12 à 2,23 mg·kg<sup>-1</sup>. Les pellicules, sont également une source importante d'eugénol libre (de 0,44 à 0,92 mg·kg<sup>-1</sup>) : sa concentration est significativement plus concentrée dans la pellicule que dans la pulpe et c'est également la deuxième source d'eugénol dans la baie. Le reste de l'eugénol se concentre significativement moins dans la pulpe, soit sous forme lié (de 0,1 à 0,28 mg·kg<sup>-1</sup>) soit sous forme libre (0,01 à 0,21 mg·kg<sup>-1</sup>) avec, parfois, des différences significatives entre les deux formes. En terme de répartition pour les 11 échantillons (Figure 35d), c'est la forme lié de l'eugénol dans les pellicules qui représente la proportion majeure (de 52,2 à 77,7 %).

Cependant la forme liée dans la pulpe ne représente que 3,5 à 11,7 % de la concentration totale en eugénol. La partie libre de l'eugénol dans les pellicules représente 15,3 à 40,4 % de la concentration totale, tandis que dans les pulpes, cette part ne représente plus que 0,3 à 8,3 %.

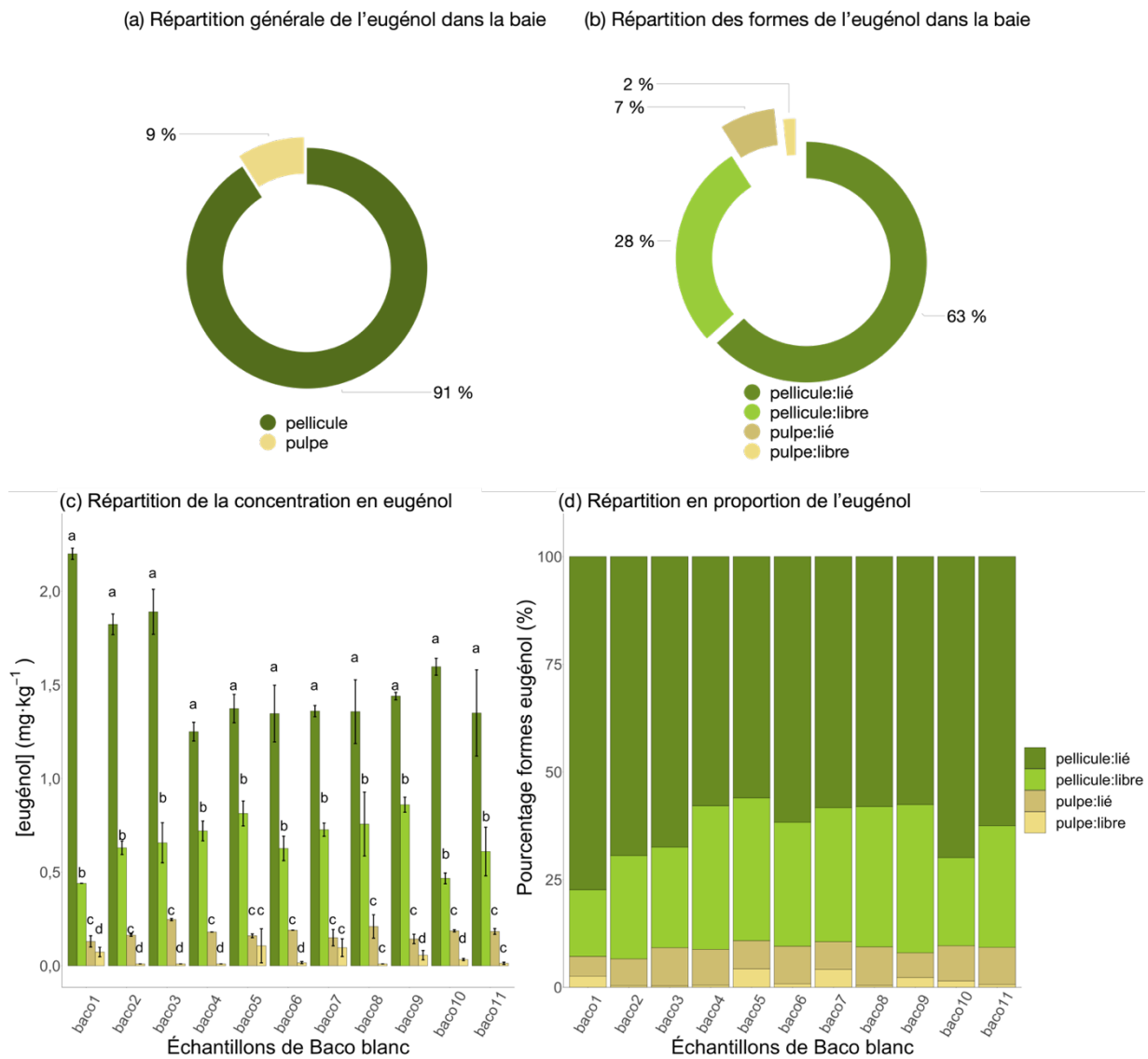


Figure 35 : Répartition générale des différentes formes de l'eugénol dans plusieurs compartiments d'une baie de Baco blanc. Figure (a), répartition générale de l'eugénol dans une baie de Baco blanc. Figure (b), répartition générale des formes de l'eugénol dans les compartiments de la baie de Baco blanc. Figure (c), répartition de la concentration de plusieurs formes de l'eugénol (libre et lié) dans les pellicules et les pulpes de Baco blanc. Figure (d), répartition en proportion des différentes formes de l'eugénol (libre et lié) dans les pellicules et les pulpes de Baco blanc. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Les tests statistiques ont été réalisés par échantillon de Baco blanc. Des lettres différentes induisent des différences statistiques

## I.2. Cinétique de l'eugénol dans la baie

Ces travaux se sont également intéressés à l'accumulation de l'eugénol dans les pellicules au cours du développement de la baie de Baco blanc. Pour établir une telle cinétique, un échantillonnage régulier et pratiqué selon la détermination de stade phénologique précis a été effectué sur la parcelle PREMS32 au cours du millésime 2021. Ce sont en fait, trois cinétiques qui ont pu être établies sur les vignes effeuillées du dispositif expérimental présenté au paragraphe (page 77). En effet, un suivi a été réalisé sur l'eugénol total, l'eugénol lié et l'eugénol libre (Figure 36).

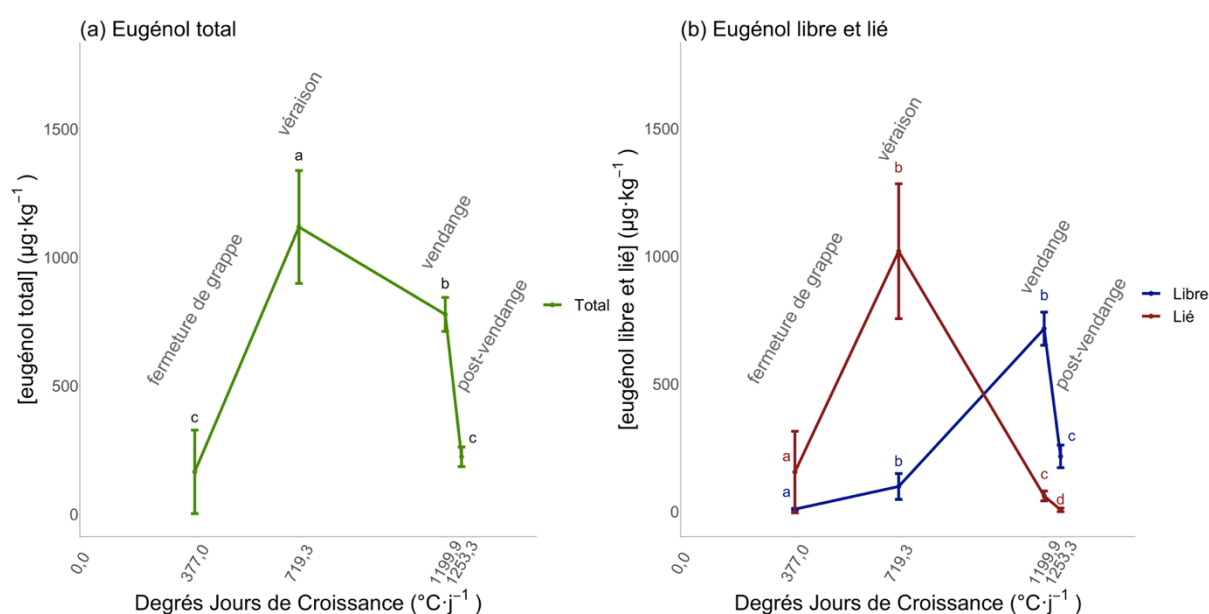


Figure 36 : Cinétique des concentrations en eugénol total, libre et lié, dans les pellicules, au cours du développement de la baie. Figure (a), cinétique de la concentration totale en eugénol au cours du développement de la baie de Baco blanc. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences statistiques. Figure (b), cinétiques des concentrations en eugénol libre et lié au cours du développement de la baie de Baco blanc. Les lettres minuscules rouges et noires, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5% et correspondent à la comparaison des stades phénologiques entre eux pour une forme de l'eugénol

L'évolution des concentrations en eugénol total (Figure 36a), dans les pellicules, a montré des différences significatives entre les différents stades, preuves d'une cinétique de l'eugénol au cours du développement de la baie.

En effet entre la fermeture de grappe (377 DJC) et la véraison (719,3 DJC), la concentration en eugénol a augmenté de 577,6 % passant de 165 à 1 118  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Après avoir atteint ce pic de concentration, cette dernière diminue de 30,4 % entre la véraison et la vendange (1 199,9 DJC), atteignant ainsi 778  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Cette diminution a continué jusqu'au stade de post-vendange (1 253,3 DJC) jusqu'à ce que la concentration en eugénol total atteigne 245  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , soit une diminution de 68,5 %.

Pour ce qui est de l'évolution des différentes formes de l'eugénol (Figure 36b), la cinétique de l'eugénol lié est proche de celle de l'eugénol total. En effet, de fermeture de grappe à véraison, la concentration en eugénol lié augmente de 558,1 % pour passer de 155 à 1 020  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . De véraison à vendange, une diminution de 93,9 % a été observée, la concentration en eugénol lié atteignant ainsi 62  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Cette dynamique (- 88,7 %) s'est poursuivie jusqu'à post-vendange pour atteindre 7  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . La cinétique de l'eugénol libre a été différente : de fermeture de grappe à véraison une augmentation (890 %) a pu être observé, l'eugénol libre passant de 10 à 99  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Augmentation qui s'est poursuivie jusqu'à vendange (632,2 %), la concentration en eugénol libre atteignant 716  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Ce n'est qu'à partir de la vendange que l'eugénol libre a diminué de 69,8 % pour atteindre à post-vendange 216  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

### **I.3. Le lien entre l'eugénol et la maturation des baies**

Au vu des différentes cinétiques établies au paragraphe Chapitre 2 :I.2, des investigations ont été menées quant au lien de l'eugénol avec la maturation du raisin. Pour cela, l'ensemble des données collectées en 2022 sur les parcelles étudiées (PREMS32, CONS32) concernant les analyses d'eugénol ainsi que les données de maturité (indice de maturité technologique) ont été mis en corrélation (Figure 37).

Une corrélation négative entre la concentration totale en eugénol dans les pellicules de Baco blanc et l'IMT des mêmes raisins a pu être établie en 2022. Ces deux relations permettent d'établir un lien fort entre la concentration en eugénol des pellicules et l'état de maturité des raisins. La corrélation étant négative, il est apparu que plus les baies étaient mûres, moins l'eugénol était concentré dans les pellicules.

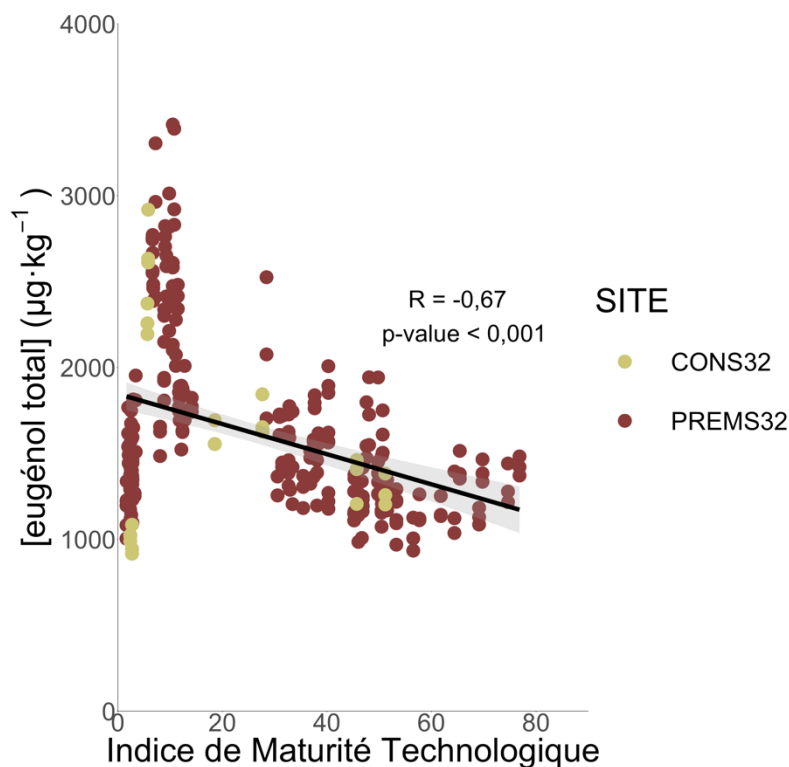


Figure 37 : Corrélation, entre l'Indice de Maturité Technologique et la concentration en eugénol total dans les pellicules de raisins de Baco blanc, sur le millésime 2022 et sur plusieurs sites (CONS32 et PREMS32), n = 288

## II. Le rôle de l'eugénol dans le Baco blanc

L'eugénol est non seulement un composé antifongique efficace contre *B. cinerea* mais il est également un marqueur biochimique du Baco blanc. Si l'eugénol se concentre particulièrement dans les pellicules des raisins et qu'il est très lié à la maturité des baies, quel est son rôle dans la tolérance du Baco blanc à *B. cinerea* ? De plus, l'existence de plusieurs clones non homologués de Baco blanc, induit-elle une variabilité de composition chimique des pellicules de ces clones et donc une différence de sensibilité à *B. cinerea* ?

## II.1. La tolérance du Baco blanc à *B. cinerea*

Le Baco blanc est cité dans la littérature scientifique comme étant peu sensible à la pourriture grise. Sa sensibilité à *B. cinerea* a tout de même été testé de nouveau dans les conditions expérimentales de ces travaux. Pour cela, des raisins de deux Baco blanc, issus de deux parcelles différentes ont été comparés lors d'un biotest (page 74) à des raisins d'Ugni blanc et de Folle blanche issus de la parcelle CONS32 (Figure 38). Les baies, prélevées à vendange le 26 Août 2020, ont été volontairement infectées par la souche i de *B. cinerea*. Les évolutions de deux symptômes du champignon ont été évalués après 5 jours d'incubation : les sévérités de brunissement et de sporulation.

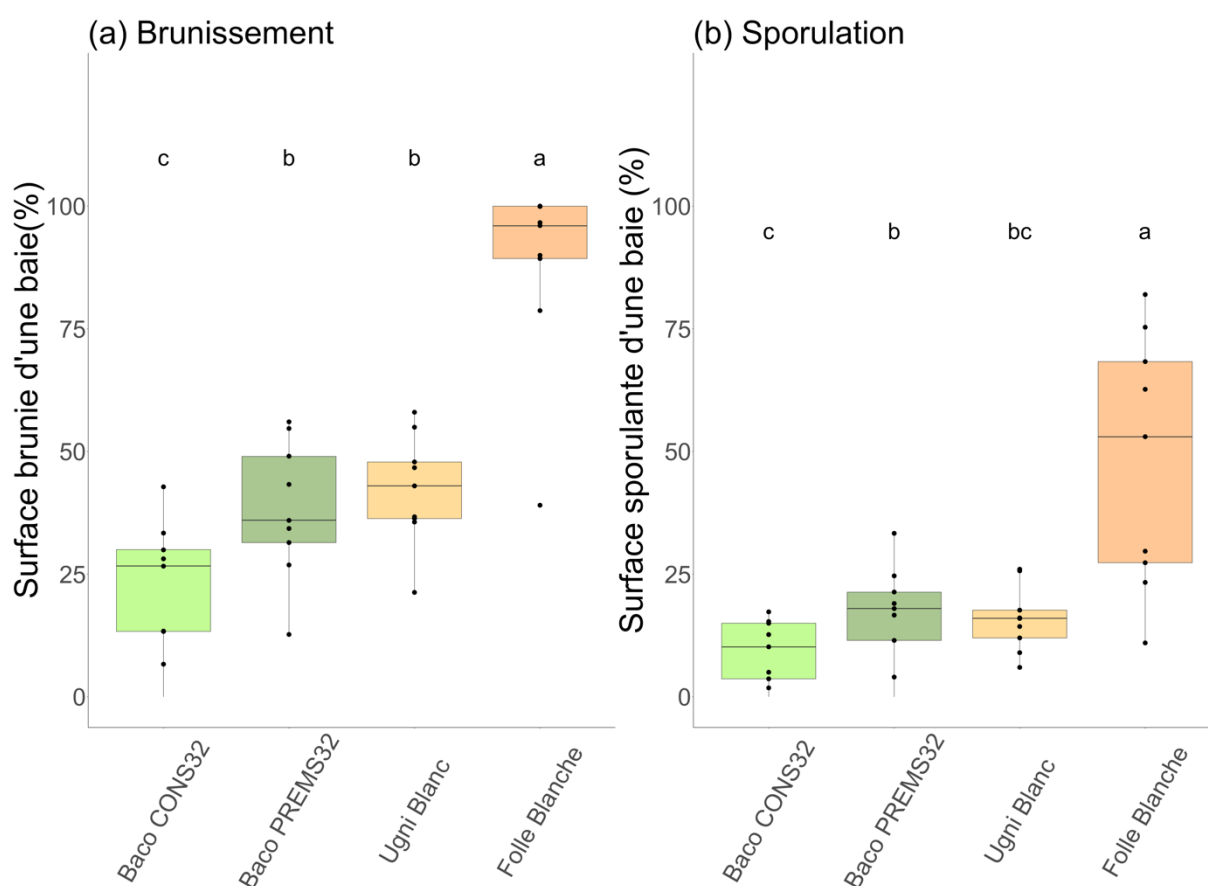


Figure 38 : Sévérités du brunissement et de la sporulation de *B. cinerea* sur 4 variétés, évalués lors d'un biotest. Figure (a) sévérité de brunissement concernant les 4 variétés étudiées. Figure (b), sévérité de sporulation concernant les 4 variétés étudiées. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus de chaque boîte à moustache sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences statistiques. Pour chaque symptôme et par variété,  $n= 15$

Ce premier biotest a confirmé la plus grande tolérance du Baco blanc, comparé à deux autres variétés très utilisées en Armagnac : l'Ugni Blanc et la Folle blanche. Considérant le symptôme de brunissement (Figure 38a), la Folle blanche est apparue comme le cépage le plus sensible à *B. cinerea* avec une sévérité moyenne de 87,7 % tandis que le Baco blanc de la parcelle CONS32 était significativement la variété la plus tolérante à ce même pathogène, avec une sévérité de 21,6 %. Le Baco blanc de la parcelle PREMS32 est apparue comme intermédiaire quant à sa sensibilité à *B. cinerea* avec une sévérité de brunissement de 38,3 %. S'il était significativement différent de l'autre Baco blanc, il s'est avéré ne pas l'être de l'Ugni blanc, qui présentait une sévérité de 42,3 %. Pour ce qui est de la sporulation (Figure 38b), la Folle blanche est, une fois de plus, apparue comme le cépage le plus sensible avec une sévérité de 48,1 % tandis que le Baco blanc de CONS32 était la variété la plus tolérante à *B. cinerea*. Encore une fois, le Baco blanc de PREMS32 était d'une sensibilité intermédiaire avec une sévérité de 16,5 %, non significativement différente du Baco blanc CONS32 ni de l'Ugni blanc qui présentait une sévérité de 15,9 %.

## **II.2. La variabilité intra-variétale du Baco blanc : concentration en eugénol et sensibilité à *B. cinerea***

Les résultats précédents semblent indiquer une certaine variabilité intra-variétale du Baco blanc dans la sensibilité à *B. cinerea*. Afin de tester cette hypothèse, un biotest a été mené à partir de raisins récoltés, le 8 Septembre 2021 (soit 1 084,7 DJC), sur la parcelle CLONES40, regroupant 6 clones de Baco blanc. Le plan d'expérience du biotest a suivi le carré latin organisant la parcelle de clones (6 rangs contenant à chacun les 6 différents clones). Au cours de ce biotest, l'incidence et la sévérité de brunissement ainsi que la sévérité de sporulation ont été évaluées pour les 2 isolats de *B. cinerea* utilisés lors de ce biotest. À la suite de ce dernier, seules les baies entièrement occupées par un ou deux des symptômes (brunissement et/ou sporulation) afin de quantifier le nombre de spores (Figure 39). En parallèle, sur d'autres raisins du même échantillonnage, l'eugénol lié et libre ont été quantifiés sur les pellicules de ces échantillons (Figure 40).

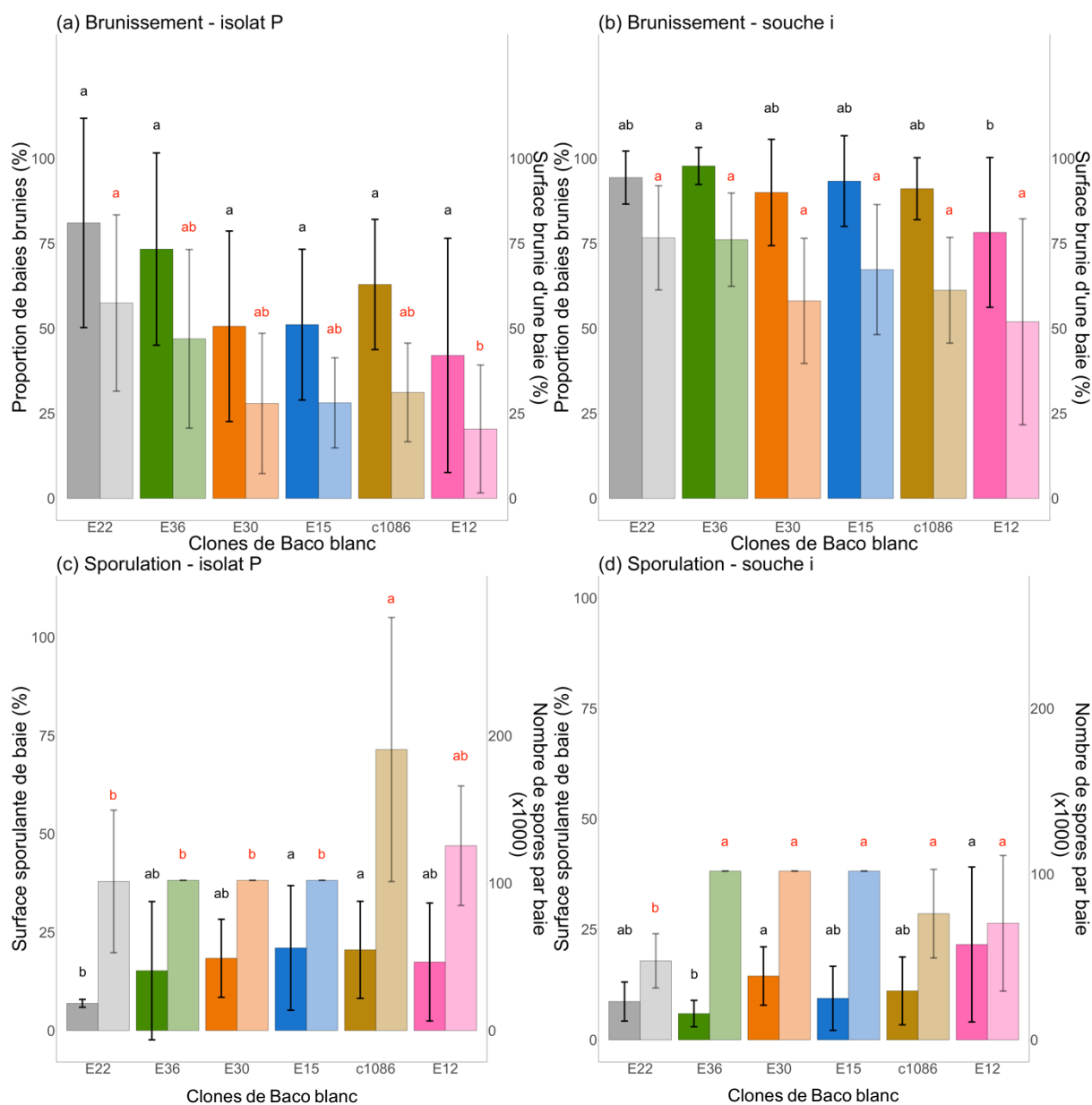


Figure 39 : Évaluation de différents symptômes de *B. cinerea* sur 6 clones de Baco blanc selon l'isolat utilisé durant le biotest. Les histogrammes en couleurs franches correspondent à l'échelle de gauche de chaque graphique tandis que les histogrammes en couleurs diluées correspondent à l'échelle de droite de chaque graphique. Figure (a), incidence et sévérité de brunissement causées par l'isolat P. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des histogrammes sont issues d'un test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%, les rouges correspondent à un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences significatives. Figure (b), incidence et sévérité de brunissement causées par la souche i. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des histogrammes sont issues d'un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%, les rouges correspondent à un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences significatives. Figure (c), sévérité de sporulation causée par l'isolat P. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des histogrammes sont issues d'un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%, les rouges correspondent à un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences significatives. Figure (d), sévérité de sporulation causée par la souche i. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des histogrammes sont issues d'un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%, les rouges correspondent à un test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences significatives. Pour chaque clone et pour chaque symptôme,  $n = 80$



Au cours de ce biotest, il est apparu qu'avec l'utilisation de l'isolat P, l'incidence de brunissement (Figure 39a) n'était pas significativement différente pour les 6 clones de Baco blanc. Les valeurs de cette incidence ont variés entre 81,0 % pour le clone E22 jusqu'à 42,1 % pour le clone E12. Concernant la sévérité du brunissement, des différences significatives entre clones ont pu être observées, différences qui ont suivi la même hiérarchie qu'observée pour l'incidence : le clone E22 est apparu comme le clone le plus sensible à l'isolat P (57,5 %) tandis que le clone E12 était le clone le plus tolérant (20,4 %). Les clones E36, c1086, E15 et E30 étaient intermédiaires avec des sévérités respectives de 46,9 %, 31,2 %, 28,1 % et 27,9 %.

Pour ce qui est de la souche i, l'incidence de brunissement (Figure 39b) était significativement différente entre les clones : le clone E36 était alors le clone le plus sensible à la souche i avec une incidence de 97,8 % tandis que le clone E12 était le moins sensible des clones en présentant une incidence de brunissement de 78,3 %. Les clones E22, E15, c1086 et E30 étaient des clones intermédiaires avec des incidences respectives de 94,4 %, 93,3 %, 91,1 % et 90 %. À l'inverse, la sévérité de brunissement n'a présenté aucune différence significative entre les clones. Elle variait de 76,6 % pour le clone E22 à 51,9 % pour le clone E12.

Les sévérités de sporulation obtenues en utilisant l'isolat P (Figure 39c) étaient significativement différentes entre les clones : les clones E15 et c1086 sont apparus comme les clones les plus sensibles (sévérités respectives de 21,0 et 20,5 %) tandis que le clone E22 était le clone le plus tolérant à l'isolat P et présentait donc une sévérité de sporulation de 6,9 %. Les clones E30, E12 et E36 étaient intermédiaires, leur sévérités respectives étaient de 21,7 %, 18,8 % et 14,6 %. Pour ce qui est de la quantification du nombre de spores, c'est le clone c1086 qui a présenté la sporulation la plus importante significativement avec 178 621 spores par baie. Les clones E15, E30, E36 et E22 étaient les moins sensibles avec des nombres de spores respectifs de 95 480, 95 480, 95 480 et 94 759 par baie. Seul le clone E12 était intermédiaire avec un nombre 117 472 spores par baie.

Enfin l'utilisation de la souche i a permis d'observer des différences significatives entre les clones pour la sévérité de sporulation. En effet les clones E12 et E30 étaient les plus sensibles (respectivement 21,6 et 14,4 % de sévérité), alors que le clone E36 est apparu comme le clone le plus tolérant à la sporulation de la souche i, en présentant une sévérité de sporulation de 5,9 %. Les clones c1086, E15 et E22 étaient, quant à eux, intermédiaires et présentaient des sporulations respectives de 11,1 %, 9,4 % et 8,7 %. Concernant la quantification du nombre de spores, c'est le clone E22 qui est apparu significativement comme le plus sporulant avec 44 713 spores par baie.

Tous les autres clones, E30, E15, E36, c1086 et E12 ne présentaient pas de différence significative entre eux. Ils comptabilisaient respectivement 95 480, 95 480, 95 480, 71 385 et 65 934 spores par baie.

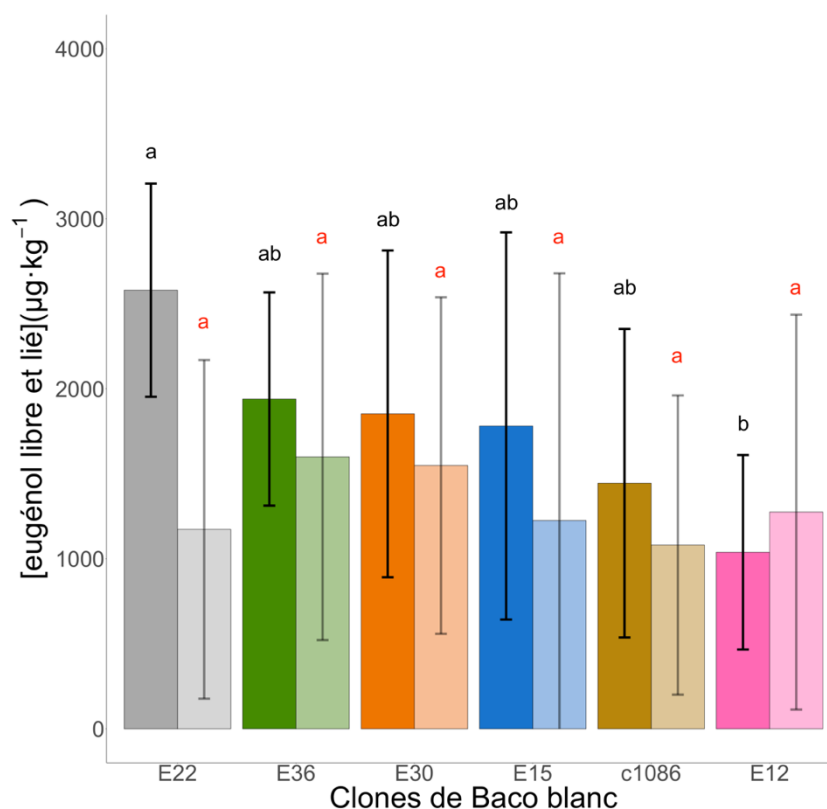


Figure 40 : Concentrations en eugénol libre et lié des 6 clones de Baco blanc dont le seul autorisé à ce jour (c1086). Les histogrammes en couleurs franches correspondent aux quantifications en eugénol libre tandis que les histogrammes en couleur diluées correspondent aux quantifications en eugénol lié. Les lettres minuscules noires et rouges, situées au-dessus des histogrammes sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences statistiques. Pour chaque clone et par analyse,  $n = 102$

L'eugénol libre et l'eugénol lié ont donc été quantifiés (Figure 40) sur le même échantillons de baie qui a servi au biotest (Figure 39). De manière générale, tous les clones ont présenté des teneurs en eugénol libre supérieures à celles en eugénol lié. Seul le clone E12 a semblé présenter un schéma inverse. Concernant spécifiquement l'eugénol libre, le clone E22 a présenté la teneur la plus importante significativement avec  $2\,580\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  tandis que le clone E12 présentait la concentration considérée comme significativement la plus faible avec  $1\,039\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Les autres clones ont présenté des teneurs intermédiaires en eugénol libre : E36 ( $1939\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),

E30 (1853  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), E15 (1782  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) et c1086 (1445  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Toutefois, concernant la concentration en eugénol lié, aucune différence significative entre les clones n'a pu être observée. Cependant, en tendance, le clone E36 est apparu comme le clone présentant la concentration pelliculaire d'eugénol lié la plus importante avec 1 600  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , suivi par le clone E30 avec 1 549  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , E12 à 1 275  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , E15 à 1 225  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , E22 à 1 1173  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  et enfin c1086 qui était le moins concentré en eugénol lié avec 1 081  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

### III. Conclusions et discussion

Concernant l'eugénol, ce dernier est donc bien un composé principalement pelliculaire et se concentre de manière préférentielle sous forme liée. Les résultats obtenus ici étayent les observations faites par d'autres auteurs (Franc *et al.*, 2023). Cette répartition de l'eugénol, couplée à sa capacité antifongique tendent bien à en faire un composé mobilisé dans la défense de la plante. De plus, la préférence de conservation de l'eugénol sous forme lié peut être le signe d'une stratégie de mobilisation de l'eugénol, en tant que molécule antifongique, sur le long terme (Gachon *et al.*, 2005; Vogt & Jones, 2000).

Les différentes cinétiques de cet eugénol, établies dans cette partie, ont permis d'identifier la véraison comme le stade où l'eugénol total (en grande majorité de l'eugénol lié) est le plus fortement concentré dans la pellicule de la baie de Baco blanc. Une telle évolution de l'eugénol totale n'est pas sans rappeler celles des tanins pelliculaires, dont la diminution à partir de la véraison a été démontrée (Deytieux-Belleau *et al.*, 2009). De plus, les évolutions contraires de l'eugénol libre et de l'eugénol lié laissent penser que l'eugénol lié est progressivement libéré d'un potentiel précurseur au cours de la maturation des baies. Une telle libération de l'eugénol sous forme libre pourrait correspondre à une mise à disposition progressive d'une molécule antifongique tandis que la baie devient progressivement plus sensible à différents pathogènes.

Pour ce qui est du Baco blanc, les biotests menés dans cette partie ont donc confirmé qu'il était bien une variété hautement tolérante à *B. cinerea*, tel que François Baco le remarquait déjà au XX<sup>e</sup> siècle (Baco, 1925, 1926), ainsi que des auteurs plus récents (Galet, 2015). De plus si le Baco blanc est plus tolérant à *B. cinerea*, en prenant en compte plusieurs symptômes de ce dernier, que des variétés de *V. vinifera*, il est également apparu qu'il existe une variabilité intra-variétale chez le Baco blanc. En effet les différents clones de Baco blanc étudiés n'ont pas réagi de la même manière face à l'infection volontaire par *B. cinerea*. La sensibilité au champignon pouvant être lié à des facteurs liés à l'architecture de la grappe (Alonso-Villaverde *et al.*, 2008;

Vail & Marois, 1991), les biotests ont permis de rendre compte de cet effet clone quant à la sensibilité à *B. cinerea*. Certains clones ont pu être identifiés comme très peu sensibles au brunissement comme le clone E12, ou à la sporulation comme le clone E22. Des clones plus tolérants encore, pour les symptômes concernés, que le seul autorisé à ce jour, le clone 1086. Cette variabilité dans la sensibilité peut être rapproché d'une autre variation, celle de la concentration en eugénol de ces mêmes clones. En effet, le clone E22, avec ses 2 580  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  d'eugénol libre est apparu comme le clone le plus sensible au brunissement mais le plus tolérant à la sporulation, tandis que le clone E12, le plus faiblement concentré en eugénol libre (1 039  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) présentait une sensibilité inverse (le moins bruni et le plus sporulant). Le clone 1086 apparaissait toujours comme un intermédiaire (brunissement, sporulation et concentration en eugénol). Pour résumer, il semblerait que plus la pellicule d'une baie est concentré en eugénol libre, moins elle présentera des symptômes de sporulation. Précisant ainsi l'action de l'eugénol sur *B. cinerea*.

Une relation claire a été établie entre le niveau de maturité des baies et la concentration en eugénol des pellicules de Baco blanc. Autrement dit, plus les baies sont mûres, moins elles sont concentrées en eugénol. De plus, les différences significatives observées quant à la concentration en eugénol libre dans les clones de Baco blanc permettent de proposer l'eugénol comme un marqueur biochimique du Baco blanc permettant d'expliquer une part de la variabilité de tolérance de ces mêmes clones à *B. cinerea*. Cependant, les concentrations d'eugénol libre retrouvées dans les clones, comparées aux  $\text{CI}_{50}$  calculées pour l'eugénol ne permettent pas d'inhiber suffisamment le champignon. Toutefois une résistance plus précoce, lorsque la baie est immature et plus concentrée en eugénol, semble plus plausible. Cette hypothèse étaye le statut de l'eugénol comme marqueur biochimique de la résistance ontogénique du Baco blanc.

Si l'eugénol peut être considéré comme tel, il serait particulièrement intéressant de pouvoir moduler sa concentration, très précocement dans le cycle de développement de la baie.

## Chapitre 3 : L'eugénol, une molécule inductible

Étant donné le rôle antifongique de l'eugénol, sa présence notoire mais néanmoins atypique dans le Baco blanc et son rôle quant à la sensibilité à *B. cinerea*, plusieurs pistes ont été envisagées afin de déclencher une induction de l'eugénol chez le Baco blanc. Les tests réalisés ont été de deux ordres, l'agression abiotique contrôlée et la gestion de la concentration des raisins en métabolites primaires et secondaires.

### I. Agression abiotique et induction de l'eugénol

#### I.1. Effet inductif de l'effeuillage

L'agression abiotique a consisté en un essai d'effeuillage contrôlé réalisé en 2021 (page 77). Les nombreux échantillonnages réalisés aux 4 stades phénologiques déterminés ont permis d'établir une cinétique des différentes formes de l'eugénol au cours du développement de la baie (Figure 41).

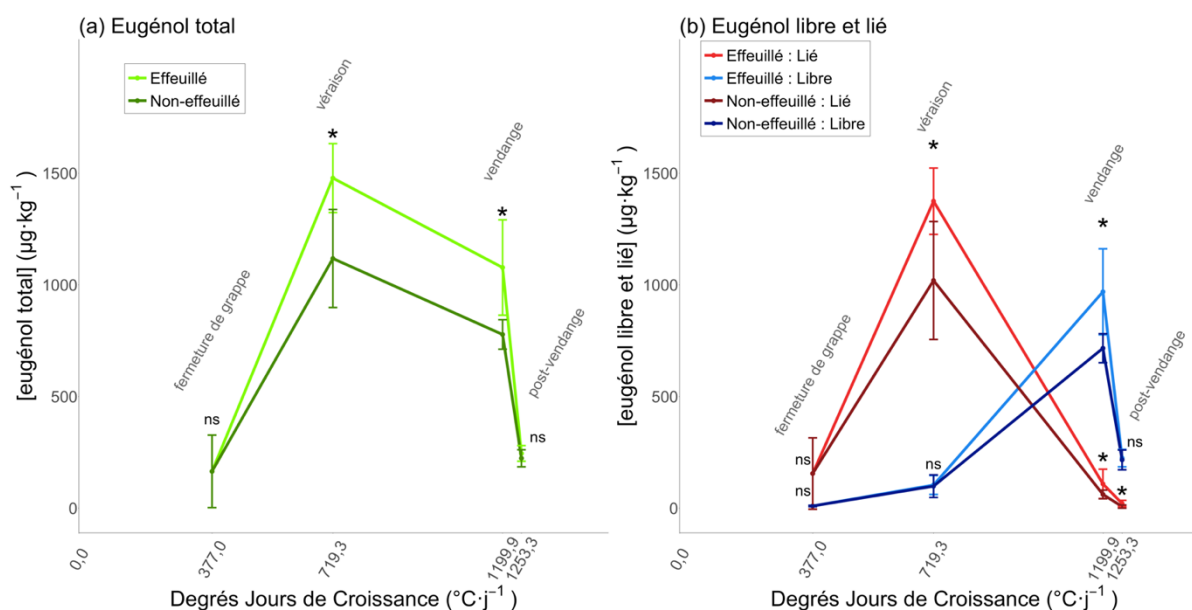


Figure 41 : Cinétique des concentrations en eugénol total, libre et lié, dans les pellicules, au cours du développement de la baie. Figure (a), cinétique de la concentration totale en eugénol au cours du développement de la baie de Baco blanc, en fonction du niveau d'effeuillage. Figure (b), cinétiques des concentrations en eugénol libre et lié au cours du développement de la baie de Baco blanc, en fonction du niveau d'effeuillage. Les étoiles situées au-dessus de certains points représentent des différences significatives entre les modalités d'effeuillage à stade phénologique égal tandis que, les lettres « ns » indiquent une absence de différence significative. La significativité a été obtenue par un test Wilcoxon-Mann-Whitney au risque  $\alpha$  de 5%. À chaque stade et pour chaque modalité,  $n = 18$ . L'effeuillage a été réalisé à fermeture de grappe (377 DJC)

La Figure 41 illustre l'induction marquée qui a été obtenue par l'effeuillage total. Au stade la véraison (719,3 DJC), la teneur en eugénol total (Figure 41a) des vignes effeuillées était significativement supérieure ( $1\,478\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) à celles des vignes contrôles ( $1\,118\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Cette différence marquée a également pu être observé à vendange (1 199,9 DJC), stade auquel la concentration en eugénol total des vignes effeuillées a atteint  $1\,078\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  tandis que celle des vignes contrôles était de  $778\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Cependant à la fermeture de grappe (377 DJC), aucune différence significative n'a été observé entre les vignes effeuillées et les vignes non effeuillées ( $165\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). De la même manière, au stade de post-vendange (1 253,3 DJC), la concentration en eugénol total des vignes effeuillées ( $223\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) n'était pas significativement différent de celle des vignes non effeuillées ( $245\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Dans le détail, la concentration en eugénol lié à véraison (Figure 41b) des pellicules de baies issues de vignes effeuillées ( $1\,375\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) était significativement plus importante que celle des pellicules de baie issues de vignes non effeuillées ( $1\,020\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). De la même manière, à vendange, le même schéma a pu être observé : la teneur en eugénol lié des vignes effeuillées était supérieure ( $108,7\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) à celle des vignes non effeuillées ( $62\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). À vendange encore, une différence significative entre la teneur en eugénol libre des vignes effeuillées ( $969\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) et la teneur en eugénol libre des vignes non effeuillées ( $716\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Au stade de post-vendange, l'eugénol lié dans les pellicules de baies issues de vignes effeuillées ( $21\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) était significativement plus concentré que l'eugénol lié des pellicules de baie issues de vignes non effeuillées ( $7\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Cependant, à fermeture de grappe, aucune différence entre les concentrations en eugénol lié des vignes non effeuillées ( $155\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) et des vignes effeuillées ( $155\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) n'a pu être décelée. Cette absence de différence notable est également observé pour les concentrations en eugénol libre ( $10\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). De la même manière, à la véraison les pellicules de baie issues de vignes effeuillées et de vignes non effeuillées n'ont présenté aucune différence significative quant à la concentration en eugénol libre, respectivement de  $104$  et  $99\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Enfin, au stade de post-vendange, aucune différence significative n'a pu être observé entre la concentration en eugénol libre des vignes effeuillées ( $224\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) et les vignes non effeuillées ( $216\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

## I.2. Lien avec la sensibilité à *B. cinerea*

Les nombreux échantillonnages de grappes réalisés afin d'établir les cinétiques de l'eugénol ont également permis de pratiquer des biotests afin de déterminer l'influence de la modification de la composition chimique des baies quant à leur sensibilité à *B. cinerea* (Figure 42). Si aucun résultat probant n'a pu être tiré de ces biotests, réalisés sur les échantillons du stade vendange, une évaluation aux champs de l'infection par *B. cinerea* a également été menée afin d'analyser l'influence de l'effeuillage (Figure 43).

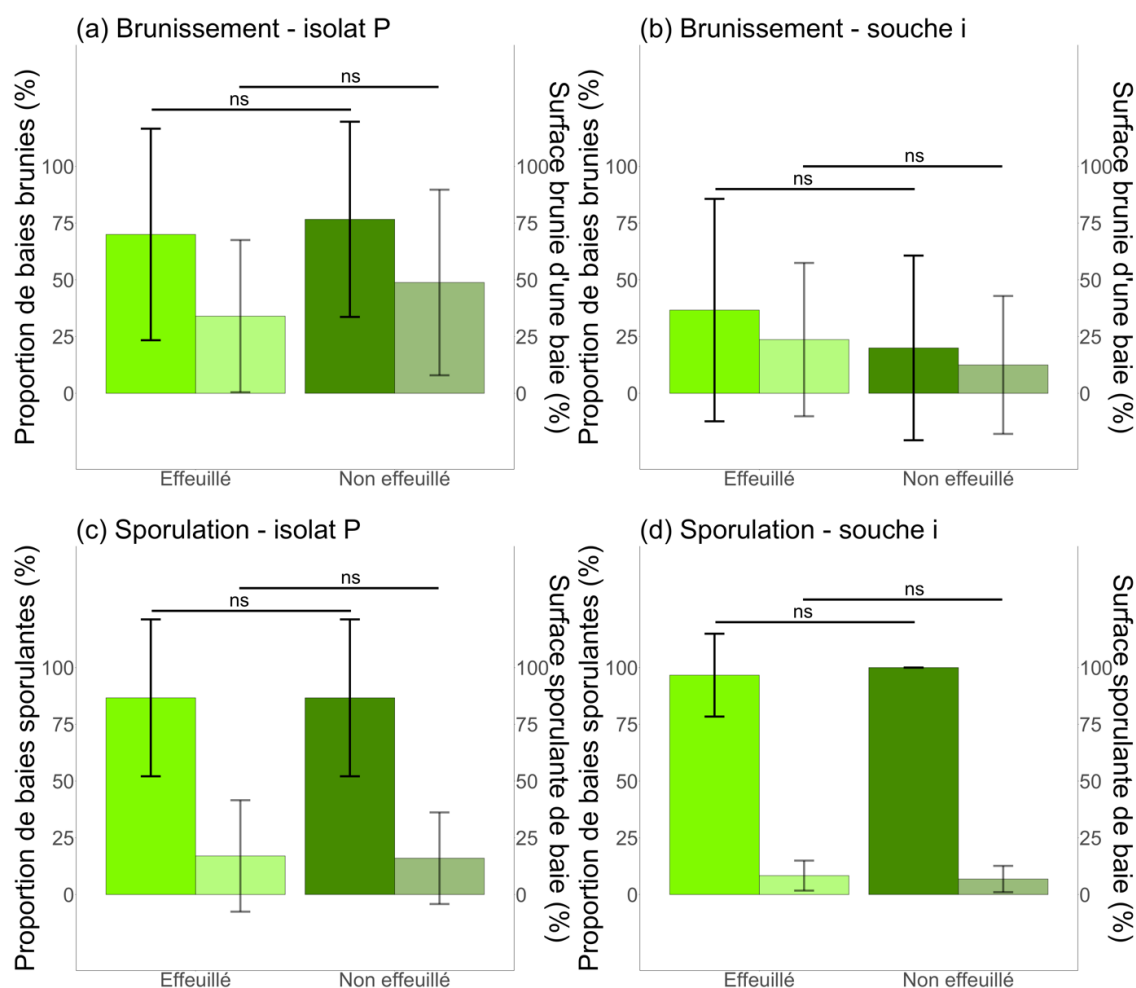


Figure 42 : Évaluation de différents symptômes de *B. cinerea* en fonction du niveau d'effeuillage appliqué et selon l'isolat utilisé durant le biotest. Les histogrammes en couleurs franches correspondent à l'échelle de gauche de chaque graphique tandis que les histogrammes en couleurs diluées correspondent à l'échelle de droite de chaque graphique. Figure (a), incidence et sévérité de brunissement causées par l'isolat P. Figure (b), incidence et sévérité de brunissement causées par la souche i. Figure (c), incidence et sévérité de sporulation causées par l'isolat P. Figure (d), incidence et sévérité de sporulation causées par la souche i. Les segments horizontaux présents entre deux histogrammes représentent les tests de Student réalisés au risque  $\alpha$  de 5 %. Les lettres minuscules « ns » signifient qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités concernées.

Au cours des biotests réalisés à partir des baies échantillonnées à vendange (Figure 42), aucune différence significative n'a pu être observée entre les deux modalités d'effeuillage et ce, quelle que soit l'isolat de *B. cinerea* utilisé. En effet, pour ce qui est du brunissement causé par l'isolat P (Figure 42a), les incidences de brunissement entre vignes effeuillées et vignes non effeuillées étaient proches : 70 et 76,7 %. De la même manière, les sévérités des deux modalités d'effeuillage ne variaient que peu : 70 % pour les vignes effeuillées et 76,7 % pour les vignes non effeuillées. Une logique similaire a pu être observée pour la souche i (Figure 42b). En effet, pour ce qui est de l'incidence de brunissement, aucune différence n'a pu être établie entre les vignes effeuillées (36,7 %) et les vignes non effeuillées (20 %). Concernant la sévérité du même symptôme, une logique identique a été décelée, les vignes effeuillées (23,7 %) n'étaient pas statistiquement différentes des vignes non effeuillées (12,5 %).

Le symptôme de sporulation a suivi un schéma similaire, à savoir qu'en considérant l'incidence de sporulation (Figure 42c), aucune différence statistique n'a pu être identifiée entre les vignes effeuillées (86,7 %) et les vignes non effeuillées (86,7 %). La sévérité a suivi une logique identique avec des vignes effeuillées présentant une sévérité de 17 % et les vignes non effeuillées une sévérité de 16 %. Enfin, pour ce qui est de la sporulation développée par la souche i (Figure 42d), il est apparu, qu'en incidence, aucune différence n'a pu être établie entre vignes effeuillées (96,7 %) et vignes non effeuillées (100 %). Si ces incidences étaient très importantes, la sévérité des vignes effeuillées (8,3 %) et des vignes non effeuillées (6,8 %) étaient, elles, très faibles et n'étaient pas statistiquement différentes. Pour ce qui est de la sévérité de l'infection par *B. cinerea* au vignoble (Figure 43a), les vignes effeuillées ont présenté une sévérité significativement moindre (6,3 %) que les vignes non effeuillées (19,3 %). De la même manière, concernant l'incidence d'infection (Figure 43b), les vignes effeuillées ont présenté une incidence significativement moindre (69,8 %) que les vignes non effeuillées (89,3 %).



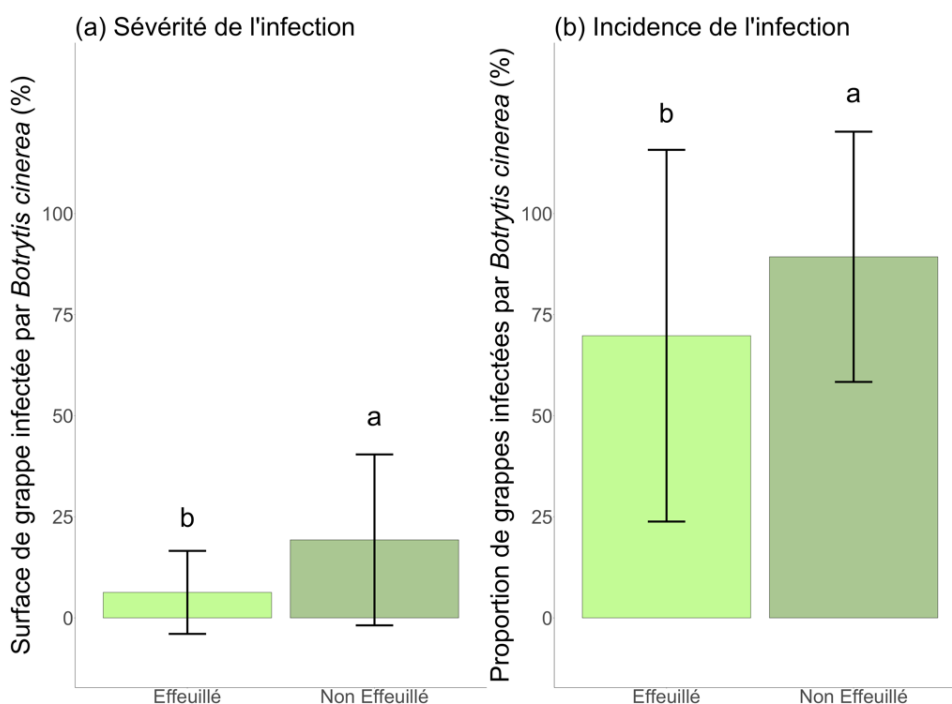


Figure 43 : Évaluation de symptômes de *B. cinerea* aux champs en fonction du niveau d'effeuillage sur Baco blanc à vendange. Figure (a), sévérité de l'infection par *B. cinerea* en fonction du niveau d'effeuillage. Figure (b), incidence de l'infection par *B. cinerea* en fonction du niveau d'effeuillage. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes induisent des différences statistiques

## II. Concentration des raisins par éclaircissage et inductibilité de l'eugénol

### II.1. Quel(s) effet(s) de l'éclaircissage sur l'induction de l'eugénol ?

La modification potentielle du métabolisme des baies lors d'un éclaircissage contrôlé, de différentes intensités, a été testée en 2022 (page 79). Les nombreux échantillonnages réalisés aux 4 stades phénologiques déterminés ont permis d'établir une cinétique des différentes formes de l'eugénol au cours du développement de la baie (Figure 44). Mais également, de mesurer l'IMT permettant ainsi d'évaluer l'effet des éclaircissages sur l'état de maturité des raisins (Tableau 25). Seules les modalités ec0 (non égrappée) et ec50 (égrappée à 50 %) sont présentées afin d'améliorer la lisibilité dans la lecture des résultats.

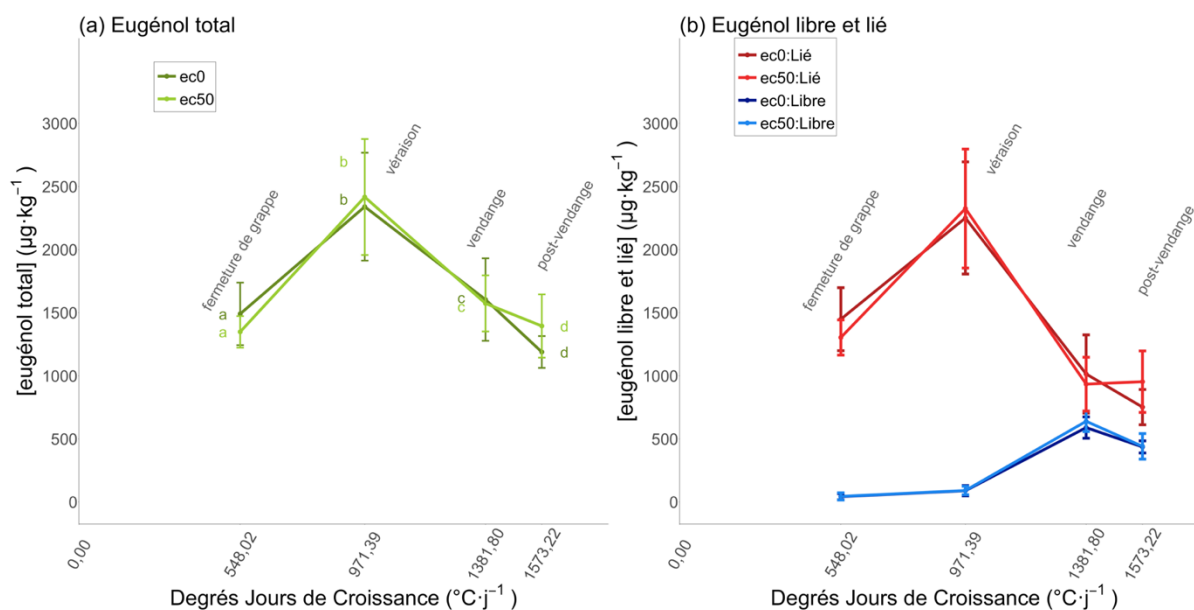


Figure 44 : Cinétique des concentrations en eugénol total, libre et lié, dans les pellicules, au cours du développement de la baie de Baco blanc, en fonction du niveau d'éclaircissage. Figure (a), cinétique de la concentration totale en eugénol. Figure (b), cinétiques des concentrations en eugénol libre et lié. Les lettres minuscules de couleur situées au-dessus de certains points représentent des différences significatives entre les différents stades phénologiques à modalité d'éclaircissage identique. La significativité a été testée grâce à des tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5 %. Pour chaque modalité et à chaque stade,  $n = 18$ . L'éclaircissage a été réalisé à fermeture de grappe (548,02 DJC)

Les cinétiques présentées à la Figure 44a confirment celles obtenues lors de l'essai d'effeuillage (page 131). En effet pour chaque modalité d'éclaircissage, une cinétique similaire d'augmentation de la concentration en eugénol total de fermeture de grappe a pu être identifiée, soit 548,0 DJC ( $1\,491\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour les vignes non-éclaircies et  $1\,348\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour la modalité éclaircie) jusqu'à véraison soit 971 DJC ( $2\,340\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le contrôle non-éclairci et  $2\,416\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour les vignes éclaircies). À partir de la véraison, une diminution progressive de l'eugénol total a été observée. D'abord jusqu'à la vendange soit 1 382 DJC ( $1\,640\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le contrôle non-éclairci et  $1\,574\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour les vignes éclaircies) et ensuite jusqu'à post-vendange soit 1 573 DJC ( $1\,189\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le contrôle et  $1\,395\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour la modalité éclaircie). Cependant, à stade phénologique égal, aucune différence significative n'a pu être observée entre éclaircissage (ec50) et contrôle non éclairci (ec0).

Pour ce qui est des cinétiques de l'eugénol libre et de l'eugénol lié (Figure 44b), aucune différence significative n'a pu être décelée entre les modalités d'éclaircissage à stade phénologique égal. Cependant les cinétiques étaient similaires à celles établies avec l'essai d'effeuillage (page 131). En effet, une augmentation de l'eugénol lié a été observée de la fermeture de grappe ( $1\,449\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le contrôle non-éclairci et  $1\,304\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour ma

modalité éclaircie) à la véraison (2 251  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour la modalité non éclaircie et 2 325  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour les vignes éclaircies). De façon similaire pour l'eugénol libre : sa concentration a augmenté de 42  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  à 89  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour ec0 et de 45  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  à 91  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour ec50. À partir de la véraison, l'eugénol lié a diminué progressivement, d'abord jusqu'à vendange pour atteindre 1 014  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  chez la modalité sans éclaircissage (ec0) et 934  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  chez la modalité éclaircie à 50 % (ec50). Et ensuite jusqu'à post-vendange et atteindre pour ec0 752  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  et pour ec50 953  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Tandis que l'eugénol libre, lui a progressivement augmenté, atteignant à vendange 590  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le contrôle non-éclairci et 640  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour la modalité éclaircie. La teneur en eugénol libre des différentes modalités a fini par diminuer de nouveau, atteignant ainsi au stade de post-vendange : 437 et 441  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectivement pour ec0 et ec50. Enfin, contrairement aux cinétiques des différentes formes de l'eugénol obtenues avec l'essai d'effeuillage, la dégradation de l'eugénol lié ne s'est pas traduit par une augmentation du même ordre de grandeur en eugénol libre. Si libération de l'eugénol lié, il y a eu, elle a été moindre en 2022 qu'en 2021.

Tableau 25 : Résumé des Indices de Maturité Technologique des différentes modalités d'éclaircissage en fonction des stades phénologiques. Aucune différence significative n'a été décelée d'où l'absence de lettres de significativité. Des tests statistiques indépendants ont été réalisés à chaque stade phénologique

Modalité d'éclaircissage	Indice de Maturité Technologique			
	FG	V	VG	PVG
ec0	2,6 ± 0,6	9,1 ± 1,9	32,7 ± 4,0	48,2 ± 3,3
ec50	2,5 ± 0,3	10,1 ± 1,2	36,1 ± 2,9	53,2 ± 8,4

L'étude des IMT (Tableau 25) n'a montré aucune différence significative entre les différentes modalités d'éclaircissage. En tendance, il est tout de même possible d'observer qu'à partir de la véraison, les valeurs d'IMT des vignes éclaircies à 50 % (ec50) sont systématiquement supérieures à celles des vignes non éclaircies (ec0).

## II.2. Effet sur la sensibilité à *B. cinerea*

De nombreux échantillonnages de grappes ont été réalisés afin d'établir les cinétiques de l'eugénol mais également, de pratiquer des biotests afin de déterminer l'influence de la modification de la composition chimique des baies sur leur sensibilité à *B. cinerea* (Figure 45).

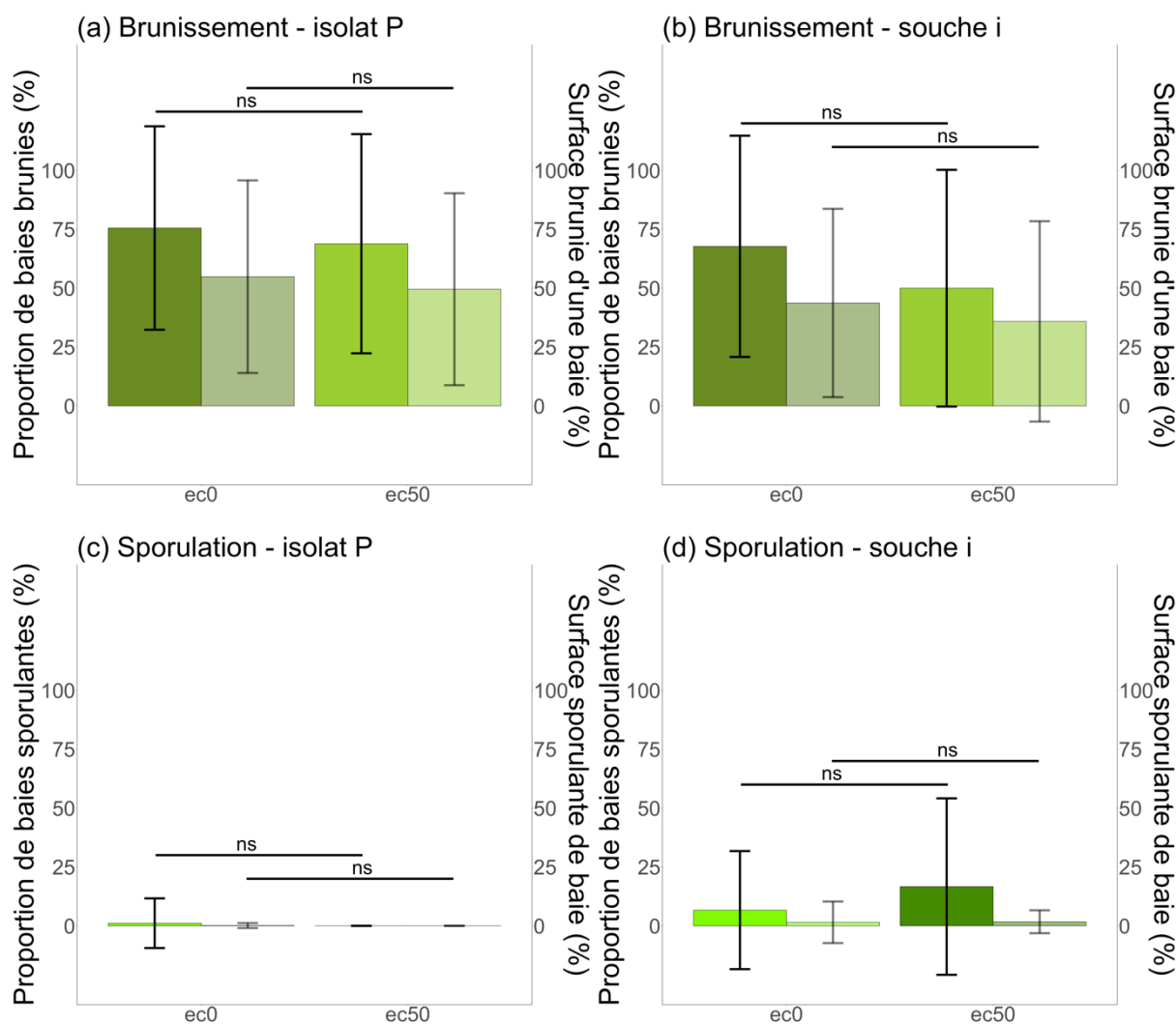


Figure 45 : Évaluation de développement de *B. cinerea* en fonction du niveau d'éclaircissage appliqué et selon l'isolat utilisé durant le biotest. Les histogrammes en couleurs franches correspondent à l'échelle de gauche de chaque graphique tandis que les histogrammes en couleurs diluées correspondent à l'échelle de droite de chaque graphique. Figure (a), incidence et sévérité de brunissement causées par l'isolat P. Figure (b), incidence et sévérité de brunissement causées par la souche i. Figure (c), incidence et sévérité de sporulation causées par l'isolat P. Figure (d), incidence et sévérité de sporulation causées par la souche i. Les segments horizontaux présents entre deux histogrammes représentent les tests de Student réalisés au risque  $\alpha$  de 5 %. Les lettres minuscules « ns » signifient qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités concernées

Au cours des biotests réalisés à partir des baies échantillonnées à vendange (Figure 45), aucune différence significative n'a été observée entre les deux modalités d'effeuillage et ce, quelle que soit l'isolat de *B. cinerea* utilisé.

Pour ce qui est du brunissement causé par l'isolat P (Figure 45a), les incidences des modalités d'éclaircissage n'aient pas statistiquement différentes : 75,6 % pour ec0 et 68,9 % pour ec50. De même, les sévérités n'étaient pas significativement différentes : 54,9 % pour ec0 et 49,6 % pour ec50.

Concernant la souche i, la logique était similaire (Figure 45b). Les incidences de brunissement étaient statistiquement identiques : 67,8 % pour ec0 et 50,0 % pour ec50. De même, les sévérités n'ont présenté aucune différence significative : 43,7 % pour ec0 et 35,9 % pour ec50.

De manière générale, le symptôme de sporulation était très faiblement exprimé et n'a montré aucune différence significative entre les modalités d'éclaircissage.

Pour l'isolat P (Figure 45c), seule la modalité ec0 a présenté une très faible incidence de 0,1 % tandis que ec50 n'a présenté aucune baie sporulante. Pour les sévérités, encore une fois, seule ec0 a présenté une très faible sévérité de sporulation égale à 1,1 %.

Enfin pour la souche i (Figure 45d), les incidences de sporulation étaient de 6,7 % pour ec0 et de 16,7 % pour ec50. Tandis que les sévérités étaient de 1,5 % pour ec0 et 1,7 % pour ec50.

### III. Conclusions et discussions

Dans ce chapitre a été établie pour la première fois une cinétique de l'eugénol au cours du développement de la baie de Baco blanc. En effet, les deux années d'essais (2021 effeuillage et 2022 éclaircissage) ont confirmé l'accumulation de l'eugénol jusqu'à véraison. L'après véraison s'est caractérisé par une lente diminution jusqu'à la vendange. De plus, l'étude des différentes formes de l'eugénol a permis de déceler une libération progressive de l'eugénol lié, pouvant participer à l'accumulation de l'eugénol libre. Cette transformation hypothétique de l'eugénol lié en eugénol libre pourrait être le signe de la libération de l'eugénol à partir d'un précurseur, hydrolysé (chimiquement ou par voie enzymatique) progressivement au cours de la maturation.

L'induction de l'eugénol a été mise en évidence grâce à l'effeuillage total mais restreint à la zone des grappes, réalisé à fermeture de grappe. Il semblerait que l'agression abiotique que représente la défoliation totale soit à l'origine de cette induction. L'effeuillage, causé artificiellement ou naturellement, induit une diminution de la vigueur des vignes et expose les grappes à un choc thermique et/ou une surexposition aux radiations solaires (Keller, 2020). DE plus, l'effeuillage, tel que réalisé dans les essais en 2021 sur la parcelle PREMS32, a conduit à un effet bien connu de cette pratique, à savoir une diminution de l'infection aux champs par *B. cinerea* (Elmer & Reglinski, 2006; Latorre *et al.*, 2015). Ce meilleur état sanitaire des vignes effeuillées peut également s'expliquer par la modification du microclimat au niveau des grappes : augmentation de la circulation de l'air, augmentation de l'exposition aux radiations solaires et augmentation de la température au niveau des grappes limitant ainsi la croissance de *B. cinerea* dont la seuil de développement est d'environ 30 °C (Ciliberti *et al.*, 2016).

L'analyse des deux formes de l'eugénol, dans un contexte d'éclaircissage ou d'effeuillage, a permis d'observer la cinétique d'accumulation de l'eugénol lié jusqu'à véraison, ainsi qu'une progressive accumulation de l'eugénol libre. Ces deux formes de l'eugénol, identifiées grâce à un protocole récemment établi (Franc *et al.*, 2023), permettent d'émettre l'hypothèse de la présence d'un ou plusieurs précurseurs de l'eugénol. En considérant ce dernier comme une molécule impliquée dans la défense naturelle du Baco blanc, il est possible de supputer que des formes hétérosides de l'eugénol pourraient être libérées par les enzymes de type  $\beta$ -glucosidase produites par *B. cinerea* au cours de l'infection, mettant ainsi le champignon en contact avec une molécule antifongique, qu'est l'eugénol libre (Le Roy *et al.*, 2016; Sasaki & Nagayama, 1994). Les fortes concentrations d'eugénol lié à véraison, induites par l'effeuillage, pourraient également s'expliquer par leur propre rôle antifongique, à l'instar d'hétéroside de flavonols, eux aussi pouvant être induits par une agression UV. L'induction de ces hétérosides permettent à la plante de mobiliser sous formes stables, des flavonols utilisés pour leur rôle antioxydant (Hectors *et al.*, 2014). De plus, une telle accumulation d'eugénol lié pourrait également représenter la constitution d'une réserve d'aglycone, mobilisable pour une future agression (Gachon *et al.*, 2005; Vogt & Jones, 2000).

L'éclaircissage est cité dans la littérature comme une technique permettant d'accélérer la maturation des grappes (Bena-Tzourou *et al.*, 1999; Ezzahouani & Williams, 2001). Dans le contexte des essais d'éclaircissage menés en 2022 sur la parcelle PREMS32, aucune différence notable de maturité n'a pu être détectée. De plus, l'éclaircissage n'est pas apparu comme une technique permettant d'induire une augmentation de la production d'eugénol. Reste qu'une année telle que 2022, particulièrement chaude et sèche, a pu interférer avec les résultats obtenus. Toutefois, ces essais ont permis de confirmer les cinétiques de l'eugénol établies en 2021. Enfin les différents biotests menés en 2021 et en 2022 avaient pour but d'identifier une possible influence de la modification de composition chimique des baies sur leur sensibilité à *B. cinerea*. Ils n'ont malheureusement pas permis de détecter cette influence de l'eugénol.

## **Conclusion de la partie 1 : L'eugénol, marqueur de la résistance ontogénique du Baco blanc**

Une méthodologie d'étalement de produits antifongiques, directement sur la gélose, tels que l'eugénol, a permis de déterminer les  $CI_{50}$  de ce dernier. Plus encore, cette nouvelle méthodologie a permis de mettre en avant une double action de l'eugénol, par contact direct mais également par vapeur. Cependant les  $CI_{50}$  de l'eugénol sont plus élevées que ce qu'il est possible de retrouver dans les pellicules de Baco blanc. Toutefois, les valeurs de  $CI_{10}$  sont proches des concentrations en eugénol de ces pellicules. L'eugénol est donc bien une composante de la tolérance du Baco blanc à *B. cinerea*.

Tolérance qui a été confirmée en comparant le Baco blanc à des variétés de *V. vinifera*. Plus encore une variabilité intra-variétale de sensibilité à *B. cinerea* a pu être mise en évidence. Certains clones, non autorisés, de Baco blanc sont apparus comme plus tolérant à certains symptômes du champignon.

Étant donné la place qu'occupe l'eugénol dans la tolérance du Baco blanc, des essais d'induction de l'eugénol par différentes techniques ont été mises en place. L'effeuillage est apparu comme une agression abiotique intéressante pour induire une production accrue d'eugénol. Plus encore ces essais d'induction, ont permis de confirmer sur deux années consécutives, des cinétiques des différentes formes de l'eugénol. À savoir, une accumulation de l'eugénol jusqu'à véraison, suivie d'une diminution progressive jusqu'à vendange. L'analyse des différentes formes de l'eugénol, a permis de d'identifier l'eugénol lié comme la forme principalement accumulée au cours du développement de la baie. L'augmentation progressive de la forme libre semble correspondre à une libération progressive de la forme liée. Enfin l'eugénol est très lié à la maturation des raisins de Baco blanc, plus ces derniers sont mûrs, moins l'eugénol se retrouve concentré dans les pellicules. Pour toutes ces raisons, l'eugénol a été proposé comme un marqueur ontogénique de résistance du Baco blanc.

L'eugénol est également un composé aromatique, bien connu en œnologie, et donc très concentré dans le raisin de Baco blanc. Ce dernier est une variété de chaudière, uniquement destiné à l'élaboration d'eau-de-vie. Plus qu'une molécule antifongique, l'eugénol peut également être un marqueur de qualité des eaux-de-vie d'Armagnac élaborées à base de Baco blanc.





---

# PARTIE 2 : De la caractéristique sensorielle des eaux-de-vie blanches de Baco blanc et influence de l'eugénol

---

*Le vin nous initie aux mystères volcaniques du sol, aux richesses minérales cachées : une coupe [...] bue à midi, en plein soleil, ou au contraire absorbée par un soir d'hiver dans un état de fatigue qui permet immédiatement de sentir au creux du diaphragme son écoulement chaud, sa sûre et brûlante dispersion le long de nos artères, est une sensation presque sacrée, parfois trop forte pour une tête humaine*

Les mémoires d'Hadrien, Marguerite Yourcenar



## Chapitre 1 : Composition chimique des eaux-de-vie blanches et marqueurs sensoriels

L'établissement de la composition chimique des eaux-de-vie qui ont été dégustées a permis d'identifier certains composés comme propres à certaines variétés de chaudière ou du moins, à identifier les différences de composition aromatique pouvant exister entre ces mêmes variétés. Les concentrations en arômes, qui vont être présentées dans ce chapitre, ont été réalisées à partir des échantillons d'eaux-de-vie blanches récoltés au cours du millésime 2022. Ces spiritueux sont issus de différents producteurs d'Armagnac et de 3 variétés : le Baco blanc, l'Ugni blanc et la Folle blanche. En tout, 48 eaux-de-vie blanches ont permis de dresser les profils aromatiques qui suivront : 23 de Baco blanc, 13 de Folle blanche et 10 d'Ugni blanc.

Étant donné le caractère hybride du Baco blanc, une recherche qualitative des molécules responsables du « foxé », à savoir l'antranilate de méthyle, l'*o*-aminoacétophénone, le furanéol et le 3-mercaptopropionate d'éthyle, a été entreprise. Si la méthode employée a présenté un défaut de fiabilité, certaines molécules précédemment citées ont pu être retrouvées, notamment l'antranilate de méthyle et le furanéol. Corroborant ainsi les déclarations des panélistes, citant le caractère « foxé » des vins de Baco blanc. Cette même recherche a été effectuée sur les eaux-de-vie blanches de Baco blanc correspondantes, cette fois-ci sans succès. Il semblerait donc que les eaux-de-vie blanches de Baco blanc ne présenteraient pas les molécules responsables du « foxé ». Encore une fois, ces indices de composition chimique correspondaient aux déclarations des panélistes qui n'ont pas cité le « foxé » comme un descripteur possible pour une eau-de-vie blanche. Reste que bien d'autres substances rentrent dans la composition d'une eau-de-vie d'Armagnac et constituent les caractéristiques sensorielles propres à ces eaux-de-vie.

## I. L'eugénol

L'eugénol a été identifié dans les raisins de Baco blanc comme un facteur de la résistance ontogénique de cette variété. Plus encore, l'eugénol est un marqueur biochimique spécifique du Baco blanc (Franc *et al.*, 2023). Le millésime 2022 n'a pas fait exception aux observations réalisées depuis 5 ans sur les eaux-de-vie blanches d'Armagnac.

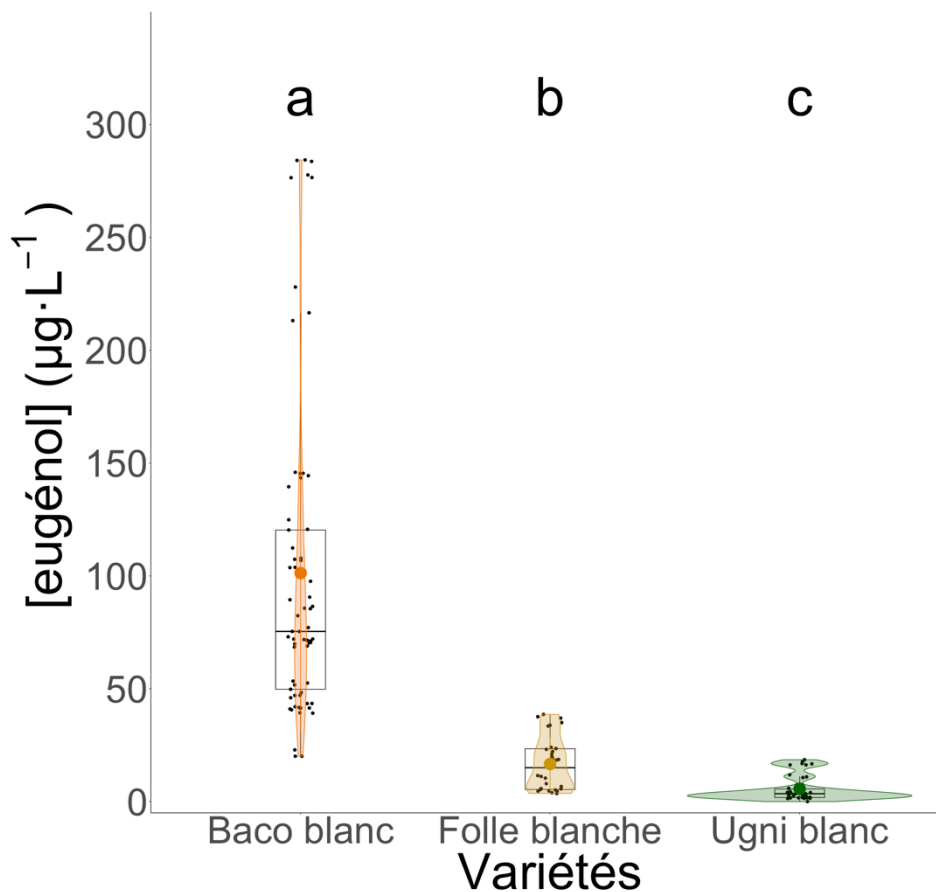


Figure 46 : Concentrations en eugénol dans les eaux-de-vie blanches du millésime 2022 produites à partir de 3 variétés, le Baco blanc, la Folle blanche et l'Ugni blanc. Les concentrations sont représentées par des diagrammes en violon permettant de représenter la variabilité intra-variétale, couplés à des boîtes à moustaches afin de compléter cette représentation. La ligne horizontale de chaque boîtes à moustache indique la concentration médiane tandis que le point de couleur indique la concentration moyenne. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des diagrammes, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Baco blanc n = 69, Folle blanche n = 39, Ugni blanc n = 30)

La Figure 46 confirme, pour le millésime 2022, que le Baco blanc est bien la variété dont les eaux-de-vie blanches sont les plus concentrées en eugénol. En effet, les eaux-de-vie blanches de Baco blanc ont présenté une concentration moyenne en eugénol de  $101,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , significativement supérieure à celle des eaux-de-vie blanches de Folle blanche ( $16,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), elle-même significativement supérieure à celles des eaux-de-vie blanches d'Ugni blanc ( $5,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Les diagrammes en violon présents dans la Figure 46 permettent également d'avoir une image de la répartition des concentrations en eugénol. Autrement dit, cette représentation a permis de rendre compte de la grande variabilité de concentration en eugénol existante dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc, d'où un violon très étendu. Et de confirmer par la même, la quasi-absence d'eugénol dans les eaux-de-vie d'Ugni blanc, en témoigne l'aplatissement du violon. Le cas de la Folle blanche était plus atypique, en témoigne le diagramme en forme de poire, indicateur de plusieurs modes de distribution. En effet, si les concentrations restaient faibles, certaines eau-de-vie ont présenté, dans des proportions moindres que le Baco blanc, des concentrations en eugénol proches d'eaux-de-vie de Baco blanc faiblement concentrées en cette même molécule.

## **II. Les alcools supérieurs et autres composés d'importances dans les eaux-de-vie de vins**

### **II.1. Vue d'ensemble de l'éthanal, de l'acétal et de quelques alcools supérieurs**

Les alcools supérieurs, autrement dit les alcools présentant plus de 2 atomes de carbone, participent à la complexité aromatique des vins et des eaux-de-vie. Certains sont issus, en plus du métabolisme principal des sucres, des acides aminés par l'action des levures durant la fermentation alcoolique. Leur influence sur l'aromatique des vins et des eaux-de-vie dépend essentiellement de leur concentrations (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). En distillation continue, les alcools supérieurs passent intégralement du vin à l'eau-de-vie (Bertrand & Ségur, 1991). Le cas du butan-1-ol et du butan-2-ol est particulier, une teneur en ces composés dépassant  $1 \text{ g}\cdot\text{hL}^{-1}$  indique plutôt une altération microbienne (Bertsch, 1992). Le 2-phényléthanol est une exception parmi les alcools supérieurs car il est considéré comme un produit de queue en distillation continue.

L'éthanal est le principal composé carbonyle des vins. À l'instar des alcools supérieurs, la totalité de l'éthanal passe du vin à l'eau-de-vie lors d'une distillation continue. Mais sa teneur dans les eaux-de-vie augmente aussi progressivement du fait de l'oxydation de l'éthanol.

Si les teneurs en éthanal des vins de distillation et eaux-de-vie correspondantes sont généralement faibles, la sensibilité accrue de ces vins produits sans SO<sub>2</sub> à l'oxydation peut induire d'importante concentration d'éthanal dans les eaux-de-vie qui se retrouveront marquées par son arôme (Hervé, 1996).

Le 1,1-diéthoxyéthane, ou par métonymie l'acétal, est formé dans les eaux-de-vie par la réaction entre l'éthanal et l'éthanol. Sa concentration dans les eaux-de-vie est donc très liée à celle de l'éthanal. En trop forte teneur, il est associé à un défaut (Hervé, 1996).

L'ensembles des molécules précédemment citées ont été quantifiées dans les eaux-de-vie blanches du millésime 2022 (Tableau 26). Certaines différences significatives, dans les concentrations en éthanal, acétal et alcools supérieurs entre les variétés ont pu être décelées. D'abord concernant, l'éthanal et l'acétal, la Folle blanche a été systématiquement la variété présentant les plus importantes concentrations. La sensibilité particulière de la Folle blanche à la pourriture grise et aux oxydations des composés de la baie que celle-ci peut engendrer, pourrait expliquer ces concentrations plus élevées que dans le Baco blanc ou l'Ugni blanc. Pour ce qui est du butan-1-ol et du butan-2-ol, bien que des différences significatives aient pu être détectées pour le premier composé, les valeurs faibles des deux molécules semblent indiquer, qu'en moyenne, aucune déviation microbienne responsable de leur apparition ait été détecté dans les vins de distillation menant aux eaux-de-vie analysées. Les autres alcools supérieurs étant d'origine fermentaire, les différences significatives qui peuvent apparaître entre les variétés pourraient être dues à des différences d'itinéraires de vinifications ou de teneurs variables en sucres et en acides aminés.

Tableau 26 : Concentrations en éthanal, acétal et alcools supérieurs des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, de Folle blanche et d'Ugni blanc. Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne  $\pm$  écart-type. Les lettres minuscules en exposant, placées après l'écart-type sont issues des tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5 %. Afin de faciliter la lecture, les teneurs en composés pour lesquels des différences significatives ont été détectées, apparaissent en police orange et gras

Composés volatils (mg·L <sup>-1</sup> )	Variétés		
	Baco blanc n = 69	Folle blanche n = 39	Ugni blanc n = 30
Éthanal	<b>62,8 <math>\pm</math> 122,9<sup>b</sup></b>	<b>180,1 <math>\pm</math> 377,4<sup>a</sup></b>	<b>33,0 <math>\pm</math> 41,4<sup>b</sup></b>
Acétal	<b>36,1 <math>\pm</math> 57,4<sup>b</sup></b>	<b>91,2 <math>\pm</math> 176,1<sup>a</sup></b>	<b>24,6 <math>\pm</math> 28,4<sup>b</sup></b>
2-phényléthanol	14,0 $\pm$ 10,4 <sup>a</sup>	17,8 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>	7,8 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>
Butan-2-ol	<b>0,6 <math>\pm</math> 1,1<sup>b</sup></b>	<b>1,2 <math>\pm</math> 1,4<sup>a</sup></b>	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,5<sup>c</sup></b>
Propan-1-ol	<b>162,3 <math>\pm</math> 49,1<sup>a</sup></b>	<b>159,6 <math>\pm</math> 48,8<sup>a</sup></b>	<b>138,5 <math>\pm</math> 77,7<sup>b</sup></b>
2-méthylpropan-1-ol	<b>282,8 <math>\pm</math> 224,0<sup>b</sup></b>	<b>338,3 <math>\pm</math> 163,2<sup>a</sup></b>	<b>368,0 <math>\pm</math> 348,4<sup>a</sup></b>
Butan-1-ol	0,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
2-méthylbutan-1-ol	<b>194,7 <math>\pm</math> 119,6<sup>b</sup></b>	<b>246,3 <math>\pm</math> 98,4<sup>ab</sup></b>	<b>265,8 <math>\pm</math> 124,2<sup>a</sup></b>
3-méthylbutan-1-ol	<b>781,5 <math>\pm</math> 408,0<sup>b</sup></b>	<b>934,8 <math>\pm</math> 302,7<sup>ab</sup></b>	<b>1 081,3 <math>\pm</math> 398,3<sup>a</sup></b>

## II.2. Précisions sur le méthanol

Une précision sur le méthanol semblait incontournable tant sa supposée forte concentration dans les vins d'hybrides a préoccupé le législateur français puis européen au XX<sup>e</sup> siècle. Le méthanol est issu de la dégradation enzymatique des pectines du raisin (Whitaker, 1993). S'il est vrai que les raisins de vignes hybrides peuvent contenir plus de pectines, il est nécessaire que les enzymes de destruction de la pectine soient actives pour obtenir des concentrations importantes en méthanol dans les vins (C. Y. Lee *et al.*, 1975). Plus encore, les étapes pré-fermentaires sont déterminantes dans les concentrations finales de méthanol dans les vins. Par exemple la macération pelliculaire permet la mise en contact de la pectine avec les enzymes capables de la déstructurer (Gnekow & Ough, 1976). Autrement dit, certaines étapes de vinifications sont à proscrire dans le cas de raisins hybrides. Enfin, les teneurs de méthanol retrouvées dans les vins d'hybrides sont bien en deçà des limites maximales recommandées par l'OIV et des doses toxiques pour la santé humaine de cette substance (Pedneault & Provost, 2016; Skrzydlewska, 2003).

En distillation continue, la totalité du méthanol des vins est retrouvée dans les eaux-de-vie (Bertrand & Ségur, 1991). Les paramètres influençant donc la concentration en méthanol dans les vins, influent directement sur la concentration en méthanol dans les eaux-de-vie. Cette

dernière fait d'ailleurs l'objet d'un règlement européen fixant la limite maximale à 200 g·hL<sup>-1</sup> d'AP (Règlement UE 2019/787).

La teneur en méthanol a donc été mesurée sur l'ensemble des eaux-de-vie du millésime 2022 (Figure 47). Il est apparu que la Folle blanche présentait la teneur moyenne en méthanol la plus élevée (36,9 g·hL<sup>-1</sup> AP). Elle n'était cependant pas significativement différente de la teneur moyenne du Baco blanc (34,5 g·hL<sup>-1</sup> AP). Seule la teneur en méthanol de la Folle blanche était supérieure à celle de l'Ugni Blanc (30,6 g·hL<sup>-1</sup> AP). Si la concentration en méthanol plus élevée du Baco blanc peut s'expliquer par sa nature de vigne hybride, la forte teneur de la Folle blanche pourrait, quant à elle, s'expliquer par la sensibilité de ce cépage à *B. cinerea*. En effet, les enzymes pectolytiques du champignon, combinées à celles déjà présentes dans le raisin, peuvent augmenter la dégradation de la pectine et former une plus grande quantité de méthanol, qui se retrouve alors dans les eaux-de-vie (Hervé, 1996). L'analyse de la répartition des teneurs en méthanol pour chaque variété grâce à la représentation en violon, a semblé indiquer que pour le Baco blanc deux modes pouvaient être mis en avant. Certaines des concentrations étaient réparties autour de la médiane (30,9 g·hL<sup>-1</sup> AP) tandis qu'une partie restreinte, plus élevée, se répartissait autour du maximum soit 61,6 g·hL<sup>-1</sup> AP. Pour la Folle blanche, un seul mode de répartition des dégagait autour de la moyenne et de la médiane. Enfin pour l'Ugni blanc, si un mode principal s'est dégagé autour de la moyenne et de la médiane (30,6 g·hL<sup>-1</sup> AP), deux autres modes plus restreints ont été identifiés autour du minimum (15,2 g·hL<sup>-1</sup> AP) et autour du maximum (62,1 g·hL<sup>-1</sup> AP).

Les concentrations en méthanol des eaux-de-vie de Baco blanc, donc d'une vigne hybride, sont bien inférieures, encore une fois, à la limite maximale autorisée. Il se confirme régulièrement que cette idée de concentration excessive de méthanol est fautive lors d'une utilisation maîtrisée des procédés.



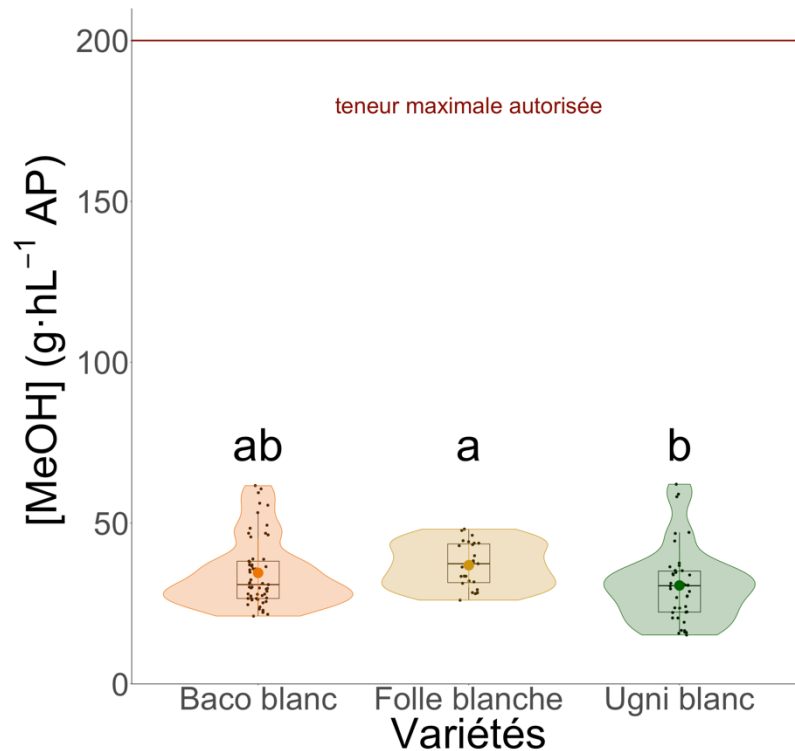


Figure 47 : Teneurs ( $\text{g}\cdot\text{hL}^{-1}$  AP) en méthanol des eaux-de-vie du millésime 2022 en fonction de la variété considérée. Les lettres minuscules noires situées au-dessus des diagrammes en violon sont issues d'un test de Newman-Keuls au seuil de risque  $\alpha$  de 5 %. La ligne horizontale de chaque boîtes à moustache indique la concentration médiane tandis que le point de couleur indique la concentration moyenne. Des lettres différentes indiquent des différences significatives. La ligne horizontale rouge indique la teneur maximale autorisée en méthanol dans une eaux-de-vie de vin, fixée par le Règlement UE 2019/787. Baco blanc  $n = 69$ , Folle blanche  $n = 39$ , Ugni blanc  $n = 30$

### III. Les esters

#### III.1. Les esters éthyliques d'acides gras

Les esters éthyliques d'acide gras sont issus de la réaction entre l'éthanol et un acide carboxylique. La chaîne carbonée peut être plus ou moins longue et plus ou moins ramifiée. Dans les vins, leur origine est double : ils sont formés pendant la FA via les estérifications enzymatiques ou durant la conservation des vins par estérifications chimiques, certains en fonction des concentrations peuvent subir une hydrolyse et doit diminuer leur teneur. Antalick et ses collaborateurs ont développé une méthode de quantification pour 32 esters du vin

(Antalick *et al.*, 2010), ce qui a élargi largement la connaissance de cette famille importante pour l'arôme des vins et la diversité de leurs concentrations (Antalick *et al.*, 2014).

(Lytra, 2012) propose un intéressant travail de compilation bibliographique des différents arômes et seuils de perception dans le vin des esters. Dans les eaux-de-vie obtenues par distillation continue, les esters éthyliques d'acides gras du vin sont en totalité retrouvés dans l'eau-de-vie correspondante. Plus encore, quantité d'esters éthyliques d'acides gras peut être proportionnellement plus importante dans l'eau-de-vie que dans le vin par libération du contenu cellulaire des levures (Bertrand & Ségur, 1991).

Les profils des eaux-de-vie blanches en ester éthyliques n'ont que peu différé en fonction de la variété utilisée (Tableau 27). Toutefois, une importante variabilité peut être notée pour chaque molécule, reflet de la grande diversité des produits analysés. Cette diversité peut provenir des différents itinéraires techniques envisagés par chaque producteur d'Armagnac. Seuls certains composés étaient concernés par des différences significatives de concentrations. Il s'agit surtout d'esters moins concentrés dans les eaux-de-vie d'Ugni blanc que dans les autres variétés : cela était le cas pour le butyrate d'éthyle et le décanoate d'éthyle. Une différence significative marquée est apparue pour le dodécanoate d'éthyle. En effet les eaux-de-vie blanches de Baco blanc étaient les plus concentrées tandis que celles d'Ugni blanc ont présenté la plus faible concentration en cette molécule, les eaux-de-vie de Folle blanche ont un profil intermédiaire. De manière générale, les esters éthyliques d'acides gras ont été systématiquement dosés en plus faible quantité dans les eaux-de-vie d'Ugni blanc. Les concentrations des esters en C<sub>16</sub> sont liées à la trituration de la vendange : plus une vendange est triturée plus les eaux-de-vie qui leur correspondent seront concentrées en esters éthyliques d'acides gras (Hervé, 1996). Le rôle de l'oxygénation peut également être avancé. Le phénylacétate d'éthyle est apparu comme significativement plus concentré dans les eaux-de-vie de Folle blanche que dans les spiritueux des autres variétés. Si aucune différence significative n'a pu être décelée entre les variétés pour la concentration en 2-phényléthanol (Tableau 26), la Folle blanche est tout de même celle qui présentait, en tendance, la concentration la plus élevée. Enfin le cinnamate d'éthyle est apparu comme significativement plus concentré dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc que dans les eaux de vie blanches des deux autres variétés.

Tableau 27 : Concentrations en esters éthyliques des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, de Folle blanche et d’Ugni blanc. Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne  $\pm$  écart-type. Les lettres minuscules en exposant, placées après l’écart-type sont issues des tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5 %. Afin de faciliter la lecture, les concentrations des composés pour lesquels des différences significatives ont été détectées, les concentrations apparaissent en police orange et gras

Esters ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Abréviation	Variétés		
		Baco blanc n = 69	Folle blanche n = 39	Ugni blanc n = 30
Propanoate d'éthyle	C3C2	96,2 $\pm$ 54 <sup>a</sup>	514,4 $\pm$ 1365,8 <sup>a</sup>	93,4 $\pm$ 43,5 <sup>a</sup>
Isobutyrate d'éthyle	iC4C2	46,4 $\pm$ 31,4 <sup>a</sup>	152,2 $\pm$ 359,7 <sup>a</sup>	39,4 $\pm$ 40,4 <sup>a</sup>
Butyrate d'éthyle	C4C2	<b>419,9 <math>\pm</math> 225,3<sup>a</sup></b>	<b>718,2 <math>\pm</math> 893,9<sup>a</sup></b>	<b>284,5 <math>\pm</math> 189,8<sup>b</sup></b>
2-méthylbutyrate d'éthyle	2-mC4C2	3,7 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	12,1 $\pm$ 29 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>
Isovalérate d'éthyle	iC5C2	7,1 $\pm$ 7,1 <sup>a</sup>	16,1 $\pm$ 36,7 <sup>a</sup>	6,8 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>
Valérate d'éthyle	C5C2	0,7 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	2,2 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
Hexanoate d'éthyle	C6C2	981,2 $\pm$ 440,8 <sup>a</sup>	1592,5 $\pm$ 1998,5 <sup>a</sup>	829,6 $\pm$ 521,3 <sup>a</sup>
Heptanoate d'éthyle	C7C2	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Éthyl trans 2-hexanoate	HexC2	8 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	14,2 $\pm$ 24,7 <sup>a</sup>	7,1 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>
Octanoate d'éthyle	C8C2	1125,5 $\pm$ 552,7 <sup>a</sup>	1646 $\pm$ 2208,8 <sup>a</sup>	908,8 $\pm$ 536,8 <sup>a</sup>
Nonanoate d'éthyle	C9C2	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,3<sup>a</sup></b>	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,4<sup>b</sup></b>	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,1<sup>b</sup></b>
Décanoate d'éthyle	C10C2	<b>233 <math>\pm</math> 175,8<sup>a</sup></b>	<b>251,7 <math>\pm</math> 284,6<sup>a</sup></b>	<b>142,4 <math>\pm</math> 117,1<sup>b</sup></b>
Dodécanoate d'éthyle	C12C2	<b>28,1 <math>\pm</math> 30,7<sup>a</sup></b>	<b>24,1 <math>\pm</math> 24,4<sup>ab</sup></b>	<b>15,4 <math>\pm</math> 19,1<sup>b</sup></b>
Phénylacétate d'éthyle	PhC2C2	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,1<sup>b</sup></b>	<b>0,7 <math>\pm</math> 1,8<sup>a</sup></b>	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,1<sup>b</sup></b>
Dihydrocinnamate d'éthyle	DhCinnC2	0,1 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
Cinnamate d'éthyle	CinnC2	<b>0,12 <math>\pm</math> 0,11<sup>a</sup></b>	<b>0,09 <math>\pm</math> 0,13<sup>b</sup></b>	<b>0,06 <math>\pm</math> 0,03<sup>b</sup></b>

### III.2. Les acétates d'alcools supérieurs

Les acétates sont exclusivement issus de l'estérification de l'acide acétique par des alcools supérieurs (Antalick *et al.*, 2014). Également produits durant la FA, ils sont hydrolysés plus rapidement au cours de la conservation du vin. En distillation continue, les acétates d'alcools supérieurs du vin sont en quasi-totalité récupérés dans l'eau-de-vie (Bertrand & Ségur, 1991). L'acétate d'éthyle n'est pas à proprement parlé un ester d'alcool supérieur. Si sa concentration dans une eau-de-vie est dépendante de sa concentration dans le vin, il s'en forme progressivement au cours du vieillissement d'eau-de-vie par estérification ente l'acide acétique et l'éthanol.

Une nouvelle fois, une importante variabilité est observable pour chaque molécule. Cette variabilité peut être encore imputable à la diversité des itinéraires techniques suivies par les professionnels. À l'exception de l'acétate d'isoamyle (Figure 48), les concentrations retrouvées pour chaque acétate sont relativement faibles, voire très faibles.

Les différences entre les eaux-de-vie blanches d'Armagnac étaient plus marquées que pour les esters (Tableau 28). Les eaux-de-vie d'Ugni blanc étaient, encore une fois, significativement moins concentrées en certains esters que les eaux-de-vie des deux autres variétés. En effet c'était le cas pour les acétates d'isobutyle, de propyle, d'octyle et de phényléthyle. L'acétate de butyle était statistiquement plus concentré dans les eaux-de-vie de Folle blanche que dans les eaux-de-vie de d'Ugni blanc. Les eaux-de-vie de Baco blanc avaient un profil intermédiaire. Enfin l'acétate d'octyle était significativement plus concentré dans les eaux-de-vie de Folle blanche que dans les eaux-de-vie de Baco blanc. Elles-mêmes statistiquement plus concentrées en ce composé que les eaux-de-vie d'Ugni blanc.

Tableau 28 : Concentrations en acétates d'alcools supérieurs des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, de Folle blanche et d'Ugni blanc. Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne  $\pm$  écart-type. Les lettres minuscules en exposant, placées après l'écart-type sont issues des tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5 % (sauf pour l'acétate d'hexyle, pour lequel, un test de Newman-Keuls a été effectué au seuil de risque  $\alpha$  de 5 %). Afin de faciliter la lecture, les composés pour lesquels des différences significatives ont été détectées, les concentrations apparaissent en police orange et gras

Esters ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Abréviation	Variétés		
		Baco blanc n = 69	Folle blanche n = 39	Ugni blanc n = 30
Acétate d'éthyle	C2C2	<b>259,3 <math>\pm</math> 347,3<sup>a</sup></b>	<b>304,0 <math>\pm</math> 315,4<sup>a</sup></b>	<b>158,2 <math>\pm</math> 64,3<sup>b</sup></b>
Acétate d'isobutyle	C2iC4	<b>119,6 <math>\pm</math> 58,4<sup>a</sup></b>	<b>313,7 <math>\pm</math> 546,9<sup>a</sup></b>	<b>60,7 <math>\pm</math> 39<sup>b</sup></b>
Acétate de propyle	C2C3	<b>48 <math>\pm</math> 21,3<sup>a</sup></b>	<b>119,5 <math>\pm</math> 203,5<sup>a</sup></b>	<b>27,8 <math>\pm</math> 13,1<sup>b</sup></b>
Acétate de butyle	C2C4	<b>10,7 <math>\pm</math> 7,8<sup>ab</sup></b>	<b>18,7 <math>\pm</math> 22,4<sup>a</sup></b>	<b>8,8 <math>\pm</math> 7,7<sup>b</sup></b>
Acétate d'hexyle	C2C6	<b>300,4 <math>\pm</math> 312,5<sup>b</sup></b>	<b>234,9 <math>\pm</math> 283,6<sup>a</sup></b>	<b>129,5 <math>\pm</math> 168,7<sup>c</sup></b>
Acétate d'octyle	C2C8	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,6<sup>a</sup></b>	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,4<sup>a</sup></b>	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,1<sup>b</sup></b>
Acétate de phényléthyle	C2PhC2	<b>30,7 <math>\pm</math> 23,5<sup>a</sup></b>	<b>58,6 <math>\pm</math> 69,4<sup>a</sup></b>	<b>15,4 <math>\pm</math> 11,1<sup>b</sup></b>

### III.3. L'acétate d'isoamyle

L'acétate d'isoamyle est issu de de la réaction entre l'acide acétique et le 3-méthylbutan-1-ol. Il est surtout connu pour son arôme typique de banane chimique ou de bonbon à la banane pouvant instiller un style particulier aux vins nouveaux (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012).

Un focus nécessaire sur l'acétate d'isoamyle (Figure 48) a été effectué car il pourrait être impliqué dans une interaction perceptive pouvant participer à une note aromatique caractéristique des eaux-de-vie blanches de Baco blanc (page 188). Il est apparu que les eaux-de-vie blanches de Baco blanc et de Folle blanches présentaient des concentrations moyennes

en acétate d'isoamyle (respectivement de 2 715,7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et 3 871,9  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significativement supérieures à celle retrouvée dans les eaux-de-vie d'Ugni blanc, (1 295,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

La forme des diagrammes en violons (Figure 48) a également renseigné sur la répartition de la variabilité en acétate d'isoamyle pour chaque variété étudiée. S'il est apparu qu'une diversité notable de concentration a été observée pour les eaux-de-vie blanches de Baco blanc et de Folle blanche, ce n'était pas le cas des eaux-de-vie d'Ugni blanc, qui ont présenté une certaine homogénéité. En effet, la moitié des eaux-de-vie présentait une concentration proche du premier quartile (888  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Cette faible concentration moyenne en acétate d'isoamyle des eaux-de-vie d'Ugni blanc est à mettre en perspective avec les concentrations en 3-méthylbutan-1-ol (Tableau 26). Étonnamment, les eaux-de-vie d'Ugni blanc étaient pourtant celles qui présentaient la plus grande concentration en 3-méthylbutan-1-ol.

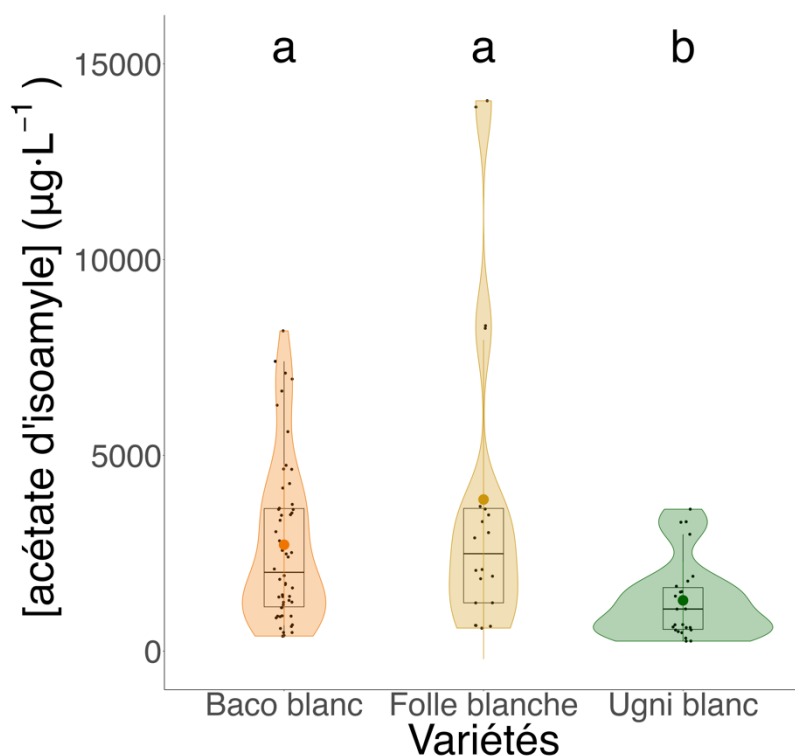


Figure 48 : Concentrations en acétate d'isoamyle dans les eaux-de-vie blanches du millésime 2022 produites à partir de 3 variétés, le Baco blanc, la Folle blanche et l'Ugni blanc. Les concentrations sont représentées par des diagrammes en violon permettant de représenter la variabilité intra-variétale, couplés à des boîtes à moustaches afin de compléter cette représentation. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des diagrammes, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Baco blanc n= 69, Folle blanche n = 39, Ugni blanc = 30



## **Chapitre 2 : Existe-t-il un espace sensoriel propres aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc ?**

Si les professionnels de l'Armagnac ont reconnu, au cours des différentes discussions qui ont lieu durant ces 3 années de thèse, une spécificité sensorielle aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc, la verbalisation de ces caractéristiques propres à cette variété a été plus complexe. Toutefois quelques notions comme des notes de « fruits surmûris », des notes « lourdes » ou encore de « végétal » ont été citées spécifiquement pour décrire les eaux-de-vie de Baco blanc. De plus, les panélistes ont noté une spécificité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc concernant les notes « amyliques ». Ces dernières paraissaient plus intenses dans une eau-de-vie de Baco blanc que dans une eau-de-vie d'Ugni blanc ou de Folle blanche. Le besoin de différencier le Baco blanc des autres variétés utilisées pour la production d'eaux-de-vie tient essentiellement dans la place que celui-ci occupe dans l'imaginaire collectif de l'Armagnac. En effet le Baco blanc est la variété identitaire de cette région viticole. Pour répondre à ce besoin, il a fallu vérifier l'existence, ou non, d'un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie de Baco blanc. Pour cela, une fiche de dégustation a été co-construite avec le panel de professionnels de l'Armagnac au cours de la thèse. Si plusieurs fiches étaient déjà préexistantes (Séгур *et al.*, 1991; Séгур & Chassin, 2008), aucune n'était focalisée sur la description aromatiques des eaux-de-vie blanches d'Armagnac. Les différentes séances d'analyse sensorielle, ont servi à la construction de la fiche et à la recherche d'un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie de Baco blanc. Ce furent donc 22 professionnels de la filière Armagnac qui ont participé à ces dégustations. Enfin le développement de cette fiche de dégustation s'est inspiré de précédents travaux sur la caractérisation sensorielle de produits par méthode adaptée (Pelonnier-Magimel *et al.*, 2020; Séгур *et al.*, 1991; Séгур & Chassin, 2008). Pour ce qui est de la temporalité de ce travail avec le panel de professionnels, la constitution de la fiche a occupé une part majeure des séances de dégustation (une vingtaine de séance soit 2 ans). La dernière année de la thèse a permis d'éprouver l'outil constitué, même imparfait.

## I. Le développement d'une fiche de dégustation

### I.1. Génération libre de vocabulaire et premières réductions du nombre de descripteurs

Afin de déterminer un espace sensoriel olfactif propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc, une première étape de génération libre de vocabulaire a été proposée aux panélistes. Pour cela, sur 6 séances de 2 heures chacune, 24 eaux-de-vie blanches, anonymisées, des 3 variétés étudiées (Baco blanc, Ugni blanc, Folle blanche) réduites à 40 % d'éthanol (v/v) ont été présentées aux panélistes. Ces derniers ont eu à disposition une feuille par eau-de-vie sur laquelle ils pouvaient inscrire autant de descripteurs (les phrases étaient interdites) qu'ils le souhaitaient. Les expressions et termes hédoniques étaient normalement prohibés. Afin de normaliser, le temps alloué à chaque eau-de-vie était fixé. C'est ainsi que 272 descripteurs uniques ont été générés après une première analyse sémantique permettant de regrouper certains mots, avec le même radical, sous le même descripteur. Par exemple les termes « vanille » et « vanillé » ont été regroupés sous le descripteur « vanille ».

Ce nombre très important de descripteurs a conduit à une première réduction. En effet, les termes hédoniques (par exemple « très bon »), normalement bannis, ont été supprimés. De la même manière, les termes propres aux défauts des eaux-de-vie comme « acescent » ont également été supprimés puisque l'objectif était de déterminer un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc et non pas, de lister les défauts des eaux-de-vie. De plus, les fiches de dégustations précédemment construites listaient déjà les défauts des eaux-de-vie (Ségur *et al.*, 1991; Ségur & Chassin, 2008). Enfin, tous les termes liés à la description d'une sensation en bouche (goûts ou perceptions somesthésiques) ont également été supprimés. Seuls les descripteurs se rapportant à des caractéristiques aromatiques ont été conservés. Le nombre de descripteurs a ainsi été réduit jusqu'à 187 descripteurs.

Une seconde étape de réduction a été nécessaire. Pour cela, l'ensemble des termes n'ayant pas été cité au moins 3 fois sur l'ensemble des séances a été supprimé. Ce sont donc 107 descripteurs uniques qui ont été obtenus. Les fréquence d'occurrence de ces termes (nombre de citation d'un descripteur divisé par la totalité des citations de l'ensemble des descripteurs) ont été calculées et sont résumées à l'Annexe 3.



## **I.2. Regroupement de descripteurs**

Le nombre de descripteurs étant encore trop important, une nouvelle réduction a été nécessaire. Pour cela des regroupements successifs de descripteurs, qui pourraient être jugés trop proches, ont été réalisés.

### **I.2.1. Regroupement par outil bibliographique**

Dans un premier temps les 107 descripteurs déjà obtenus ont été rassemblés grâce la systématique de Noble (Noble *et al.*, 1987), proposée en Annexe 4. Cette dernière est organisée en plusieurs niveaux. Le premier niveau appelé « termes de premier niveau » rassemble les descripteurs selon de grandes caractéristiques. Par exemple, des descripteurs tels que « banane » ou « pomme » sont rassemblés dans le terme de premier niveau « Fruité ». Les termes de deuxième niveau rassemblent les descripteurs de manière plus précise. En gardant l'exemple des descripteurs fruité « banane » et « pomme », le premier est classé dans le terme de 2<sup>e</sup> niveau « Fruit tropical » tandis que le second est classé dans le terme de 2<sup>e</sup> niveau « Fruit du verger ». Enfin les termes de 3<sup>e</sup> niveau correspondent aux descripteurs eux-mêmes : en poursuivant l'exemple « pomme » et « banane » sont des termes de 3<sup>e</sup> niveau.

Les regroupements ont donc été réalisés grâce aux termes de premier niveau décrit par Noble. Le terme de premier niveau « Pâtisserie » est en fait une invention propre à ces travaux de thèse. Il a en fait rassemblé 4 termes de premier niveau déjà existant chez Noble : « Boisé », « Caramélisé », « Microbiologique » et « Noix ». Après discussions avec les panélistes, ces derniers ont regroupés les termes de 3<sup>e</sup> niveau, appartenant normalement aux 4 termes de 1<sup>er</sup> niveau précédemment cités, sous ce nouveau terme de 1<sup>er</sup> niveau « Pâtisserie ».

Cette liberté prise par rapport à l'outil développé par Noble peut s'expliquer par la différence de matrice. En effet, la systématique de Noble a été construite en se basant sur une matrice vin et écrite en langue anglaise, ce qui la rend culturellement décalée. De plus, la volonté ici était de co-construire une fiche de dégustation que les panélistes pourraient s'approprier rapidement à ainsi faciliter la description des eaux-de-vie blanches.

### **I.2.2. Regroupement de descripteurs par consensus des panélistes**

Afin de permettre la co-construction de la fiche tout en continuant la réduction du nombre de descripteurs encore trop important, il a été demandé aux panélistes, lors d'un travail à distance, de regrouper par proximité aromatique, les 113 termes de 3<sup>e</sup> niveau.

Le regroupement fait par la systématique de Noble a permis de découper cette tâche en autant de termes de 1<sup>er</sup> niveau retenus au paragraphe page 169. Ces regroupement ont été réalisés à l'aide de questionnaires en ligne, conçus à l'aide du logiciel Sphinx (Le Sphinx, Chavanod, France). Ce sont 5 questionnaires, correspondant au termes de 1<sup>er</sup> niveau « Fruité », « Floral », « Épicé », « Végétal » et « Pâtissier » qui ont été envoyés à intervalle régulier aux panélistes. Pour chaque questionnaire, les panélistes devaient proposer le regroupement de plusieurs descripteurs selon leur proximité aromatique. Ces rassemblements ont été effectués de manière intellectuelle, individuelle et sans échantillons à déguster. Les résultats obtenus ont été traités en produisant, pour chaque terme de 1<sup>er</sup> niveau, une matrice de distance selon la méthode euclidienne. À partir de cette matrice, une classification ascendante hiérarchique (CAH), utilisant la méthode Ward, a pu être établie (Annexe 5).

### **I.3. La construction de la fiche**

#### **I.3.1. Consensus sur la forme et les descripteurs**

Les CAH obtenues au paragraphe précédent ont constitué une base de discussions avec les panélistes afin de nommer les différentes catégories qui deviennent les descripteurs à utiliser. Étant donné que les regroupements opérés par les CAH sont statistiques, il est apparu, après plusieurs discussions avec les panélistes, que certains descripteurs, voire certaines catégories dans leur ensemble n'étaient pas pertinents. Certains ajustements (déplacement de descripteur ou suppression) ont donc été réalisés afin de déterminer les 16 descripteurs qui structurent la fiche. Lors de ces ajustements, la même consigne de regrouper les descripteurs par proximité aromatique, a été donnée au panel. Dans le détail, sur les 5 catégories établies par la CAH pour le terme de 1<sup>er</sup> niveau « Végétal », seules 2 ont été conservées. Les autres ont été supprimées car jugées trop peu pertinentes pour décrire une eau-de-vie blanche. Autre exemple, le descripteur « banane » a été catégorisé par la CAH avec : « Coing », « Rhubarbe », « Melon », « Abricot », « Pêche », « Prune », « Fraise », « Fruité ». Après discussion avec les panélistes, ce descripteur « banane » a été regroupé avec : « Ananas », « Fruit exotique », « Letchee », « Mangue ».

À chaque catégorie finalement co-construite avec le panel a été attribué un descripteur qui deviendra celui présent sur la fiche de dégustation. Ces descripteurs pouvaient être un des descripteurs présents dans la catégorie travaillée ou un descripteur représentant l'ensemble des termes de la catégorie. Par exemple, le descripteur « Fruit exotique » a été attribué aux descripteurs : « Ananas », « Banane », « Letchee », « Mangue ».

Si un nom catégorie reprenait un descripteur déjà existant, celui-ci était supprimé de la liste. D'une autre manière, des noms de catégories qui n'étaient pas des descripteurs ont été proposés. Par exemple, la catégorie regroupant les descripteurs : « Foin », « Herbe sèche », « Tabac », « Tisane » a été nommé par le descripteur « Végétal sec ».

### **I.3.2. Choix d'une échelle discontinue**

Deux types d'échelles ont été proposés aux panélistes : l'échelle bornée discontinue et l'échelle continue. Ces derniers ont préféré l'échelle discontinue, plus proche de celle qu'ils peuvent utiliser en dégustation d'agrément de produits. Un nombre de pas restreint a également été choisi afin de faciliter la discrimination des produits. Les 16 descripteurs seront donc notés sur une échelle discontinue allant de 0 à 5. Ce choix imparfait est le fruit d'un compromis avec le panel de professionnels, bien qu'il limite potentiellement la discrimination des échantillons. Afin d'optimiser la discrimination des variétés à l'origine des eaux-de-vie blanches, chaque descripteur sera noté deux fois sur l'échelle discontinue : une première après une analyse au nez seulement et une seconde fois après dégustation en bouche de l'eau-de-vie. L'objectif est d'améliorer l'efficacité du panel en utilisant l'olfaction directe ou la rétro-olfaction.

### **I.3.3. Une fiche de dégustation propre aux eaux-de-vie blanches**

La fiche de dégustation destinée à l'analyse sensorielle spécifique d'eaux-de-vie blanches est disponible à la Figure 49 et comprend 16 descripteurs. Une fiche complémentaire de dégustation a été proposée aux panélistes afin de les familiariser avec ce nouvel outil. Elle comprend l'ensemble des descripteurs catégorisés au paragraphe page 170 et est présentée à l'Annexe 6.

Numéro participant :

Code échantillon :

### Profil sensoriel

Veillez évaluer l'intensité perçue de chaque descripteur présenté ci-dessous pour chaque eau-de-vie à l'aide des échelles. Il est important d'évaluer chaque descripteur même si vous ne le percevez pas et dans ce cas, vous attribuez la note de 0.

	Orthonasal	Rétronasal
Agrume	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Fruit exotique	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Fruit du verger	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Fruit surmûri	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Fruit confit	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Fruit cuit	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Confiserie	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Pâtissier	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Beurré	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Fleur blanche	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Fleur capiteuse	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Végétal frais	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Végétal sec	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Anisé	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Épices	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
Empyreumatique	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5

Figure 49 : Fiche d'analyse sensorielle propre aux eaux-de-vie blanches d'Armagnac permettant d'établir le profil sensoriel de ces dernières

## II. Utilisation et validation de la fiche

### II.1. Validation de l'outil

#### II.1.1. Consensus interindividuel sur les descripteurs

Afin de déterminer des différences entre les eaux-de-vie blanches dégustées, il a fallu s'assurer du consensus entre les panélistes pour chaque descripteur. Pour cela, à partir du nuage des variables (les dégustateurs) dans l'espace des individus (les notes attribuées aux eaux-de-vie), une Analyse en Composante Principale (ACP), correspondant au plan comprenant les deux premiers axes (les deux premières dimensions) a été générée par descripteur. La Figure 50 donne l'exemple d'un descripteur non-consensuel et d'un descripteur consensuel. La Figure 50b représente le descripteur « Fruit confit » qui a présenté un consensus interindividuel. En effet, 8 panélistes étaient positionnés sur la partie positive de l'axe 1 (Dim 1), qui représentait 34,3 % de la variance totale, indiquant ainsi la tendance de ces derniers à noter les eaux-de-vie de la même manière. Le second axe (Dim 2), représentant 29,7 % de la variance totale, renseignait sur la variabilité inter-individuelle des panélistes existante dans l'évaluation d'un descripteur. De plus, 7 panélistes (jea2, jea22, jea25, jea13, jea8, jea18, jea14) présentaient une contribution à l'axe 1 au moins égale à 10 %. Cette forte contribution au premier axe représentant le consensus interindividuel permet de faire du descripteur « Fruit confit » un descripteur consensuel. À l'inverse, pour le descripteur « Agrumes » (Figure 50a), 6 panélistes avec une contribution supérieure à 10 % étaient représentés sur la partie positive de l'axe 1, tandis que 5 panélistes avec cette même forte contribution étaient représentés sur la partie négative de l'axe 1. Le descripteur « Agrumes » pouvait être considéré comme un descripteur non-consensuel. Ce sont sur ces notions, sur le consensus des descripteurs, que des différences entre les notes attribuées par descripteur aux eaux-de-vie ont pu être établies. Autrement dit, les 16 descripteurs ont été travaillés à chaque séance de dégustation mais seuls ceux qui présentaient un profil consensuel ont été considérés pour la discrimination des eaux-de-vie.

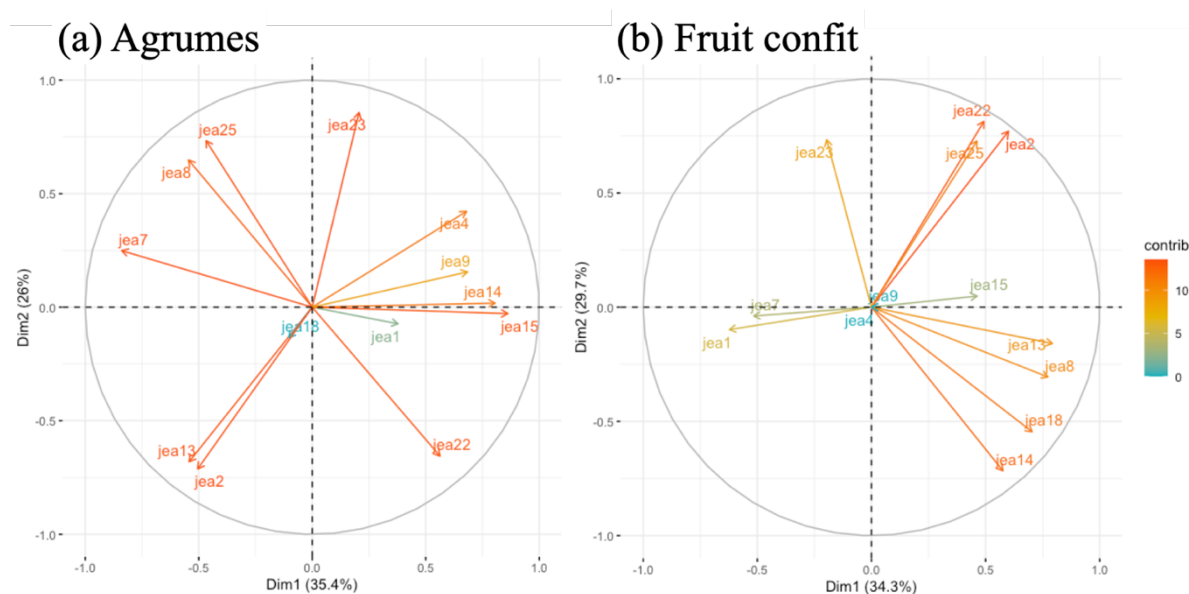


Figure 50 : Exemples de cercles de corrélation issus d'ACP. Figure (a), exemple d'un descripteur non-consensuel. Figure (b), exemple d'un descripteur plutôt consensuel. Les étiquettes « jea » suivies d'un chiffres représentent les numéros d'anonymat des panélistes

### II.1.2. Répétabilité dans la notation

Pour s'assurer de la répétabilité de notation en utilisant la fiche de dégustation, une eau-de-vie blanche a été dégustée deux fois au cours de la même séance. Au cours de cette séance, 7 eaux-de-vie blanches réduites à 40 % d'éthanol ont été proposées à la dégustation. L'ensemble des ordres a été décidé de manière équilibrée et chaque panéliste a reçu un ordre de dégustation obtenu aléatoirement selon un carré latin. Parmi les eaux-de-vie anonymisées, la même eau-de-vie a été présentée deux fois, se présentant ainsi sous deux nombres à 3 chiffres différents. Les profils de ces eaux-de-vie ont été établis pour les seuls descripteurs consensuels, pour l'olfaction et la rétro-olfaction (Figure 51).

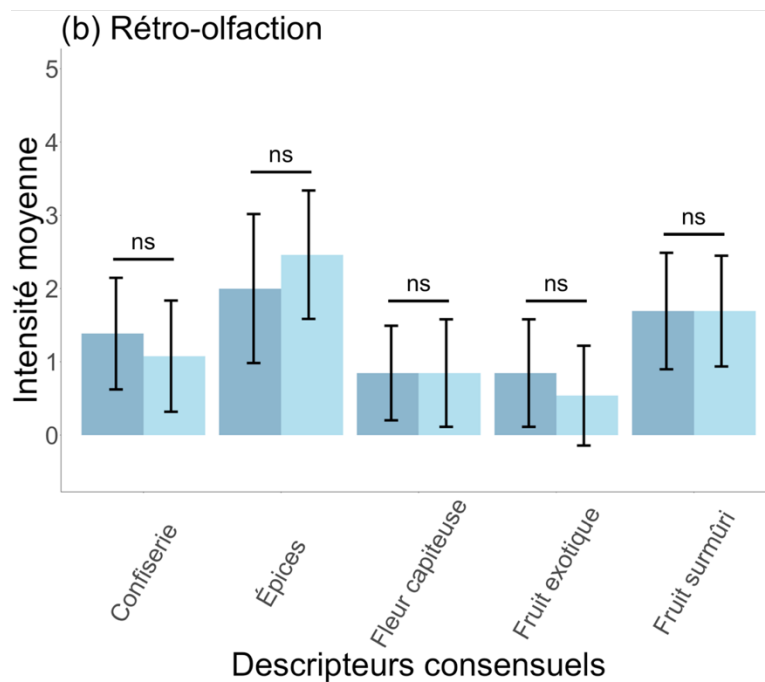
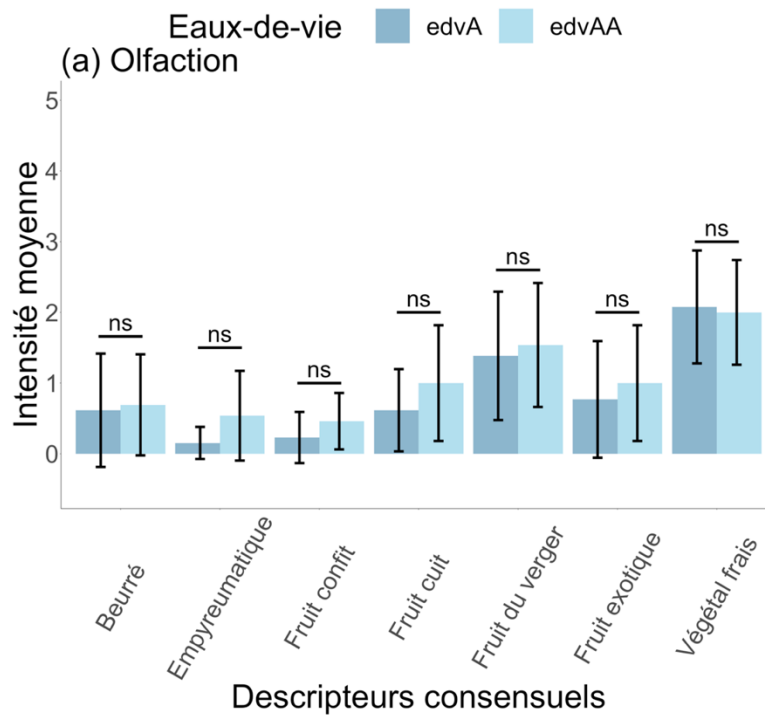


Figure 51 : Intensités moyennes des descripteurs (uniquement consensuels) de la même eau-de-vie répétée deux fois et anonymisée avec deux nombres à 3 chiffres (216 et 719). Figure (a), intensités moyennes des descripteurs consensuels en olfaction. Figure (b), intensités moyennes des descripteurs consensuels en rétro-olfaction. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95 %. Les segments horizontaux présents entre deux histogrammes représentent les tests de Student réalisés au risque  $\alpha$  de 5 %. Les lettres minuscules « ns » signifient qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités concernées. Les noms A et AA pour les eaux-de-vie ne correspondent pas aux numéros donnés aux panélistes mais sont présentés ici sous cette forme par lisibilité. Pour chaque descripteur et pour chaque eau-de-vie,  $n = 22$

L'analyse des profils établis pour la même eau-de-vie présentée deux fois au cours de la même séance, n'a montré pour l'olfaction (Figure 51a) et la rétro-olfaction (Figure 51b) aucune différence entre les deux échantillons de cette même eau-de-vie blanche réduite à 40 % d'éthanol (v/v). Il est à noter que pour l'olfaction, seulement 7 descripteurs étaient consensuels tandis que pour la rétro-olfaction, 5 descripteurs étaient notés de manière consensuelle par les panélistes. De ces absences de différences significatives pour les descripteurs consensuels, il est possible de conclure à une répétabilité intra-séance dans la notation par la fiche de dégustation. De plus, les descripteurs considérés ici ont tous présentés des moyennes d'intensité supérieures à 0, permettant d'exclure une notation consensuelle et répétable due à l'absence de description. Toutefois, plusieurs limites sont à noter. Sur les 16 descripteurs disponibles seuls 7 ont été notés de manière consensuelle pour la perception olfactive et 5 pour la perception rétro-olfactive, ce qui indique une difficulté à utiliser la fiche de dégustation et démontre encore une fois le besoin d'entraînement. De plus, les intervalles de confiance de la Figure 51 sont assez importants, indiquant une dispersion dans la notation par les panélistes. Ces observations tempèrent l'existence de la répétabilité identifiée.

### **II.1.3. Reproductibilité de la notation**

Afin d'évaluer une reproductibilité dans la notation des eaux-de-vie par la fiche de dégustation construite, les mêmes eaux-de-vie, dégustées à la séance permettant d'évaluer la répétabilité de la notation (page 174), ont été dégustées dans les mêmes conditions (même jour de la semaine, même heure de la journée dans la même salle). Ce furent donc 6 eaux-de-vie blanches des différentes variétés étudiées qui ont été dégustées. Chaque eau-de-vie était anonymisée avec un nombre à 3 chiffres, nombre qui différait de la séance précédente. Chaque panéliste ayant un ordre de dégustation aléatoire selon un carré latin (l'ensemble des ordres a été décidé de manière équilibrée). Encore une fois, les profils sensoriels, établis avec la fiche de dégustation (Figure 49), de ces eaux-de-vie ont été établis pour les seuls descripteurs consensuels, en rétro-olfaction uniquement, aucun descripteur consensuel commun aux deux séances n'ayant pu être isolé (Figure 52). Le Tableau 29 résume les comparaisons faites entre les deux séances.



Tableau 29 : Résumé des comparaisons proposées entre les eaux-de-vie blanches dégustées d'une séance à l'autre. Les couleurs correspondent à celles utilisées dans la Figure 52 afin de faciliter la lecture. Pour chaque variété, une comparaison comprend 3 eaux-de-vie, anonymisées différemment, dégustées pour s'assurer de la répétabilité de la notation. Les noms données aux eaux-de-vie ne sont pas les numéros anonymisés donnés aux panélistes

<b>Eaux-de-vie blanche</b>	<b>Séance C</b>	<b>Séance D</b>
	<b>A – AA</b>	<b>a</b>
Baco blanc	<b>B</b>	<b>b</b>
	<b>C</b>	<b>c</b>
	<b>D</b>	<b>d</b>
Ugni blanc	<b>E</b>	<b>e</b>
	<b>F</b>	<b>FF – f</b>

La Figure 52 permet d'illustrer l'absence de différence de notation entre des eaux-de-vie blanches identiques, dégustées à deux séances différentes et ce, pour 5 descripteurs consensuels communs entre les deux séances. Exception faite d'une paire d'eaux-de-vie (D et d) pour laquelle une différence significative est apparue pour le descripteur « Fruit surmûri ». Ce descripteur était le seul à ne pas être descriptif d'un ensemble d'un plus grand nombre de descripteur mais seulement d'une qualité de fruité. Cela pourrait expliquer la différence significative pour ce seul descripteur. De ces absences de différences significatives pour les descripteurs consensuels, il est possible de conclure à une reproductibilité dans la notation, d'une séance à une autre, par la fiche de dégustation. De plus, les descripteurs considérés ici ont tous présenté des moyennes d'intensité supérieures à 0, permettant d'exclure une notation consensuelle et reproductible due à l'absence de description. Enfin, concernant les trios d'eaux-de-vie, aucune différence significative n'a été identifiée, ni entre les eaux-de-vie dégustées lors de la même séance, ni entre celles dégustées à deux séances différentes, renforçant ainsi la conclusion sur la répétabilité de la notation établie au paragraphe (page 174). Toutefois, de la même manière que pour la répétabilité, certaines limites peuvent être relevées. Tout d'abord, le faible nombre de descripteurs consensuels. En effet entre les deux séances, seuls 5 descripteurs consensuels communs ont pu être identifiés posant la question de cette variabilité dans le consensus inter-séance. Encore une fois, les intervalles de confiance importants témoignent de la dispersion dans la notation des descripteurs. Enfin, seule la reproductibilité de la rétro-olfaction a pu être évaluée, aucun descripteur consensuel entre les deux séances considérées n'ayant pu être identifié.

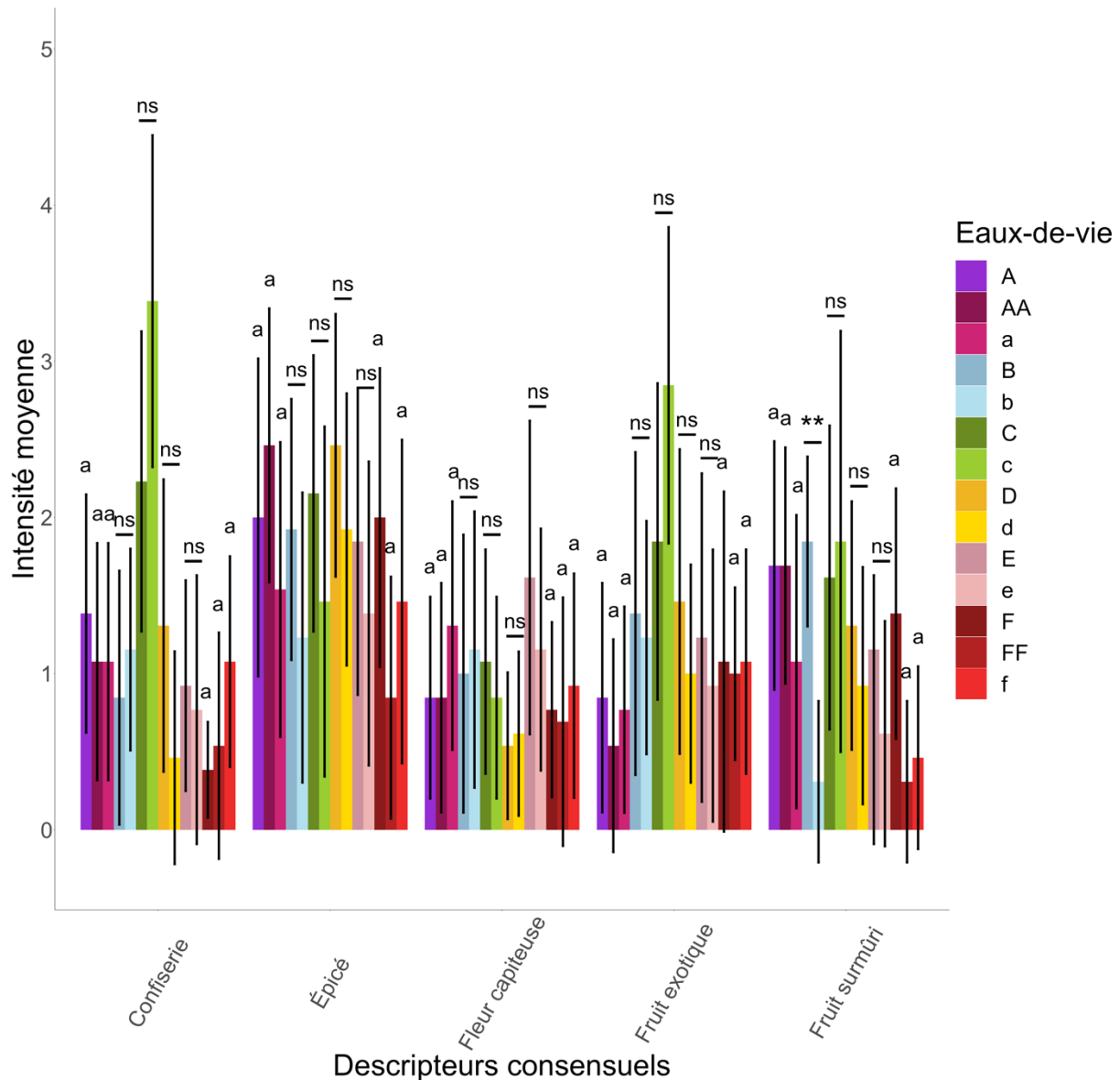


Figure 52 : Intensité moyenne des descripteurs (uniquement consensus) des mêmes eaux-de-vie, anonymisées différemment, dégustées à 2 séances différentes et uniquement en bouche. L'ANOVA réalisée n'a montré aucune significativité pour l'interaction descripteur-séance ( $p$ -value = 0,24). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95 %. Les segments horizontaux présents entre deux histogrammes représentent les tests de Student réalisés au risque  $\alpha$  de 5 %. Les lettres minuscules « ns » signifient qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités concernées. La double étoile représente une différence de signification dont la  $p$ -value est inférieure à 0,01. Les lettres minuscules noires sont issues de tests de Newman-Keuls au seuil de risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des groupes statistiques significativement différents. Afin de faciliter la lecture, les eaux-de-vie comparées entre elles sont représentées par des couleurs similaires et nuancées. L'ensemble des comparaisons (couple d'eaux-de-vie) est résumé dans le Tableau 29. Pour chaque descripteur et pour chaque eau-de-vie,  $n = 22$

## II.2. Tentative de discrimination des eaux-de-vie blanches

Le but premier de la fiche de dégustation était de permettre la description d'un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc et ainsi de les discriminer des eaux-de-vie blanches d'Ugni blanc et de Folle blanche. Pour 4 séances de 2022, au cours desquelles la fiche de dégustation a été utilisée, des CAH ont été générées afin d'évaluer la proximité entre les eaux-de-vie blanches et ainsi pouvoir observer une potentielle similarité entre des produits de même variété (Figure 53 et Figure 54). Ne sont présentés ici que deux exemples représentatifs d'un ensemble de résultats disponible à l'Annexe 7.

Séance C - Olfaction

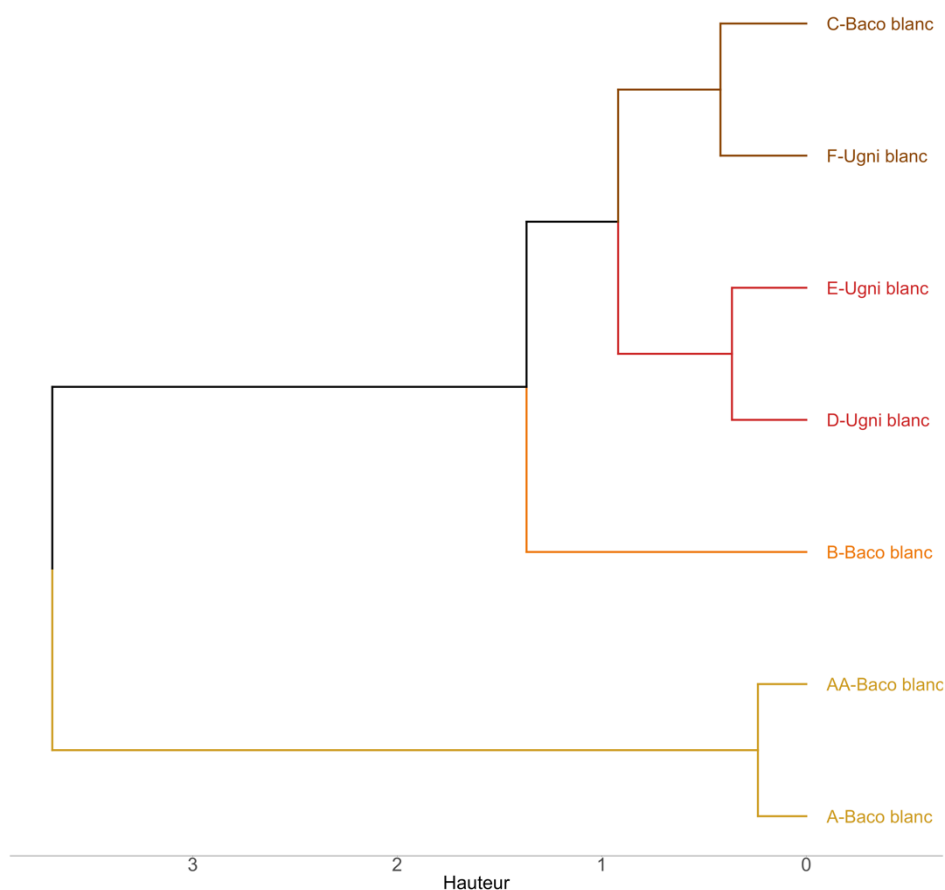


Figure 53 : Classification Ascendante Hiérarchique des eaux-de-vie blanches dégustées au cours de la séance C et générée uniquement pour les descripteurs consensuels (« Beurré », « Emphyreumatique », « Fruit confit », « Fruit cuit », « Fruit du verger », « Fruit exotique », « Végétal frais ») et pour l'analyse par olfaction uniquement. Les eaux-de-vie A et AA sont en fait la même eau-de-vie anonymisée de deux manières différentes. Les différentes couleurs représentent les groupes formés par la CAH

L'analyse des CAH produites a permis de dégager une réelle difficulté à discriminer les eaux-de-vie par leur variété. En effet concernant l'olfaction directe (Figure 53), les eaux-de-vie C et F ont été regroupées alors qu'elles sont issues de deux variétés différentes (Baco blanc et Ugni blanc). De plus, d'autres eaux-de-vie blanches de Baco blanc ont été rassemblées dans d'autres groupes alors qu'elles partagent la variété comme trait commun. Cependant, il est à noter que les eaux-de-vie A et AA sont rassemblées dans le même groupe. S'agissant de la même eau-de-vie, il y a là une preuve d'une certaine capacité de la fiche de dégustation, utilisée avec ce panel de professionnels, à permettre une répétabilité intra-séance dans la notation des eaux-de-vie. De plus, la variabilité dans le regroupement des eaux-de-vie peut également s'expliquer par la variabilité même de la production d'eau-de-vie blanche d'une même variété. Pouvant ainsi introduire la question de plusieurs typicités pour les eaux-de-vie de Baco blanc.

Séance C - Rétro-olfaction

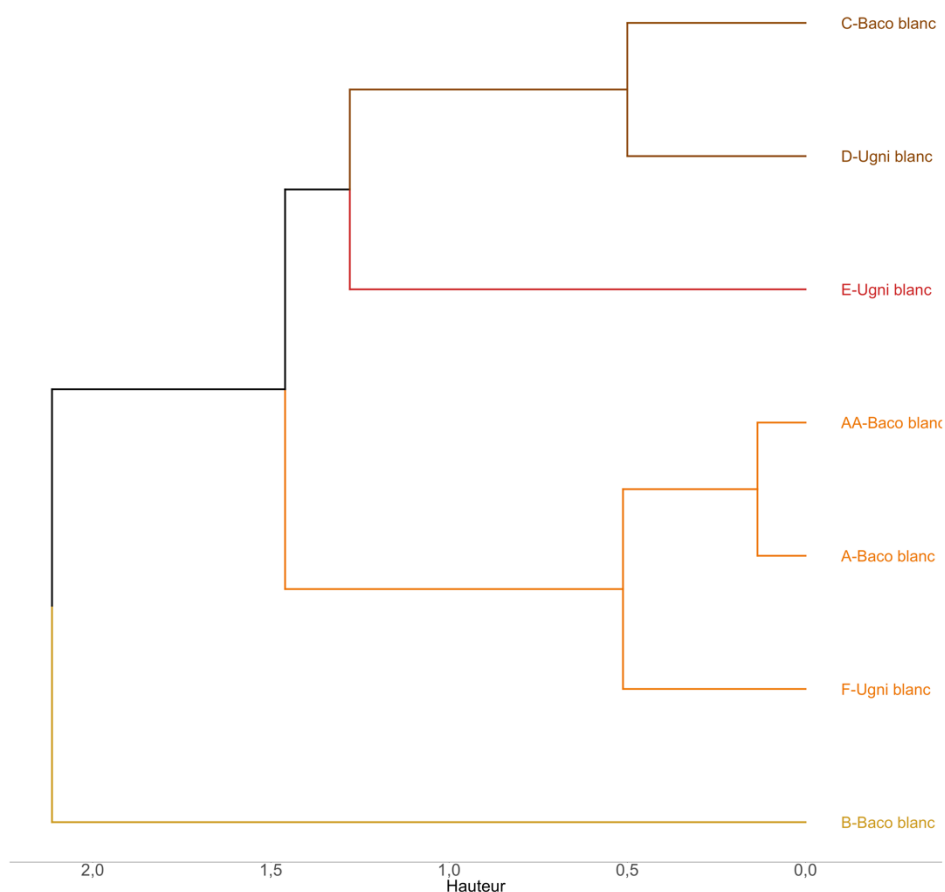


Figure 54 : Classification Ascendante Hiérarchique des eaux-de-vie blanches dégustées au cours de la séance C. CAH générée uniquement pour les descripteurs consensuels (« Beurré », « Fruit confit », « Fruit du verger », « Fruit exotique », « Végétal frais ») et pour l'analyse par rétro-olfaction uniquement. Les eaux-de-vie A et AA sont en fait la même eau-de-vie anonymisée de deux manières différentes. Les différentes couleurs représentent les groupes formés par la CAH

En prenant en compte la rétro-olfaction (Figure 54), un constat similaire à l'olfaction peut être effectué. En effet, la même difficulté de rassemblement des eaux-de-vie d'une même variété a été observée : les eaux-de-vie C et D ont été regroupées alors qu'il s'agit respectivement de produits de Baco blanc d'une part et d'Ugni blanc d'autre part. De la même manière, l'Ugni blanc F a été rassemblé avec les Baco blanc A et AA. Deux eaux-de-vie ont constitué chacune un groupe à part entière sans être rapprochée d'eaux-de-vie de même variété, il s'agissait de l'Ugni blanc E et du Baco blanc B. Cependant, les eaux-de-vie A et AA, identiques, ont bien été rassemblées dans le même groupe.

La difficulté à rassembler les eaux-de-vie blanches d'une même variété au sein d'un même groupe a donc été observée, à la fois en olfaction directe et en rétro-olfaction. Cette tendance a été retrouvée au cours des 4 séances réalisées avec le panel de professionnel, dont les résultats sont disponibles à l'Annexe 7. Il est également apparu, que les regroupement réalisés en olfaction et en rétro-olfaction n'étaient pas identiques, étant sous-entendu que les deux notations, par olfaction et rétro-olfaction, ont produit des profils d'eaux-de-vie distincts.

### **III. Analyse sémantique des termes associés aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc**

L'utilisation de la fiche de dégustation avait deux objectifs principaux : discriminer les eaux-de-vie de Baco blanc par rapport aux autres variétés (Ugni blanc et Folle blanche) mais également de décrire un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Ce dernier aspect a été travaillé d'une autre manière et en parallèle de l'utilisation de la fiche. Comptant sur l'expérience acquise du panel au cours de l'ensemble des dégustations, des descriptions libres d'eaux-de-vie blanches ont été proposées au panel.

Lors d'une séance, 6 eaux-de-vie ont été données à déguster au nez et en bouche, de manière anonyme, aux panélistes professionnels du BNIA. Parmi elles, 3 étaient issues d'Ugni blanc et les 3 autres de Baco blanc. Ici la Folle blanche n'est pas incluse, la production d'eau-de-vie reste modeste pour ce cépage. Il a été demandé aux dégustateurs de décrire librement (sans notation), avec l'aide de la fiche complémentaire de dégustation (Annexe 6) les 6 eaux-de-vie qui leur ont été présentées dans un ordre aléatoire selon un carré latin pour chacun (l'ensemble des ordres de dégustation était équilibré). Les 6 produits ont été sélectionnés par un dégustateur expert des eaux-de-vie blanches d'Armagnac issu du BNIA, capable de définir si ces dernières étaient représentatives de la diversité des eaux-de-vie de Baco blanc et d'Ugni blanc.

Sur la base de ces descriptions libres, la fréquence d'occurrence des termes générés a été calculée par variété (Figure 55).

De l'analyse des fréquences d'occurrence (Figure 55), il est apparu que les eaux-de-vie blanches de Baco blanc étaient principalement décrites par le descripteur « banane » (10,9 %) quand les eaux-de-vie d'Ugni blanc étaient, elles, décrites majoritairement par le descripteur « poire » (8,4 %). Il est également apparu que les eaux-de-vie blanches de Baco blanc étaient également décrites par des descripteurs évoquant des nuances de cuisson : « pâtissier » (5,9 %) et « banane cuite » (4,1 % ; toutefois retrouvé chez l'Ugni blanc à 3,16 %) mais également des notes d' « épices » (2,9 %). Les eaux-de-vie d'Ugni étaient davantage décrites par des descripteurs floraux (4,2 %) ainsi qu'un nombre important de descripteurs de fruits : « fruits du verger » (2,8 %), « mandarine » (2,8), « fruits exotiques » (2,5 %).

Cette importante représentation des descripteurs liés à la banane et ses nuances mais également, des descripteurs liés aux épices, dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc, ont permis d'imaginer un travail autour du rôle potentiel de l'eugénol sur ces notes de banane. En effet si le descripteur « banane » peut servir à décrire des eaux-de-vie blanches d'Ugni blanc (3,5 %), il est possible d'envisager que la présence spécifique de l'eugénol dans les produits de Baco blanc puisse interagir avec les marqueurs moléculaires de ces notes de banane et ainsi, participer à la spécificité aromatique des eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Cela donnerait un sens aux notes « amyliques » plus intenses dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc, évoquées dans l'introduction de ce chapitre (0). Ces interactions pourraient être une part importante de la définition de l'espace sensoriel propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc.

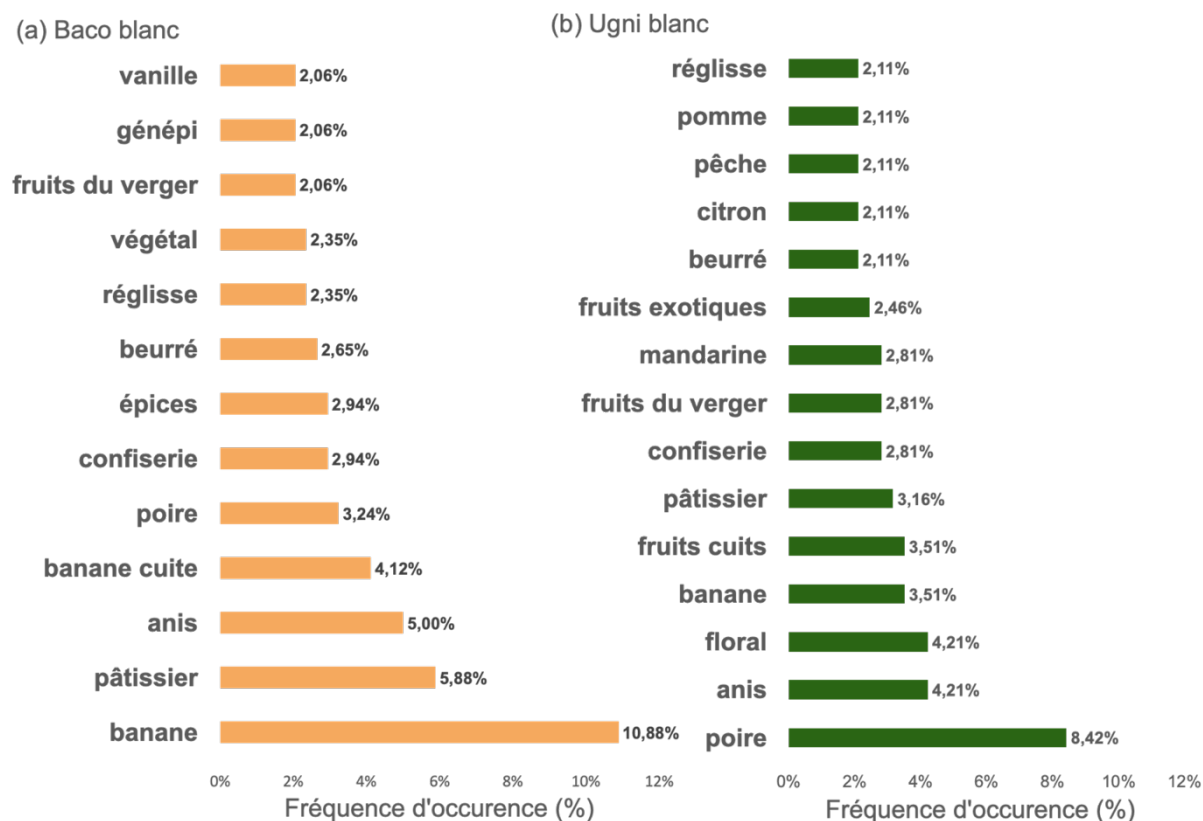


Figure 55 : Fréquences d'occurrence des descripteurs générés lors d'une description libre d'eaux-de-vie blanches de Baco blanc et d'Ugni blanc. Figure (a), fréquence d'occurrence des descripteurs générées lors de la dégustation olfactive et rétro-olfactive de 3 eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Figure (b), fréquence d'occurrence des descripteurs générées lors de la dégustation olfactive et rétro-olfactive de 3 eaux-de-vie blanches d'Ugni blanc. Les descripteurs dont la fréquence d'occurrence était inférieure à 2 % ont été supprimés

#### IV. Les forces et limites de la fiche de dégustation ainsi que de l'usage du panel de professionnels

Le développement d'une fiche de dégustation propre aux eaux-de-vie blanches a été un travail mené durant 3 années consécutives et en lien fort avec les panélistes professionnels du BNIA. La construction de cet outil a été relativement longue (2 ans) et son utilisation s'est cantonnée à la dernière séquence d'analyse sensorielle en 2023. Cette fiche avait pour but de faciliter la définition d'un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc, en discriminant leurs profils des eaux-de-vie blanches issues des autres variétés étudiées, la Folle blanche et l'Ugni blanc. Une validation de la fiche de dégustation a été menée. S'il est apparu que dans un certain cadre, la fiche pouvait permettre de présenter une certaine répétabilité et reproductibilité, cela reste très perfectible pour ne pas dire trop restreint.

L'appropriation de la fiche par les panélistes est une temporalité à prendre en compte dans l'amélioration de ces paramètres de validation. Cependant, la difficulté observée à réaliser le travail de discrimination des eaux-de-vie, et donc à la définition d'un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc, peut être imputable en partie aux limites de l'outil développé dans ce chapitre. En effet, dans la construction même de la fiche, la génération de vocabulaire par les panélistes n'a pas été suivie d'un entraînement sur les descripteurs générés, avec des solutions modèles et représentatives de ces descripteurs. En poursuivant sur la construction de la fiche, la première étape de regroupement a été réalisée à l'aide de la bibliographie (Noble *et al.*, 1984). Cette dernière a été développée pour les vins tandis que la fiche ainsi décrite l'a été pour les eaux-de-vie blanches. De plus certains descripteurs générés par les panélistes ne correspondaient à aucune catégorie proposée par Noble. Il a donc fallu en créer d'autres. En complément, certains descripteurs faisaient référence à une aromatique boisée, fait paradoxal s'il en est puisque le propre des eaux-de-vie blanches est de ne pas avoir subi d'élevage en barrique. D'autre part, le nombre encore important de descripteurs, 16, peut également représenter une difficulté supplémentaire dans l'analyse de produits à fortes teneurs en éthanol ( $\geq 40$  % (v/v)). D'autant plus que chaque descripteur était analysé au nez et en bouche, ce qui pouvait augmenter la fatigue sensorielle due à l'éthanol. Cependant 4 descripteurs (sur 16) ont présenté des intensités moyennes très faibles ( $< 0,8$ ) : « Beurré », « Empyreumatique », « Fleur blanche » et « Fruit confit ». Il serait alors possible de questionner leur pertinence et proposer leur suppression. Enfin, concernant les panélistes, ils ont exprimé une difficulté à utiliser l'échelle discontinue malgré leur préférence affichée pour celle-ci. Outre une simplification de la fiche ainsi construite l'amélioration du travail et la pertinence des résultats avec cet outil passera par une meilleure appropriation par le panel et donc à de l'entraînement important et régulier.



## Chapitre 3 : L'eugénol peut-il contribuer à la caractérisation des eaux-de-vie blanches de Baco blanc ?

### I. Lien entre typicité du Baco blanc et concentration en eugénol

Si la fiche de dégustation devait permettre la discrimination des eaux-de-vie blanches entre elles (entre les variétés) et la définition d'un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc, elle ne permettait pas l'investigation de l'influence que pourrait avoir l'eugénol sur la spécificité de ces dernières.

Afin de définir la place que pourrait occuper l'eugénol dans la caractérisation des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, une première étape a été d'observer le lien unissant la concentration en eugénol de 20 eaux-de-vie blanches, réduites à 50 % d'éthanol (v/v), dont 16 de Baco blanc, 2 de Folle blanche et 2 d'Ugni blanc, et la notation de typicité de ces eaux-de-vie, assurée par le panel de professionnels du BNIA (Figure 56). Les 20 eaux-de-vie ont été présentées aux panélistes dans un ordre aléatoire selon un carré latin, pour chaque dégustateur, et ce de manière équilibrée. La question qui leur était posée était :

*« Cette eau-de-vie présente-t-elle l'une des caractéristiques aromatiques essentielles d'un armagnac de Baco blanc ? ».*

Cette question a été choisie car le caractère de typicité qu'elle peut évoquer est apparu comme difficile à appréhender par les panélistes (suites à des discussions avec eux). Les panélistes avaient à disposition une fiche comportant une échelle continue, de 10 cm, bornée de « mauvais exemple » à gauche (note de 0) à « bon exemple » à droite (note de 10) pour répondre à la question posée. Les eaux-de-vie ont été seulement dégustées par olfaction afin de réduire la fatigue sensorielle étant donné le nombre important d'échantillons à déguster. En préambule, la notation d'eaux-de-vie blanches de Folle blanche et d'Ugni blanc avait pour but la notation d'échantillon qui pourrait être qualifié de témoin négatif. Autrement dit, il était attendu que les produits de Folle blanche et d'Ugni blanc, très peu concentrés en eugénol ( $< 25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), présentent des notes de typicité Baco blanc, « faible » à « très faible ». Si cela a été le cas pour 3 d'entre elles (les 2 Ugni blanc et une Folle blanche), qui ont présentés des notes de typicité inférieures à 13 eaux-de-vie de Baco blanc (note  $< 5$ ), une eau-de-vie de Folle blanche a présenté une note de typicité moyenne égale à  $6,8 \pm 3,3$  ce qui la classait parmi les 4 eaux-de-vie

considérées comme les plus typiques. Certaines eaux-de-vie de Folle blanche pourraient donc être sensoriellement proche des eaux-de-vie de Baco blanc, ce qui les rendraient plus difficile à discriminer.

Une corrélation positive ( $p$ -value = 0,04) entre la note de typicité moyenne, attribuée par le panel de professionnels du BNIA, aux eaux-de-vie blanches et leur concentration en eugénol a pu être établie (Figure 56). Cette corrélation, certes modeste mais existante ( $R = 0,12$ ), a permis d'imaginer l'implication de l'eugénol dans la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Il est tout de même à noter qu'il existe une variabilité importante de style d'eau-de-vie au sein même de la variété Baco blanc. Comme déjà évoqué précédemment, si les panélistes reconnaissent oralement une spécificité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, les descripteurs cités sont parfois variables, assimilables parfois à des notes « végétal », de « lourdeur » ou encore de « fruit surmûri », et par d'autres encore comme « épice ». Cette différence dans les descripteurs aromatiques peut être le signe de cette variabilité de style.

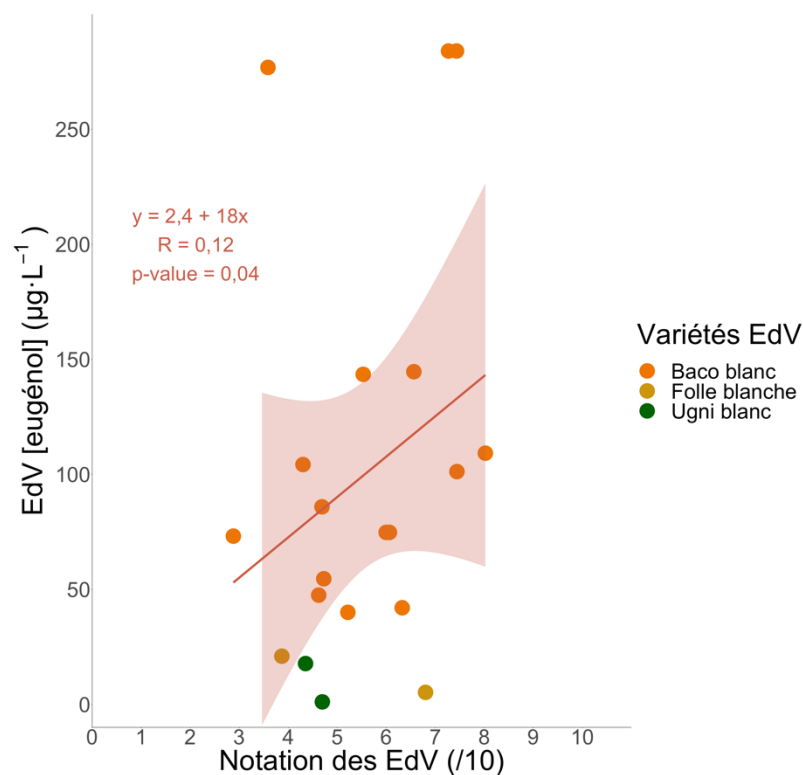


Figure 56 : Corrélation entre la note de typicité moyenne attribuée aux eaux-de-vie blanches (n=20) par le panel de professionnels du BNIA et leur concentration en eugénol

## II. Influences directe et somesthésique de l'eugénol

### II.1. Influence directe

Si le seuil de détection de l'eugénol dans une matrice hydroalcoolique à 12 % d'éthanol est connu et a pour valeur  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Cameleyre, 2017), des travaux préliminaires à cette thèse ont permis d'établir 3 nouveaux seuils de détection de l'eugénol dans des matrices à fortes teneur en éthanol. En effet, dans des solutions hydroalcooliques à 40 et 58 % d'éthanol (v/v), les seuils respectifs de l'eugénol étaient de 12 et  $58 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Tandis que pour une matrice eau-de-vie, plus complexe par essence, ce seuil de détection atteignait  $606 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . L'eau-de-vie blanche utilisée alors pour la détermination de ce seuil était un produit d'Ugni blanc présentant un TAV de 60 % (v/v) (Monsant, 2020). En comparant ces valeurs de seuils, à la concentration maximale d'eugénol égale à  $317 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  observée pour les eaux-de-vie de l'ensemble des millésimes observés durant 3 ans (2020, 2021 et 2022), il apparaît alors difficile d'envisager une influence orthonasale directe de l'eugénol sur les caractéristiques aromatiques des eaux-de-vie blanches de Baco blanc.

### II.2. Influence somesthésique

L'influence somesthésique de l'eugénol a été recherchée en se basant sur les discussions avec les panélistes. Ces derniers ont donné la description des sensations gustatives et somesthésiques d'une eau-de-vie blanche de Baco blanc. Pour eux, ces dernières apparaissent plus « volumineuses », plus « longues », plus « rondes » et plus « douces ». Étant donné l'importante concentration reconnue d'eugénol dans les eaux-de-vie de Baco blanc comparativement aux eaux-de-vie blanches de Folle blanche et d'Ugni blanc, l'hypothèse de l'eugénol comme responsable de ces caractéristiques somesthésiques et gustatives a été avancée.

Ces travaux menés au cours de l'année 2022 ont été menés en collaboration avec une étudiante de Master 2 Sciences de la Vigne et du Vin de l'ISVV, Julia Canac. Afin d'étudier les potentielles influences somesthésique et/ou gustative de l'eugénol en dégustation de matrices alcoolisées (ramenées à 40 % d'éthanol (v/v)), plusieurs tests triangulaires ont été conduits au cours de différentes séances avec le panel de professionnels du BNIA (Tableau 30). Les concentrations d'eugénol testées alors étaient au moins égales au maximum des concentrations en eugénol qu'il est possible d'observer dans une eau-de-vie blanche de Baco blanc ( $\sim 300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et ont pu atteindre jusqu'à 20 fois la concentration maximale, soit  $6 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

L'objectif de ces tests employant des doses hyperboliques était d'être certain d'observer un effet somesthésique et/ou gustatif de l'eugénol si existant. De plus, l'ensemble des produits a été dégusté en verres opaques noirs (ISO 8589 : 2010) et les panélistes portaient des pince-nez afin de ne se concentrer sur les sensations gustatives et/ou somesthésiques uniquement. S'il est vrai que l'utilisation d'un pince-nez peut être perturbant pour un dégustateur, les panélistes ont toutefois été plusieurs fois habitués à son utilisation (2 séances d'appréhension).

Tableau 30 : Résumé des tests triangulaires réalisés afin de déterminer une potentielle influence gustative et/ou somesthésique de l'eugénol lors de la dégustation de matrices fortement alcoolisées. L'ensemble des présentations possibles pour un test triangulaire a été présenté au panel de professionnels du BNIA, de manière équilibrée

Série de test triangulaire	Produit A ou B	Produit A ou B
Solution hydroalcoolique (SHA)	SHA	SHA + 6 mg·L <sup>-1</sup> eugénol
	eUB	eUB + 0,3 mg·L <sup>-1</sup> eugénol
Eau-de-vie d'Ugni blanc (eUB)	eUB	eUB + 0,6 mg·L <sup>-1</sup> eugénol
	eUB	eUB + 3 mg·L <sup>-1</sup> eugénol
	eUB	eUB + 6 mg·L <sup>-1</sup> eugénol

Aucune différence significative n'a pu être observée sur l'ensemble des tests réalisés. Il est donc apparu que des influences somesthésique et/ou gustative de l'eugénol, lors de la dégustation d'eau-de-vie blanche pouvaient être exclues. Du moins, l'eugénol ne semble pas avoir d'influence lors de la mise en bouche d'une eau-de-vie blanche y compris à des doses très élevées.

### III. La mise en évidence d'une interaction perceptive avec l'acétate d'isoamyle

Les influences significatives directes, gustative et/ou somesthésique de l'eugénol ont donc été exclues. Cependant ce dernier semble tout de même participer à la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, comme il vient d'être montré. Il a donc été envisagé la possibilité que l'eugénol soit compris dans des interactions perceptives. L'analyse du vocabulaire généré lors d'une description libre d'eaux-de-vie blanches de Baco blanc (Figure 55), démontre l'importance des descripteurs liés à la banane. Le marqueur moléculaire connu pour ce descripteur dans les eaux-de-vie blanches est l'acétate d'isoamyle. Les concentrations en cet ester dans les différentes eaux-de-vie dégustées en 2022 sont disponibles à la Figure 48.

La recherche d'une possible interaction perceptible entre l'eugénol et l'acétate d'isoamyle a été menée en collaboration avec une étudiante de Master 2 Sciences de la Vigne et du Vin de l'ISVV, Émilie Paudois.

### III.1. L'interaction perceptible entre l'eugénol et l'acétate d'isoamyle

La mise en évidence de cette interaction a été réalisée à l'aide d'un panel qualifié (Chapitre 2 :I.2). En effet, ce genre de travail ne nécessite pas un panel de professionnels. Des tests triangulaires ont été proposés aux panélistes de manière équilibrée. Deux types de solutions ont été présentés aux dégustateurs : des solutions hydroalcooliques à 40 % (v/v) contenant  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  d'acétate d'isoamyle et des solutions hydroalcooliques à 40 % (v/v) contenant  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  d'acétate d'isoamyle ajoutées de  $150 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol. Ces concentrations, en eugénol, faisaient partie des derniers quartiles observées dans le Baco blanc. Il est apparu que sur les 24 panélistes ayant participé à ces tests, 13 ont détecté le verre différent. Il est donc possible de conclure, à une différence significative, selon la loi binomiale au risque  $\alpha$  de 5 %, de perception entre, les molécules étudiées seules et le mélange des deux. Cette observation est valable pour la matrice constituée d'une solution hydroalcoolique à 40 % (v/v) et pour les concentrations étudiées.

### III.2. Effet quantitatif de l'eugénol sur la perception de l'acétate d'isoamyle

L'interaction entre eugénol et acétate d'isoamyle ayant été détectée, l'évaluation d'un potentiel effet quantitatif de l'eugénol sur la perception de l'acétate d'isoamyle a été étudié. Il s'agissait de déterminer à quel seuil l'interaction, entre les deux molécules, était perceptible. Deux nouveaux seuils de perception ont donc été calculés selon la méthode ascendante à choix forcé 3-AFC (norme NF ISO 13301 : 2018) par le panel de l'ISVV (Tableau 31). D'abord le seuil de détection de l'acétate d'isoamyle dans une solution hydroalcoolique à 40 % (v/v), puis le seuil de l'acétate d'isoamyle dans une solution hydroalcoolique à 40 % (v/v) additionnée de  $150 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol ont été déterminés.

Tableau 31 : Concentrations testées pour la détermination des seuils de perception de l'acétate d'isoamyle en solution hydroalcoolique à 40 % (v/v)

Matrices	Concentrations d'acétate d'isoamyle ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )								Seuils de perception ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
SHA 40 % (v/v)	39	78	156	313	625	1250	2500	5000	394
SHA 40 % (v/v) + $150 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'eugénol	39	78	156	313	625	1250	2500	5000	468

La comparaison des deux seuils obtenus, à savoir celui de l'acétate d'isoamyle seul et celui de l'acétate d'isoamyle additionné d'eugénol, par la méthode BET (E18 Committee, 2019), n'a pas permis d'observer une différence significative entre les deux seuils, compris dans la même gamme de concentrations. Semblant ainsi exclure un effet quantitatif (synergie ou masquage) de l'eugénol sur l'acétate d'isoamyle. Une observation qui reste valable, au minimum, pour la concentration testée d'eugénol.







### **III.3. Effet qualitatif de l'eugénol sur la perception de l'acétate d'isoamyle**

#### **III.3.1. Sensibilisation du panel à plusieurs notes aromatiques de banane**

Afin de définir l'influence qualitative que l'eugénol pourrait opérer sur l'acétate d'isoamyle, en lien avec les descripteurs utilisés pour décrire les eaux-de-vie blanches de Baco blanc, une sensibilisation des panélistes, s'inspirant de la norme ISO 8586 : 2014 portant sur la sélection et l'entraînement d'un panel, a été effectuée sur différentes notes aromatiques de banane : banane verte, banane mûre, banane surmûrie, banane cuite, banane séchée et bonbon à la banane. Pour cela, des solutions de référence ont été préparées (Tableau 32).

Les solutions de référence, telles que résumées dans le Tableau 32, ont été présentées aux panélistes professionnels du BNIA, à chaque début de 3 séances d'analyse sensorielle. Cette sensibilisation a été complétée d'une familiarisation à l'utilisation d'une échelle continue bornée. Pour cela, le citral ((2E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-diène) a été choisie comme arôme modèle car jugé suffisamment éloigné des notes de banane à travailler. Ce sont donc 4 solutions de citral qui ont été préparées dans une solution hydroalcoolique à 40 % (v/v) pour représenter 4 niveaux d'intensité perçue de citron (faible, intermédiaire faible, intermédiaire forte et forte). Les panélistes du BNIA ont été invités à sentir les 4 solutions en connaissant la note attribuée, ceci afin de faciliter la normalisation de la notation par les panélistes.

Tableau 32 : Résumé des différentes solutions de référence utilisées pour la sensibilisation du panel. L'ensemble des préparations a été filtré. Les solutions, exceptée celle de bonbon à la banane, ont été ajoutées de SO<sub>2</sub> à 1 mg·L<sup>-1</sup> ainsi que d'acide ascorbique à 5 mg·L<sup>-1</sup> afin de les conserver sans altérer leurs qualités aromatiques. Le séchage des banane a été réalisé avec un déshydrateur alimentaire Fruit Jerky Steel 10 (Chal-Tec GmbH, Strasbourg, France) . Toutes les solutions ont été préparées à la veille de la séance de dégustation et conservées à 4 °C dans des bouteilles en verres de 75 cL, inertées au diazote

Note aromatique	Images	Produit utilisé	Maturité (couleur)	Préparation
Banane verte			Verte	100 g coupés en morceaux et macérés dans 450 mL de SHA 40 % pendant 6 heures sous agitation (150 rpm)
Banane mûre			Jaune	
Banane surmûrie		Marque : « Bio Village » Origine : Rép. Dominicaine Espèce : Cavendish Calibre 2 Catégorie 14	Jaune-noircie	
Banane cuite			Jaune	
Banane séchée			Jaune	
Bonbon à la banane		Banan's® Haribo		

### III.3.2. L'effet qualitatif de l'eugénol en matrice simplifiée

Dans un premier temps, 3 solutions hydroalcooliques à 40 % (v/v) ont été présentées au panel : la première contenait uniquement 5 mg·L<sup>-1</sup> d'acétate d'isoamyle, la deuxième contenait uniquement 150 µg·L<sup>-1</sup> d'eugénol et la dernière contenait un mélange de 5 mg·L<sup>-1</sup> d'acétate d'isoamyle et 150 µg·L<sup>-1</sup> d'eugénol. Les solutions ont été présentées anonymisées et dans un ordre aléatoire et équilibré à l'ensemble des panélistes. À l'aide d'une échelle linéaire bornée, les dégustateurs devaient noter le niveau d'intensité perçue pour les 6 notes aromatiques de banane. Seul le descripteur « bonbon à la banane » est apparu comme consensuel et a présenté des différences significatives entre les produits (Figure 57).

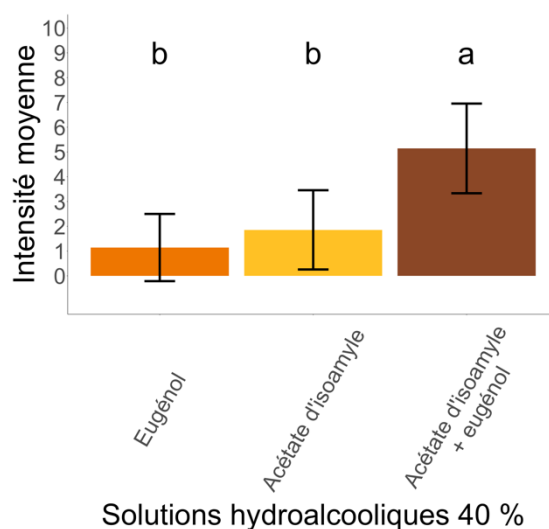


Figure 57 : Intensités moyennes perçues des différentes solutions hydroalcooliques à 40 % contenant soit de l'eugénol, soit de l'acétate d'isoamyle, soit un mélange des deux. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque solution,  $n = 22$

L'eugénol a donc bien semblé induire une augmentation significative de la perception de l'acétate d'isoamyle, en considérant uniquement la notation du descripteur « bonbon à la banane ». En effet, le mélange acétate d'isoamyle et eugénol a été perçu plus intensément (5,1) que l'acétate d'isoamyle et l'eugénol seuls en matrice hydroalcoolique à 40 %, avec des intensités moyennes respectives de 1,9 et de 1,1.

À la fin de l'exercice, une discussion a été engagée avec les panélistes. Ces derniers ont fait part de leur difficulté à noter les différents descripteurs de banane. Ils ont mis en avant l'aspect très simplifié des solutions.

### III.3.3. L'effet qualitatif de l'eugénol en matrice eau-de-vie blanche

Une eau-de-vie de Baco blanc a été sélectionnée pour ses faibles concentrations en eugénol ( $55 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et en acétate d'isoamyle ( $1,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Cette eau-de-vie a été réduite à 40 % d'éthanol (v/v) et supplémentée en eugénol et en acétate d'isoamyle afin d'être présentée aux panélistes professionnels du BNIA, selon les modalités résumées dans le Tableau 33. Les concentrations



en acétate d'isoamyle choisies correspondaient à des valeurs proches du premier quartile, de la médiane et du troisième quartile. La sélection des concentrations en eugénol a été réalisée en se concentrant sur des valeurs moyennes et hautes (moyenne et valeurs du troisième et dernier quartiles). Les deux séries présentées aux panélistes avaient pour but d'évaluer l'influence de l'eugénol sur l'acétate d'isoamyle et vice et versa.

Tableau 33 : Séries d'eaux-de-vie de Baco blanc supplémentées en eugénol et en acétate d'isoamyle afin d'évaluer l'influence d'une molécule sur l'autre, pour la notation d'intensité perçue de certains descripteurs de banane

Série	Solutions	Eugénol ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Acétate d'isoamyle ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Série 1	edvBB	55	1,2
	edvBB_AI	55	3,2
	edvBB+AI+eug100	100	1,2
	edvBB+AI+eug150	150	1,2
	edvBB_AI_eug200	200	1,2
Série 2	edvBB	55	1,2
	edvBB_eug	150	1,2
	edvBB+eug+AI1,8	150	1,8
	edvBB+eug+AI3,2	150	3,2
	edvBB+eug+AI5,3	200	5,3

Après discussion avec le panel, seuls 3 descripteurs de banane ont été jugés pertinents et conservés : « bonbon à la banane », « banane cuite » et « banane mûre ». Cette réduction des descripteurs a également permis de réduire la fatigue des dégustateurs. Ces derniers avaient à disposition une fiche de dégustation par descripteur, comportant 6 échelles linéaires bornées représentant l'ensemble des eaux-de-vie d'une série à déguster de manière olfactive seulement. L'ordre des descripteurs, des séries et eaux-de-vie d'une série ont été présentés, à chaque panéliste, dans un ordre aléatoire. Ordres équilibrés sur l'ensemble du panel.

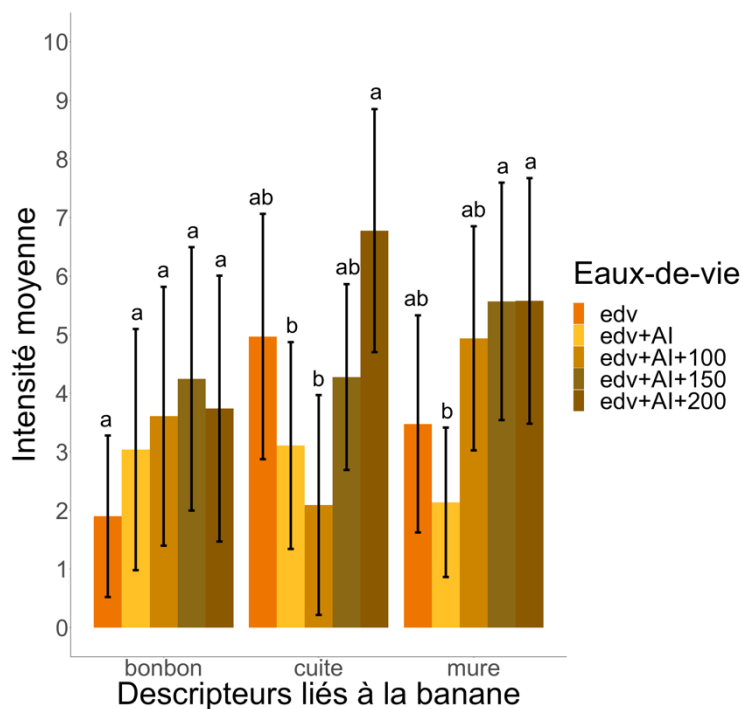


Figure 58 : Intensités moyennes perçues des différentes eaux-de-vie, réduites à 40 % d'éthanol (v/v), supplémentées soit en eugénol, soit en acétate d'isoamyle, soit un mélange des deux. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Les tests statistiques ont été réalisés par descripteur. Pour chaque descripteur et chaque eau-de-vie,  $n = 22$

Seule la série 1, autrement dit avec un ajout fixe d'acétate d'isoamyle et des ajouts croissants d'eugénol, a autorisé l'observation de différence entre eaux-de-vie (Figure 58). En effet, les descripteurs dans cette série seulement ont été jugés consensuels. Pour le descripteur « bonbon à la banane », aucune différence significative entre les eaux-de-vie n'a pu être décelée. L'eau-de-vie sans ajout (edv) a présenté une intensité moyenne perçue pour ce descripteur égale à 1,9. Une augmentation tendancielle peut être observée avec l'ajout d'acétate d'isoamyle (edv+AI) induisant une intensité moyenne perçue de 3,0 mais également avec l'ajout d'acétate d'isoamyle et de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol portant à 3,6 l'intensité moyenne. Cette augmentation de l'intensité est également observée avec l'ajout de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol (edv+AI+150), menant à une valeur de 4,2. L'ajout de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol (edv+AI+200) a conduit à une augmentation moyenne de l'intensité moyenne perçue, par rapport à l'eau-de-vie sans ajout, portant la valeur à 3,7.

Pour le descripteur « banane cuite », des différences significatives entre les eaux-de-vie ont pu être observées. Si l'eau-de-vie sans ajout a présenté une intensité moyenne de 5,0, l'eau-de-vie additionnée d'acétate d'isoamyle (edv+AI) a engendré une diminution tendancielle de l'intensité (3,1). Cette diminution, par rapport à l'eau-de-vie sans ajout, a également été observée avec l'addition de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol qui a atteint une intensité moyenne perçue de 2,1. De manière intéressante, avec un ajout de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol, l'intensité moyenne a atteint 4,3. Une logique qui s'est poursuivie en ajoutant  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol, l'intensité perçue du descripteur « banane cuite » a alors atteint 6,8. L'eau-de-vie avec l'ajout maximal d'eugénol était donc significativement différente de l'eau-de-vie simplement additionnée d'acétate d'isoamyle et de celle ajoutée d'acétate d'isoamyle et d'une faible concentration d'eugénol.

Une logique similaire a été observée pour le descripteur « banane mure ». En effet l'eau-de-vie sans ajout a présenté une intensité moyenne de 3,5. Tandis que celle additionnée seulement d'acétate d'isoamyle avait été notée avec une intensité moyenne de 2,1 et donc sans différence significative avec l'eau-de-vie sans ajout. L'ajout de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol a permis d'augmenter la note d'intensité moyenne perçue jusqu'à 4,9. Là encore aucune différence significative n'a été perçue avec les deux autres eaux-de-vie précédemment citées. Toutefois l'ajout de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol a permis d'obtenir une eau-de-vie présentant une intensité moyenne significativement supérieure (5,6) à celle avec un simple ajout d'acétate d'isoamyle. De la même manière, un ajout de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol a également induit une augmentation de l'intensité moyenne perçue (5,6), significativement supérieure à celle d'une eau-de-vie avec un simple ajout d'acétate d'isoamyle.

#### **III.4. Effet de l'interaction entre l'eugénol et l'acétate d'isoamyle sur la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc**

Afin d'évaluer l'influence de l'interaction entre l'eugénol et l'acétate d'isoamyle sur la typicité perçue d'eaux-de-vie blanches d'Armagnac, la même eau-de-vie blanche de Baco blanc qu'utilisée au paragraphe précédent, dont les concentrations en eugénol et en acétate d'isoamyle ont été ajustées à des valeurs voulues (Tableau 34), a été dégustée par les panélistes professionnels du BNIA. Cette eau-de-vie de Baco blanc, réduite à 40 % d'éthanol (v/v) présentait des teneurs initiales en eugénol et en acétate d'isoamyle considérées comme faibles, respectivement de  $55 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $1,2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Tableau 34 : Séries d'eaux-de-vie de Baco blanc supplémentées en eugénol et en acétate d'isoamyle afin d'évaluer l'influence d'une molécule sur l'autre, pour la notation de la typicité

Série	Solutions	Eugénol ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Acétate d'isoamyle ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Série 1	edvBB	55	1,2
	edvBB_AI	55	3,2
	edvBB+AI+eug100	100	1,2
	edvBB+AI+eug150	150	1,2
	edvBB_AI_eug200	200	1,2
Série 2	edvBB	55	1,2
	edvBB_eug	150	1,2
	edvBB+eug+AI1,8	150	1,8
	edvBB+eug+AI3,2	150	3,2
	edvBB+eug+AI5,3	200	5,3

Afin de noter la typicité perçue des différentes eaux-de-vie, uniquement de manière olfactive, les panélistes avaient à disposition une fiche, par série, portant une échelle linéaire bornée par eau-de-vie à déguster. Ils devaient répondre à la question suivante :

« Cette solution présente-t-elle une des caractéristiques aromatiques essentielles d'une eau-de-vie blanche de Baco blanc ? »

L'ordre des séries ainsi que l'ordre des eaux-de-vie d'une série ont été déterminés aléatoirement. Sur l'ensemble de la dégustation, les ordres de dégustation étaient équilibrés. Seuls les résultats concernant la série 1 (Tableau 34) sont présentés. En effet, afin de pouvoir évaluer les potentielles différences existantes entre les eaux-de-vie, il a d'abord fallu établir le caractère consensuel de la notation de la typicité. Or seuls les résultats de la série ont permis cette conclusion. Il est apparu que l'eau-de-vie sans ajout (edvBB) a présenté une note de typicité moyenne de 5,4 tandis que l'eau-de-vie additionnée d'acétate d'isoamyle (edvBB+AI) a présenté une note de typicité moyenne de 6,1. Pour autant, aucune différence significative n'a été décelée entre ces deux eaux-de-vie. En revanche, tendanciellement l'ajout d'acétate d'isoamyle et d'eugénol à  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a induit une diminution de la typicité, qui a atteint la valeur de 4,2 pour l'eau-de-vie correspondante (edvBB+AI+eug100). Toujours de manière tendancielle, l'ajout d'acétate d'isoamyle et d'eugénol à  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (edvBB+AI+eug150) a permis l'obtention d'une eau-de-vie présentant une typicité moyenne de 6,0. Enfin, un ajout d'acétate d'isoamyle et d'eugénol à  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a augmenté le niveau de la note de cette eau-de-vie (edvBB+AI+eug200) jusqu'à 6,8.

Une différence significative a été décelée avec edvBB+AI+eug100. De plus, de manière tendancielle, edvBB+AI+eug200 est l'eau-de-vie notée comme étant le meilleur exemple d'eau-de-vie présentant une des caractéristiques essentielles d'une eau-de-vie de Baco blanc.

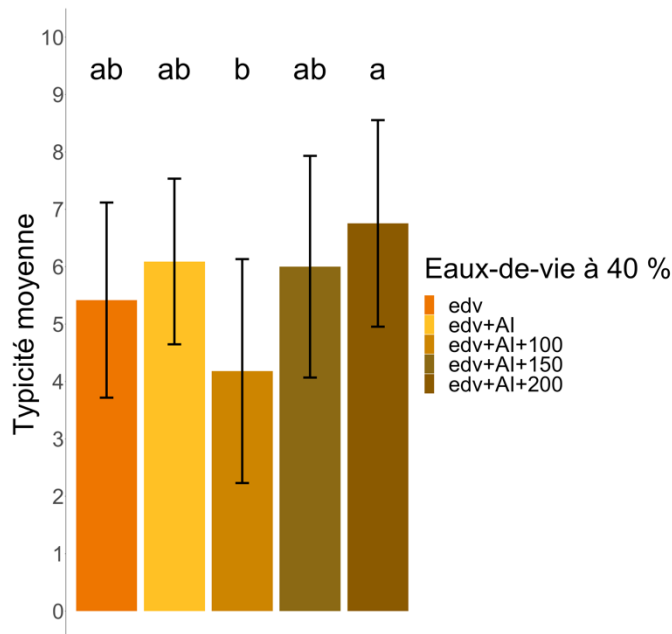


Figure 59 : Typicité moyenne perçue des différentes eaux-de-vie, réduites à 40 % d'éthanol (v/v), supplémentées soit en eugénol, soit en acétate d'isoamyle, soit par un mélange des deux. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. . Pour chaque descripteur et chaque eau-de-vie, n = 22

#### IV. Conclusions et discussions

L'eugénol, en tant que marqueur biochimique du Baco blanc, du raisin à l'eau-de-vie, semble également occuper une place importante dans les caractéristiques organoleptiques de ces eaux-de-vie. Si aucun effet direct, gustatif et/ou somesthésique n'a pu être identifié, une interaction perceptible entre l'eugénol et l'acétate d'isoamyle a été bien mise en évidence. En effet l'ajout simultanée d'eugénol et d'acétate d'isoamyle a permis une perception significativement accrue de ce mélange, comparée aux solutions ne contenant que des molécules seules. Dans les eaux-de-vie, l'approche a été différente en raison de la complexité supérieure de la matrice.

En analysant le vocabulaire attribué aux eaux-de-vie blanches, il est apparu que certaines notes associées à des nuances de banane étaient citées de manière prépondérantes, comme « banane cuite ». C'est pourquoi les panélistes ont été sensibilisés à ces différentes nuances de banane, avant d'en noter l'intensité sur des eaux-de-vie ajoutées d'eugénol et/ou d'acétate d'isoamyle. Il est observé que l'interaction entre l'eugénol et l'acétate d'isoamyle pouvait augmenter la perception des nuances de banane, nuances pouvant être qualifiées de « lourdes » telle « banane cuite ». De manière intéressante, il est à noter que la concentration de l'eugénol dans le fruit du bananier est liée à l'état de maturité de cette dernière. Plus elle est mûre, plus l'eugénol y est concentrée (Brat *et al.*, 2004). De plus, ce phénol volatil est réputé pour apporter des notes « corsée » et « moelleuse » à la banane (Miranda *et al.*, 2001). Ce changement qualitatif de l'odeur de banane, dans une eau-de-vie blanche de Baco blanc, semble donc bien être l'interaction, telle que décrite naturellement dans le fruit, entre l'eugénol, molécule spécifique au Baco blanc, et l'acétate d'isoamyle, provenant de la fermentation alcoolique des vins de distillation. L'eugénol participant ainsi à une modification de l'odeur de banane dans l'eau-de-vie semble être à l'origine d'un accord, qualifié de continuité, puisqu'apportant une note qualitative, sans pour autant donner naissance à une nouvelle odeur (Thomas-Danguin *et al.*, 2014).

En demandant aux panélistes de déguster un nombre important d'eaux-de-vie de Baco blanc et d'en noter la typicité du caractère Baco blanc, il est apparu que la concentration en eugénol de ces eaux-de-vie était positivement corrélée à leur note de typicité. Plus encore, la notation de la typicité sur des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, ajoutées d'acétate d'isoamyle et d'eugénol, a permis de montrer que l'accord de continuité impliquant les deux molécules citées précédemment, pouvait influencer partiellement cette notation de typicité. Toutefois, les professionnels de l'Armagnac constituant le panel ont bien souligné que toutes les eaux-de-vie de blanches de Baco blanc n'étaient pas nécessairement caractérisées par ces arômes plus intenses de banane. Il ne s'agit que d'une caractéristique pouvant être essentielle à la typicité des produits de Baco blanc. Il est tout à fait envisageable, que l'eugénol puisse agir sur d'autres composés présents dans les eaux-de-vie blanches et, contribuer à une certaine variabilité aromatique dont il reste à définir les notes essentielles dans les nuances prédéfinies à l'aide de la fiche de 16 descripteurs.

## **Conclusions de la Partie 2 : De la caractéristique sensorielle des eaux-de-vie blanches de Baco blanc**

Dans cette partie, l'étude de la composition chimique des eaux-de-vie blanches des trois variétés étudiées, ainsi que l'important travail d'analyse sensorielle menée avec les différents panels, a permis de développer un outil de caractérisation aromatique des eaux-de-vie blanches d'Armagnac. Cet outil, dont certains paramètres de fiabilité comme la répétabilité et la reproductibilité ont pu être approchés, a partiellement permis de discriminer les eaux-de-vie de Baco blanc des eaux-de-vie des autres variétés étudiées (Folle blanche et Ugni blanc). Toutefois, la fiche de dégustation n'a pas permis de définir un espace sensoriel des eaux-de-vie de Baco blanc. Cependant, certaines notes aromatiques liées à la banane sont apparues comme essentielles dans la caractérisation des eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Les composés responsables des notes de banane semblent ainsi former, avec l'eugénol, un accord de continuité permettant de décrire un des aspects sensoriels des eaux-de-vie blanches de Baco blanc.

L'eugénol, composé spécifique des raisins de Baco blanc, semble donc être également très impliqué dans l'aromatique des eaux-de-vie blanches de cette même variété. Sa valorisation dans les raisins dans les vins et au cours de la distillation pourrait donc être souhaitable et doit être envisagée.





---

# PARTIE 3 : L'optimisation de la richesse en eugénol dans les vins et les eaux- de-vie de Baco blanc

---

*Le plus compliqué, c'est de réussir à faire simple*

Christopher Coutanceau d'après Joël Robuchon



# Chapitre 1 : Les principaux facteurs influençant l'eugénol dans les vins de distillation de Baco blanc

## I. La construction d'un plan d'expériences à large spectre d'observation

### I.1. Choix du type de plan et des facteurs à étudier

Pour identifier les paramètres clefs influençant les concentrations en eugénol libre et liés dans les vins de base de Baco blanc, un plan d'expériences (Design of Experiments ; DoE) a été mis en place. Cette technique de modélisation mathématique permet de rendre compte du lien entre une grandeur d'intérêt et des variables qui peuvent modifier cette grandeur. Les DoE permettent d'obtenir un maximum de renseignements, sur le lien entre grandeur et variables, en un minimum d'expériences. Les essais œnologiques s'inscrivant tout autant en science qu'en industrie (Goupy, 2016), l'utilisation des DoE est apparu comme une voie possible pour déterminer les liens entre concentration en eugénol dans les vins de Baco et les principales modalités de vinifications connues à ce jour.

Le choix des facteurs à étudier a été effectué sur la base des pratiques, de vinifications, des professionnels de l'Armagnac. Cinq facteurs ont donc été sélectionnés :

- La date de récolte ou état de maturité des raisins de Baco blanc : **MAT** ;
- Le débouillage des moûts avant la fermentation alcoolique (FA) : **DEB** ;
- L'utilisation d'enzymes œnologiques libératrices d'arômes en fin de FA (préparations enzymatiques enrichies en activité  $\beta$ -glucosidase) : **ENZ** ;
- Le soutirage des vins en fin de FA, excluant l'influence des lies lourdes sur les vins pendant leur conservation jusqu'à la distillation : **LIES** ;
- Le temps de conservation sur ces lies avant distillation. L'usage étant de distiller les vins avant la fin de l'année de la récolte, ou bien de distiller en début d'année suivante (le décret d'appellation limitant la date de distillation au 31 Mars de l'année suivant la récolte) : **TdC**.

À chacun de ces facteurs, ont été attribués des niveaux. Autrement dit, les niveaux représentent les valeurs ou modalités prises par les facteurs. L'objectif principal de ce DoE était d'identifier les facteurs influençant le plus la concentration en eugénol dans les vins de distillation et les

eaux-de-vie de Baco blanc. Les niveaux ont donc été choisis en conséquence, selon une logique binaire (modalité effectuée ou non). Seul le facteur temps de conservation sur lies a généré deux valeurs numériques : 1 et 3 mois de conservation sur lies. De plus, les vins ont été conservés avec une quantité minimale de lies, le facteur quantité de lies a donc généré les deux niveaux suivants : lies totales (pas de soutirage) et absence de lies (quantité minimale de lies fines). Fort de ces caractéristiques, le DoE mis en place était donc un plan d'expériences factoriel complet  $2^5$ , c'est-à-dire à 5 facteurs prenant chacun 2 niveaux, soit un total de 32 expériences non répétées de vinifications (Tableau 35).

Tableau 35 : Résumé des différentes vinifications mises en œuvre dans le cas du plan d'expérience factoriel complet  $2^5$ . Pour la maturité, d1 correspond à une date précoce de vendange (16 septembre 2021) tandis que d2 correspond à une date de récolte proche de ce qu'un vigneron armagnacais mettrait en place (5 octobre 2021). Pour le débouillage, D correspond à un débouillage strict, assisté par l'usage d'une préparation enzymatique pectolytique, pour atteindre 300 NTU et nD pour les moûts non-débouillés (> 1 000 NTU). Concernant l'enzymage, E représente les vins enzymés avec une préparation enrichie en activité  $\beta$ -glucosidase, et ce en fin de FA tandis que nE représente les vins non enzymés. Pour le temps de conservations sur lies, 1m et 3m sont les durées de conservations, respectivement de 1 et 3 mois avant distillation des vins. Enfin pour le taux de lies, S regroupe les vins entièrement soutirés (lies fines conservée) et L, les vins laissés sur la totalité des lies

N° d'expé	MAT	DEB	ENZ	TdC	LIES	N° d'expé	MAT	DEB	ENZ	TdC	LIES
1	d1	D	E	1m	S	17	d1	D	E	1m	L
2	d2	D	E	1m	S	18	d2	D	E	1m	L
3	d1	nD	E	1m	S	19	d1	nD	E	1m	L
4	d2	nD	E	1m	S	20	d2	nD	E	1m	L
5	d1	D	nE	1m	S	21	d1	D	nE	1m	L
6	d2	D	nE	1m	S	22	d2	D	nE	1m	L
7	d1	nD	nE	1m	S	23	d1	nD	nE	1m	L
8	d2	nD	nE	1m	S	24	d2	nD	nE	1m	L
9	d1	D	E	3m	S	25	d1	D	E	3m	L
10	d2	D	E	3m	S	26	d2	D	E	3m	L
11	d1	nD	E	3m	S	27	d1	nD	E	3m	L
12	d2	nD	E	3m	S	28	d2	nD	E	3m	L
13	d1	D	nE	3m	S	29	d1	D	nE	3m	L
14	d2	D	nE	3m	S	30	d2	D	nE	3m	L
15	d1	nD	nE	3m	S	31	d1	nD	nE	3m	L
16	d2	nD	nE	3m	S	32	d2	nD	nE	3m	L

## I.2. Microvinifications et microdistillations

L'ensemble des vinifications a été réalisé à partir des mêmes raisins de Baco blanc issus d'un domaine viticole basé à Réans (Gers) et produisant des eaux-de-vie d'Armagnac, des vins de Côtes de Gascogne et des Flocs de Gascogne. Les vendanges et le pressurage ont été réalisés en grandeur réelle dans les conditions du Domaine, illustratives d'une partie des pratiques armagnacaise. A la suite de la récolte mécanique, la vendange a été égouttée dans un égouttoir dynamique puis pressée à l'aide d'un presseur horizontal continu de diamètre 800. Seuls les jus d'égouttage et de première presse (~3 hL) ont été récupérés pour être vinifiés. La suite des microvinifications avec les différentes modalités prévues a eu lieu à la station IFV du Gers, sur le site du Château de Mons à Caussens (Gers). La mise en place des différentes expériences du DoE a été faite en cascade, autrement dit le plus grand volume commun a été conservé le plus longtemps possible. Jusqu'à la FA, les modalités ont été travaillées dans des cuves en acier inoxydable d'1 hL. Pour le débouillage, une préparation enzymatique de type pectinase, élaborée spécialement pour les vins destinés à la distillation, Trenolin® Disti (Erbslöh SAS, Servian, France) a été utilisée à la dose de 3 mL·hL<sup>-1</sup>. Les FA ont eu lieu dans des fûts en acier inoxydable de 50 L après ensemencement avec une levure sèche active *Saccharomyces cerevisiae*, Lalvin® FC9 (Lallemand SAS, Blagnac, France) à 20 g·hL<sup>-1</sup>. Pour les vins enzymés, une préparation enzymatique enrichie en β-glucosidase, Rapidase® Revelation Aroma (Erbslöh SAS, Servian, France), a été ajoutée à la dose de 4 g·hL<sup>-1</sup> en fin de FA. L'ensemble des modalités, soutirées ou non, a ensuite été transféré dans des contenants de type fontaine à vin de 5L et conservées dans une chambre froide à 4 °C pour une durée déterminée par le DoE. Pour s'assurer du bon déroulement des expérimentations, des échantillonnages de moûts et de vins ont été réalisés à chaque étape de vinification. Ils ont ensuite été analysés (page 106) par l'Œnopôle de Gascogne de Gondrin (Gers). Des contrôles d'implantations ont également été effectués afin de s'assurer de l'uniformité des FA (réalisés en prestation de service par Microflora). Enfin des échantillons ont été prélevés avant distillation et conservés à -20 °C avant les différentes analyses de composés d'intérêt dont l'eugénol et ses précurseurs.

Les distillations de l'ensemble des différentes modalités ont été assurées par l'Œnopôle de Gascogne. Il s'agissait de distillations double-chauffes dont le protocole est disponible à l'Annexe 8. Plusieurs produits issus de ces distillations ont été récoltés : vinasses de première et de seconde distillation, brouillis (distillation de première chauffe) et distillats (distillation de seconde chauffe).

L'ensemble de ces produits ont été conservés à 20 °C avant analyse des composés d'intérêt. L'Enopôle de Gascogne a réalisé les analyses de suivi des FA (page 106).

## II. Les facteurs principaux influençant les concentrations en eugénol

Afin de déterminer les facteurs influençant le plus les concentrations en eugénol (libre, lié et total) dans les différents produits de Baco blanc (vins et eaux-de-vie), une ANOVA a été réalisée sur l'ensemble des données collectées durant la mise en œuvre du plan d'expériences. Le Tableau 36 résume l'ensemble des contributions des facteurs aux concentrations en eugénol dans les différents produits mais également les contributions des interactions de facteurs (seulement de premier ordre). La Figure 60, quant à elle, permet d'avoir une lecture graphique des résultats compilés dans le Tableau 36. Les résidus (residuals) représentent la part de variabilité des résultats qui ne sont pas explicables par le modèle du plan d'expérience.

Tableau 36 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expériences 2<sup>5</sup>. Pour chaque facteur étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou distillats) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les 2 niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque  $\alpha$  de 5 % sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs ; les interactions entre eux sont indiquées par deux points.

	EdV (n = 96)		Vin_Libre (n = 96)		Vin_Lié (n= 96)	
	Contrib. (%)	p-value	Contrib. (%)	p-value	Contrib. (%)	p-value
MAT	41,7	<b>1,1E-18</b>	47,7	<b>9,4E-25</b>	21,4	<b>1,4E-07</b>
DEB	1,3	<b>4,6E-02</b>	0,7	8,1E-02	3,5	<b>2,2E-02</b>
ENZ	13,4	<b>5,5E-09</b>	11,7	<b>1,4E-10</b>	3,8	<b>1,7E-02</b>
TdC	3,6	<b>1,1E-03</b>	10,9	<b>4,4E-10</b>	1,1	1,9E-01
LIES	0,0	9,3E-01	0,0	9,5E-01	2,1	7,4E-02
MAT:DEB	2,8	<b>3,9E-03</b>	0,0	8,4E-01	3,3	<b>2,5E-02</b>
MAT:ENZ	2,5	<b>6,0E-03</b>	3,3	<b>1,7E-04</b>	0,4	4,3E-01
MAT:TdC	1,8	<b>1,9E-02</b>	0,0	9,5E-01	0,5	3,6E-01
MAT:LIES	0,1	5,4E-01	0,2	3,1E-01	0,0	8,9E-01
DEB:ENZ	0,5	2,1E-01	0,7	7,2E-02	0,4	4,4E-01
DEB:TdC	3,8	<b>8,2E-04</b>	2,8	<b>5,7E-04</b>	4,6	<b>8,7E-03</b>
DEB:LIES	0,0	7,1E-01	0,0	7,9E-01	1,3	1,6E-01
ENZ:TdC	1,3	<b>4,6E-02</b>	3,6	<b>1,1E-04</b>	2,6	<b>4,7E-02</b>
ENZ:LIES	0,8	1,3E-01	0,1	5,7E-01	2,2	6,9E-02
TdC:LIES	1,3	<b>4,8E-02</b>	1,1	<b>2,5E-02</b>	1,4	1,4E-01
Résidus	25,1	nd	17,2	nd	51,3	ndz

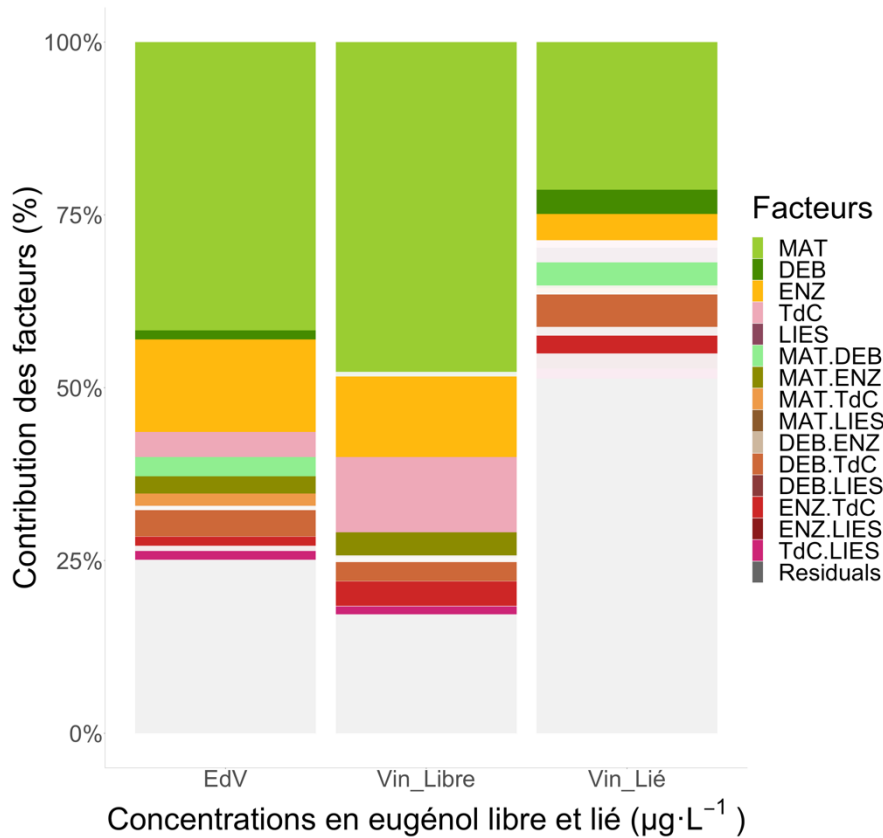


Figure 60 : Contribution des facteurs aux concentration en eugénol (libre et lié) dans les différents produits (vins et eaux-de-vie) pour le plan d'expériences  $2^5$  mis en œuvre. Pour faciliter la lecture, seuls les facteurs dont la p-value est inférieure au risque  $\alpha$  de 0,05 apparaissent en couleur franche. Les autres facteurs apparaissent avec des couleurs atténuées. Pour chaque variable réponse,  $n = 96$

## II.1. La maturité

Quelle que soit la variable réponse considérée (concentrations en eugénol), la maturité est apparue comme le facteur prépondérant dans sa variabilité (résidus exclus). De manière concrète cela signifie que la modulation de la concentration en eugénol passait essentiellement par le choix de la date de récolte des raisins de Baco blanc. Afin d'observer l'influence exacte de la maturité sur la concentration en eugénol dans les vins et les distillats, des tests de Student et de Wilcoxon au risque  $\alpha$  de 5 % ont été effectués (Figure 61).

Il apparaît clairement que dans les vins, la maturité était le facteur influençant de manière prépondérante (Figure 60 et Tableau 36), les concentrations d'eugénoles libres (47,7 %) et liées (21,4 %). Plus encore, une date de récolte précoce (d1) a permis d'obtenir des teneurs moyennes en eugénoles libres ( $73,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et liées ( $164,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) supérieures à celles obtenues avec une date de vendange plus proche de la pratique actuelle des vignerons d'Armagnac (d2), soit  $39,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le libre et  $54,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le lié (Figure 61a et Figure 61b). Il en va de même pour les distillats, 41,7 % de la variabilité était expliquée par le facteur MAT, avec une teneur moyenne en eugénoles de  $194,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour d1 et de  $109,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour d2 (Figure 61c).

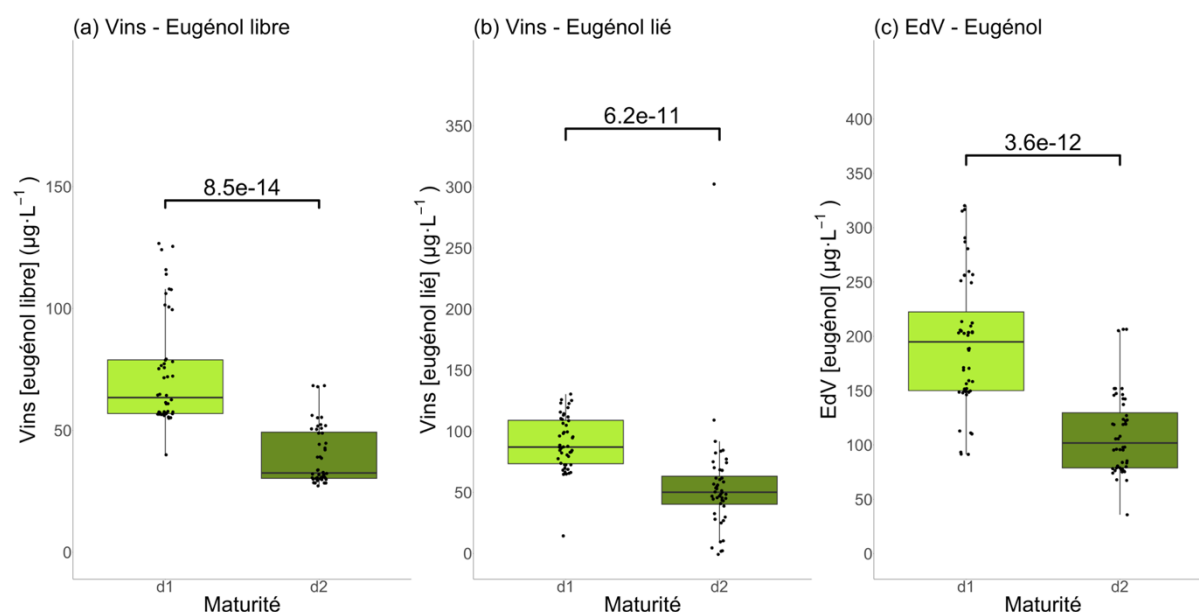


Figure 61 : Concentrations en eugénoles (libre et lié) dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (d1 et d2) par le facteur maturité (MAT). Les boîtes à moustaches sont reliées par la valeur de p-value du test de Student au risque  $\alpha$  de 5 %, sauf pour la figure (b), pour laquelle un test de Wilcoxon a été réalisé. Figure (a), concentration en eugénoles libres dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénoles liées dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénoles dans les distillats (EdV). Les points autour des boîtes à moustaches correspondent à toutes les expérimentations concernées par les modalités attenantes. Pour chaque variable et par niveau pris,  $n = 48$

## II.2. Le rôle des enzymes libératrices d'arômes

Dans ce paragraphe, les enzymes aromatiques seront assimilées à des préparations enzymatiques utilisées en œnologie pour leur enrichissement en activité  $\beta$ -glucosidase. En effet la plupart des arômes du vin existant sous la forme de précurseurs glycosylés, l'utilisation de telles préparations enzymatiques permet de libérer le potentiel aromatique des moûts de raisins durant la vinification.



Les enzymatiques aromatiques (ENZ) sont apparues comme le second facteur influençant le plus (Figure 60 et Tableau 36) les concentrations en eugénol libre dans les vins (13,4 %) et les distillats (11,7 %). De la même manière que pour la maturité, des tests de Student ont été effectués afin de déterminer le sens de cette influence (Figure 62).

Concernant les vins, leur teneur en eugénol libre a été favorisée par l'utilisation d'enzymes aromatiques (Figure 62a). En effet les vins enzymés présentaient une concentration moyenne en eugénol libre supérieure ( $65,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) à celle des vins non enzymés ( $48,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Les distillats issues de vins enzymés ont suivi la même logique avec une teneur en eugénol de  $175,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et donc supérieure à celle des distillats issues des vins non enzymés soit  $128,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 62c). Pour l'autre variable réponse, l'eugénol lié (Figure 62b), un effet tendanciel opposé a pu être observé sur sa teneur en dans les vins. En effet, cette dernière était plus importante dans les vins non enzymés ( $80,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que dans les vins enzymés ( $65,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

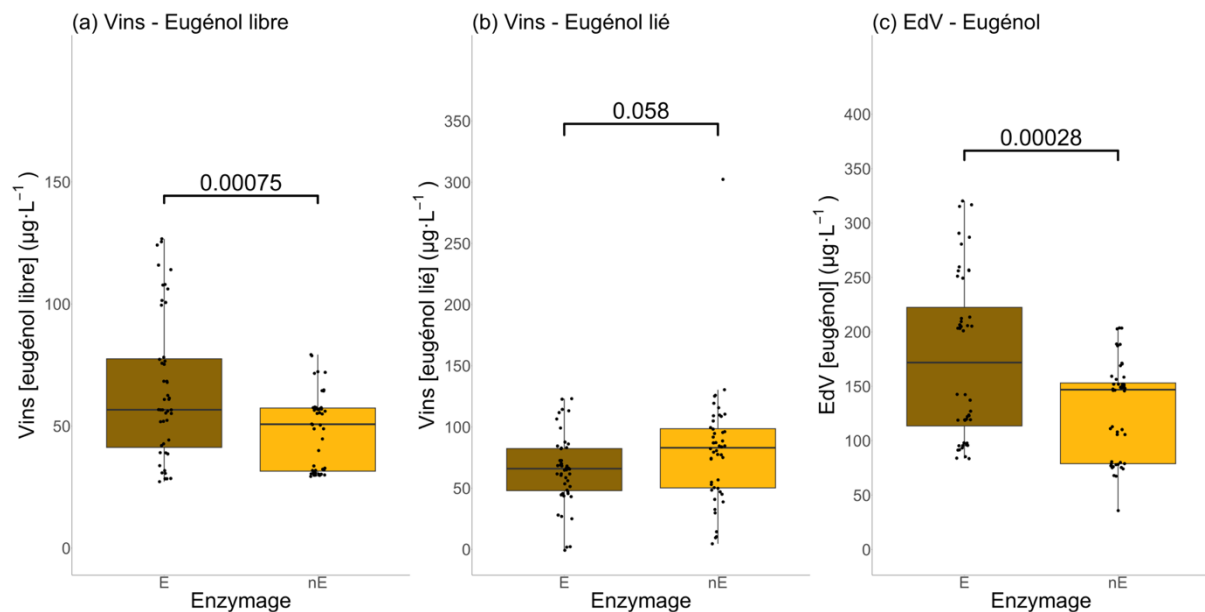


Figure 62 : Concentrations en eugénol (libre et lié) dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (E et nE) par le facteur enzymage (ENZ). Les boîtes à moustaches sont reliées par la valeur de p-value du test de Student au risque  $\alpha$  de 5 %. Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Pour chaque variable et par niveau pris,  $n = 48$

### II.3. Implication des autres facteurs et des interactions sur la conduite des vinifications

Dans ce paragraphe sont présentés les effets significatifs de facteurs et d'interactions mais dont la contribution à la variabilité des teneurs en eugénol dans les produits de Baco blanc est relativement faible (Figure 60 et Tableau 36).

Une interaction de facteurs significative existe entre la maturité (MAT) et l'enzymage (ENZ) (Figure 63). Il est tout de même à noter que cette interaction a peu contribué aux différentes variables réponses (de 2,2 % à 3,5 %) pour lesquelles elle est significative (Figure 60 et Tableau 36).

Pour ce qui est de la teneur en eugénol libre dans les vins (Figure 63a), il s'agissait d'une interaction ordonnée. C'est-à-dire que les vins issus d'une vendange précoce, enzymés ou non, présentaient des teneurs moyennes en eugénol libre, respectivement de 86,9  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et 60,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , supérieures à celles des vins, enzymés ou non, issus eux d'une récolte plus tardive, soit 43,4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et 35,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La même interaction ordonnée a été observée pour les concentrations en eugénol des distillats correspondants (Figure 63b) car les distillats de vins, enzymés ou non, issus de vendange précoce ont présenté des concentrations moyennes en eugénol, respectivement de 228,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et 159,9  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , supérieures à celles des distillats de vins, enzymés ou non, issus eux d'une vendange plus tardive, soit 123,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et 96,4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

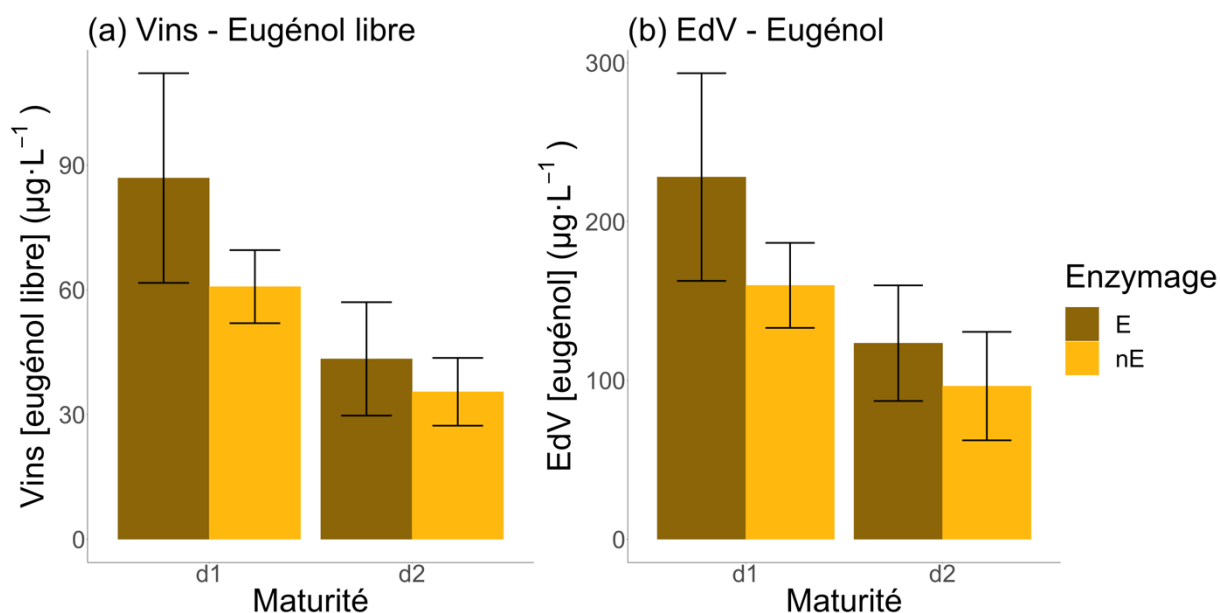


Figure 63 : Interactions entre les facteurs MAT et ENZ pour les teneurs en eugénol. Figure (a), interaction des facteurs MAT et ENZ pour la teneur en eugénol libre des vins. Figure (b), interaction des facteurs MAT et ENZ pour la teneur en eugénol pour les distillats. « E » correspond aux produits enzymés et « nE » aux produits non enzymés

Le temps de conservation sur lies, TdC, a également été un facteur contributeur aux différentes variables réponses étudiées (Figure 64). En effet pour les concentrations en eugénol libre des vins, le TdC contribue de manière quasi-égale à l'enzymage, soit à 10,9 %. Pour la concentration en eugénol des distillats, sa contribution est plus modeste puisqu'elle n'est que de 3,6 %. En revanche, concernant le recouvrement de l'eugénol, cette contribution atteint les 7,5 % (Figure 60 et Tableau 36).

Les teneurs en eugénol des vins et des distillats suivent le même schéma (Figure 64a et Figure 64b), à savoir une teneur moyenne significativement plus importante pour les produits ayant passé un temps de conservation sur lies de 3 mois ( $64,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour les vins et  $164,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour les distillats) que les produits n'ayant passé qu'un mois de conservation ( $48,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour les vins et  $139,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour les distillats).

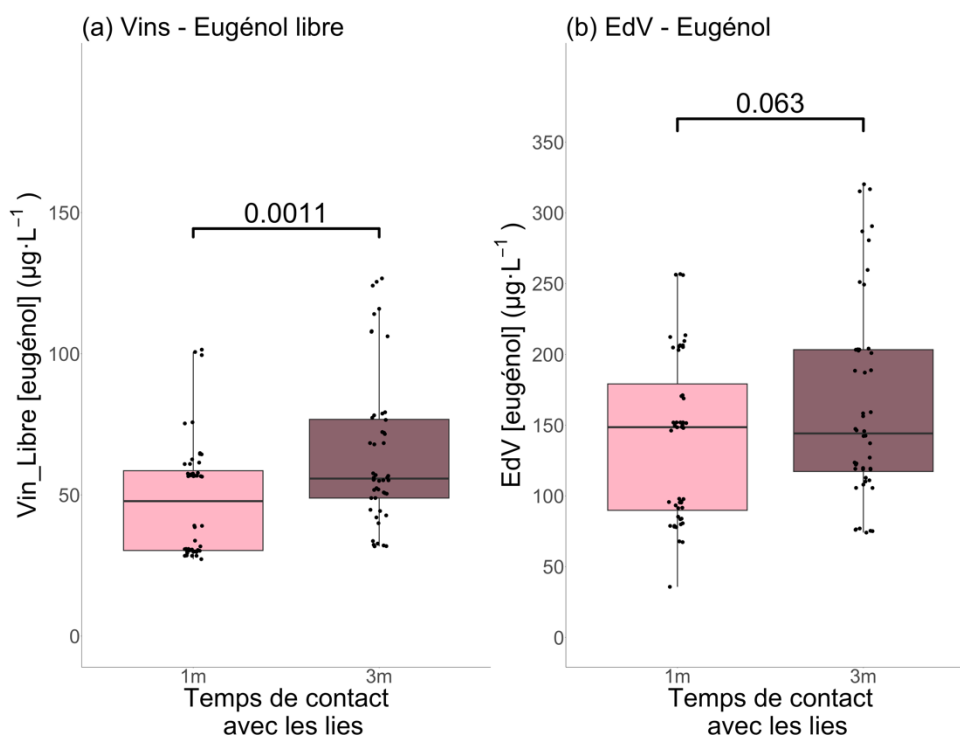


Figure 64 : Concentrations en eugénol dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (1m et 3m) par le facteur temps de conservation sur lies (TdC). Les boîtes à moustaches sont reliées par la valeur de p-value du test de Student au risque  $\alpha$  de 5%. Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Pour chaque variable et par niveau pris,  $n = 48$

#### II.4. Corrélation entre concentration en eugénol des vins et concentration en eugénol des distillats

De l'ensemble des résultats précédents, il a été possible de dégager une tendance générale entre les concentrations en eugénol libre dans les vins et les concentrations en eugénol dans les distillats (Figure 65).

Il apparaît clairement qu'une corrélation positive ( $p\text{-value} < 0,001$  ;  $R = 0,86$ ) existe entre la concentration en eugénol libre des vins et la concentration en eugénol dans les distillats correspondants. Autrement dit, il existe une certaine prédictibilité dans les concentrations en eugénol des distillats. En effet les concentrations en eugénol libre des vins sont proportionnelles aux concentrations en eugénol des distillats, dans le cas présent de double-distillation.

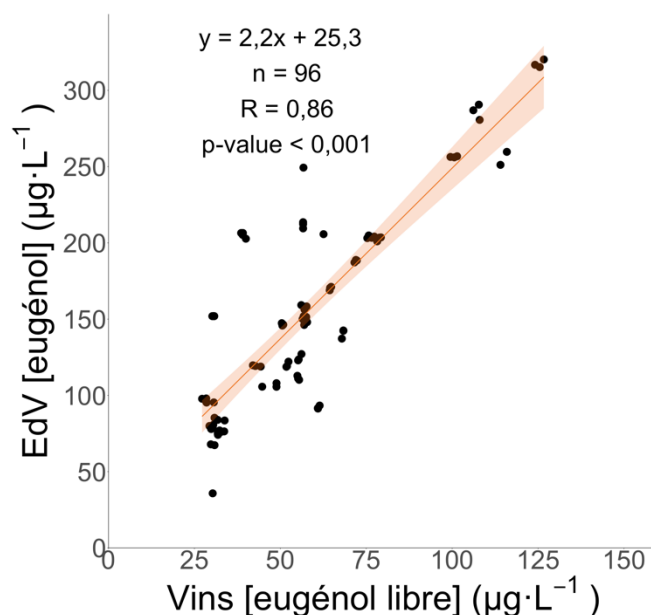


Figure 65 : Corrélation positive entre les concentrations en eugénol libre dans les vins et en eugénol dans les distillats de Baco blanc. Cette corrélation est issue de l'ensemble des vins et eaux-de-vie du plan d'expériences. Les points représentent l'ensemble des triplicatas analytiques des 32 expériences (soit n = 96)

### III. Discussions et conclusion

La maturité est, relativement, le facteur influençant le plus la variation des teneurs en eugénol dans les produits de Baco blanc (en excluant les résidus). De manière pratique, cela signifie que la date de récolte est le principal outil de modulation des concentrations en eugénol dans les produits de Baco blanc étudiés ici. En considérant l'eugénol comme une molécule aromatique variétale du Baco blanc, il est possible de trouver dans la littérature scientifique une explication à l'importance de la maturité. En effet, cette dernière, en fonction des niveaux qu'elle peut prendre, influence de manière importante les arômes développés par les vins (Leeuwen *et al.*, 2022). Plus encore, durant la maturation des raisins, les niveaux de précurseurs d'arômes peuvent également évoluer (Y. Z. Gunata *et al.*, 1985; Park *et al.*, 1991). De plus, il semblerait qu'une maturité précoce permet d'obtenir des concentrations d'eugénol plus importante dans les vins (eugénol libre et total) et dans les distillats. Ceci est parfaitement cohérent avec les cinétiques d'eugénol établies au paragraphe page 131 et présentées à la Figure 36 ainsi qu'avec des études précédentes sur les cinétiques de précurseurs d'arômes au cours de la maturation du raisin (Roland *et al.*, 2010).

L'enzymage est l'autre facteur prépondérant dans ce plan d'expérience. En effet l'utilisation de préparations enzymatiques enrichies en  $\beta$ -glucosidase a induit des concentrations en eugénol plus importantes dans les vins et distillats de Baco blanc. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les précurseurs de l'eugénol pourraient exister sous forme glycosylée (Franc *et al.*, 2023). Plus encore, ils confirment également de nombreux résultats sur l'action des  $\beta$ -glucosidases sur la libération d'arômes variétaux du raisin (Cordonnier & Bayonove, 1974; Z. Gunata *et al.*, 1993; Shoseyov *et al.*, 1990). Enfin ces résultats confortent l'idée d'un potentiel en eugénol qu'il serait utile et possible d'exploiter puisqu'il s'agit d'un marqueur de la qualité des produits issus de Baco blanc.

L'interaction de la maturité et de l'enzymage permet de confirmer l'importance de ces deux facteurs. Une vendange précoce associée à l'utilisation d'enzymes aromatiques permet d'obtenir les produits de Baco blanc les plus concentrés en eugénol. Toutefois, la contribution de cette interaction reste à relativiser. En effet c'est bien la maturité qui guide majoritairement la variation des concentrations en eugénol.

Le temps de contact sur lies et son influence sur les composés aromatiques des eaux-de-vie blanches ont déjà été étudiés en collaboration avec le BNIA (Bertsch, 1992). Cependant les durées n'étaient pas aussi longues que celles étudiées dans ces travaux. À l'instar des autres facteurs, vins et eaux-de-vie semblent réagir de concert vis-à-vis du temps de conservation sur lies : une durée plus longue induit une concentration plus importante en eugénol. L'action des lies sur les composés aromatiques durant ce temps de conservation peut varier : activités enzymatiques de transformation ou de libération, fixation de certains composés (Chatonnet, 1995) ou encore libération de précurseur (Feuillat & Charpentier, 1982). Dans le cadre de ce plan d'expériences, le facteur temps de conservation n'a eu que peu d'influence mais ces éléments de littérature permettent d'imaginer un futur travail plus approfondi sur le rôle du temps de conservations sur lies.

Certains facteurs comme le débourbage n'ont pas été présentés ici car trop peu influents. Ce paramètre a déjà été étudié pour son influence sur la composition aromatique d'eaux-de-vie blanches (Bertsch, 1992). Le débourbage étant une étape de clarification visant à débarrasser le moût d'une partie des résidus de pellicules, et l'eugénol étant un composé essentiellement pelliculaire (Franc *et al.*, 2023), il serait intéressant d'explorer plus en profondeur cette étape de vinification.

Enfin, les distillats obtenus par microdistillation, telles que pratiquées dans ces expérimentations, semblent être des miroirs des vins correspondants, comme en attestent les corrélations entre eugénoles (libre et total) dans les vins et la teneur en eugénoles dans les distillats. Cette prédictibilité de la teneur en eugénoles des distillats grâce aux teneurs en eugénoles des vins n'est, peut-être, que le fait de la double-distillation pratiquée dans ce plan d'expérience. Cependant, cette même corrélation a également été observée pour des eaux-de-vie produites en conditions réelles par distillation continue (Franc *et al.*, 2023).

Toutefois plusieurs résultats indiquent quelques faiblesses du modèle, construit par le plan d'expérience, à décrire les différents phénomènes en présence. Par exemple, la contribution élevée (Figure 60 et Tableau 36) des résidus (51,3 %) à la concentration en eugénoles liés des vins reflète le dosage indirect de cette fraction de l'eugénoles (par calcul) mais également une certaine variabilité dans la libération enzymatique de l'eugénoles à partir de son précurseur. De plus, cette importante variabilité restant à expliquer, peut être le signe de l'existence de plusieurs formes précurseurs de l'eugénoles (page 54), l'enzyme utilisée pour libérer l'eugénoles étant spécifique d'un seul type de liaison. Il serait alors intéressant de tester différentes préparations enzymatiques afin d'observer celle qui permettrait la plus grande libération d'eugénoles au cours de la vinification mais également au cours de sa conservation avant distillation.

De plus, la contribution des résidus au recouvrement de l'eugénoles (Figure 60 et Tableau 36), est importante (48,1 %). Cette part non négligeable de variabilité non expliquée, indique que d'autres phénomènes, non testés dans ce plan d'expériences, régissent le passage de l'eugénoles du vin à l'eau-de-vie et notamment dans les conditions de distillation, spécifiquement de type armagnacaise.

## Chapitre 2 : Le rôle particulier des enzymes

### I.1. Exploration des enzymes œnologiques

#### I.1.1. Choix des préparations enzymatiques

Dans le cadre de cette deuxième expérimentation œnologique et au vu des conclusions tirées du premier plan d'expérience, le choix a été fait de travailler, au cours d'un second millésime (2022) sur plusieurs préparations enzymatiques à plusieurs étapes de la vinification. L'idée ici était double : premièrement préciser l'action des enzymes œnologiques (second facteur le plus influant du premier plan d'expérience) et secondement explorer plus profondément certains facteurs (débouillage et temps de conservation sur lies) du premier plan d'expérience n'ayant pas présenté une influence très importante. Trois stades de vinifications impliquant possiblement l'action d'enzymes œnologiques ont été choisis : le débouillage, la révélation aromatique en fin de FA et le travail des vins sur lies avant distillation. Pour étudier l'influence des enzymes œnologiques à ces étapes précises, 6 préparations enzymatiques commerciales ont été sélectionnées pour leurs activités enzymatiques. Le but étant d'observer quelle(s) activité(s) influence(nt) le plus les teneurs en eugénol (libre et lié) dans les produits de Baco blanc (vins et eaux-de-vie). Il ne s'agissait pas de comparer les différentes spécialités commerciales, ces dernières ont donc été codées et classées selon leur stade d'utilisation (Tableau 37).

Tableau 37 : Résumé des préparations enzymatiques utilisées durant la seconde expérimentation œnologique

Étape de vinification	Préparation commerciale	Activités enzymatiques	Dose appliquée
Débouillage	A1	Polygalacturonase AG II Hydrolase Pectine lyase	3 mL·hL <sup>-1</sup>
	A2	Polygalacturonase	4 mL·hL <sup>-1</sup>
Révélation aromatique	B1	Polygalacturonase $\alpha$ -L-arabinofuranosidase	4 g·hL <sup>-1</sup>
	B2	Polygalacturonase $\beta$ -D-glucosidase	4 g·hL <sup>-1</sup>
Travail de conservation sur lies	C1	Polygalacturonase Endo-1,3(4)- $\beta$ -D-glucanase	4 g·hL <sup>-1</sup>
	C2	Polygalacturonase Exo-(1,3)- $\beta$ -D-glucanase Exo-(1,6)- $\beta$ -D-glucanase	10 g·hL <sup>-1</sup>



### I.1.2. La disponibilité en enzymes œnologiques

Il existe aujourd'hui, dans la filière viti-vinicole, un nombre important de spécialités commerciales couvrant les principales activités enzymatiques utilisées en œnologie (Tableau 38). Un abus de langage est pratiqué depuis le début de cette partie et sera poursuivi par soucis de simplicité d'écriture et de lecture. En effet les enzymes œnologiques utilisées dans ces expérimentations sont en fait des préparations enzymatiques, autrement dit la combinaison de plusieurs enzymes, plus ou moins purifiées.

Tableau 38 : Résumé des principales activités enzymatiques retrouvées en œnologie ainsi que leurs principales applications technologiques (<https://www.vignevin.com/publications/les-itineraires/>)

Activités enzymatiques	Opérations pré-fermentaires			Opérations post-fermentaires			
	Débouillage	Clarification	Pressurage	Extraction/ Macération	Libération d'arômes	Amélioration de la filtrabilité	Élevage sur lies
Pectolytiques	Polygalacturonase (PG)	■	■	■	■		■
	Pectine Lyase (PL)	■	■	■	■		■
	Pectine Méthyl Esterase (PME)	■	■	■	■		■
	Galactanase		■				■
Hemicellulolytiques							
Cellulases	Xylanase			■	■		
	Endo-(1-4)- $\beta$ -D- glucanase			■	■		■
Glycosidases	Exo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanase			■	■		■
	$\beta$ -D-glucosidase			■	■	■	
	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase			■	■	■	
Glucanases	$\alpha$ -L-rhamnosidase			■	■	■	■
	Exo-(1-3)- $\beta$ -D-glucanase		■				■
	Exo-(1-6)- $\beta$ -D-glucanase						■

### I.1.3. Plan d'expériences

Les différents stades de vinification décrits au paragraphe (page 216) ont constitué les 3 facteurs d'un second plan d'expériences, basé sur l'utilisation d'enzymes œnologiques :

- Le débouillage des moûts avant la FA : **DEB** ;
- La révélation aromatique en fin de FA : **AROM** ;
- Le travail sur les lies de FA : **LIES**.

À chacun de ces facteurs, ont été attribués 3 niveaux : deux préparations enzymatiques ont été testées par facteur et le troisième niveau correspondait à une expérience témoin, sans utilisation de préparation enzymatique. L'ensemble de ces caractéristiques forment un plan d'expériences factoriel complet  $3^3$ , c'est-à-dire à 3 facteurs prenant chacun 3 niveaux, soit un total de 27 expériences non répétées de vinifications.

Tableau 39 : Résumé des différentes vinifications mises en œuvre dans le cas du plan d'expérience factoriel complet  $3^3$ . Pour chaque facteur, le code de la préparation enzymatique, issu du Tableau 37, a été utilisé pour expliciter le niveau pris par le facteur. Le niveau R se retrouvant dans chaque facteur correspond au niveau « Rien », un niveau témoin pour lequel aucune préparation enzymatique n'a été utilisée. Dans ce cadre, pour le débourbage (DEB), la modalité R correspondait à un vin non débourbé ( $> 1\ 000$  NTU)

N° d'expé	DEB	AROM	LIES	N° d'expé	DEB	AROM	LIES
1	A1	B2	C1	15	R	B1	C2
2	A2	B2	C1	16	A1	R	C2
3	R	B2	C1	17	A2	R	C2
4	A1	B1	C1	18	R	R	C2
5	A2	B1	C1	19	A1	B2	R
6	R	B1	C1	20	A2	B2	R
7	A1	R	C1	21	R	B2	R
8	A2	R	C1	22	A1	B1	R
9	R	R	C1	23	A2	B1	R
10	A1	B2	C2	24	R	B1	R
11	A2	B2	C2	25	A1	R	R
12	R	B2	C2	26	A2	R	R
13	A1	B1	C2	27	R	R	R
14	A2	B1	C2				

Jusqu'au débourbage, la gestion des moûts a été menée de la même manière que pour le premier plan d'expériences (page 205). Le principe d'expérimentation en cascade a été suivi, autrement dit le plus grand volume commun a été conservé le plus longtemps possible. La totalité du volume de moût a été divisée en 3 parties afin d'appliquer les différentes modalités de débourbage (DEB). En fin de FA, conduite avec la Lalvin® FC9 à  $20\text{ g}\cdot\text{hL}^{-1}$ , chacun des 3 lots a été divisé en 3 autres lots afin d'appliquer les différentes modalités de libération enzymatique (AROM). Afin d'obtenir les 27 expériences, chacun des 9 lots a été divisé en 3 autres pour appliquer les différentes modalités de travail sur lies (LIES). Pour cela l'ensemble des modalités a été transféré dans des contenants de type fontaine à vin de 5L et conservées dans une chambre froide à  $4^\circ\text{ C}$  pour une durée de 3 mois. Le suivi du déroulement des expérimentations, la prise d'échantillon et l'analyse des composés d'intérêt et les distillations, ont été effectués de la même manière que lors du premier plan d'expérience (page 205).

## II. La libération du potentiel aromatique en eugénol

De la même manière que pour le premier plan d'expériences, l'ANOVA réalisée sur l'ensemble des données collectées durant ce second plan d'expérience, a permis de dégager les facteurs influençant de façon prépondérante les variations des teneurs en eugénol dans les produits de Baco blanc. Le Tableau 40 résume l'ensemble des contributions des facteurs aux concentrations en eugénol dans les différents produits mais également les contributions des interactions de facteurs (seulement de premier ordre). La Figure 66, quant à elle, permet d'avoir une lecture graphique des résultats compilés dans le Tableau 40. Les résidus (residuals) représentent la part de variabilité des résultats qui ne sont pas explicables par le modèle du plan d'expérience.

Tableau 40 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expériences 3<sup>3</sup> mis en œuvre. Pour chaque facteur étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou distillats) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les 3 niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque  $\alpha$  de 5 % sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs, les interactions entre eux sont indiquées par deux points

	EdV (n = 81)		Vin_Libre (n = 81)		Vin_Lié (n = 81)	
	Contrib. (%)	p-value	Contrib. (%)	p-value	Contrib. (%)	p-value
DEB	1,5	<b>2,2E-08</b>	2,7	<b>3,0E-25</b>	5,4	<b>2,5E-06</b>
AROM	86,3	<b>8,6E-52</b>	90,9	<b>2,0E-70</b>	73,4	<b>7,6E-29</b>
LIES	7,2	<b>3,0E-21</b>	4,4	<b>4,8E-31</b>	3,1	<b>3,4E-04</b>
DEB:AROM	0,6	<b>1,4E-03</b>	0,9	<b>1,1E-12</b>	1,7	<b>4,4E-02</b>
DEB:LIES	1,1	<b>8,9E-06</b>	0,1	<b>1,1E-02</b>	3,7	<b>6,7E-04</b>
AROM:LIES	1,2	<b>4,5E-06</b>	0,6	<b>1,4E-09</b>	2,3	<b>1,3E-02</b>
Résidus	2	nd	0,5	nd	10,4	nd

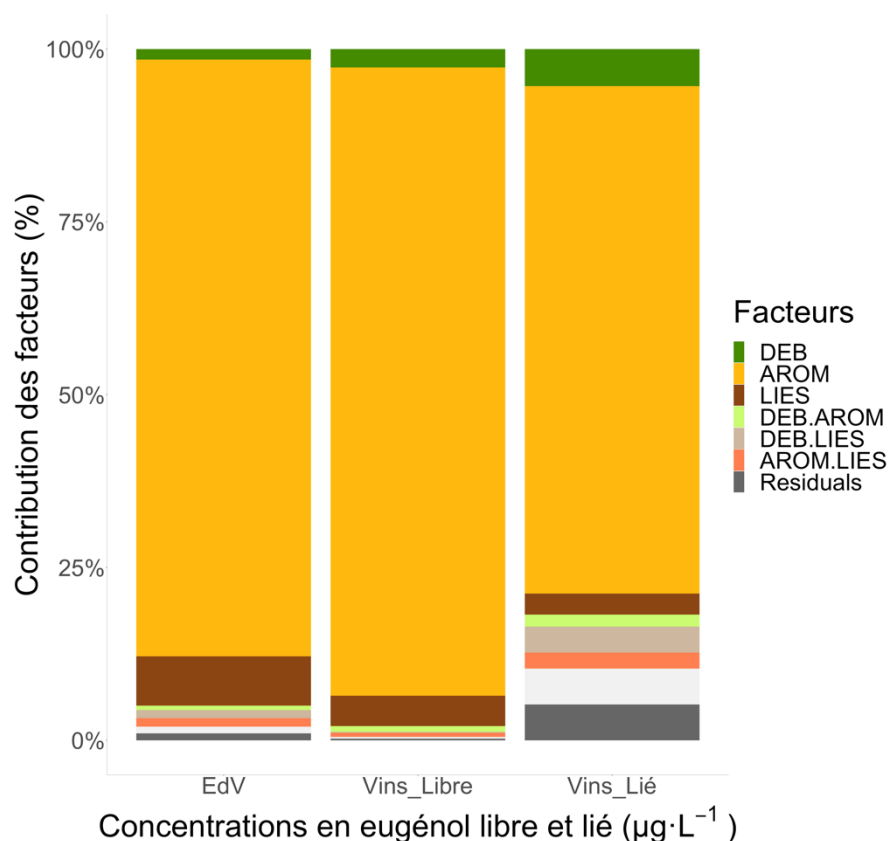


Figure 66 : Contribution des facteurs aux concentration en eugénol (libre et lié) dans les différents produits (vins et distillats) pour le plan d'expériences 3<sup>3</sup> mis en œuvre. Pour faciliter la lecture, seuls les facteurs dont la p-value est inférieure au risque  $\alpha$  de 0,05 apparaissent en couleur franche. Les autres facteurs apparaissent avec des couleurs atténuées. Pour chaque variable réponse, n = 81

## II.1. Approche des formes précurseurs de l'eugénol

De l'analyse de la contribution des facteurs (Tableau 40 et Figure 66), l'utilisation d'enzymes libératrices d'arômes (facteur AROM) apparaît comme le facteur prépondérant dans la variation des concentrations en eugénol dans les produits de Baco blanc. En effet dans les vins, il contribue entre 73,4 % (pour l'eugénol lié) et 90,9 % (pour l'eugénol libre) à cette variation. Il en va de même pour les distillats puisque le facteur AROM contribue à hauteur de 86,3 %. Pour aller plus loin, il a été nécessaire de regarder l'influence de chaque niveau sur ces concentrations en eugénol. Des tests *post hoc* de Newman-Keuls ont donc été effectués pour évaluer l'activité enzymatique permettant d'optimiser les concentrations en eugénol (Figure 67).

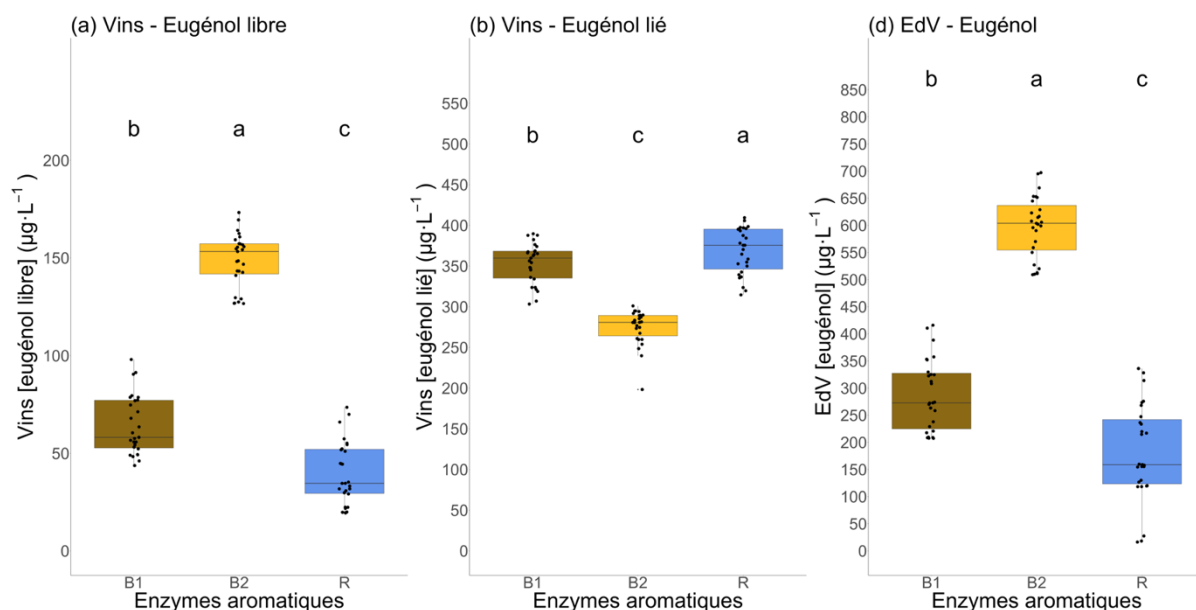


Figure 67 : Concentrations en eugénol (libre et lié) dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (B1, B2 et R) par le facteur enzymes aromatiques (AROM). Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Les points autour des boîtes à moustaches correspondent à toutes les expérimentations concernées par les modalités attenantes. Pour chaque variable réponse et pour un niveau de facteur,  $n = 27$

Pour chaque variable réponse, des différences significatives peuvent être mises en évidence. Pour ce qui est de l'eugénol libre dans les vins (Figure 67a) et de l'eugénol dans les distillats (Figure 67c), la même tendance est observée, autrement dit c'est la préparation enzymatique B2 (préparation enrichie en  $\beta$ -d-glucosidase ; cf. Tableau 37) qui permet une concentration optimale en eugénol ( $148,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour les vins et  $597,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour les distillats). À noter également que pour les mêmes variables réponses, la préparation enzymatique B1 (préparation enrichie en  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ; cf. Tableau 37) permet une augmentation de la concentration en eugénol vis-à-vis de la modalité R (sans ajout de préparation enzymatique libératrice d'arômes). En effet pour les vins, cette préparation enzymatique permet de passer de  $40,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour la modalité R à  $64,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour la modalité B1. Pour les distillats, la concentration en eugénol varie de  $181,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour la modalité R à  $287,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour la modalité B1.

Concernant la concentration en eugénol lié dans les vins (Figure 67b), une tendance opposée apparaît logiquement. La modalité B2 est celle qui présente significativement la concentration en eugénol lié la plus faible avec  $274,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Tandis que la modalité R est celle qui présente significativement la teneur en eugénol lié la plus importante avec  $368,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La modalité B1 reste une modalité intermédiaire avec  $351,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

## **II.2. Rôle des enzymes dans le débourbage et la conservation sur lies sur la disponibilité en eugénol**

Les autres facteurs que sont le débourbage (DEB) et le travail des lies (LIES) sont moins influant sur les teneurs en eugénol que l'utilisation de préparations enzymatiques (Tableau 40 et Figure 66). En effet leurs contributions respectives pour les différentes variables réponses oscillent entre 1,5 et 5,4 % pour le premier et entre 3,1 et 7,2 % pour le second. Afin de déterminer quelle(s) préparation(s) enzymatique(s) de débourbage ou de travail sur lies, permet une optimisation des teneurs en eugénol, des tests *post hoc* de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 % ont été effectués pour chaque facteur (Figure 68 et Figure 69).

Concernant le facteur DEB (Figure 68), c'est la préparation enzymatique A2 (polygalacturonase seule ; Tableau 37) qui permet une teneur moyenne en eugénol libre dans les vins (Figure 68a) significativement plus importante ( $94,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que la préparation enzymatique A1 avec  $83,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (préparation composée d'activités enzymatiques plus destructrices de la pectine ; Tableau 37) et que la modalité R ( $44,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Il en va de même pour les distillats (Figure 68c) : l'utilisation de la préparation A2 induit une teneur moyenne en eugénol significativement plus importante ( $386,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que l'utilisation de la préparation A1 ( $348,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et que la modalité R ( $330,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Pour ce qui est de l'eugénol lié (Figure 68b), une tendance inverse a pu être observée. En effet, la modalité R a présenté une concentration moyenne en eugénol lié ( $346,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significativement supérieure aux concentrations des modalités A1 ( $319,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et A2 ( $330,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

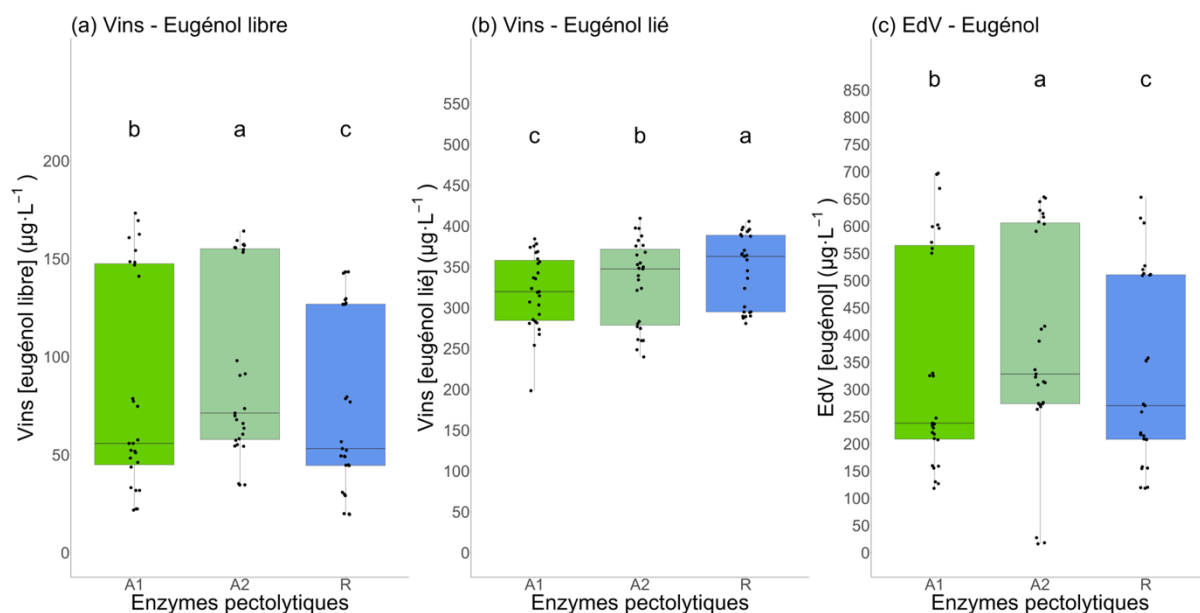


Figure 68 : Concentrations en eugénoł libre dans les vins et en eugénoł dans les distillats en fonction des niveaux pris (A1, A2 et R) par le facteur débouillage (DEB). Figure (a), concentration en eugénoł libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénoł lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénoł dans les distillats (EdV). Les points autour des boîtes à moustaches correspondent à toutes les expérimentations concernées par les modalités attenantes. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque variable réponse et pour un niveau de facteur,  $n = 27$

Pour ce qui est du facteur LIES, la préparation enzymatique C1 (Endo-1,3(4)- $\beta$ -D-glucanase ; cf. Tableau 37) permet une optimisation de la teneur en eugénoł libre dans les vins (Figure 69a). En effet la teneur moyenne en eugénoł libre est significativement plus importante avec cette modalité ( $98,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) qu'avec la modalité C2, préparation enzymatique composée d'un complexe exo-(1,3) et (1,6)- $\beta$ -D-glucanase (cf. Tableau 37), qui présente une teneur en eugénoł libre de  $81,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , et qu'avec la modalité R ( $73,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Encore une fois, il en va de même pour les distillats (Figure 69c) : la préparation C1 induit une teneur en eugénoł significativement plus importante ( $421,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) qu'avec les modalités C2 ( $345,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et R ( $298,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Enfin, pour ce qui est de l'eugénoł lié, une tendance inverse a pu être observée (Figure 69b), à savoir, la modalité R a présenté une concentration moyenne en eugénoł lié significativement supérieure ( $338,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) à celle de la modalité C1 ( $320,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et a présenté, très légèrement supérieure en tendance à la concentration en eugénoł lié de la modalité C2 ( $338,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

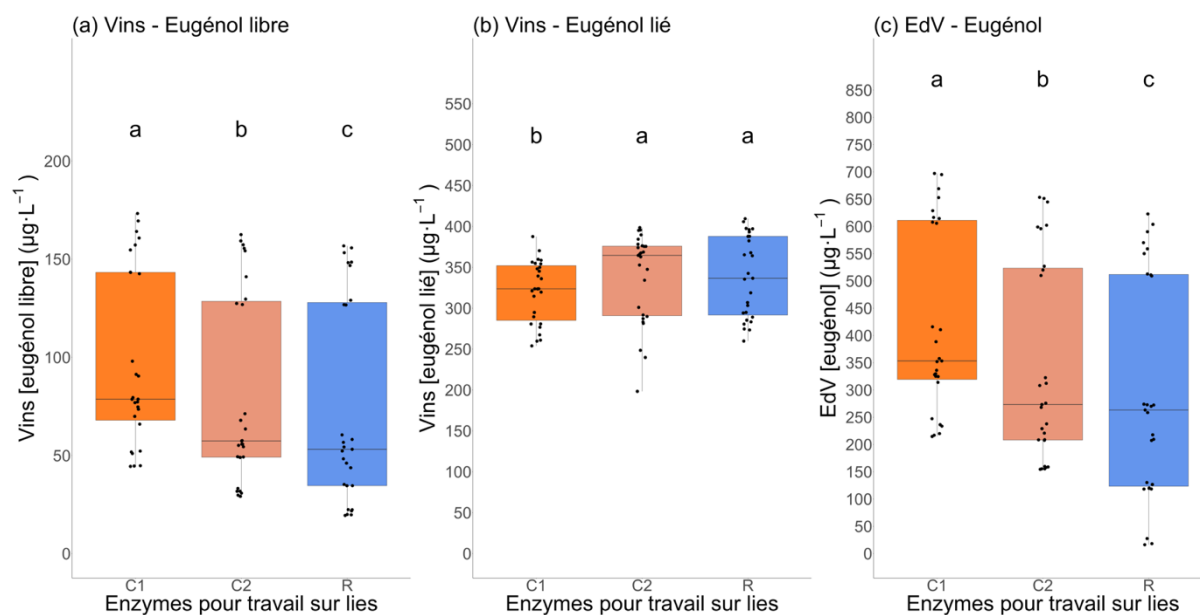


Figure 69 : Concentrations en eugénol libre et lié dans les vins et en eugénol dans les distillats en fonction des niveaux pris (C1, C2 et R) par le facteur travail sur lies (LIES). Figure (a), concentration en eugénol libre dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en eugénol lié dans les vins avant distillation. Figure (c), concentration en eugénol dans les distillats (EdV). Les points autour des boîtes à moustaches correspondent à toutes les expérimentations concernées par les modalités attenantes. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque variable réponse et pour un niveau de facteur,  $n = 27$

### III. Discussions et conclusion

Dans ce second plan d'expériences, c'est bien l'utilisation d'enzymes aromatiques qui s'est révélé être le facteur prépondérant dans la variation des teneurs en eugénol dans les produits de Baco blanc (Tableau 40 et Figure 66). Plus encore, l'activité  $\beta$ -glucosidase a permis de confirmer l'existence d'un potentiel en eugénol encore inexploité dans les produits de Baco blanc. Cette forte influence d'enzymes  $\beta$ -glucosidases a également donné des informations sur la nature du ou des précurseurs de l'eugénol. En effet, si des formes monoglucosidiques peuvent exister, des formes hétérosidiques plus complexes (aglycone lié à plusieurs oses) peuvent également exister (V. Ferreira & Lopez, 2019). Il est donc possible d'imaginer au moins deux formes d'eugénol lié. De plus, l'efficacité partielle d'une préparation enzymatique contenant majoritairement une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase permet d'imaginer plus précisément le(s) précurseur(s) de l'eugénol. Soit un hétéroside simple : arabinose lié à l'eugénol, soit un hétéroside plus complexe dont l'enchaînement serait : arabinose-glucose-eugénol. L'activité  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase étant une première étape dans la libération d'un composé aromatique à partir d'hétéroside complexe (Grossmann & Rapp, 1988; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012).



L'étude du facteur débourage (DEB), assisté par l'utilisation de préparations enzymatiques, est intéressante bien que sa contribution reste faible (Tableau 40 et Figure 66). Concernant les vins, la clarification du moût peut limiter les activités  $\beta$ -glucosidases du raisin (Grossmann *et al.*, 1990). De plus, ce même débourage peut causer d'importantes diminutions en précurseurs d'arômes en fonction du type de clarification. Mais un débourage aidé par l'utilisation d'enzymes pectolytiques est celui qui permet la plus grande préservation des précurseurs d'arômes (Moio *et al.*, 2004). Les résultats présentés ici sont en accord avec la littérature scientifique. En effet, l'utilisation d'enzymes pectolytiques a permis une libération de l'eugénol. De plus, ce sont les préparations les moins destructrices de la pectine qui induisent la libération la plus importante d'eugénol. Appuyant ainsi le fait que l'eugénol et ses précurseurs sont bien plus concentrés dans la pellicule des raisins de Baco blanc.

Enfin concernant la conservation des vins avant distillation, le travail des lies grâce à des enzymes appropriées, semble permettre l'induction de plus grandes teneurs en eugénol dans les produits de Baco blanc. Les préparations enzymatiques riches en endo-1,3(4)- $\beta$ -D-glucanase semblent permettre une plus grande libération de l'eugénol dans les vins et les distillats. Ces enzymes sont effectivement capables de lyser les glucanes des parois cellulaires des levures (Kulminskaya *et al.*, 2001). En effet, (Chung, 1986) a quantifié de plus grandes concentrations de composés volatils dans des matrices ayant subi un temps de conservations sur lies plus important. Ceci fait parfaitement écho aux conclusions du premier plan d'expériences (page 213). Outre le temps de conservation, l'état d'autolyse des levures est également un facteur important : une conservation sur des levures mortes particulièrement dégradées peut induire des concentrations en composés volatils plus élevées (Molnar *et al.*, 1981). Enfin, un élevage sur lies peut permettre une libération de composés aromatiques à partir de leurs précurseurs. Leur libération serait assurée par des  $\beta$ -glucosidases internes aux parois cellulaires des levures mortes (Zoecklein *et al.*, 1997).

Reste que le Baco blanc est une variété de chaudière donc destinée à la production d'eau-de-vie. Si les microdistillations double-chauffe ont permis d'approcher le comportement de l'eugénol en distillation, l'intérêt de travailler sur l'observation et la compréhension des phénomènes de distillation continue en conditions réelles est grand.

## Chapitre 3 : L'influence de la distillation sur la concentration et la récupération de l'eugénol du vin

De nombreux échantillons de vins et d'eaux-de-vie correspondantes ont été récoltés directement chez les producteurs d'Armagnac, lors de la distillation pratiquée avec un alambic continu. Cet échantillonnage à large échelle de temps et de lieux a permis de nombreuses analyses afin de dégager de grandes tendances.

### I. Influence de quelques paramètres de distillation

#### I.1. Le TAV de coulage

Le TAV « de coulage » est le TAV auquel l'eau-de-vie d'Armagnac est obtenue par distillation. Ses valeurs minimales et maximales sont fixées par le cahier des charges de l'appellation (de 52 à 72,4 % (v/v) en distillation continue et de 65 à 72,4 % en distillation double chauffe, En distillation continue, le TAV de coulage est essentiellement dépendant du TAV du vin de base, des réglages de l'alambic et des capacités de ce dernier (Bertrand & Ségur, 1991). Le TAV de coulage influence de manière significative les teneurs en composés volatils, notamment en fonction de la nature chimique de ces derniers (Bertrand & Ségur, 1991; Puentes *et al.*, 2018). À partir des échantillons récoltés chez les producteurs d'Armagnac et pratiquant uniquement la distillation continue, il a été possible d'évaluer l'effet du TAV de coulage sur les concentrations en eugénol dans les eaux-de-vie blanches élaborées avec la variété Baco blanc (Figure 70).

Il apparaît que pour le millésime 2020, plus les eaux-de-vie sont obtenues à TAV élevés, moins elles sont concentrées en eugénol (corrélation négative significative avec  $p\text{-value} = 1,4 \times 10^{-6}$ ). Il en va de même pour le millésime 2021 ( $p\text{-value} = 9,8 \times 10^{-6}$ ) et donc pour l'ensemble des millésimes étudiées ( $p\text{-value} = 5,5 \times 10^{-9}$ ). Ces observations confirment des résultats obtenus au cours des millésimes 2018 et 2019 sur des eaux-de-vie blanches de Baco blanc issues de distillation continue (Franc *et al.*, 2023). De plus ce comportement de l'eugénol, c'est-à-dire une diminution de sa concentration avec l'augmentation du TAV de coulage de l'eau-de-vie, tend à en faire un « produit de queue » (Segur & Bertrand, 1992) ou un composé qualifié « d'intermédiaire » (Puentes *et al.*, 2018). Ce statut de l'eugénol associé à son intérêt supposé dans les caractéristiques aromatiques des eaux-de-vie plaident pour une distillation à bas TAV, favorisant sa concentration dans les eaux-de-vie.

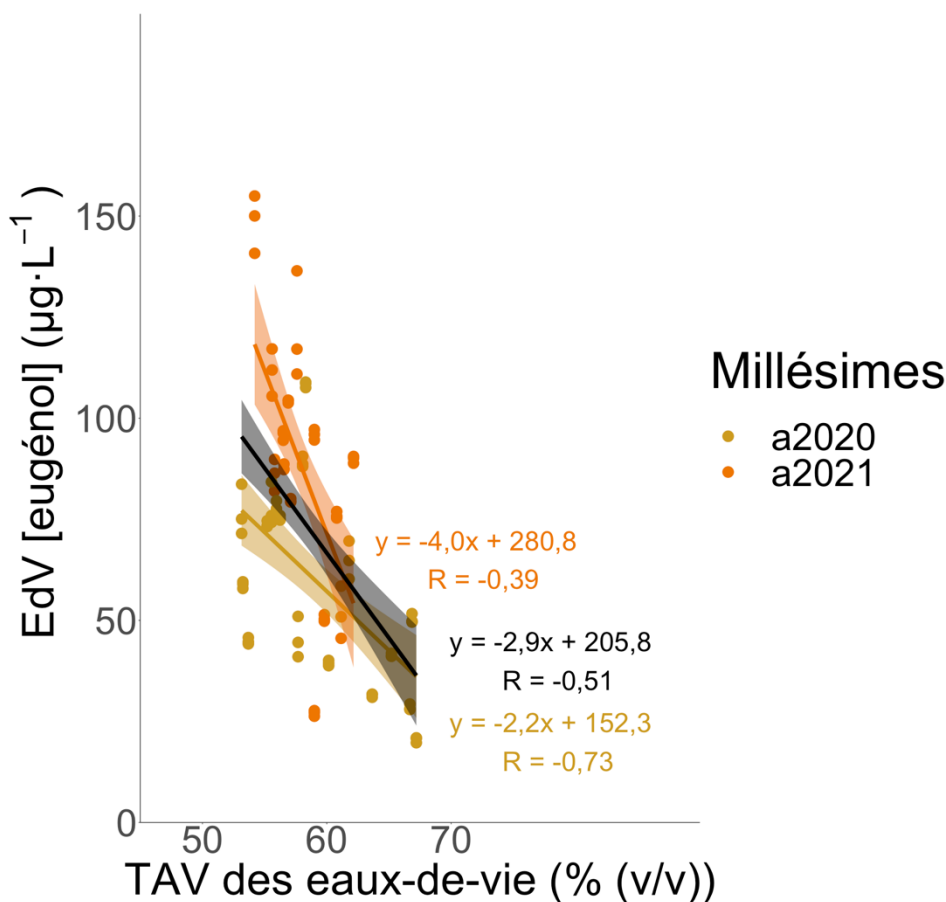


Figure 70 : Corrélations linéaires entre TAV de coulage et concentration en eugénol d’eaux-de-vie d’Armagnac élaborées avec la variété Baco blanc. En jaune foncé sont représentés les points correspondant aux triplicata analytiques de 17 eaux-de-vie récoltées (soit n = 51) durant la campagne 2020-2021 (millésime a2020). En orange sont représentés les points correspondant aux triplicata analytiques de 14 eaux-de-vie blanches récoltées (soit n = 42) durant la campagne de distillation 2021-2022 (millésime a2021). En noir apparaît la corrélation linéaire et ses intervalles de confiance à 95 % de l’ensemble des deux millésimes. Les corrélations linéaires (ligne en pointillés) et les intervalles de confiance à 95 % de ces dernières sont représentés avec la même couleur que les points correspondant. Pour chaque corrélation sont indiqués, en usant de la même couleur, l’équation de la droite de régression ainsi que le R de Pearson

## I.2. Mode de distillation, différence entre distillations continue et double-chauffe

La comparaison entre distillation double-chauffe à repasse et distillation continue peut permettre d’identifier des différences de comportement de l’eugénol en distillation. Pour cela, un même lot de vin de Baco blanc a été distillé, dans la même distillerie, sur un alambic à

repassé et sur un alambic continu. La Figure 71 illustre la concentration en eugénol selon le temps de distillation dans l'alambic à repasse et donc pour deux distillations consécutives : la chauffe du vin (Figure 71a) et la bonne chauffe (Figure 71b).

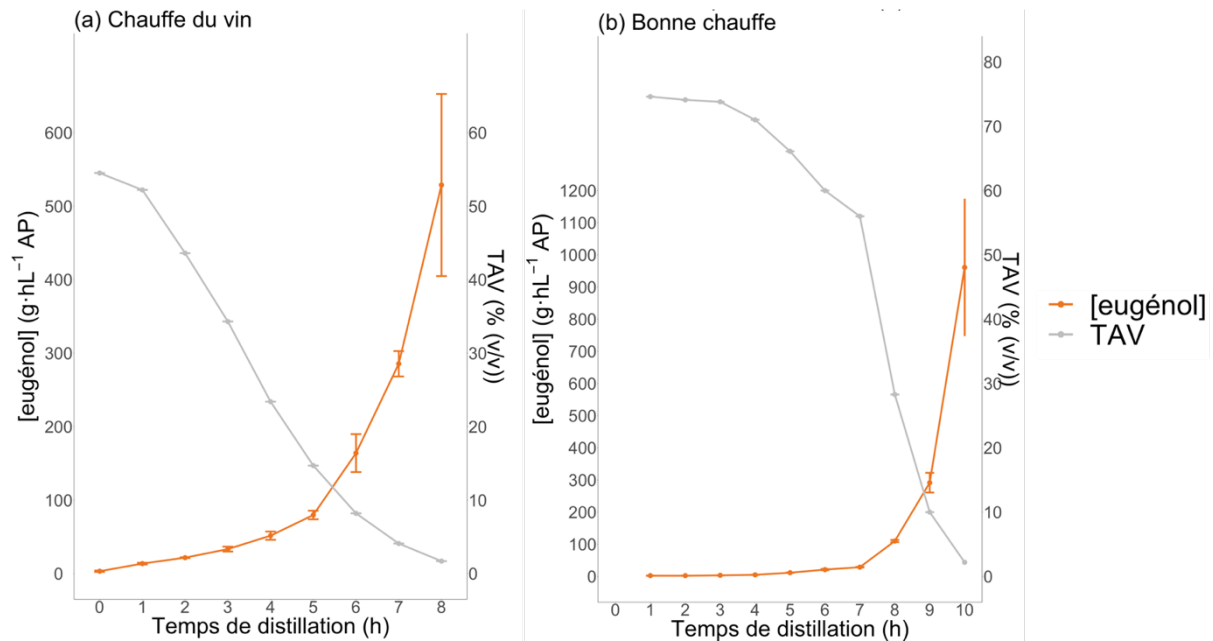


Figure 71 : Comportement de l'eugénol au cours d'une distillation double-chauffe. Figure (a), comportement de l'eugénol au cours de la chauffe du vin. Sa concentration est suivie grâce à la courbe orange tandis que le TAV du distillat est suivi grâce à la courbe grise. Figure (b), comportement de l'eugénol au cours de la chauffe du vin. Sa concentration est suivie grâce à la courbe orange tandis que le TAV du distillat est suivi grâce à la courbe grise. La concentration est ici exprimée en g·hL<sup>-1</sup> d'AP

Les concentrations, illustrées dans la Figure 71, sont exprimées en g d'eugénol par hL d'alcool pur, autrement dit la concentration en eugénol est ramenée à une solution d'éthanol pur. Cela permet de comparer les différentes étapes (heure par heure) de la distillation, marquées par des TAV très différents. En prenant en compte cette unité de concentration, il apparaît qu'au cours des deux distillations (chauffe du vin et bonne chauffe), l'eugénol se concentre dans les dernières fractions de distillation. Ce qui confirme que l'eugénol est un produit de distillation qualifié de « queue ».

La Figure 72, quant à elle, illustre les concentrations en eugénol dans différents produits issus d'une distillation du même vin de Baco blanc en alambic continu. Leurs différences résident dans l'utilisation ou pas d'une annexe de cet alambic : l'extraction de queues à partir d'un piquage situé sous les premières spires du serpentin au début de la condensation des vapeurs d'eau-de-vie.

Les échantillons ayant permis le dosage de l'eugéno1 sur ces eaux-de-vie ont été prélevés lorsque l'alambic a atteint son point nominal de fonctionnement (constance du TAV de coulage).

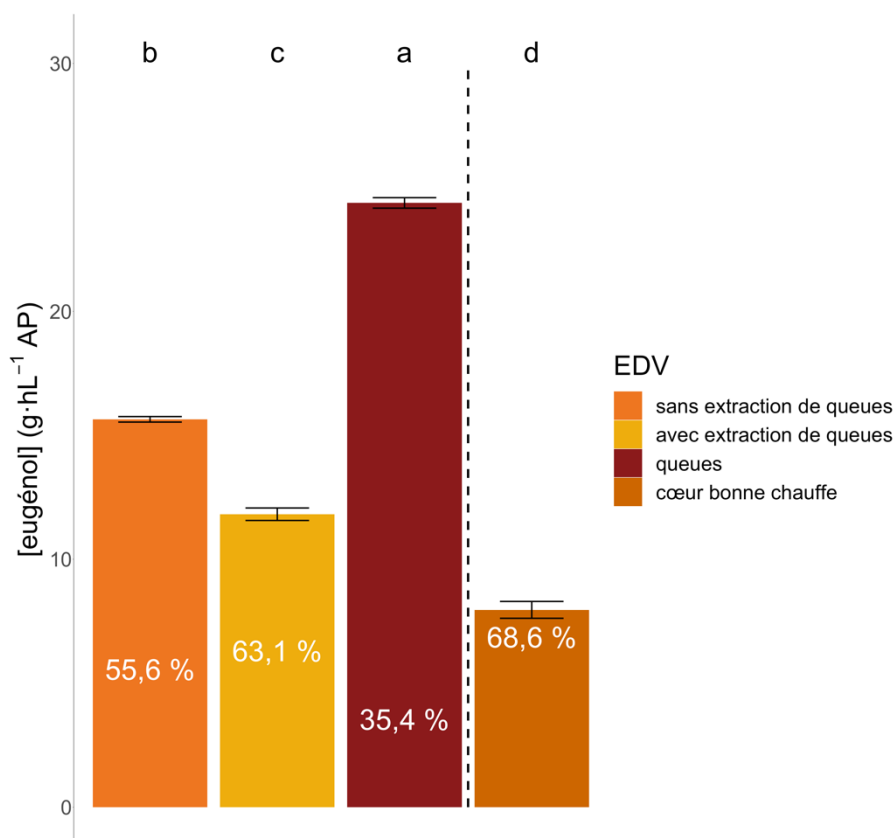


Figure 72 : Concentrations en eugéno1 dans des eaux-de-vie obtenues à partir d'un même alambic continu et selon l'activation de plusieurs annexes de cet alambic. En blanc apparaissent les TAV propres à chaque eau-de-vie. La modalité « cœur bonne chauffe » est en fait issue des données de distillation double-chauffe (plus précisément de la chauffe du vin disponible en Figure 71). Pour chaque modalité, n = 3

Les concentrations de la Figure 72 sont exprimées en g d'eugéno1 par hL d'alcool pur. Les résultats de dosage en eugéno1 de ces différentes eaux-de-vie tendent à confirmer les précédents résultats (cf. la distillation à repasse Figure 71, cf. l'influence du TAV sur les concentrations en eugéno1 (Figure 70). C'est-à-dire, que l'eugéno1 serait bel et bien un produit de queue puisque la fraction des queues est significativement la plus concentrée en eugéno1 (24,4 g·hL<sup>-1</sup> AP). De plus une distillation sans extraction de queue induit une concentration significativement plus importante en eugéno1 (15,6 g·hL<sup>-1</sup> AP) qu'une distillation avec extraction de queue (11,8 g·hL<sup>-1</sup> AP). Pour un alambic continu, il apparaît donc que l'utilisation

de l'annexe permettant l'extraction des queues ne semble pas souhaitable si l'objectif est de conserver une concentration maximale en eugénol dans les eaux-de-vie. Enfin si comparaison est faite avec la distillation double-chauffe (modalité « cœur bonne chauffe » de la Figure 72), il est clairement apparu que la distillation continue permet une concentration plus importante en eugénol. En effet, les deux eaux-de-vie obtenues avec ou sans extraction de queues ont présenté des concentrations en eugénol significativement plus importantes que leur pendant (fraction des cœurs) en distillation double-chauffe ( $8,0 \text{ g}\cdot\text{hL}^{-1}$  AP).

Ces observations empiriques ont milité pour l'exploration plus large de l'influence des paramètres opératoires de la distillation avec un alambic continu sur le comportement de l'eugénol. Cependant, les expérimentations en conditions réelles sont difficiles à mettre en œuvre de manière rigoureuse. De plus, aucun alambic pilote de dimension réduite n'était disponible. De ce fait, il a été demandé au CRITT-GPTE de Toulouse, une étude de la simulation du comportement de l'eugénol en distillation continue armagnacaise.

## **II. Simulation numérique de l'eugénol en distillation continue**

Le BNIA entretient un partenariat avec le CRITT (Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie) – GPTE (Génie des Procédés et Technologie Environnementale) de Toulouse, institut qui a donc réalisé, en prestation de service, une étude sur le comportement de l'eugénol durant la distillation armagnacaise. Pour ce faire le CRITT – GPTE a d'abord développé un modèle thermodynamique permettant de nourrir une analyse de sensibilité du comportement de l'eugénol en distillation. Ce modèle s'est basé sur un système simplifié faisant intervenir une matrice eau/éthanol contenant de faibles quantités d'eugénol (représentation schématique d'une eau-de-vie blanche de Baco blanc). Les équilibres liquide-vapeur dégagés de ce modèle, ont permis de nourrir l'étude de sensibilité réalisée grâce à une simulation numérique d'une distillation continue menée avec le logiciel ProSim Plus 3 (ProSim SA, Labège, France). L'environnement de cette simulation a été défini en prenant comme modèle un alambic armagnacais déjà étudié par le CRITT – GPTE et dont les caractéristiques sont donc déjà connues (descriptions de la chaudière, de l'alimentation en vin, de la colonne à distiller, du serpentín en tête de colonne, du chauffe-vin et de certaines annexes de l'alambic).

## II.1. Modèle thermodynamique

Le modèle thermodynamique choisi par le CRITT – GTPE est un modèle prédictif de contribution des groupe fonctionnels PSRK. Autrement dit, il s'agit d'un modèle estimant les phases d'équilibres entre les états de la matière d'un mélange de plusieurs composants. Pour établir ce modèle une recherche bibliographique a été nécessaire afin d'insérer au modèle des données d'équilibre liquide – vapeur pour tous les binaires possibles de l'eau, de l'éthanol et de l'eugénol. Les données d'équilibre concernant les binaires eau/éthanol et éthanol/eugénol sont disponibles dans les bases de données spécifiques. Celles du binaire eau/eugénol, non disponibles, ont dû être prédites à partir du modèle PSRK. Modèle considéré comme robuste par le CRITT qui a permis d'établir des valeurs de volatilité relative et absolue de l'eugénol par rapport à l'eau et à l'éthanol (Figure 73).

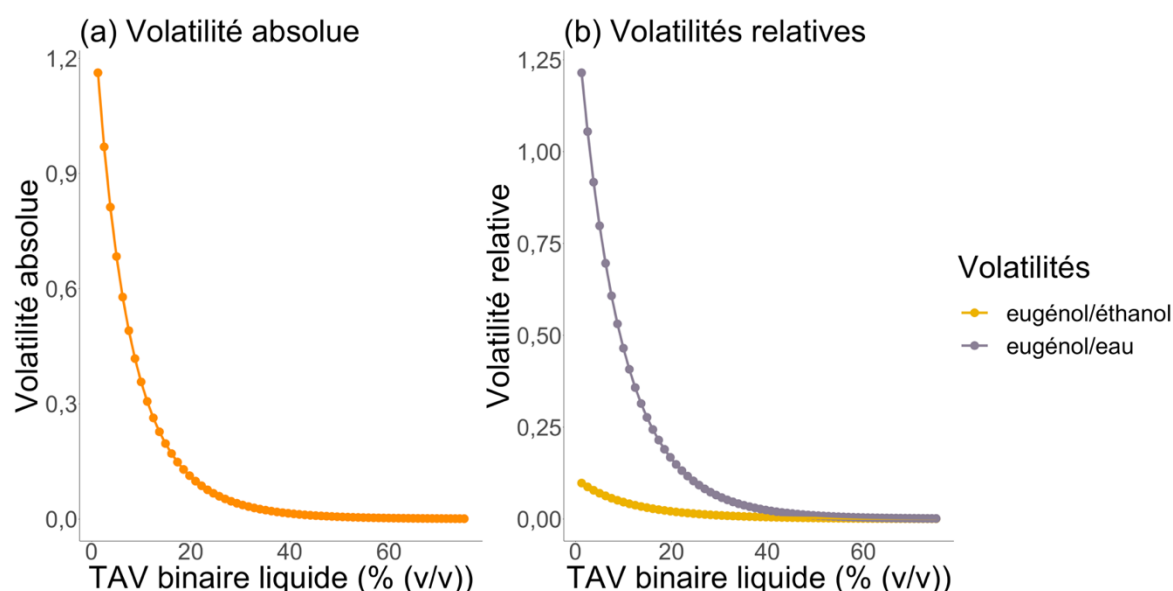


Figure 73 : Volatilités de l'eugénol en fonction du TAV d'un binaire liquide eau/éthanol, obtenues avec le modèle thermodynamique défini. Figure (a) en orange, volatilité absolue de l'eugénol. Figure (b), volatilités relatives de l'eugénol par rapport à l'eau et par rapport à l'éthanol

L'analyse de la volatilité absolue de l'eugénol (Figure 73a) a montré qu'il s'est plus concentré dans la phase liquide que dans la phase vapeur pour des TAV supérieurs à 25 % (v/v). La phase vapeur était plus concentrée en eugénol que la phase liquide mais seulement pour des TAV très bas. En considérant les volatilités relatives de l'eugénol (Figure 73b), pour les TAV du vin seulement, ce dernier est apparu comme plus volatil que l'eau mais moins volatil que l'éthanol. Ces résultats confirment de manière plus fondamentale, les observations empiriques faites sur

des productions d'eau-de-vie (page 226) conduisant à la classification de l'eugénol en produit de queue ou produit intermédiaire selon (Puentes *et al.*, 2018).

## **II.2. Étude de sensibilité de la concentration en eugénol en fonction de la variation de paramètres opératoires de l'alambic et leur influence sur des paramètres clefs de la conduite d'un alambic**

Au cours de cette étude de sensibilité par le CRITT – GTPE, différents paramètres de pilotage d'un alambic continu ont été étudiés. L'influence de ces modifications a été évaluée en mesurant plusieurs paramètres clefs de la production d'eau-de-vie (comme le TAV, le débit de coulage ...) ainsi qu'en évaluant la variation de la concentration en eugénol dans l'eau-de-vie. Les paramètres de pilotage de l'alambic étudiés sont les suivants :

- La quantité de chaleur délivrée au bouilleur (chaudière) ;
- Le débit de soutirage des queues ;
- Et le débit d'alimentation en vin.

Pour chaque paramètre dont les valeurs variaient, les autres étaient fixés à leur valeur lorsque l'alambic avait atteint son point nominal de fonctionnement.

### **II.2.1. Sensibilité de la quantité de chaleur apportée au bouilleur**

La quantité de chaleur apportée au bouilleur d'un alambic est un paramètre clef de distillation qui influence la séparation des molécules dans la colonne à distiller mais également les conditions de coulage. En effet, cette quantité de chaleur appliquée au bouilleur est corrélée au débit de vapeur dans la colonne, pouvant ainsi modifier la qualité de séparation des molécules et le débit de coulage en sortie du serpent. Une augmentation de cette quantité de chaleur apportée au bouilleur va induire une augmentation du débit de vapeur dans la colonne, augmentant par la même le débit de coulage de l'eau-de-vie. Cette dernière se retrouvera alors plus diluée et présentera donc un TAV diminué.

Lors de la simulation, la variation de la quantité de chaleur apportée au bouilleur était comprise entre 77 et 90 kW, faisant varier le TAV de l'eau-de-vie entre 60 et 52 % (v/v) et le débit de coulage de l'eau-de-vie entre 1,3 et 1,5 hL h<sup>-1</sup> (Figure 74a). L'augmentation de la quantité de chaleur apportée au bouilleur a bien induit l'augmentation du débit de coulage conjointement à une diminution du TAV. Bien que les valeurs de concentration en eugénol au cours de



l'évolution de la quantité de chaleur ne soient pas représentatives des valeurs empiriquement observées (certainement à cause du manque de données thermodynamique, concernant l'eugénol implémentées au modèle), la tendance a été particulièrement intéressante à observer. En effet, une augmentation de la concentration en eugénol était visible et concomitante à l'augmentation de la quantité de chaleur et donc à la diminution du TAV (Figure 74b).

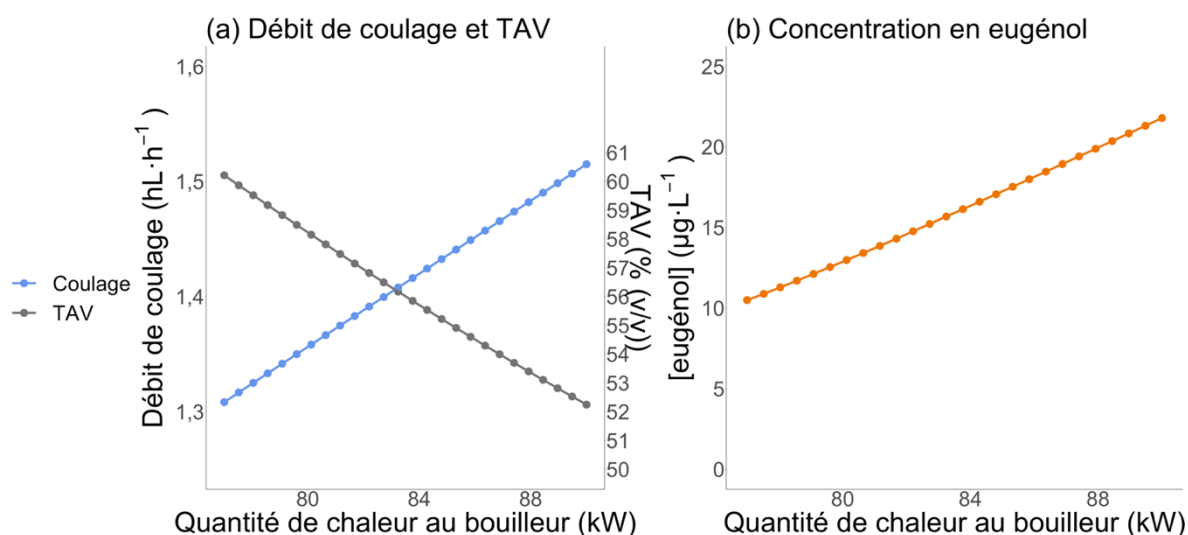


Figure 74 : Évolutions du débit du coulage, du TAV et de la concentration en eugénol d'une eau-de-vie blanche, établies par simulation numérique en fonction de la quantité de chaleur apportée au bouilleur. Figure (a), évolution du débit de coulage et du TAV de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution de la quantité de chaleur apportée au bouilleur. Figure (b), évolution de la concentration en eugénol de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution de la quantité de chaleur apportée au bouilleur

### II.2.2. Sensibilité du débit des queues

Un piquage de queues, autrement dit une extraction des queues, permet une concentration, au coulage, de l'eau-de-vie en éthanol ainsi qu'une diminution du débit de ce coulage. Comme indiqué dans la construction du modèle thermodynamique, une augmentation du TAV induit une volatilité moindre des molécules aromatique semblables à l'eugénol. La perte en volatilité engendre une diminution de la concentration de ces molécules dans la phase vapeur et donc dans l'eau-de-vie au coulage.

C'est ce qui a été observé lors de la simulation (Figure 75). L'augmentation du débit de queues, donc de leur extraction, a bien engendré une augmentation du TAV et une diminution du débit de coulage (Figure 75a). Pour ce qui est de la concentration en eugénol, l'augmentation du débit de queues a effectivement induit une diminution de la concentration en eugénol (Figure 75b).

De la même manière que pour la quantité de chaleur apportée au bouilleur, pour les mêmes raisons, les valeurs de concentrations en eugénol n'ont pas semblé cohérentes avec les observations empiriques.

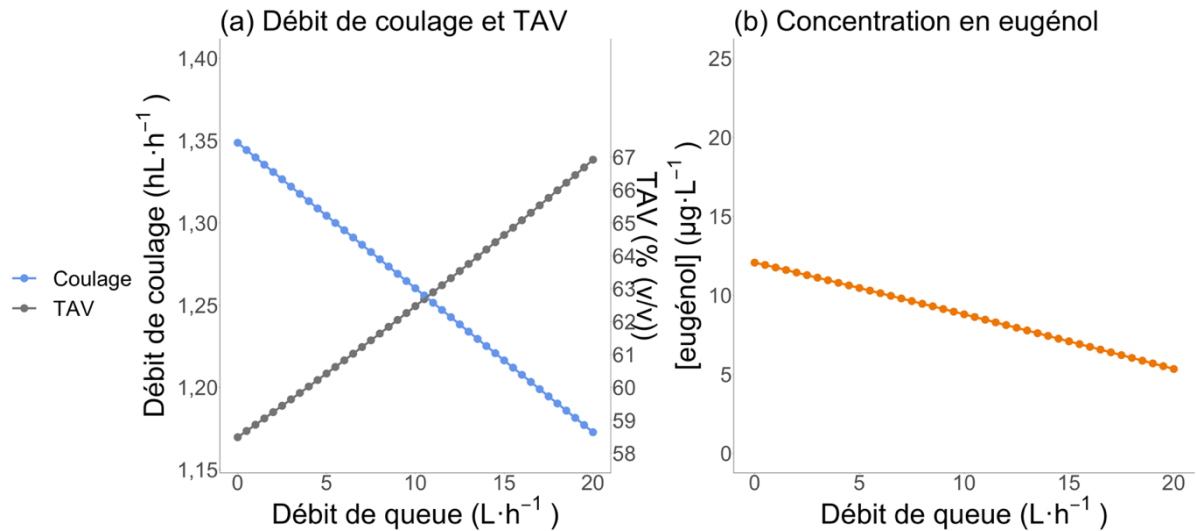


Figure 75 : Évolutions du débit du coulage, du TAV et de la concentration en eugénol d'une eau-de-vie blanche, établies par simulation numérique en fonction du débit d'alimentation en vin. Figure (a), évolution du débit de coulage et du TAV de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit d'alimentation en vin. Figure (b), évolution de la concentration en eugénol de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit d'alimentation en vin

### II.2.3. Sensibilité du débit de l'alimentation

Le débit d'alimentation de l'alambic continu est en fait le débit du vin entrant dans le chauffe-vin. Augmenter son débit va engendrer une augmentation de la quantité d'éthanol entrant dans l'alambic. Cette augmentation induira donc une augmentation du TAV de coulage. Une diminution de la volatilité des molécules aromatiques semblables à l'eugénol est donc attendue. Encore une fois la simulation numérique a confirmé les phénomènes attendus (Figure 76). L'augmentation du débit d'alimentation a conduit à une augmentation du TAV de coulage et donc à une diminution concomitante du débit de ce coulage (Figure 76a), ainsi qu'à une diminution de la concentration en eugénol (Figure 76b). De la même façon que pour le débit des queues et pour la quantité de chaleur apportée au bouilleur, les valeurs de concentration en eugénol ne semblent pas cohérentes avec les observations empiriques.

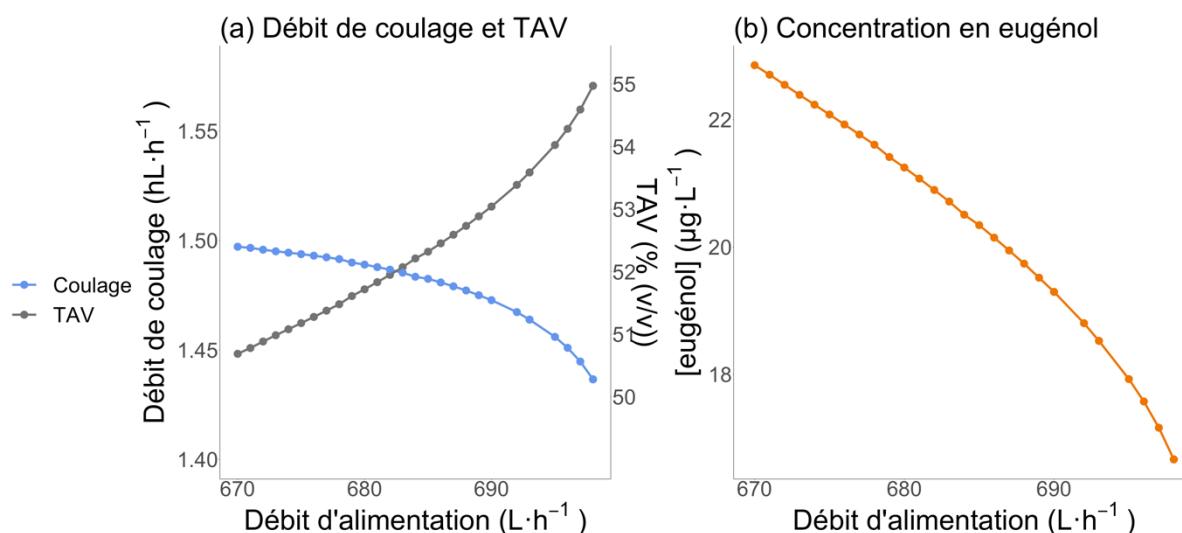


Figure 76 : Évolutions du débit du coulage, du TAV et de la concentration en eugénol d'une eau-de-vie blanche, établies par simulation numérique en fonction du débit de queue. Figure (a), évolution du débit de coulage et du TAV de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit de queue. Figure (b), évolution de la concentration en eugénol de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit de queue

Cette étude de sensibilité menée par le CRITT – GTPE, au moyen du logiciel ProSim Plus 3, a permis de mettre en exergue, de manière fondamentale, le comportement de l'eugénol en distillation. Le modèle thermodynamique développé et la simulation numérique de la distillation en alambic continu ont permis de confirmer des observations empiriques. Plus encore, ces essais virtuels ont explicité le rôle de certains paramètres clefs dans le pilotage d'un alambic continu et leur influence sur la concentration en eugénol. Cette étude confirme le lien entre le TAV de coulage et la concentration en eugénol des eaux-de-vie et semble montrer que quelle que soit la méthode utilisées pour augmenter le TAV de coulage (augmentation du débit d'alimentation en vin, piquage de queues au serpentin ou diminution de la puissance de chauffe), l'influence sur l'eugénol est la même, il en résulte concomitamment une diminution de sa teneur.

### III. Le rôle inattendu du cuivre

Les distillations double-chauffe mises en œuvre dans le cadre des plans d'expériences (pages 206 et 217) ont conduit aux dosages des vinasses obtenues après double-distillation. Mais il s'est avéré que la quantification de leur concentration en eugénol a été rendu impossible par une importante perte de sensibilité concernant le signal de cette molécule mais surtout celui de l'étalon interne (eugénol-d<sub>3</sub>). Après plusieurs hypothèses et tests, il s'est avéré que leur forte

teneur en cuivre était responsable de cette perte de sensibilité. Cet effet inattendu du cuivre sur le dosage de l'eugénol, a conduit à mener des recherches bibliographiques concernant l'influence du cuivre sur d'autres molécules aromatiques mais également sur son origine dans les eaux-de-vie. Plus encore, certaines vérifications de dosage de l'eugénol ont été conduites sur plusieurs échantillons d'eaux-de-vie présentant, eux-aussi, des profils chromatographiques douteux, vis-à-vis des teneurs en eugénol ou de la surface de l'étalon interne (eugénol-d<sub>3</sub>).

### **III.1. Le cuivre dans les eaux-de-vie blanches**

#### **III.1.1. Origine**

La totalité des éléments de l'alambic qui sont en contact avec les produits (vins et eaux-de-vie) sont en cuivre. Durant la distillation, ce cuivre permet la fixation, et donc l'élimination dans le produit final, d'acides gras volatils et de composés soufrés (Bertsch, 1992; Cantagrel *et al.*, 1991). D'après certaines observations, le cuivre contenu dans les eaux-de-vie blanches d'Armagnac pourrait provenir du serpentín de l'alambic, dans une moindre mesure du col de cygne et aucunement de la colonne (Bertrand & Ségur, 2009). D'après ces mêmes observations, les teneurs élevées de cuivre, dans les distillats, en début de distillation continue seraient liées à plusieurs facteurs : le temps de fonctionnement de l'alambic depuis son dernier nettoyage la nature du cuivre des serpentins, les conditions de distillation (température du serpentín et vitesse de distillation) et la nature du vin (son pH notamment).

#### **III.1.2. Présence remarquable dans certaines eaux-de-vie blanches**

Des dosages de cuivre ont été effectués sur plusieurs eaux-de-vie du millésime 2022 pour connaître la répartition du cuivre dans les eaux-de-vie et observer quelques concentrations particulièrement importantes (Figure 77). Aucune législation n'existe sur cette concentration en cuivre des spiritueux hormis quelques rares normes à l'importation, en Chine par exemple. Ces dosages avaient deux objectifs : un but descriptif mais surtout tenter d'apporter une explication à des teneurs très élevées en cuivre qui ont pu conduire à des concentrations en eugénol faussées.

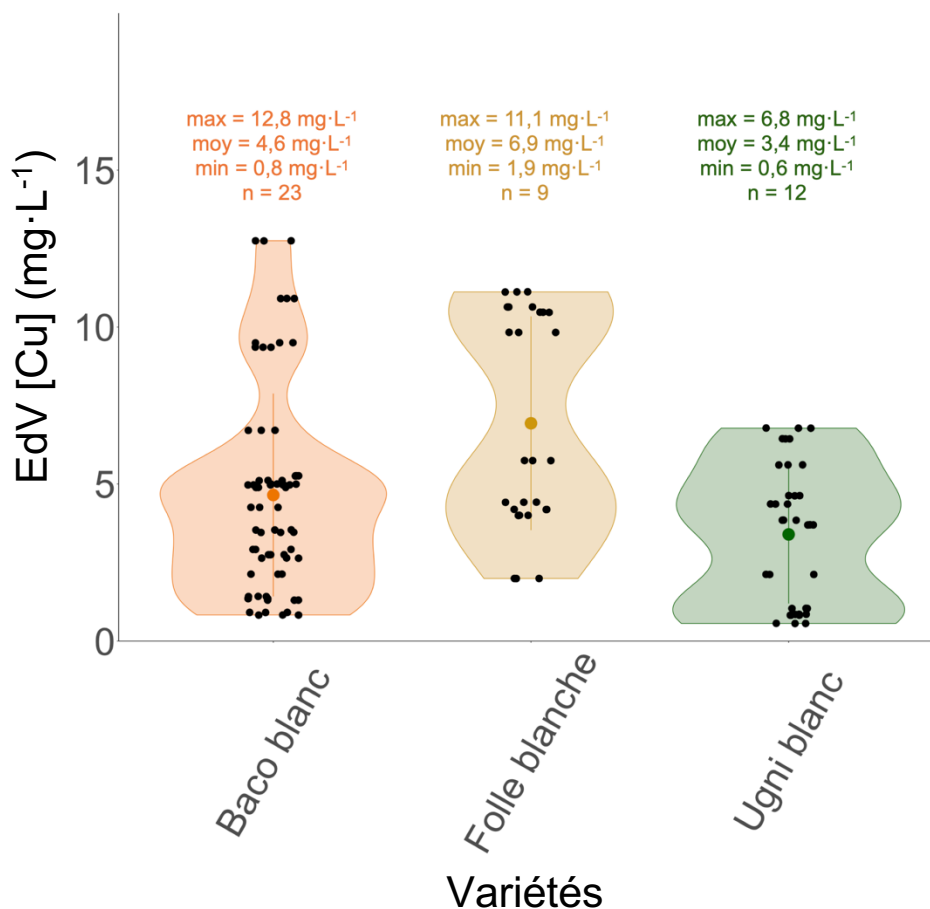


Figure 77 : Diagrammes en violon des teneurs en cuivre dans les eaux-de-vie en fonction des différentes variétés. Dans chaque diagramme est représentée par un point de couleur la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Les points noirs à l'intérieur des violons représentent les triplicatas d'analyse. Enfin, au-dessus de chaque violon sont indiqués : la valeur maximale (max), la valeur moyenne (moy), la valeur minimale (min) et le nombre d'eaux-de-vie (n).

Il apparaît que les teneurs en cuivre dans les eaux-de-vie sont très variables, de 0,6 à 12,8 mg·L<sup>-1</sup> toutes variétés confondues. Les eaux-de-vie blanches de Folle blanche sont apparues comme les plus concentrées en cuivre (6,9 mg·L<sup>-1</sup> en moyenne), venaient ensuite celles de Baco blanc (4,6 mg·L<sup>-1</sup> en moyenne) et enfin celles d'Ugni blanc (3,4 mg·L<sup>-1</sup> en moyenne). Si aucune différence significative n'a été décelable, certaines explications peuvent être avancées pour expliquer ces variations.

Parmi les différents paramètres influençant les teneurs en cuivre des eaux-de-vie, le temps de distillation depuis le dernier nettoyage de l'alambic est également prépondérant dans la valeur des concentrations en cuivre. Autrement dit, la concentration en cuivre d'un distillat diminue d'heure en heure au cours des 2 premiers jours de fonctionnement de l'alambic. En cause, l'encrassement du cuivre constituant le serpent et sa capacité à se solubiliser dans les vapeurs

(Bertrand & Ségur, 2009). Cela induit que l'ordre de passage des vins dans l'alambic peut conditionner la teneur en cuivre des eaux-de-vie correspondantes. Un vin distillé après plusieurs jours de distillation sur un alambic pourrait alors donner une eau-de-vie plus faiblement concentrée en cuivre que le 1<sup>er</sup> jour de fonctionnement. Les différences qui ont pu être observées entre les variétés pourraient donc s'expliquer par l'ordre de distillation des vins (Figure 77). En effet, dans les échantillonnages réalisés au cours de ces travaux, les vins de Folle blanche ont généralement été distillés en premier ; cette pratique fréquente est liée à la maturité précoce du cépage et à sa sensibilité à la pourriture grise. Ces hypothèses peuvent expliquer la concentration moyenne en cuivre supérieure des eaux-de-vie blanches de Folle blanche par rapport aux deux autres variétés, le Baco blanc et l'Ugni blanc.

## **III.2. Confirmation de la complexation du cuivre avec l'eugénol**

### **III.2.1. Méthode expérimentale**

Afin de vérifier la perte de sensibilité analytique due au cuivre, 8 solutions hydroalcooliques à 10 % (v/v) ont été préparées à l'aide de concentrations en sulfate de cuivre pentahydraté ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) croissantes ont été préparées (Tableau 41). Dans chaque solution, de l'eugénol a été ajouté jusqu'à atteindre  $115 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Dix millilitres de chaque solution ont été introduits dans un vial en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl. Enfin dans chaque vial, qui servira à l'analyse chromatographique, ont été introduits  $20 \mu\text{L}$  d'eugénol deutéré (eugénol  $\text{d}_3$  à  $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dissout dans de l'éthanol) et  $20 \mu\text{L}$  de 4-éthylphénol deutéré (4-éthylphénol  $\text{d}_{10}$  à  $56 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dissout dans de l'éthanol) ont été ajoutés en tant qu'étalons internes. Chaque analyse a été répétée 2 fois.

Tableau 41 : Caractéristiques des 8 solutions hydroalcooliques à 10 % (v/v) préparées avec du sulfate de cuivre afin de déterminer l'influence du cuivre sur la quantification de la concentration en eugénol. La solution à 0 mg·L<sup>-1</sup> de cuivre, est une solution témoin. Pour chaque solution, la masse molaire moléculaire du sulfate de cuivre pentahydraté a été prise en compte afin d'obtenir la concentration désirée en cuivre métal.

Concentration en eugénol (µg·L <sup>-1</sup> )	Concentration en cuivre (mg·L <sup>-1</sup> )
115	0,0
	0,5
	1,0
	1,5
	2,0
	2,5
	3,0
	3,5

### III.2.2. Perte de sensibilité

Afin d'observer la perte de sensibilité pour l'eugénol-d<sub>3</sub> et de continuer à doser l'eugénol malgré cette perte, la quantification a été réalisée à l'aide d'un autre étalon interne, le 4-éthylphénol-d<sub>10</sub>. Ce dernier n'étant que peu affecté par les fortes teneurs en cuivre. Ces dernières ont été sélectionnées pour représenter les concentrations effectives en cuivre retrouvées dans un échantillon d'eau-de-vie diluée au 1/5<sup>ème</sup>. Autrement dit, la solution à 10 % d'éthanol (v/v) avec une teneur en cuivre de 3,5 mg·L<sup>-1</sup>, représente une eau-de-vie à 50 % (v/v) avec une teneur en cuivre de 17,5 mg·L<sup>-1</sup> (concentration très importante et qui n'a pas été observée dans les échantillons d'eaux-de-vie 2022). La Figure 78 rend compte des résultats obtenus.

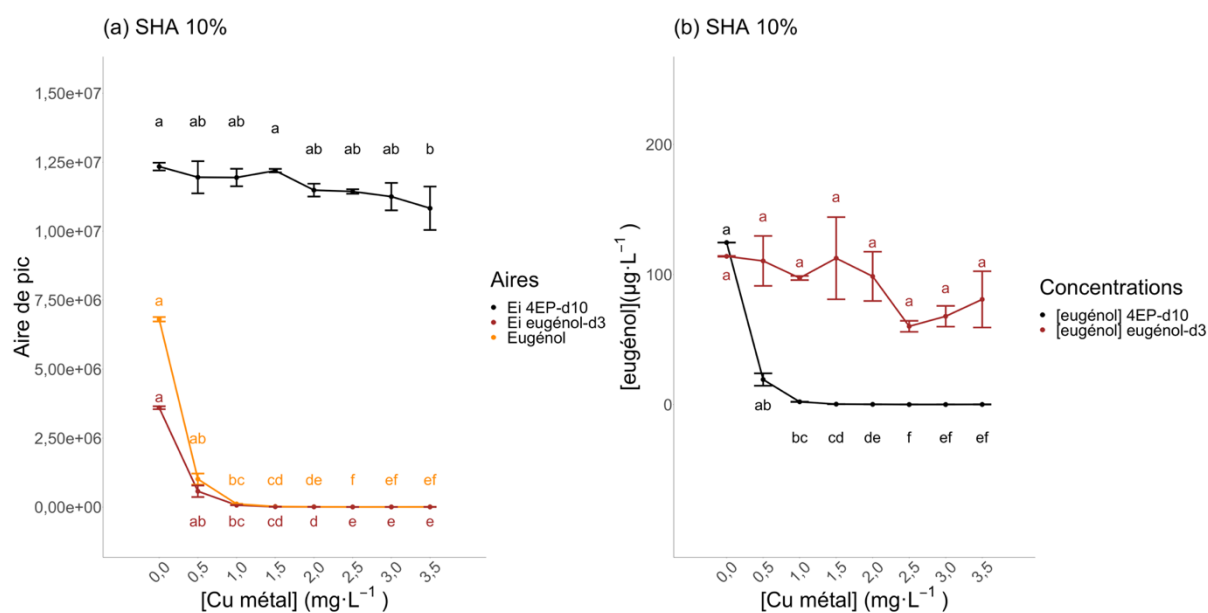


Figure 78 : Influence du cuivre sur le dosage de l'eugénol dans une matrice solution hydroalcoolique (SHA) à 10 % (v/v). Les lettres minuscules noires, oranges ou rouges, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 % ou de tests de Kruskal-Wallis en fonction des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des données. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Figure (a), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les aires des étalons internes utilisés, eugénol-d<sub>3</sub> et 4EP-d<sub>10</sub>, et sur le composé étudié, l'eugénol. Figure (b), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les concentrations en eugénol en fonction de l'étalon interne utilisé

Concernant les aires chromatographiques (Figure 78a), l'augmentation des teneurs en cuivre dans les solutions hydroalcooliques induit des diminutions significatives des aires de l'eugénol-d<sub>3</sub> (de  $3,6 \times 10^{-6}$  à 1900 ua) et de l'eugénol (de  $6,9 \times 10^{-6}$  à 1801 ua), tandis que l'aire du 4EP-d<sub>10</sub> n'est que peu influencé par une augmentation croissante des teneurs en cuivre (de  $1,0 \times 10^{-7}$  à  $1,2 \times 10^{-7}$  ua). En ce qui concerne les concentrations en eugénol calculées à partir soit de l'eugénol-d<sub>3</sub>, soit à partir du 4EP-d<sub>10</sub> (Figure 78b), il apparaît que la concentration en eugénol diminue significativement, passant de 125  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  à 0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , avec l'augmentation des concentrations en cuivre des solutions quand le 4EP-d<sub>10</sub> est utilisé. S'il n'y a pas de différence significative entre les concentrations calculées en eugénol à partir de l'eugénol-d<sub>3</sub>, il apparaît que les variations de ces concentrations sont très importantes, rendant la fiabilité des résultats douteuse. En effet les concentrations calculées varient de 114  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  avec une teneur en cuivre nulle jusqu'à 81  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  avec une teneur en cuivre de 3,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Il apparaît donc clairement que la concentration en cuivre d'un échantillon influence de manière significative la quantification de l'eugénol dans une matrice simple, telle que la solution hydroalcoolique.



Des essais supplémentaires ont été réalisés en utilisant cette fois une matrice eau-de-vie, élaborée avec la variété Baco blanc. Cette eau-de-vie a été sélectionnée pour présenter une concentration en eugénol suffisamment élevée ( $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et une concentration en cuivre suffisamment faible ( $<1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). De la même manière qu'avec les solutions hydroalcooliques, plusieurs solutions diluées au  $1/5^{\text{ème}}$  de cette eau-de-vie ont été préparées avec un ajout croissant de sulfate de cuivre pentahydraté. Les mêmes concentrations de cuivre qu'exposées au Tableau 41 ont été préparées. Puis 10 millilitres de chaque solution ont été introduits dans un vial en verre de 20 mL par analyse chromatographique contenant 3,5 g de NaCl. Enfin dans chaque vial ont été introduits  $20 \mu\text{L}$  d'eugénol deutéré (eugénol  $\text{d}_3$  à  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dissout dans de l'éthanol) et  $20 \mu\text{L}$  de 4-éthylphénol deutéré (4-éthylphénol  $\text{d}_{10}$  à  $56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dissout dans de l'éthanol) en tant qu'étalons internes. La Figure 79 rend compte des résultats obtenus.

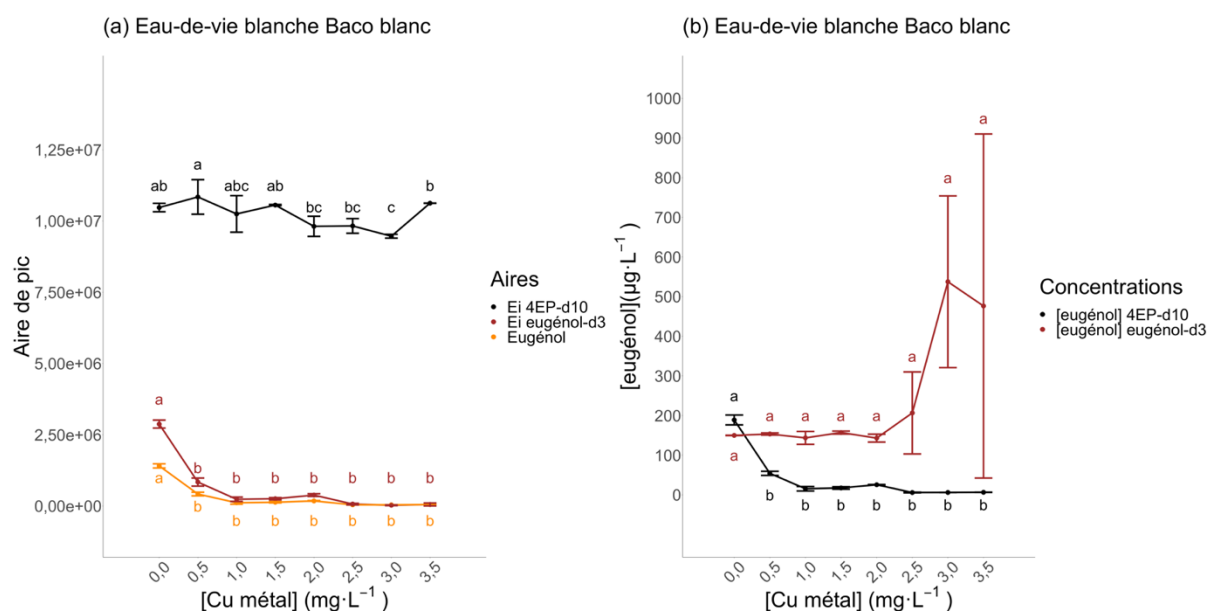


Figure 79 : Influence du cuivre sur le dosage de l'eugénol dans une matrice eau-de-vie de Baco blanc diluée au  $1/5^{\text{e}}$ . Les lettres minuscules noires, oranges ou rouges, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 % ou de tests de Kruskal-Wallis en fonction des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des données. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Figure (a), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les aires des étalons internes utilisés, eugénol- $\text{d}_3$  et 4EP- $\text{d}_{10}$ , et sur le composé étudié, l'eugénol. Figure (b), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les concentrations en eugénol en fonction de l'étalon interne utilisé.

L'augmentation des teneurs en cuivre dans les eaux-de-vie induit une diminution significative des aires de l'eugénol- $\text{d}_3$  (de  $2,9 \times 10^{-6}$  à  $25\,098 \text{ ua}$ ) et de l'eugénol (de  $1,4 \times 10^{-6}$  à  $40\,600 \text{ ua}$ ). Les aires du 4EP- $\text{d}_{10}$  sont, là aussi, peu influencées par l'augmentation des teneurs en cuivre (de  $1,1 \times 10^{-7}$  à  $9,5 \times 10^{-6} \text{ ua}$ ).

Pour les concentrations en eugénol calculées en fonction de 2 étalons internes (Figure 79b), une diminution significative de la concentration en eugénol peut être notée lorsque c'est le 4EP-d<sub>10</sub> qui est utilisé, passant ainsi de 188 µg·L<sup>-1</sup> à 5,9 µg·L<sup>-1</sup>. À l'instar des solutions hydroalcooliques, les concentrations en eugénol calculées avec l'eugénol-d<sub>3</sub> ne sont pas significativement différentes avec l'augmentation des teneurs en cuivre. Cependant, les valeurs élevées des écarts-types indiquent une variabilité importante et donc une fiabilité dans les quantifications faible. En effet les concentrations varient de 149,9 µg·L<sup>-1</sup> à 537,5 µg·L<sup>-1</sup>. Dans le cadre d'une matrice eaux-de-vie, il apparaît donc que de fortes teneurs en cuivre de certains échantillons peuvent perturber de manière significative la quantification de l'eugénol quand l'eugénol-d<sub>3</sub> est utilisé en tant qu'étalon interne et ne pas être optimale y compris en utilisant un étalon interne de substitution pourtant moins affecté. Deux points d'intérêt doivent être mis en avant à la suite de ces observations, la complexation de l'eugénol et les difficultés de dosage en tentant de palier à cette perte totale ou potentielle dans les eaux-de-vie riches en cuivre.

### III.2.1. Hypothèse de la complexation de l'eugénol par le cuivre

L'influence du cuivre sur le dosage de l'eugénol dans les eaux-de-vie peut s'expliquer sur la possible complexation de l'eugénol par le cuivre. En effet plusieurs études montrent la formation d'un complexe lorsque que le cuivre et l'eugénol sont mis en contact. Toutefois la forme proposée de ce complexe varie en fonction de ces études.

Dans la première d'entre elles (Upadhyaya *et al.*, 2014), l'eugénol a été mélangé avec du sulfate de cuivre pentahydraté, dans des solutions de méthanol, selon un ratio 5:1. Après plusieurs jours de conservation à température ambiante, le précipité bleu obtenu a été filtré puis lavé à l'éthoxyéthane (n° CAS 60-29-7) et enfin séché au dessiccateur. Le cristal a ensuite été analysé par IR-TF, par Analyse Thermique Différentielle (ATD), par analyseur CHN (Carbone, Hydrogène, Azote) et enfin par Spectroscopie d'Absorption Atomique (SAA). Les analyses ainsi réalisées ont permis aux auteurs de proposer une structure, de stœchiométrie 1:1, du complexe eugénol-cuivre (Figure 80).

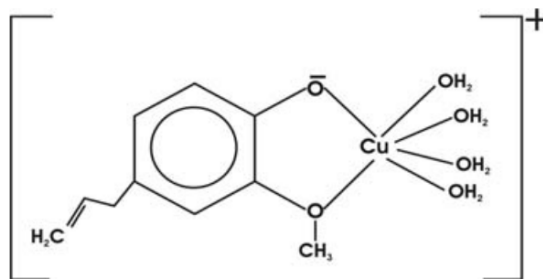


Figure 80 : Proposition de structure pour un complexe eugénol-cuivre de stœchiométrie 1:1 (Upadhyaya *et al.*, 2014)

Les auteurs de la seconde étude (Siddiqui *et al.*, 2020), ont préféré une approche plus proche de la chimie verte afin de synthétiser un complexe eugénol-cuivre. Ils ont en effet mélangé de l'eugénol isolé à partir de l'huile essentielle de basilic sacré (*Ocimum sanctum*) avec de l'oxyde cuivrique (CuO) à l'état réduit. D'après les auteurs, l'eugénol joue le rôle d'un ligand hexadenté réagissant avec le  $\text{Cu}^{2+}$  pour former un complexe. Ils proposent également une stœchiométrie différente de la première étude, avec 2 molécules d'eugénol pour un  $\text{Cu}^{2+}$  (Figure 81). La structure du complexe a été analysée par microscopie électronique à balayage et par rayons X.

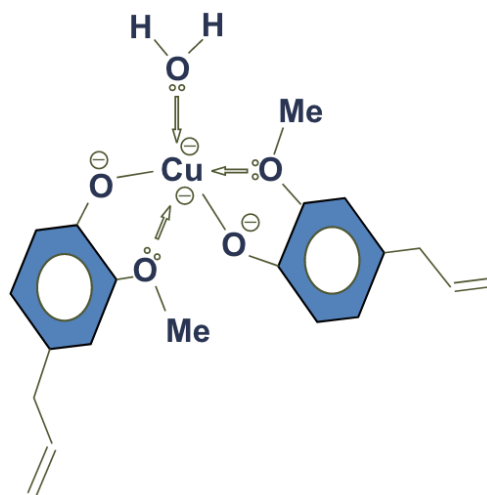


Figure 81 : Proposition de structure pour un complexe eugénol-cuivre de stœchiométrie 2:1 (Siddiqui *et al.*, 2020)

Dans ce cas précis, il serait possible de parler de chélate, le cuivre étant pris en étau par 2 liaisons à 2 molécules d'eugénol. Il est tout à fait possible d'imaginer que de tels complexes se mettent en place dans des eaux-de-vie de Baco blanc. La formation d'un tel complexe pencherait pour une simple mobilisation de l'eugénol dans le dit complexe et non une destruction de l'eugénol. Si chélation il y a, il est alors tout à fait possible d'envisager la libération de l'eugénol à partir de ce complexe. L'eugénol libéré pourrait donc être à nouveau disponible pour un dosage ou pour participer pleinement à la spécificité aromatique des eaux-de-vie de Baco blanc.

### **III.3. Conséquences analytiques et sensorielles**

#### **III.3.1. Complexation et chélation**

Le constat de chélation ayant été fait dans les paragraphes précédents, il a fallu développer une méthode permettant de libérer l'eugénol du complexe formé avec le cuivre. Plus encore, cette méthode devait s'adapter à n'importe quelle concentration en cuivre de n'importe quel échantillon. La méthode en HS-SPME-GC/MS, initialement développée, devait être adaptée.

La chélation est un phénomène particulier de complexation au cours duquel un élément métallique se lie à un ligand, le chélatant. La racine grecque de chélation ( $\chi\eta\lambda\acute{\eta}$  signifiant pince) décrit bien la réaction qui se produit : à savoir que l'élément métallique est pris en tenaille par le ligand. Le nombre de liaisons que ce dernier forme avec l'élément métallique définit la « denticité » du ligand. Il existe ainsi des ligands bidentes, tridentes, tétradentes, etc. formant respectivement 2, 3 ou 4 liaisons avec l'élément métallique. L'EDTA (Figure 82a) ou éthylènediaminetétraacétique, (n° CAS 60-00-4) est apparu comme le chélatant hexadente (Figure 82b) le plus approprié pour décomplexer l'eugénol du cuivre. De plus, l'EDTA est très connu comme un chélatant efficace du cuivre, il est d'ailleurs utilisé pour le dosage des ions cuivre (II) notamment en œnologie. Enfin, l'utilisation de l'EDTA ne devait pas altérer les performances de la méthode actuelle de dosage de l'eugénol par HS-SPME-GC/MS.

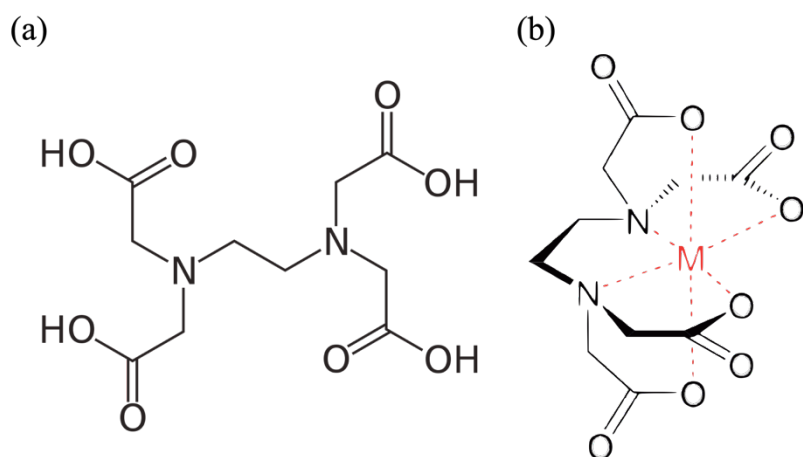


Figure 82 : Structures de l'EDTA. Figure (a), structure plane de l'EDTA sous forme tétraacide. Figure (b), structure de l'EDTA en tant que chélatant et formant une pince autour d'un élément métallique (M rouge)

### III.3.2. Adaptation de la méthode de dosage de l'eugénol

L'EDTA disodique dihydraté (n° CAS 6381-92-6) a été utilisé. Afin de stabiliser et de favoriser la réaction de complexation entre le cuivre et l'EDTA disodique, une solution tampon citrate-phosphate à 0,15 M, ajustée à pH 5 avec quelques gouttes d'hydroxyde de sodium 5 M a été préparée. Dans cette solution tampon, a été ajoutée une quantité suffisante d'EDTA disodique pour atteindre une concentration de  $5,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Cette concentration a été déterminée pour que la totalité du cuivre possiblement contenu dans un échantillon d'eau-de-vie soit chélatée par l'EDTA. Pour cela, une légère exagération de la concentration maximale en cuivre retrouvée dans les eaux-de-vie du millésime 2022 proche de  $12,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a été fixée à  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Pour s'assurer que l'EDTA soit en excès, cette concentration maximale a été multipliée par 10, se fixant ainsi à  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (soit  $5,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  en prenant en compte une masse molaire moléculaire de l'EDAT disodique de  $327,24 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Cette solution ainsi préparée, a été utilisée pour diluer au 1/5<sup>ème</sup> des eaux-de-vie de Baco blanc à analyser ainsi que des solutions hydroalcooliques à 10 % (v/v) à  $115 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  d'eugénol. Dans ces eaux-de-vie et solutions hydroalcooliques ont été ajoutées des concentrations croissantes de sulfate de cuivre pentahydraté, en suivant le même protocole et les mêmes valeurs que décrits au paragraphe page 238. Dix millilitres de ces produits ainsi dilués, ont été introduits dans des vials en verre de 20 mL contenant 3,5 g de NaCl. De plus, 20  $\mu\text{L}$  d'eugénol deutéré (eugénol  $\text{d}_3$  à  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  dissout dans de l'éthanol) et 20  $\mu\text{L}$  de 4-éthylphénol deutéré (4-éthylphénol  $\text{d}_{10}$  à  $56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  dissout dans de l'éthanol) ont été ajoutés en tant qu'étalons internes dans les vials. Ces derniers

ont été finalement scellés avec des capsules à vis munis de septum en silicone/PTFE (Chromoptic, Courtaboeuf, France). Tous les vials ont été homogénéisés sur vortex avant analyse par HS-SPME-GC/MS. Les résultats de ces dosages sont présentés à la Figure 83.

Il apparaît que l'ajout d'EDTA dans des solutions hydroalcooliques ajoutées de cuivre, a permis de conserver une certaine stabilité des aires des étalons internes mais également de l'eugénol (Figure 83a) notamment en comparaison des résultats déjà présentés à la Figure 78. En effet l'aire de l'eugénol-d<sub>3</sub> ne varie que très peu (de  $3,2 \times 10^{-6}$  à  $2,4 \times 10^{-6}$  ua), tout comme le 4EP-d<sub>10</sub> (de  $6,8 \times 10^{-6}$  à  $5,0 \times 10^{-6}$  ua) et l'eugénol (de  $8,4 \times 10^{-6}$  à  $1,2 \times 10^{-7}$  ua). Les mêmes conclusions peuvent être tirées en ce qui concerne les eaux-de-vie (Figure 83b) : l'eugénol-d<sub>3</sub> varie de  $1,8 \times 10^{-6}$  à  $2,3 \times 10^{-6}$  ua, le 4EP-d<sub>10</sub> varie, quant à lui, de  $8,2 \times 10^{-6}$  à  $1,1 \times 10^{-7}$  ua et enfin l'eugénol varie de  $6,1 \times 10^{-6}$  à  $8,4 \times 10^{-6}$  ua. Les corollaires de ces observations sur les aires, sont une stabilité dans la quantification de l'eugénol, dans les solutions hydroalcooliques (Figure 83c) et dans les eaux-de-vie (Figure 83d). Dans les solutions hydroalcooliques, il n'y a pas de différences significatives entre les quantifications d'eugénol faites avec l'eugénol-d<sub>3</sub> et ce quelle que soit la concentration en cuivre (elles ne varient que de 125,3 à 129,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Pour ce qui est des eaux-de-vie, des différences apparaissent mais elles ne semblent que peu dépendantes des concentrations en cuivre (variation de 137,1 à 149,6  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

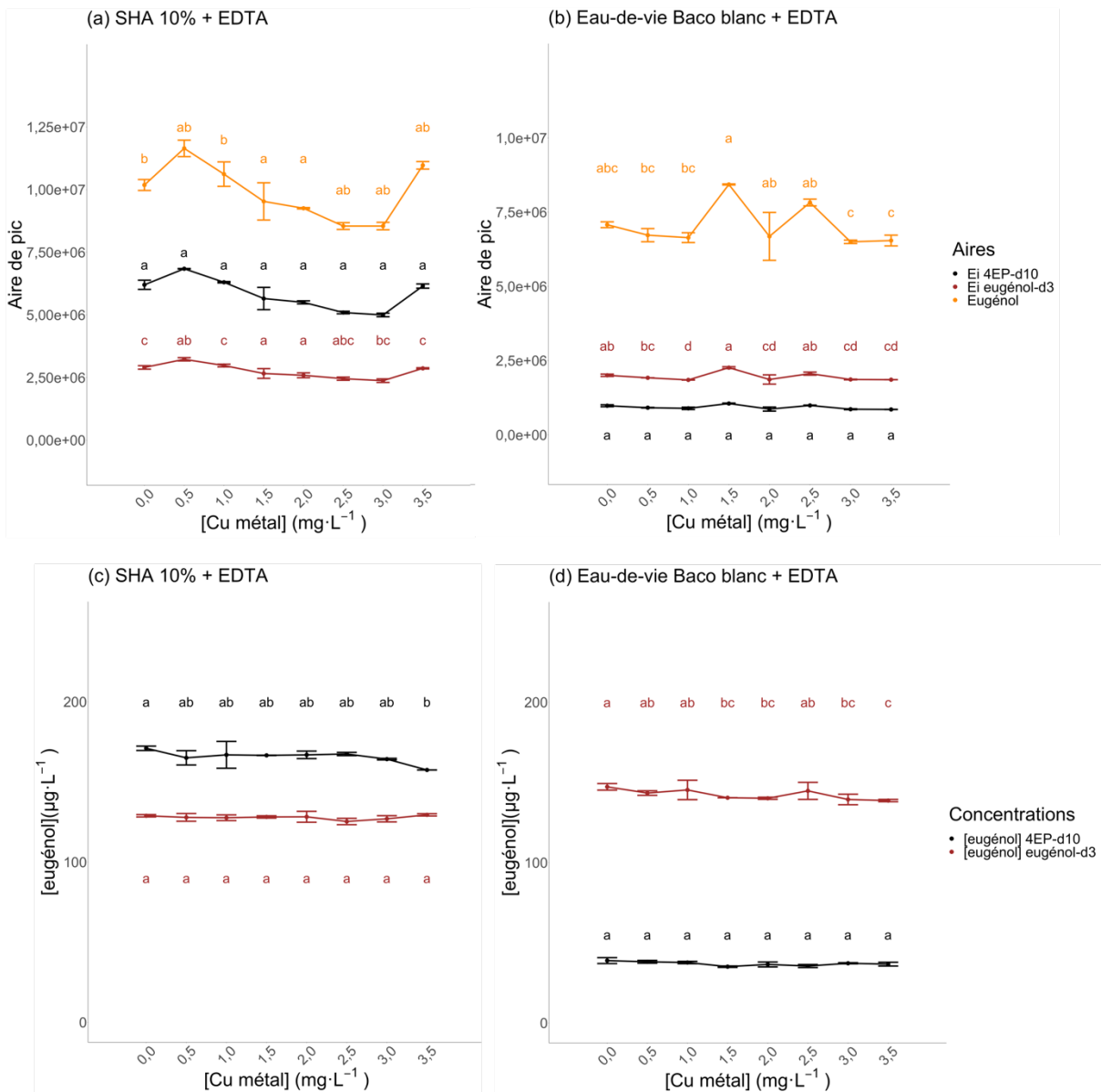


Figure 83 : Influence du cuivre sur le dosage de l'eugénol dans des matrices solutions hydroalcooliques (SHA) à 10 % (v/v) et eaux-de-vie de Baco blanc additionnées d'EDTA. Les lettres minuscules noires, oranges ou rouges, situées au-dessus de chaque point, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 % ou de tests de Kruskal-Wallis en fonction des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des données. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Figure (a), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les aires des étalons internes utilisés, eugénol-d<sub>3</sub> et 4EP-d<sub>10</sub>, et sur le composé étudié, l'eugénol dans des solutions hydroalcooliques. Figure (b), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les aires des étalons internes utilisés, eugénol-d<sub>3</sub> et 4EP-d<sub>10</sub>, et sur le composé étudié, l'eugénol, dans des eaux-de-vie. Figure (c), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les concentrations en eugénol en fonction de l'étalon interne utilisé dans des solutions hydroalcooliques. Figure (d), influence du cuivre sur la sensibilité de l'analyse par HS-SPME-GC/MS concernant les concentrations en eugénol en fonction de l'étalon interne utilisé dans des eaux-de-vie

Il apparaît que l'ajout d'EDTA dans des solutions hydroalcooliques ajoutées de cuivre, a permis de conserver une certaine stabilité des aires des étalons internes mais également de l'eugénol. De plus, des eaux-de-vie de Baco blanc à faible teneur en cuivre ont été analysées selon les deux méthodes, avec et sans EDTA, afin de s'assurer que la dilution avec la solution tampon additionnée d'EDTA n'influence pas le dosage de l'eugénol (Figure 84a). Une corrélation entre les deux méthodes a été réalisée afin de confirmer que cette nouvelle méthode n'influence pas la quantification de l'eugénol (Figure 84b).

Il a été intéressant d'observer l'influence des concentrations importantes en cuivre dans le dosage de l'eugénol et dans le comportement chromatographique des molécules deutérées. Il est possible d'envisager que le cuivre soit impliqué dans des réactions impliquant d'autres molécules que l'eugénol, les polyphénols en premier lieu (Bornet, 2006) et ne permettent pas une complexation de l'eugénol.

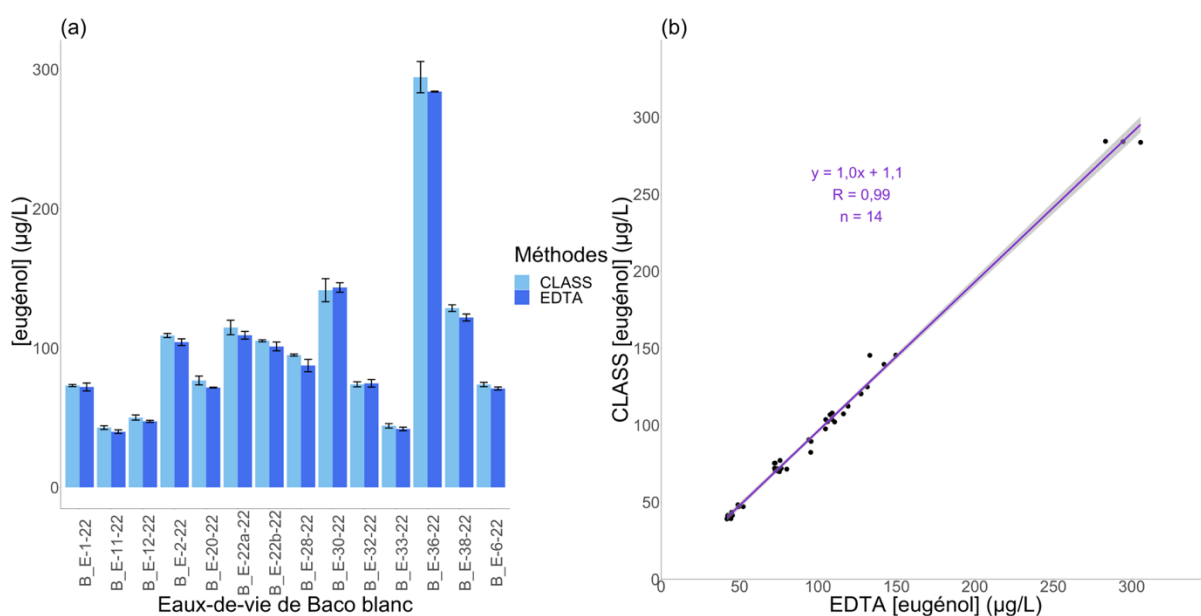


Figure 84 : Figure (a), histogrammes représentant les quantifications de l'eugénol selon les deux méthodes précédemment présentées, CLASS représente la méthode classique, EDTA représente la méthode utilisant l'EDTA disodique. De plus, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux méthodes par eau-de-vie (Test de Student au risque  $\alpha$  de 5 %). Figure (b), corrélation positive entre les quantifications d'eugénol selon les deux méthodes. Corrélation réalisée grâce aux 14 mêmes eaux-de-vie présentées à la figure (a). Les points noirs représentent les triplicats pour chaque méthode

Aucune différence significative entre les deux méthodes de quantification de l'eugénol a pu être mise en évidence sur 14 eaux-de-vie blanches de Baco blanc avec des teneurs faibles en cuivre (de 0,83 à 5,11 mg·L<sup>-1</sup>).



De plus, le coefficient de détermination calculé entre les deux méthodes de quantification (98 %) montre, la très faible influence de la méthode EDTA pour doser l'eugénol. L'adaptation de la méthode pour le dosage de l'eugénol permettant de s'adapter à n'importe quelle concentration en cuivre des différentes eaux-de-vie de Baco blanc. Cette méthode a été utilisée sur l'ensemble des échantillons d'eaux-de-vie analysés durant ces travaux, 3 millésimes étaient donc concernés (2020, 2021 et 2022) et l'ensemble des résultats d'eaux-de-vie dans ce manuscrit, ou ses annexes, intègrent la méthode modifiée par ajout d'EDTA.

### **III.3.3. Influence sensorielle potentielle de la complexation de l'eugénol par le cuivre**

L'eugénol, complexé par le cuivre, est moins volatil. Au-delà de l'analyse, dont le principe par SPME se base sur la concentration des molécules dans l'espace de tête, il est possible d'imaginer que le phénomène est identique pour une eau-de-vie de Baco blanc placée dans un verre. L'eugénol complexé par le cuivre devenu moins volatil serait donc plus difficilement discernable par un panéliste. En suivant ce raisonnement, des eaux-de-vie de Baco blanc à fortes teneurs en cuivre pourraient perdre de leur spécificité. C'est pourquoi, afin de commencer à explorer la potentielle influence de ces fortes teneurs en cuivre dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc, un test par paire a été réalisée avec le panel BNIA. Le but de ce test a été de présenter au panel, deux eaux-de-vie modifiées de Baco blanc. Les panélistes devaient alors noter la typicité de chacune de ces eaux-de-vie à l'aide d'une échelle linéaire bornée. Pour ce test donc, une eau-de-vie de Baco blanc avec une concentration en cuivre de  $4,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (représentant la moyenne des teneurs en cuivres sur l'ensemble des eaux-de-vie du millésime 2022, toutes variétés confondues) et possédant une concentration en eugénol de  $109,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (proche de la moyenne des eaux-de-vie de Baco blanc du millésime 2022), a été réduite au TAV de 50 % (v/v) avec de l'eau osmosée. Le volume total de cette eau-de-vie a été divisé en deux. Dans la première moitié, de l'EDTA disodique a été ajouté en concentration 10 fois supérieure à ce qu'il faudrait pour complexer le cuivre présent dans cette eau-de-vie. La seconde moitié est laissée telle quelle. Ces deux nouvelles eaux-de-vie ont été présentées aux panélistes comme les deux modalités à évaluer. Sur 16 panélistes du jury BNIA, 12 d'entre eux ont jugé l'eau-de-vie contenant l'EDTA comme « *la plus représentative d'une des caractéristiques aromatiques essentielles d'une eau-de-vie blanche de Baco blanc* », ce qui induit une différence significative au seuil de 5 % (selon une loi binomiale avec un test unilatéral). Autrement dit, il semblerait que l'ajout d'EDTA, permet d'améliorer la reconnaissance d'une eau-de-vie typique de Baco blanc en chélatant le cuivre, lui-même complexant l'eugénol.

Par extension, il est possible de supposer que l'eugénol se confirmerait donc comme un marqueur pouvant être important dans la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Cependant, il est tout à possible que d'autres molécules constitutives de l'eau-de-vie peuvent être complexées par le cuivre et libérables par l'EDTA. Certaines de ces molécules peuvent avoir une incidence directe ou indirecte sur la typicité du Baco blanc. Cette première expérience permet donc de répondre en partie au questionnement que le rôle de la chélation de l'eugénol par le cuivre et donc d'un rôle plutôt néfaste d'une concentration trop importante de ce dernier.

## Chapitre 4 : La présence originale du 4-vinylphénol

### I. Les eaux-de-vie blanches d'Armagnac et les phénols volatils

#### I.1. Composition des eaux-de-vie blanches

Dans ces travaux, les données bibliographiques ont fortement incité au dosage systématique des phénols volatils dans l'ensemble des échantillons récoltés, à partir du millésime 2021. Les 4 phénols volatils (4VP, 4VG, 4EP et 4EG) ont été dosés conjointement à l'eugénol.

Dans l'ensemble des échantillons d'eaux-de-vie des millésimes 2021 et 2022 (Figure 85), les écarts-types conséquents pour chacun des 4 phénols volatils indiquent, à la fois, une variabilité intra-variétale marquée et une importante diversité de vinifications, les échantillons provenant de plusieurs producteurs. L'information notable de ces dosages a été la concentration moyenne significativement plus importante du 4VP ( $407,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc que dans les eaux-de-vie de Folle blanche ( $174,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), elles-mêmes significativement plus concentrées que dans celles d'Ugni blanc ( $122,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Par contre, aucune différence significative n'a pu être décelée entre les concentrations moyennes en 4VG des eaux-de-vie blanches de Baco blanc ( $312,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), de Folle blanche ( $477,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), d'Ugni blanc ( $541,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

De plus, les concentrations en dérivés éthyloxy (4EP et 4EG) étaient très faibles. Il est à préciser que les valeurs moyennes des dérivés éthyloxy données ci-après ne reflètent pas les différences significatives qui ont été décelées. En effet, le test de Kruskal-Wallis, utilisé pour comparer les variétés entre elles, est basé sur la comparaison des moyennes de rang de chaque modalité. Seront donc présentées pour le 4EP et 4EG, les valeurs médianes des concentrations. Pour le 4EP, la Folle blanche est apparue comme la variété présentant la concentration médiane la plus importante ( $1,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , moyenne =  $10,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) tandis que le Baco blanc et l'Ugni blanc n'ont présentées que des concentrations médianes très faibles en 4EP, respectivement de  $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (moyenne =  $8,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et de  $0,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (moyenne =  $2,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). De la même manière pour le 4EG, la Folle blanche était la variété la plus concentrée (médiane =  $4,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et moyenne =  $8,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) tandis que le Baco blanc (médiane =  $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et moyenne =  $46,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et l'Ugni blanc (médiane =  $1,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et moyenne =  $41,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Les concentrations en dérivés éthyloxy présentent des valeurs extrêmement faibles et n'ont sans doute aucun rôle organoleptique. De plus, elle ne présentent aucune particularité pour les eaux-de-vie blanches de Baco blanc.

C'est donc bien le 4-vinylphénol qui est apparu, au cours de ces dosages sur la totalité des eaux-de-vie pour les 2 millésimes, comme particulièrement concentré dans le Baco blanc et de façon originale par rapport aux deux cépages impliqués dans la comparaison.

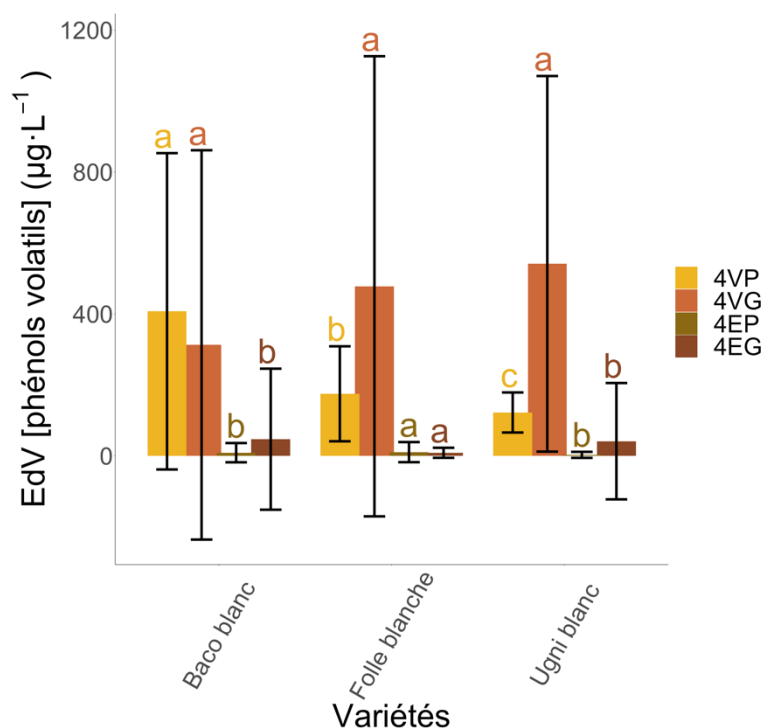


Figure 85 : Concentrations moyennes en phénols volatils des eaux-de-vie de Baco blanc, de Folle blanche et d'Ugni blanc. Les lettres de couleur au-dessus des histogrammes correspondent à des tests de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5 %, sauf pour le 4VG pour lequel un test de Newman-Keuls Wallis au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives. Pour chaque composé, Baco blanc = 136 ; Folle blanche = 44 ; Ugni blanc = 60

## I.2. Les phénols volatils dans les vins et les eaux-de-vie

Cette présence remarquable du 4-vinylphénol a incité à une recherche bibliographique afin d'expliquer cette présence atypique.

Les phénols volatils les plus connus en œnologie sont certainement le 4-vinylphénol (4VP), le 4-vinylgâïacol (4VG), le 4-éthylphénol (4EP) et le 4-éthylgâïacol (4EG) notamment pour la déviation organoleptique dont ils sont responsables. En effet, ces phénols volatils diminuent la perception hédonique des vins avant d'être reconnus par le dégustateur comme défaut rédhibitoire (Tempere *et al.*, 2016). De manière générale les vinyles (4VP et 4VG) sont principalement retrouvés dans les vins blancs, tandis que les éthyles (4EP et 4EG) se retrouvent

dans les vins rouges (Boidron *et al.*, 1988; Chatonnet *et al.*, 1992) et en constituent une altération très dommageable pour les vins.

De façon plus originale les phénols volatils semblent également être un des marqueurs des vins issus de vignes non *V. vinifera*. En effet, une étude note la présence des phénols volatils, en concentration plus importante dans des vins issus d'hybrides de première génération en comparaison des vins issus de *V. vinifera* (Pinho, 1994b). D'autres auteurs notent également la présence particulière du 4VG dans des vins issus d'hybrides tels que le Frontenac, le Maréchal Foch, la Marquette, le Sabrevois, le Sainte-Croix à des teneurs n'excédant pas la dizaine de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Slegers *et al.*, 2015) et dans le Vidal à des concentrations atteignant quasiment la centaine de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Bowen & Reynolds, 2012).

Les eaux-de-vie de vins peuvent également présenter des teneurs importantes en phénols volatils (Lehtonen, 1983; Schreier *et al.*, 1979). En effet, les éthyles ont été spécifiquement détectés à une centaine de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans des eaux-de-vie blanches de Baco blanc (Bertsch, 1992). Pour les mêmes eaux-de-vie, les vinyles ne sont présents qu'à l'état de traces. Ces éthyles ont également été retrouvés, dans des concentrations plus importantes (jusqu'à  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  chacun) dans des eaux-de-vie blanches de Baco blanc issus d'essais de fort pressurage (Hervé, 1996). Les mêmes auteurs indiquent seulement des traces des formes vinyles.

Ces données bibliographiques et les résultats de la Figure 85 ont posé les bases d'une réflexion sur l'origine de ce 4VP dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Notamment, la forte variabilité de concentration dans les eaux-de-vie de Baco blanc tendait à impliquer les paramètres viticoles mais surtout les conditions de vinifications dans l'explication de ces variations. Avant toute chose, les précurseurs du 4VP étant connus, il est apparu évident de les quantifier dans les échantillons de vins de Baco blanc.

### **I.3. L'origine du 4-vinylphénol et la recherche de sa forme précurseur**

Dans les vins, l'origine des vinylphénols s'inscrit dans le catabolisme des acides hydroxycinnamiques, principalement concentrés sous formes estérifiées avec l'acide tartrique dans la pulpe et la pellicule du raisin (Conde *et al.*, 2007). Ces acides estérifiés peuvent être lentement hydrolysés, chimiquement ou via l'action d'enzymes, durant la fermentation et ainsi engendrer des formes non-estérifiées (acide *p*-coumarique et acide férulique). Les concentrations en acides hydroxycinnamiques peuvent varier avec le millésime, les conditions de culture des vignes et la vinification (García-Falcón *et al.*, 2007; Ginjom *et al.*, 2011; Nagel

& Wulf, 1979). À partir de ces acides, la levure *Brettanomyces bruxellensis*, entre autres, est capable par l'action de certaines de ses enzymes, de transformer les acides hydroxycinnamiques en phénols volatils (Chatonnet *et al.*, 1992; Edlin *et al.*, 1998; Suárez *et al.*, 2007) (Figure 86). Toutefois, si *B. bruxellensis* est capable de dégrader les acides hydroxycinnamiques jusqu'à former des dérivés éthyloxy, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est elle aussi capable de décarboxyler les acides hydroxycinnamiques non estérifiés en hydroxystyrènes (Chatonnet *et al.*, 1993) ce qui est également le cas des bactéries lactiques (Couto *et al.*, 2006), sans pouvoir être atteints la production d'éthylphénols.

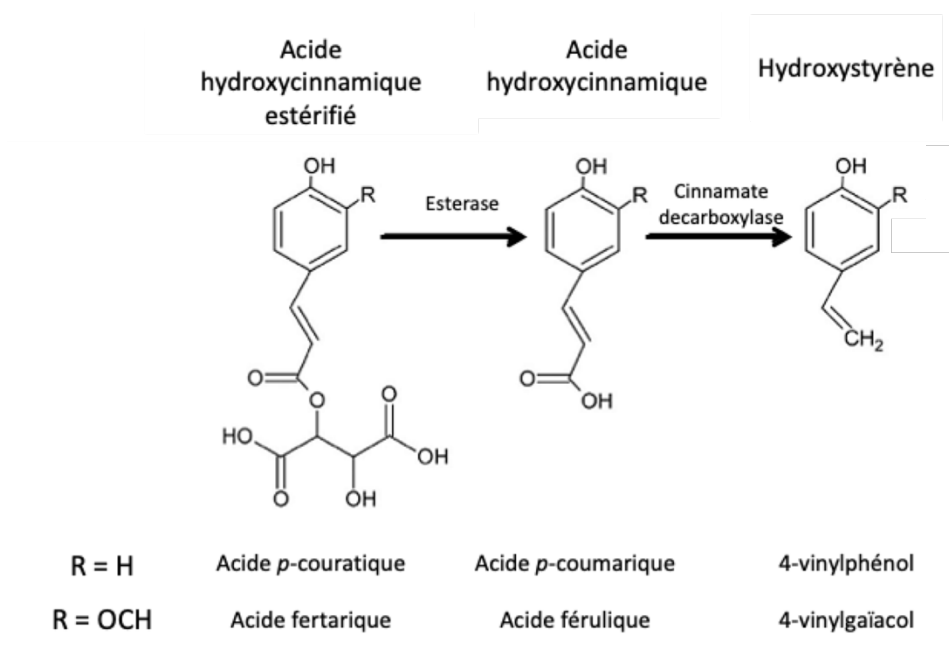


Figure 86 : Biosynthèse des phénols volatils

Les précurseurs du 4-vinylphénol, l'acide *p*-coutarique (ou *p*-coumaroyl-tartrique) et l'acide *p*-coumarique ont donc été dosés sur 31 vins de Baco blanc, 3 d'Ugni blanc et 3 de Folle blanche, tous du millésime 2021. La méthode HPLC-Q-TOF/MS utilisée est celle décrite par (Lagarde, 2022). L'objectif était d'imputer possiblement les fortes teneurs en 4-vinylphénols des vins et eaux-de-vie à Baco blanc, à une supposée richesses en précurseurs de ce phénol volatil de façon identique à certains autres hybrides. Les valeurs obtenues ont été comparées avec celles trouvées dans la littérature scientifique (Tableau 42). Dans les données bibliographiques, le Koshu, hybride complexe de *V. vinifera* et *V. davidii*, est la variété qui a présenté la concentration la plus importante en acide *p*-coutarique (53,1 mg·L<sup>-1</sup>), tandis que le Sémillon a présenté une concentration faible (4,5 mg·L<sup>-1</sup>). Le Chardonnay et le Riesling présentaient quant à eux des concentrations moyennes intermédiaires : 10,1 mg·L<sup>-1</sup> et 13,1 mg·L<sup>-1</sup>.

Pour les variétés analysés au laboratoire, le Baco blanc a présenté une concentration moyenne plutôt faible ( $4,76 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), à l'instar de la Folle blanche ( $3,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). L'Ugni blanc, lui a présenté une concentration moyenne en acide *p*-coutarique plus intermédiaire ( $9,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), en comparaison avec les données de la littérature présentées précédemment.

Concernant l'acide *p*-coumarique, bien que le Baco blanc ait montré une des concentrations les plus importantes, soit  $3,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , cette dernière n'était pas spécifiquement différentes de la concentration moyenne de l'Ugni blanc ( $4,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La Folle blanche, quant à elle, a présenté la concentration la plus faible ( $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). et le Riesling ( $2,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Dans la littérature, le Kosshu a présenté une concentration moyenne en acide *p*-coumarique plutôt faible ( $1,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) à l'instar du Chardonnay ( $1,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et le Sémillon ( $0,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Seule Riesling présentait une concentration plus importante atteignant les  $2,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En comparant les données de la bibliographie avec celles obtenues au laboratoire, le Baco blanc n'apparaît pas comme une variété hybride particulièrement concentré en précurseurs hydroxycinnamiques du 4VP, au contraire du Kosshu qui est lui fortement concentré en acide *p*-coutarique. Le Baco blanc aurait un profil chimique, pour les composés considérés, plus proche de variétés de *V. vinifera*.

Tableau 42 : Concentrations en acides *p*-coutarique et *p*-coumarique des vins de plusieurs variétés de vigne. 1 : Les valeurs sont issues des travaux de (Okamura & Watanabe, 1981)

Variété	[acide <i>p</i> -coutarique] ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	[acide <i>p</i> -coumarique] ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Baco blanc	$4,8 \pm 3,2$	$3,4 \pm 2,0$
Folle blanche	$3,6 \pm 2,4$	$1,0 \pm 0,3$
Ugni blanc	$9,0 \pm 2,0$	$4,4 \pm 3,9$
Chardonnay <sup>1</sup>	$10,1 \pm 6,6$	$1,1 \pm 1,2$
Riesling <sup>1</sup>	$13,1 \pm 5,0$	$2,9 \pm 1,4$
Sémillon <sup>1</sup>	$4,5 \pm 3,5$	$0,7 \pm 0,4$
Kosshu <sup>1</sup>	$53,1 \pm 29,1$	$1,9 \pm 1,1$

Le Baco blanc n'a donc pas présenté des teneurs significativement différentes, en précurseurs du 4-vinylphénol, pouvant expliquer la plus grande concentration de ce phénol volatil dans les vins et les eaux-de-vie. Il est possible d'envisager une autre forme de précurseur pour le 4-vinylphénol dans les vins de Baco blanc pouvant expliquer son importante teneur dans les eaux-de-vie. En effet, l'existence de précurseur glycosylé du 4VP a déjà été hypothétisée (Winterhalter *et al.*, 1990).

Dans les travaux présentés ici, le dosage du 4VP est concomitant à celui de l'eugénol. L'hypothèse d'un précurseur glycosylé pour le 4VP a donc pu être testée grâce à l'analyse des deux plans d'expériences menés en 2021 et 2022 (pages 206 et 217)) et pour lesquels une activité enzymatique de type glucosidase a été recherchée dans le cas de l'eugénol

#### **I.4. Le rôle des facteurs étudiés en plans d'expériences sur la teneur en 4-vinylphénol des vins et des eaux-de-vie de Baco blanc**

##### **I.4.1. Les facteurs principaux**

L'analyse du premier plan d'expérience (page 206) a donc permis d'identifier les grands facteurs alors étudiés qui ont le plus influencés la concentration en 4VP. De la même manière que pour l'eugénol, la contribution de chaque facteur à la concentration en 4VP dans les vins et les distillats a pu être calculée (Tableau 43).

Il est clairement apparu que le facteur ENZ a le plus influencé les concentrations en 4VP dans les vins (27,7 % de la variabilité expliquée) mais également dans les distillats (38,3 % de la variabilité expliquée). L'utilisation de préparation enzymatique enrichie en  $\beta$ -glucosidase en fin de FA a donc permis de modifier significativement la concentration en 4VP.



Tableau 43 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expériences 2<sup>5</sup> mis en œuvre en 2021. Pour chaque facteur étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou distillats) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les 2 niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque  $\alpha$  de 5 % sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs, les interactions entre eux sont indiquées par deux points

	EdV (n = 96)		Vin (n = 96)	
	Contrib. (%)	p-value	Contrib. (%)	p-value
MAT	2,0	<b>1,4E-02</b>	11,4	<b>4,7E-09</b>
DEB	6,0	<b>3,4E-05</b>	5,8	<b>1,1E-05</b>
ENZ	38,3	<b>&lt; 2,2e-16</b>	27,7	<b>3,5E-16</b>
TdC	2,0	<b>1,4E-02</b>	1,0	5,4E-02
LIES	7,0	<b>1,0E-05</b>	0,9	6,6E-02
MAT:DEB	0,2	4,7E-01	2,0	<b>7,0E-03</b>
MAT:ENZ	8,6	<b>1,3E-06</b>	18,0	<b>2,6E-12</b>
MAT:TdC	0,9	9,7E-02	5,1	<b>3,4E-05</b>
MAT:LIES	0,0	7,1E-01	0,0	6,8E-01
DEB:ENZ	2,2	<b>9,9E-03</b>	3,5	<b>4,9E-04</b>
DEB:TdC	1,7	<b>2,1E-02</b>	0,0	6,7E-01
DEB:LIES	0,5	2,0E-01	2,4	<b>3,4E-03</b>
ENZ:TdC	0,9	8,6E-02	0,6	1,4E-01
ENZ:LIES	4,6	<b>2,3E-04</b>	0,0	9,9E-01
TdC:LIES	0,0	8,1E-01	0,2	4,3E-01
Résidus	25,0	nd	21,2	nd

Afin de connaître le sens de cette influence, des comparaisons ont été faites entre les différentes modalités, à savoir enzymé (E) et non enzymé (nE), grâce à des tests de Student. L'utilisation des préparations enzymatiques dans les vins (Figure 87a) a permis d'augmenter significativement la concentration des vins en 4VP (3 463, 7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) par rapport aux vins non enzymés (765,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La même logique a été observée pour les distillats (Figure 87b), celles issues de vins enzymés ont significativement présentées des concentrations en 4VP supérieures (885,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) à celles issues de vins non enzymées (300,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

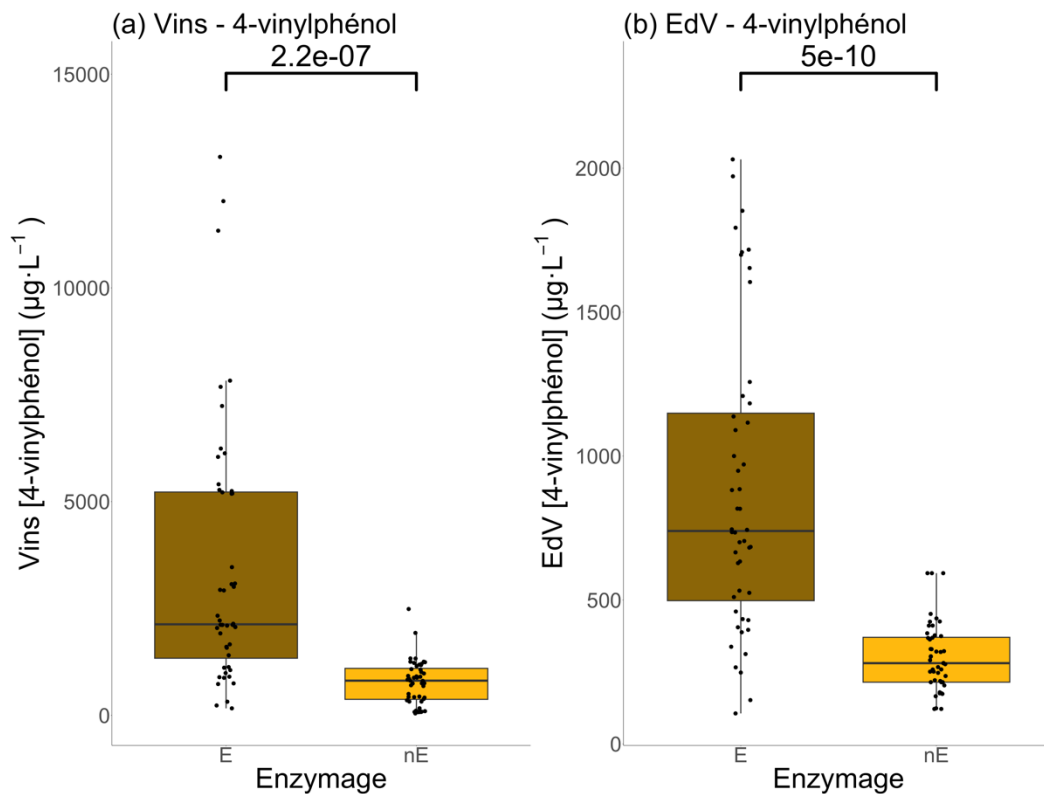


Figure 87 : Concentrations en 4VP dans les différents produits de Baco blanc (vins et distillats) en fonction des niveaux pris (E et nE) par le facteur enzymage (ENZ). Figure (a), concentration en 4VP dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en 4VP dans les distillats (EdV). Les boîtes à moustaches sont reliées par la valeur de p-value du test de Student au risque  $\alpha$  de 5%. Pour chaque variable réponse et par niveau pris,  $n = 48$ .

L'utilisation de préparations enzymatiques, enrichies en activité  $\beta$ -glucosidase, a donc semblé permettre une augmentation significative de la concentration en 4VP. De la même manière que pour l'eugénol, la tendance observée dans les vins, a été retrouvée dans les distillats. Toutefois la variabilité importante dans les concentrations des vins enzymés et des eaux-de-vie qui en étaient issues plaident pour une véritable différence d'efficacité de la préparation enzymatique utilisée sur la libération du 4VP à partir d'un potentiel précurseur glycosylé. L'existence de plusieurs formes précurseurs peut également être envisagée. Afin de vérifier ces hypothèses, le second plan d'expériences mené en 2022 a été appliquée à la concentration en 4VP.

#### I.4.2. L'influence des préparations enzymatiques

L'analyse du second plan d'expériences (page 217) a donc permis d'observer l'influence des différentes préparations enzymatiques alors utilisées. Encore une fois, la contribution de chaque facteur, à la concentration en 4VP dans les vins et les distillats, a été calculée (Tableau 44). Le

facteur AROM est très clairement apparu comme le facteur influençant majoritairement les concentrations en 4VP dans les vins (54,4 %) mais également dans distillats (60,7 %).

Tableau 44 : Principaux résultats de l'ANOVA appliquée au plan d'expériences 3<sup>3</sup> mis en œuvre. Pour chaque facteur étudié, sont données la contribution (contrib.) du facteur à la concentration en eugénol dans un des produits de Baco blanc (vins ou distillats) ainsi que la p-value issue de l'ANOVA. Cette dernière indique la présence, ou l'absence, d'une différence significative entre les 3 niveaux du facteur concerné. Pour faciliter la lecture, les p-value significatives au risque  $\alpha$  de 5% sont inscrites en gras et orange. Dans la première colonne sont inscrits les facteurs, les interactions entre eux sont indiquées par deux points

	EdV (n = 81)		Vin (n = 81)	
	Contrib. (%)	p-value	Contrib. (%)	p-value
DEB	4,4	<b>5,5E-04</b>	6,2	<b>3,2E-14</b>
AROM	60,7	<b>&lt; 2,2e-16</b>	54,4	<b>&lt; 2,2e-16</b>
LIES	2,3	<b>1,5E-02</b>	10,2	<b>&lt; 2,2e-16</b>
DEB:AROM	4,6	<b>3,0E-03</b>	7,4	<b>1,8E-14</b>
DEB:LIES	5,1	<b>1,5E-03</b>	3,7	<b>4,2E-09</b>
AROM:LIES	7,0	<b>1,2E-04</b>	14,5	<b>&lt; 2,2e-16</b>
Résidus	15,9	nd	3,6	nd

Afin de savoir quelle préparation enzymatique libératrice d'arôme influençait le plus les concentrations en 4VP, des tests de Newman-Keuls ont permis de les comparer entre elles (Figure 88). Dans les vins, la préparation enzymatique B2 (pour rappel : riche en activité  $\beta$ -D-glucosidase) a été celle ayant induit, significativement, la plus grande concentration moyenne en 4VP (314,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La préparation B1 (riche en activité  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase) a également permis une augmentation significative de la concentration en 4VP (98,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) par rapport à la modalité R (sans ajout de préparation enzymatique) qui présentait une concentration de 34,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La même logique a été observée pour les distillats, c'est la préparation enzymatique B2 qui permis aux eaux-de-vie issues des vins traités de présenter la concentration moyenne significativement la plus importante (122,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Toujours dans la même logique que pour les vins, la préparation B1 a également permis une plus grande concentration en 4VP (82,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que dans les distillats issues des vins non traités (68,6  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

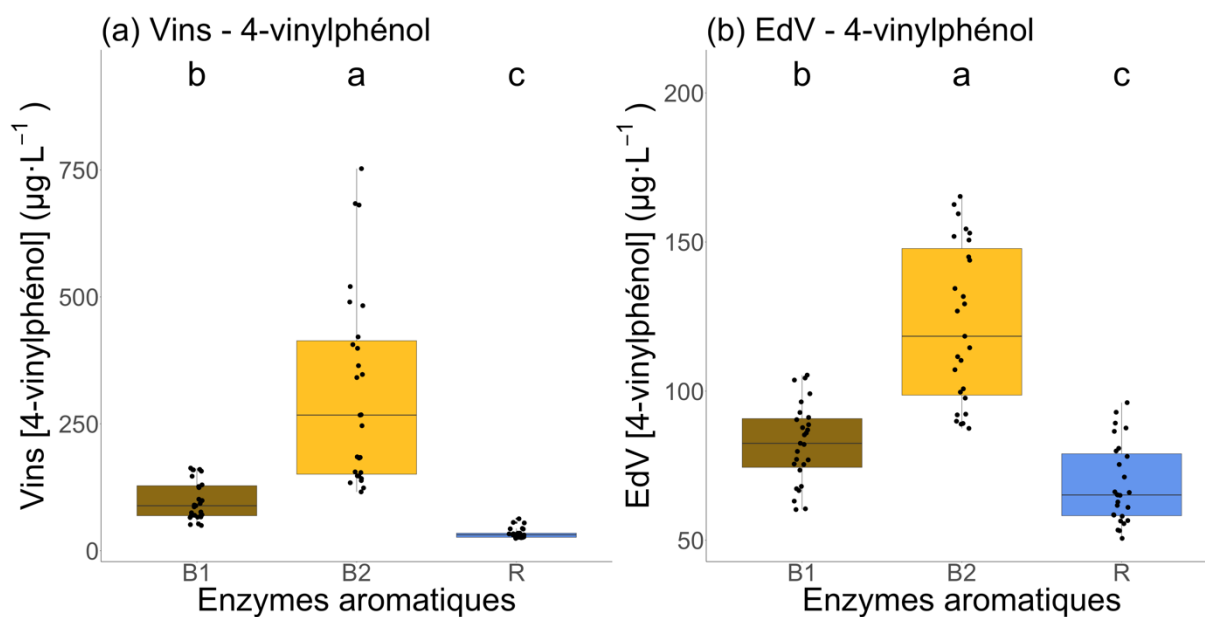


Figure 88 : Concentrations en 4VP dans les différents produits de Baco blanc (vins et eaux-de-vie) en fonction des niveaux pris (B1, B2 et R) par le facteur maturité (AROM). Figure (a), concentration en 4VP dans les vins avant distillation. Figure (b), concentration en 4VP dans les eaux-de-vie blanches (EdV). Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des boîtes à moustaches, sont issues de tests de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5 %. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque variable réponse et par niveau pris,  $n = 27$

### I.5. Le 4VP, un comportement proche de l'eugénol en distillation

Les résultats des deux plans d'expériences ont montré que le 4VP semble se comporter de la même manière que l'eugénol vis-à-vis de l'action de préparations enzymatiques. De plus, une importante variabilité de la concentration en 4VP dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc a été identifiée. Pour ces raisons, l'étude du comportement du 4VP en distillation permettrait donc de mieux appréhender les paramètres de distillation qui moduleraient sa concentration.

Le 4VP a donc été l'autre molécule étudiée lors de l'étude de sensibilité menée par le CRITT-GTPE de Toulouse (page 230). Le 4VP a présenté les mêmes caractéristiques que l'eugénol. À savoir, que pour les TAV étudiés, le 4VP est apparu plus volatil que l'eau mais moins volatil que l'éthanol (Figure 89a). De plus, pour des TAV supérieurs à 25 % (v/v), le 4VP s'est plus concentré dans la phase liquide que dans la phase gazeuse (Figure 89b). À l'instar de l'eugénol, le 4VP peut donc être classé comme produit de queue. Cette classification est importante car cela signifie que le 4VP peut réagir de la même manière que l'eugénol en fonction des valeurs imposées aux paramètres opératoires, de l'alambic, étudiés.

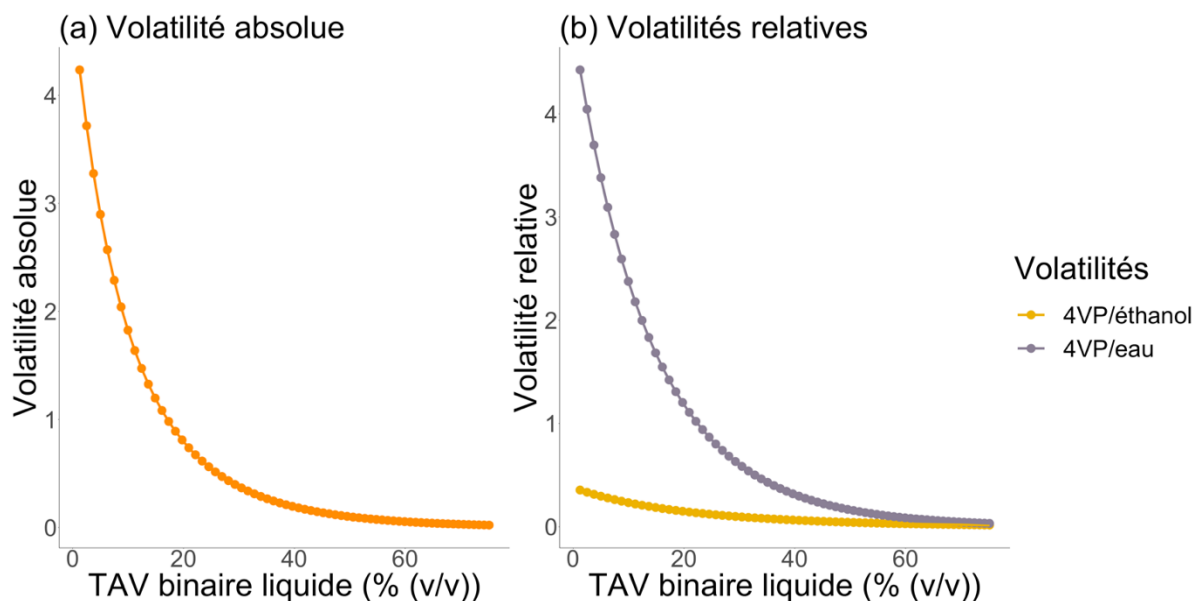


Figure 89 : Volatilités du 4VP en fonction du TAV d'un binaire liquide eau/éthanol, obtenues avec le modèle thermodynamique défini. Figure (a) en orange, volatilité absolue du 4VP. Figure (b), volatilités relatives du 4VP par rapport à l'eau et par rapport à l'éthanol

Les différents paramètres opératoires qui ont été modifiés au cours de l'étude de sensibilité, à savoir la quantité de chaleur apportée au bouilleur, le débit d'alimentation en vin et le débit de coulage des queues ont permis d'observer le comportement du 4VP durant une distillation continue (Figure 90). Au cours de cette étude de sensibilité, il est apparu que le 4VP a présenté le même comportement que l'eugénol en fonction de la variation appliquée aux différents paramètres opératoires étudiés (page 232). De la même manière que pour l'eugénol et sans doute pour les mêmes raisons, les valeurs de concentration en 4VP semblent quelque peu éloignées des concentrations opérées sur des échantillons obtenus en conditions réelles.

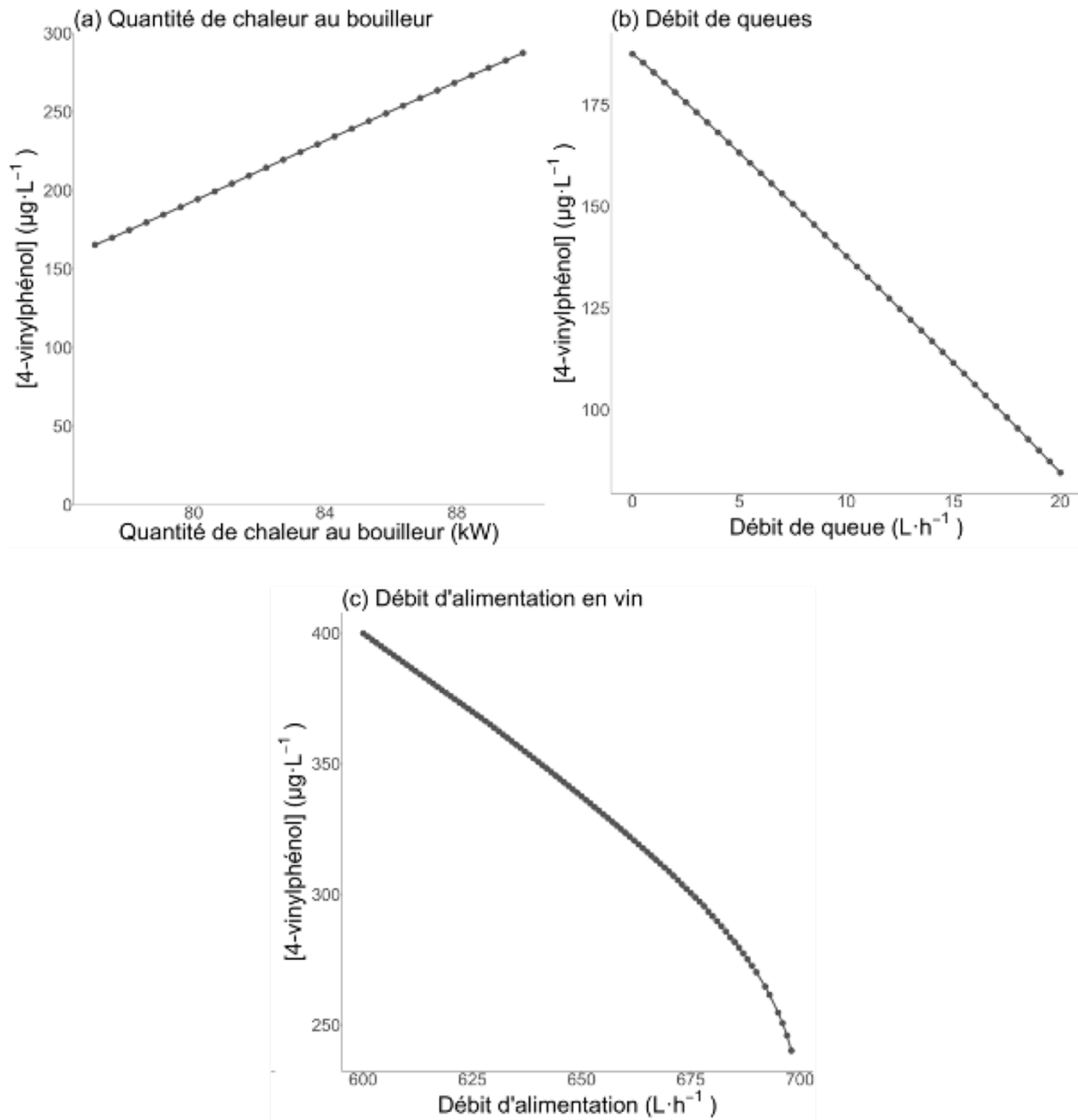


Figure 90 : Évolution de la concentration en 4VP de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution des paramètres opératoires considérés. Figure (a), évolution de la concentration en 4VP de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution de la quantité de chaleur apportée au bouilleur. Figure (b), évolution de la concentration en 4VP de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit de queue. Figure (c), évolution de la concentration en 4VP de l'eau-de-vie en fonction de l'évolution du débit d'alimentation en vin

## II. Discussion

À l'instar de l'eugénol, la variation de la concentration en 4VP a été très dépendante des préparations enzymatiques utilisées. En effet, l'utilisation d'enzymes libératrices d'arômes a permis de libérer des teneurs importantes en 4VP dans les vins et dans les eaux-de-vie. L'efficacité de telles enzymes laisse imaginer l'existence de précurseurs glycosylés du 4VP dans les vins de Baco blanc. Cette hypothèse peut expliquer la concentration spécifique du 4VP dans les vins et eaux-de-vie Baco blanc alors même que ses précurseurs connus, les acides hydroxycinnamiques ne sont pas concentrés plus significativement dans les vins de Baco blanc. Cependant les travaux de cette thèse ne se sont pas intéressés à l'identification de ces éventuels précurseurs. L'importante variabilité dans les concentrations en 4VP entre les différents millésimes étudiés est également une observation notable. Les conditions climatiques des millésimes pourraient être mises en avant pour expliquer ces importantes différences.

Enfin, le comportement du 4VP, révélé par l'étude de sensibilité du CRITT-GTPE semble très proche de celui de l'eugénol. Associé au fait que le 4VP a réagi de la même manière que l'eugénol aux préparations enzymatiques, tout semble indiquer que favoriser la concentration de l'eugénol dans les eaux-de-vie de Baco blanc induit également celle de la concentration en 4VP. Ces importantes concentrations en 4VP ouvrent donc des questionnements quant au rôle organoleptique de ce phénol volatil dans les eaux-de-vie de Baco blanc en lien avec celle envisagée maintenant pour l'eugénol. Il serait sans doute vain de vouloir influencer les teneurs fortes de l'un sans favoriser celles de l'autre.





## **Conclusions de la Partie 3 : L'optimisation de l'eugénol**

### **dans les vins et les eaux-de-vie de Baco blanc**

Dans cette partie, il est apparu que la concentration en eugénol est principalement influencée par la maturité des raisins de Baco blanc, étant entendu qu'une maturité précoce permet de favoriser la concentration en eugénol dans les vins et les eaux-de-vie. De plus, l'utilisation d'enzymes aromatiques permet également d'optimiser les concentrations d'eugénol dans les produits de Baco blanc. Plus encore, cette efficacité des enzymes aromatiques fait apparaître un potentiel en eugénol bien souvent inexploité. Potentiel dont la forme moléculaire reste encore inconnue bien que certaines pistes soient disponibles et seront exploitées dans la suite de ces travaux. L'intérêt d'identifier et de quantifier le(s) précurseur(s) de l'eugénol réside dans une meilleure optimisation de cette molécule.

Mais l'optimisation de l'eugénol dans les vins et les eaux-de-vie peut être modulée par d'autres phénomènes propres à la distillation. Notamment, le choix du TAV de coulage, quelle que soit la méthode qui permet d'y parvenir, conduit à des teneurs plus élevées en eugénol en cas de TAV bas. A l'inverse, le cuivre extrait du serpentín par les vapeurs qui y circulent, peut influencer négativement la volatilité de l'eugénol présent. En effet, le cuivre est capable de former des complexes avec l'eugénol, le rendant ainsi non-volatil et indisponible pour une perception aromatique. Dans la pratique, l'utilisation de résines échangeuses de cations pourrait permettre de réduire les teneurs en cuivre dans les eaux-de-vie blanches dont les niveaux sont en excès et ainsi éviter le masquage aromatique observé.

Si des paramètres clefs de vinifications ont pu être identifiés dans la modulation de la concentration en eugénol, des essais de distillation ont également pu mettre en exergue des paramètres opératoires de distillation d'importance dans la modulation de la concentration en eugénol. De plus grâce à ces différents essais, en conditions réelles ou en simulation numérique, l'eugénol a été identifié comme un composé de queue (ou intermédiaire) dont la concentration est fortement influencée par le TAV de coulage et ce, quelle que soit la manière de moduler ce dernier.

Dans cette partie également, la présence originale et spécifique du 4-vinylphénol dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc a été révélée. Le 4VP a présenté le même comportement que l'eugénol en vinification mais également en distillation. L'influence organoleptique du 4VP dans les eaux-de-vie blanches n'étant pas connu, il semble donc important de prendre en compte le fait que chaque action mise en œuvre pour favoriser la concentration en eugénol, favorisera également la concentration en 4VP.

---

# PARTIE 4 : Les composés précurseurs de l'eugénol

---

*Bâtir une théorie avant d'avoir des données est une erreur monumentale: insensiblement on se met à torturer les faits pour qu'ils collent avec la théorie alors que ce sont les théories qui doivent coller avec les faits.*

Les aventures de Sherlock Holmes, un scandale en Bohême, Sir Arthur Conan Doyle



## Chapitre 1 : Détermination du géoside et autres précurseurs

Ce travail a été mené en étroite collaboration avec les Drs. Céline Franc, Josep Valls-Fonayet de l'UMR ŒNOLOGIE et la Dr. Tiziana Lizanti de l'Università degli Studi di Napoli Federico II.

L'importance de l'eugénol, à la fois dans la tolérance à *B. cinerea*, mais également dans la spécificité des eaux-de-vie qu'il produit, a conduit à définir les paramètres de sa valorisation dans les vins destinés à la distillation. À chaque fois, une différenciation a été faite entre les formes libre et liée de l'eugénol. Cette distinction de l'eugénol lié reflétait tout autant une connaissance lacunaire des formes complexes de l'eugénol que l'identification d'une problématique de recherche. En effet si des précurseurs de l'eugénol ont déjà été identifiés dans d'autres plantes (page 54), ainsi que dans le bois de chêne (Slaghenaufi, 2012), leur existence dans les raisins ou les vins, issus de vignes du genre *Vitis* (*vinifera* ou non), n'a jamais été avancée. Pourtant la détermination des formes liées de l'eugénol permettrait le développement d'une stratégie d'optimisation d'hydrolyse des précurseurs de l'eugénol et de la valorisation des produits de Baco blanc.

Dans ce chapitre, l'expression « eugénol lié » sera complètement amalgamée aux « précurseurs de l'eugénol » ou « formes complexes de l'eugénol ».

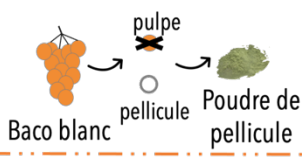
### I. Stratégie analytique de détermination

Dans ce chapitre est donc abordé le développement de méthodes de détermination et de quantification des précurseurs de l'eugénol dans les raisins de Baco blanc. La stratégie analytique globale s'est appuyée sur le couplage de deux techniques de chromatographie : la chromatographie en phase liquide afin d'isoler et de tenter de déterminer les formes des précurseurs de l'eugénol et la chromatographie en phase gazeuse servant de vérification qualitative de la présence d'eugénol dans les échantillons, après sa libération par hydrolyse (Figure 91).

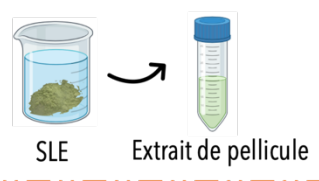
Le choix a été fait d'utiliser les échantillons récoltés à véraison, stade phénologique identifié préalablement comme l'étape de maturation où l'eugénol total se trouve en concentration plus élevée dans les pellicules. La matière première, qui a permis ce développement, a été constituée par des raisins de Baco blanc issus de la parcelle PREMS32.



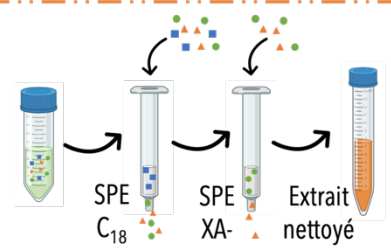
**Vérification de la libération d'eugénol, après hydrolyse, par HS-SPME-GC/MS**



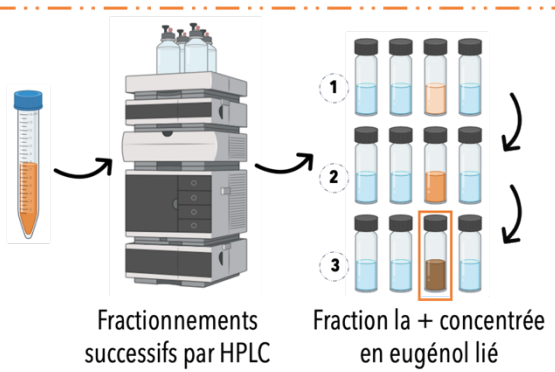
**1. Préparation des échantillons**



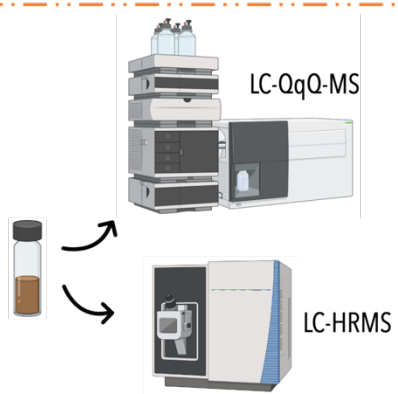
**2. Extraction de l'eugénol lié par SLE**



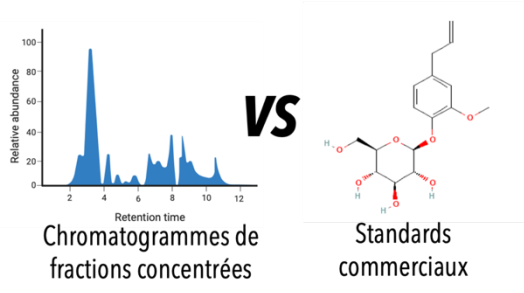
**3. 1<sup>ères</sup> purifications des extraits par SPE C<sub>18</sub> et SPE anionique (XA-)**



**4. 2<sup>ndes</sup> purifications des extraits par fractionnement HPLC**



**5. Détermination putative des précurseurs de l'eugénol par HPLC-QqQ-MS et LC-HRMS**



**6. Comparaison avec des standards commerciaux**

Figure 91 : Schéma récapitulatif de la stratégie analytique d'identification des précurseurs de l'eugénol. Chaque étape a fait l'objet d'un paragraphe spécifique. La vérification de libération d'eugénol par HS-SPME-GC/MS a été réalisée à chaque étape

## I.1. Préparation des échantillons et extraction solide-liquide

Les baies, qui étaient conservées congelées à -25 °C, ont d'abord été pelées sans décongélation. Les pellicules ainsi obtenues ont été séchées sur papier absorbant, puis pulvérisées avec de l'azote liquide dans un broyeur à billes RETSCH MM400 (Retsch France, Verder S.A.R.L., Eragny sur Oise, France). La poudre alors obtenue a été conservée dans des tubes Falcon® de 50 mL plongés dans de l'azote liquide. Un échantillon d'environ  $12,2 \pm 0,2$  g de poudre de pellicule a ensuite été pesé et placé dans un tube Falcon® de 50 mL. Huit tubes ont ainsi été préparés, pour une masse totale de poudre de pellicule de 97,9 g. Dans chaque tube, était introduit un homogénéiseur en céramique (Agilent Technologies, Massy, France) afin d'effectuer 3 SLE successives en utilisant 20, 15 et 15 mL d'un mélange acétone/eau : 1/1. Le choix de ce solvant s'est basé sur une méthodologie déjà employée au laboratoire pour extraire les précurseurs de l'eugénol à partir du bois de chêne (Slaghenaufi, 2012). L'ensemble des tubes a été placé sur une table agitante IKA HS 501 (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France) durant 1 heure à 250 rpm. Chaque SLE était suivie d'une centrifugation sur Himac CR22N (Hitachi Life-Sci, Tokyo, Japan) à 5 000 g durant 10 min à 20 °C. À la fin des 3 SLE, les surnageants des 8 échantillons ont été regroupés et concentrés sous pression réduite avec un évaporateur rotatif Laborota 4010 digital (Heidolph Instruments, Allemagne). Après évaporation, l'extrait concentré a été de nouveau centrifugé (5 000 g pendant 10 min à 5 °C). Le volume total de surnageant (l'extrait de poudre de pellicule) représentait alors 134 mL.

Afin de s'assurer de la présence des précurseurs de l'eugénol dans l'extrait, une quantification de l'eugénol lié a été effectuée. Pour cela 500 µL d'extrait (équivalent donc à 365 mg de pellicules) ont été hydrolysés en utilisant la méthodologie décrite au paragraphe page 92 puis analysés par HS-SPME-GC/MS tel que décrit au paragraphe page 93. Les résultats de cette vérification sont présentés à la Figure 92.

Il apparaît que l'extraction avec un mélange acétone/eau : 1/1 a permis d'extraire la majeure partie de la masse d'eugénol lié (Figure 92). En effet, l'absence de différences significatives entre le rendement d'extraction de l'eugénol total dans la poudre de pellicule (100 %) avant toute manipulation et le rendement d'extraction de ce même eugénol après SLE (106,6 %) ainsi que le très faible rendement d'extraction d'eugénol du culot de centrifugation (7,8 %) confirment l'efficacité de l'extraction solide-liquide mais également l'existence d'une forme de l'eugénol lié difficilement extractible.

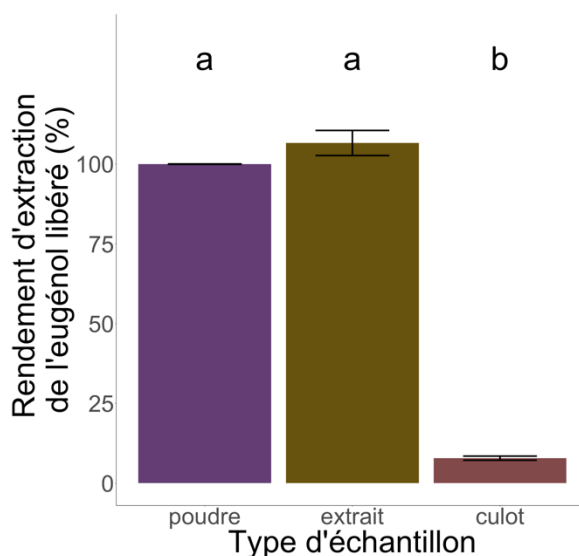


Figure 92 : Rendements d'extraction de l'eugénol lié en fonction des fractions d'extraction (surnageant = extrait S/L, et culot). La poudre de pellicule représente le maximum d'eugénol à extraire soit 100 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque matrice,  $n = 2$

## I.2. Pré-purification des extraits de pellicules

### I.2.1. Élimination des composés apolaires, des composés volatils et des sucres

Afin de purifier l'extrait solide/liquide obtenu et d'isoler les précurseurs de l'eugénol, des extractions sur phase solide (SPE) ont été réalisées. Les techniques, sur cartouche  $C_{18}$ , ont plusieurs fois prouvé leur efficacité quant à l'élimination des composés volatils présents en matrice ainsi que des sucres (Jesús Ibarz *et al.*, 2006; Loscos *et al.*, 2009).

C'est pourquoi, en se basant sur une procédure d'extraction de composés aromatiques glycosylés (Genovese *et al.*, 2013), une première SPE sur phase  $C_{18}$  avec des cartouches d'1 g/20 mL Strata (Phenomenex, Le Pecq, France) a été effectuée sur l'extrait concentré de poudre de pellicules. Cette SPE a été réalisée avec un collecteur sous pression réduite Visiprep™ (Sigma-Aldrich Chimie, St Quentin Fallavier, France). Le volume d'extrait obtenu, soit 134 mL, a été divisé en 4 portions d'environ 33,5 mL chacune. Ce sont donc 4 SPE qui ont été conduites en parallèle. Les cartouches  $C_{18}$  ont d'abord été conditionnées avec 20 mL de méthanol puis équilibrées avec 20 mL d'eau. Les volumes d'extraits ont ensuite été déposés sur chaque cartouche. Une étape de lavage des cartouches avec 12 mL d'eau ont permis d'éliminer



les composés polaires tels que les sucres. La première étape d'élution a été réalisée avec 12 mL de dichlorométhane afin d'éliminer les composés apolaires dont les aglycones (Cebrián-Tarancón *et al.*, 2021).

Une seconde étape d'élution à l'acétonitrile a été effectuée. Afin de déterminer quel pourcentage d'acétonitrile en mélange avec de l'eau, devait être utilisé, plusieurs essais ont été préalablement réalisés (Figure 93). Deux types d'élutions ont été testés : une élution unique avec de l'acétonitrile 100 % et une élution avec gradient en utilisant successivement de l'acétonitrile 30 %, de l'acétonitrile 60 % et enfin de l'acétonitrile 100 %. Les éluats ont été hydrolysés par réaction enzymatique et analysés par HS-SPME-GC/MS afin de déterminer la concentration en eugénol libéré.

Si une extraction unique avec de l'acétonitrile 100 % permet une récupération totale de l'eugénol lié (104,5 %), la première phase d'une élution avec gradient (acétonitrile 30 %) permet également de récupérer la totalité de l'eugénol lié (114,5 %). Tandis que les étapes suivantes de cette élution avec gradient, soit avec de l'acétonitrile 60 % et ensuite de l'acétonitrile 100 %, ne permettent aucune récupération de l'eugénol lié, respectivement 0,1 % et 0 % (Figure 93). Autrement dit, l'utilisation d'acétonitrile 30% comparé à de l'acétonitrile 100%, ne diminue en rien le rendement d'extraction.

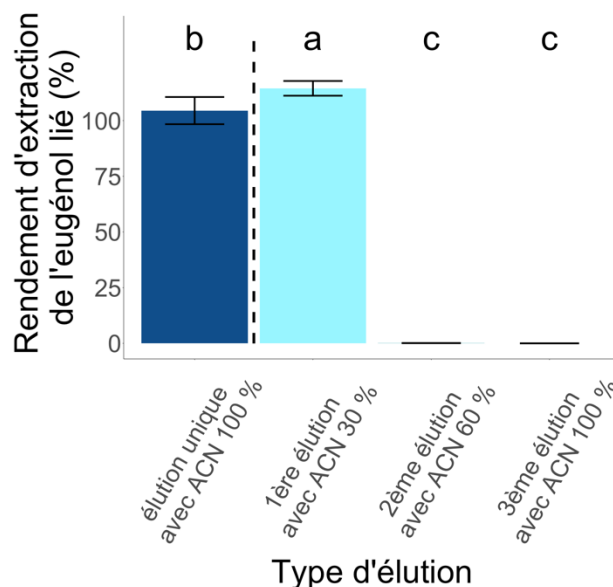


Figure 93 : Rendements d'extraction de l'eugénol lié en fonction du gradient d'acétonitrile (ACN) appliqué. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Le segment pointillé permet de séparer les 2 types d'élutions comparés : une seule élution et 3 élutions successives. Pour chaque matrice,  $n = 2$

Cette étape optimisée, l'élution des 4 SPE est préparée en parallèle. Ainsi, la seconde étape d'élution des cartouches  $C_{18}$  a été réalisée avec 12 mL d'une solution aqueuse à 30 % d'acétonitrile. L'ensemble des éluats des 4 cartouches SPE a été rassemblé puis concentré sous pression réduite avec un évaporateur rotatif. Ce sont donc environ 34 mL d'extrait qui ont été récupérés après SPE sur phase  $C_{18}$ . La présence des précurseurs glycosylés de l'eugénol a été confirmée : 200  $\mu$ L de l'extrait post-SPE  $C_{18}$  (équivalent à 574 mg de poudre de pellicule) ont été hydrolysés par réaction enzymatique, analysés par HS-SPME-GC/MS, et ont montré une libération de 111,4  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> d'eugénol.

### I.2.2. Élimination de composés ionisables

Pour éliminer des interférences, dues à des composés ionisés, dans l'isolement de molécules non-volatiles, les techniques de SPE, basées sur des ligands polaires, sont également citées dans la littérature (Cebrián-Tarancón *et al.*, 2021) comme une option intéressante et complémentaire à une première étape de purification, ici la SPE sur cartouche  $C_{18}$  (Gracia-Moreno *et al.*, 2015; López *et al.*, 2002).

Le choix s'est donc porté sur une SPE anionique, après comparaison avec une SPE cationique ayant donné des résultats peu probants. En effet si le rendement d'extraction, calculé grâce aux résultats de l'analyse HS-SPME-GC/MS (Figure 94) obtenu avec la SPE par échange de cations était significativement supérieur (98 %) à celui de la SPE par échange d'anions (81 %), l'analyse du chromatogramme HPLC en mode scan des deux SPE a montré un profil moins complexe pour la SPE anionique (Figure 95). De manière plus qualitative, l'extrait obtenu par SPE anionique ne présentait pas de coloration jaune, restée sur la colonne, contrairement à l'extrait obtenu par SPE cationique.

La SPE anionique a donc été effectuée grâce à des cartouches à échange d'anions fort (XA) 500 mg/ 6 mL Polyclean 30HAX (Interchim SAS, Montluçon, France), placées sur un collecteur sous pression réduite Visiprep™. Concrètement, le volume d'extrait post-SPE C<sub>18</sub> obtenu au paragraphe précédent a été divisé en 3 portions d'environ 11 mL chacune. C'est donc 3 SPE à échange d'anions fort qui ont été conduites en parallèle. Une étape de conditionnement des cartouches a été réalisée avec 10 mL de méthanol. Les cartouches ont ensuite été équilibrées avec 10 mL d'eau. Après dépôt des extraits sur les cartouches, ces dernières ont été d'abord lavées avec 12 mL d'une solution tampon d'acétate d'ammonium à 25 mM afin d'éliminer les composés non retenus par la phase polymérique chargée positivement. La première élution avec 12 mL de méthanol visait à récupérer les espèces chimiques basiques et neutres. La deuxième étape d'élution avec 12 mL d'une solution d'acide formique à 5 % dans du méthanol, visait à récupérer les composés acides. Les précurseurs glycosylés de l'eugénol ont été retrouvés dans la fraction correspondant à la première élution avec le méthanol pur. La présence des précurseurs glycosylés de l'eugénol a été vérifiée : 200 µL d'extrait, équivalent à environ 546 mg, post SPE-XA ont été hydrolysés par réaction enzymatique et analysés par HS-SPME-GC/MS (Figure 94). L'ensemble des éluats de la première fraction a été rassemblé en un seul volume d'environ 35,5 mL.

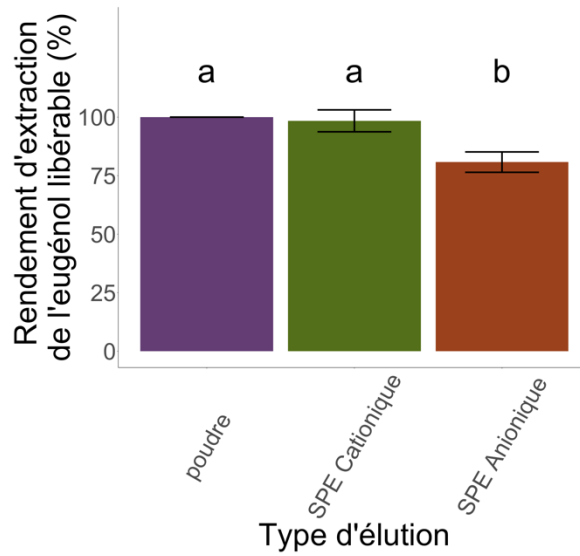


Figure 94 : Rendement d'extraction de l'eugénole libérable en fonction des SPE par échange d'ions utilisées. La poudre de pellicule représente le maximum d'eugénole à extraire soit 100 %. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Pour chaque matrice,  $n=2$

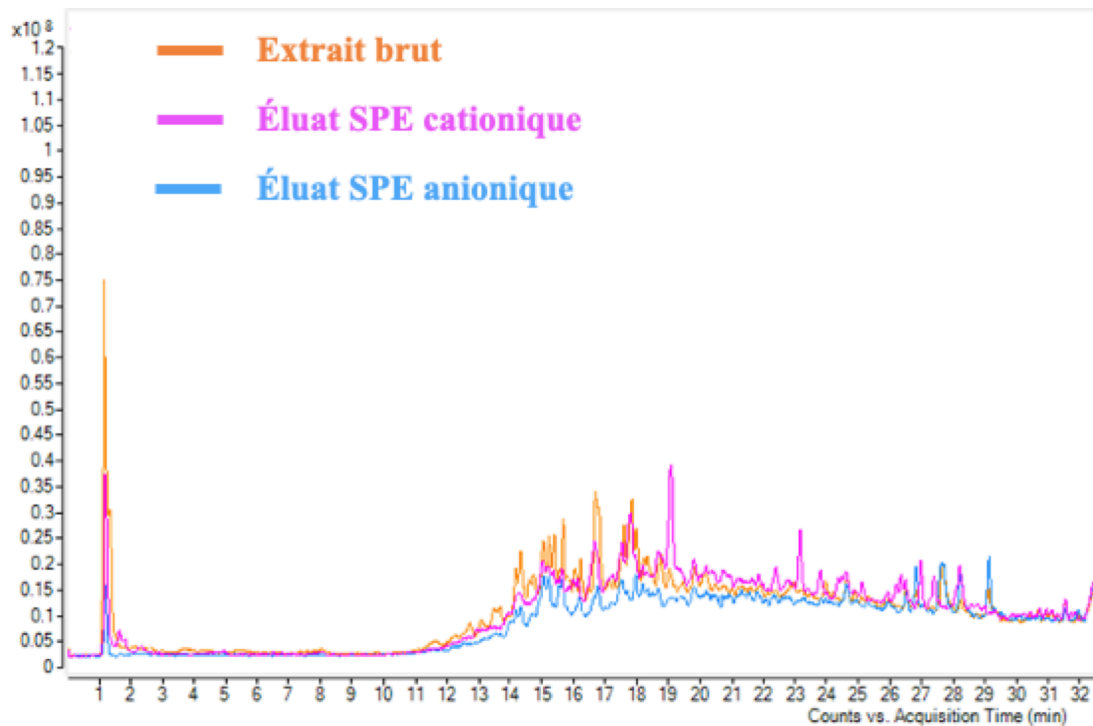


Figure 95 : Chromatogrammes superposés HPLC-QqQ/MS en mode scan de l'extrait brut et des deux éluats après SPE par échange de cations et SPE par échange d'anions

À la suite de cette SPE-XA, l'extrait obtenu a été concentré sous pression réduite avec un évaporateur rotatif jusqu'à siccité. L'extrait sec ainsi obtenu a ensuite été dissous dans 1 mL de méthanol. Sur ce volume, 500 µL ont été prélevés pour être hydrolysés par réaction enzymatique afin d'obtenir un échantillon hydrolysé à comparer avec l'échantillons non-hydrolysé à savoir, les 500 µL restants dilués au demi avec 500 µL d'eau. Ce dernier échantillon, nommé Fi par souci de lisibilité, a été utilisé pour plusieurs analyses en LC-MS, LC-HRMS et pour le fractionnement par LC.

### I.2.3. Vérification de l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique

Le volume restant d'extrait, obtenu au paragraphe page 274, a également permis de faire une comparaison entre hydrolyse acide à chaud et hydrolyse enzymatique. L'hydrolyse acide à chaud a mobilisé 10 µL de Fi dilué par 2 obtenu après SPE-XA, dilué dans 10 mL d'eau acidifiée à pH 1 avec de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 98 %. Ce mélange a été placé dans une étuve réglée à 100 °C durant 1 heure. Cette hydrolyse a été réalisée en triplicata et comparée à une hydrolyse enzymatique réalisée également sur 10 µL de Fi dilué par 2 obtenu après SPE-XA, en triplicata.

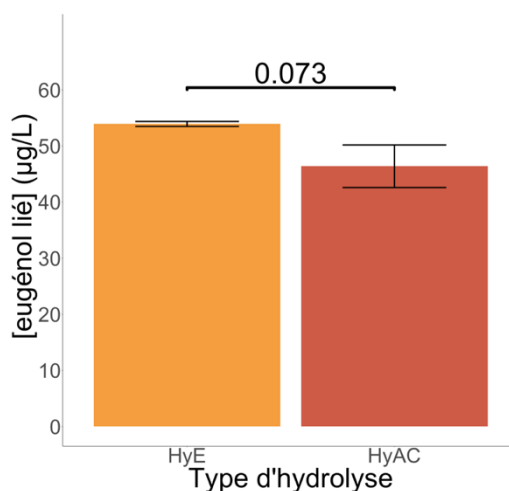


Figure 96 : Comparaison entre la performance de libération des précurseurs de l'eugénol par une hydrolyse enzymatique (HyE) avec la performance de libération de ces mêmes précurseurs par une hydrolyse acide à chaud (HyAC). La p-value faisant le lien entre deux histogrammes est issue d'un test de Student au risque  $\alpha$  de 5%. Pour chaque matrice,  $n = 3$

La comparaison entre les deux types d'hydrolyses n'a montré aucune différence significative (Figure 96). L'hydrolyse enzymatique avec une préparation riche en  $\beta$ -glucosidase, classiquement utilisée depuis le début de ces travaux, a permis une libération de  $53,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  tandis que l'hydrolyse acide a permis une libération de  $46,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . S'il n'y a pas de différence significative entre les deux modalités ( $p$ -value = 0,07), un effet tendanciel ( $p$ -value < 0,1) peut être noté en faveur de l'hydrolyse enzymatique. L'hydrolyse enzymatique est donc celle qui est la plus efficace pour la libération de l'eugénol à partir de son précurseur.

### I.3. Isolement des précurseurs de l'eugénol par fractionnement HPLC, à partir de l'extrait partiellement purifié

#### I.3.1. Méthodologie suivie

À partir de l'extrait Fi représentant ainsi l'équivalent de 47,9 g de poudre de pellicule, un fractionnement par LC a été réalisé. Le but étant d'identifier une fraction contenant les précurseurs glycosylés de l'eugénol. Ce fractionnement a été réalisé sur une colonne Kinetex Polar C<sub>18</sub> (150 mm (L) × 2,1 mm (di); 2.6  $\mu\text{m}$  de taille des particules) de Phenomenex (Le Pecq, France), montée sur un chromatographe liquide, série 1200 (Agilent Technologies, Massy, France). Les solvants utilisés étaient de l'eau pure en tant que solvant A et de l'acétonitrile pur comme solvant B. Le débit était de  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  et le gradient a suivi la logique indiquée dans le Tableau 45.

Tableau 45 : Gradient utilisé pour les fractionnements successifs par HPLC de l'extrait purifié

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	98	2
2	98	2
5	95	5
30	95	5
60	80	20
70	60	40
80	0	100
90	0	100
95	98	2

Dix  $\mu\text{L}$  de l'échantillon non hydrolysé (Fi) ont été injectés pour opérer les différents fractionnements. Chaque fraction récupérée (Tableau 46) a été hydrolysée par voie enzymatique afin de vérifier la présence des précurseurs glycosylés de l'eugénol.

Pas à pas à chaque nouveau fractionnement, la fréquence de récolte des fractions a été augmentée afin de préciser la zone contenant les précurseurs de l'eugénol. Seule la fraction hydrolysée présentant la concentration la plus importante en eugénol a été de nouveau fractionnée. À titre de comparaison, 10  $\mu\text{L}$  de l'échantillon non hydrolysé (Fi) (équivalent approximativement à 479 mg de poudre de pellicule) ont été hydrolysés par voie enzymatique.

### I.3.2. Résultats des fractionnements successifs

Un résumé des fractionnements successifs est disponible au Tableau 46. Dans un premier temps, les fractions ont été collectées toutes les 15 minutes, de 0 à 90 minutes d'analyse. Ce sont donc 6 fractions de 4,5 mL chacune qui sont ainsi récupérées. Chaque fraction a été injectée en LC/MS et les hydrolyses enzymatiques ont été effectuées sur 1 mL. Après le premier fractionnement HPLC (Figure 97a), la fraction 4 est apparue comme celle ayant permis la plus grande libération d'eugénol à partir de précurseurs. En effet c'est cette fraction qui a présenté la plus grande abondance relative pour l'ion 164 correspondant à l'eugénol. La fraction F4, comprise entre 45 et 60 min, était la seule, après hydrolyse enzymatique, à présenter une concentration mesurable en eugénol de  $8,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 97a). Lors du deuxième fractionnement de l'extrait Fi, les fractions ont été récoltées toutes les 3,5 min entre 40 et 64,5 min de façon à plus fractionner la zone de 45 à 60 min identifiée précédemment comme celle où se présentent les précurseurs de l'eugénol et ainsi resserrer la zone de recherche. Au cours de ce fractionnement 7 fractions de 1,05 mL chacune ont été récupérées. Lors du deuxième fractionnement, c'est la fraction D qui a libéré la plus grande quantité d'eugénol (Figure 97b). Encore une fois, c'est celle qui a présenté l'abondance relative pour l'ion 164 la plus importante. L'hydrolyse enzymatique de 950  $\mu\text{L}$  de la fraction D, comprise entre 50,5 et 54 min, a permis de libérer  $28,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  de cette même fraction D a été conservé pour les injections en LC/MS. Le troisième fractionnement de l'extrait Fi a permis de récolter 7 fractions de 0,3 mL, comprises entre 49,5 et 56,5 min. L'hydrolyse enzymatique a été réalisée sur 240  $\mu\text{L}$  de chacune des fractions. Enfin lors de ce troisième fractionnement, l'abondance relative pour l'ion 164 de la fraction 52 était la plus importante, c'est donc celle qui a permis la plus grande libération d'eugénol. La fraction 52, comprise entre 51,5 et 52,5 min, a libéré  $53,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol (Figure 97c). Un volume de 60  $\mu\text{L}$  de cette fraction non hydrolysée a été conservé pour être injecté en LC/MS. Toutefois, il est important de noter que les hydrolyses enzymatiques des fractions 51 et 53 ont permis de libérer respectivement 1,1 et  $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'eugénol.

Tableau 46 : Description des fractionnements successifs ayant permis la détermination des précurseurs de l'eugénol. Les fractions et intervalles apparaissant en orange correspondent aux fractions dont l'hydrolyse enzymatique a révélé la plus grande concentration en eugénol

1 <sup>er</sup> fractionnement		2 <sup>e</sup> fractionnement		3 <sup>e</sup> fractionnement	
Fraction	Intervalle de temps (min)	Fraction	Intervalle de temps (min)	Fraction	Intervalle de temps (min)
F1	0 - 15	A	40 - 43,5	50	49,5 - 50,5
F2	15 - 30	B	43,5 - 47	51	50,5 - 51,5
F3	30 - 45	C	47 - 50,5	<b>52</b>	<b>51,5 - 52,5</b>
<b>F4</b>	<b>45 - 60</b>	<b>D</b>	<b>50,5 - 54</b>	53	52,5 - 53,5
F5	60 - 75	E	54 - 57,5	54	53,5 - 54,5
F6	75 - 90	F	57,5 - 61	55	54,5 - 55,5
		G	61 - 64,5	56	55,5 - 56,5

Afin d'avoir plus de matériel pour caractériser le précurseur majoritaire, ce fractionnement a été répété sur l'échantillon Fi préalablement concentré (évalué à sec et repris avec 10 µL de MeOH et 190 µL d'eau). Lors de ce nouveau fractionnement, la fraction 51 est apparue comme la plus pure. C'est sur cette dernière fraction que l'analyse HRMS a été réalisée (page 283).

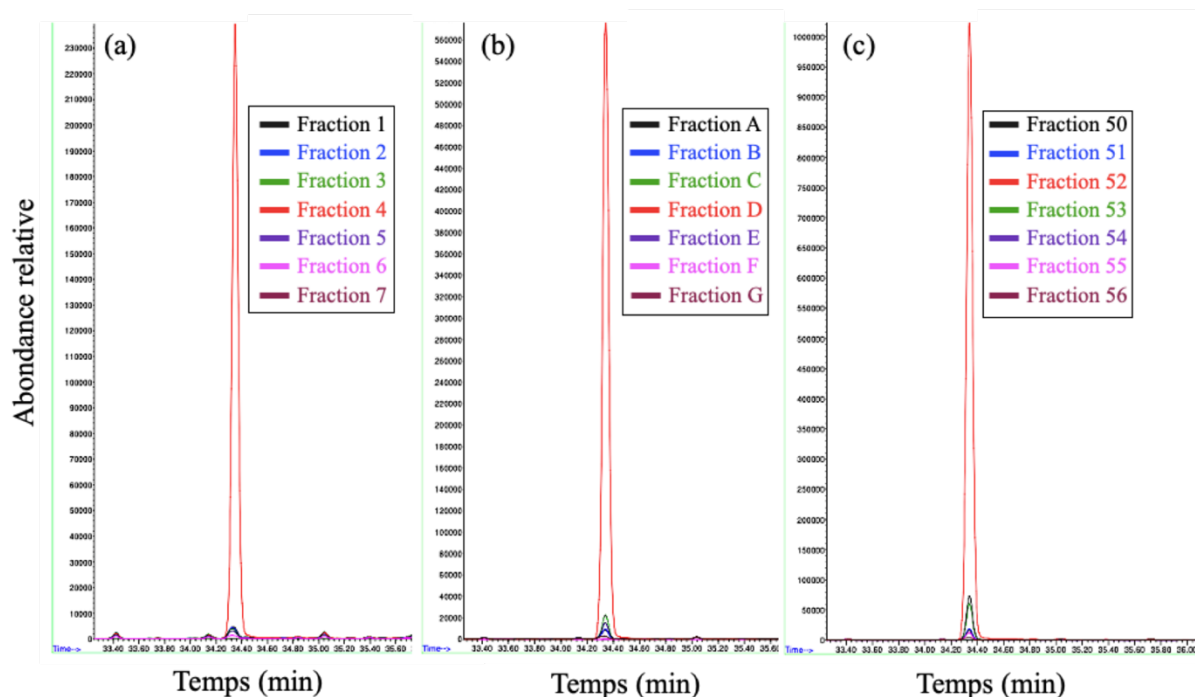


Figure 97 : Chromatogrammes obtenus par HS-SPME-GC/MS en mode SIM pour l'ion 164 (eugénol) sur les échantillons de fractions hydrolysées. Figure (a), chromatogrammes superposés des différentes fractions hydrolysées après le premier fractionnement par HPLC. Figure (b), chromatogrammes superposés des différentes fractions hydrolysées après le deuxième fractionnement par HPLC. Figure (c), chromatogrammes superposés des différentes fractions hydrolysées après le troisième et dernier fractionnement par HPLC



De manière complémentaire, la Figure 98 représente les différents chromatogrammes obtenus au cours des procédés d'extraction et de fractionnement de la poudre de pellicule de Baco blanc. La Figure 98a explicite bien la difficulté d'identifier un ou plusieurs précurseurs de l'eugénol parmi l'ensemble des pics obtenus et ce, même après les deux tentatives de purifications par SPE. À l'inverse la Figure 98b illustre le travail de fractionnement de l'extrait qui a permis d'isoler le pic rouge représentant la fraction 52 dont une tentative d'identification des composés la constituant devait être encore réalisée.

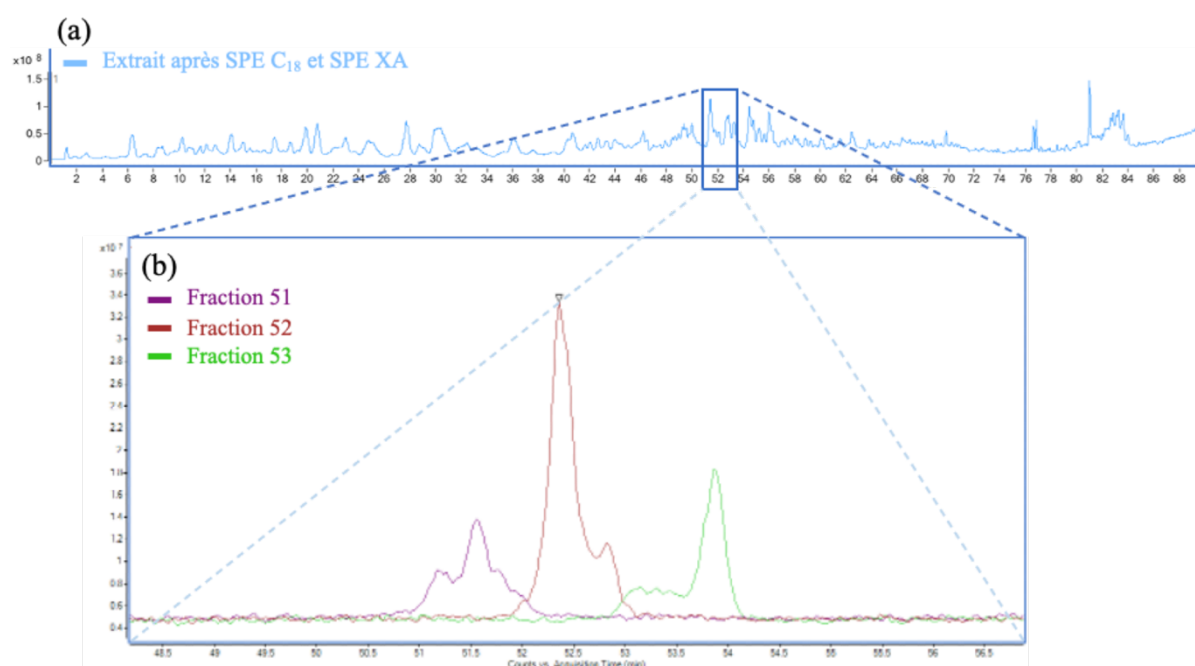


Figure 98 : Chromatogrammes LC/MS en mode scan de différents extraits de l'échantillon de poudre de pellicules de Baco blanc. Figure (a), chromatogrammes LC/MS en mode scan de l'extrait de poudre de pellicules de Baco blanc après SPE XA. La durée de l'analyse est de 90 minutes. Figure (b), chromatogramme en mode scan des fractions 51, 52 et 53

## I.4. Détermination putative de la structure de précurseurs de l'eugénol

### I.4.1. Matériel utilisé

L'ensemble des analyses menées dans la suite de ce paragraphe a été conduit sur un chromatographe liquide, série 1200, couplé à un spectromètre de masse triple quadrupôle 6430, tous deux fournis par Agilent Technologies (Massy, France). La chaîne du chromatographe en phase liquide était constituée d'une pompe binaire 1260, d'un dégazeur haute performance 1260, d'un thermostat 1290 pour passeur d'échantillons 1260 et d'un four à colonne thermostaté 1290, réglé à 40 °C. Le spectromètre de masse était équipé d'une source d'ionisation par

électrospray (ESI). Le diazote utilisé comme gaz de séchage, de nébulisation et de collision, a été produit par un générateur NiGen LCMS 40-1 (Gengaz, Wasquehal, France). L'interface ESI a fonctionné simultanément en modes positif et négatif avec une tension électrique du capillaire fixée à 3 000 V. La pression du nébuliseur était de 40 psi, le débit du gaz séchant était fixé à 11 L·min<sup>-1</sup> et la température du gaz à 350 °C. L'ensemble du dispositif était géré numériquement par le logiciel MassHunter Workstation version B.05.00. Pour l'analyse en mode scan, la gamme de recherche de masses s'étendait de  $m/z = 50$  à  $m/z = 2000$  avec une fréquence de scan de 200 ms. La tension électrique du fragmenteur était fixée à 82 V. La tension électrique d'accélération dans la cellule de collision était de 5 V.

#### I.4.2. Résultats des premières identifications des précurseurs par HPLC-QqQ-MS

L'analyse LC/MS du pic principal de la fraction ayant libéré le plus d'eugénol a révélé la présence des ions de rapport  $m/z$  481 en ESI+ (Figure 99a) et 503 en ESI- (Figure 99b) en utilisant une phase mobile ajoutée d'acide formique. Ces ions moléculaires ont pu être interprétés comme un adduit sodium (+23) en ESI<sup>+</sup> d'un composé, dont la masse molaire moléculaire est de 458, et de son adduit formiate (+45) en ESI<sup>-</sup>. L'hypothèse d'un précurseur glycosylé de l'eugénol contenant de l'eugénol (164), un hexose (162) et un pentose (132) a donc été avancée.

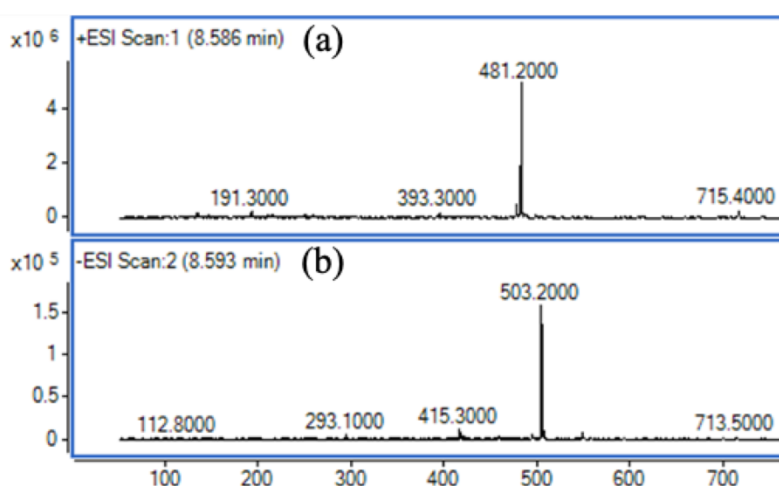


Figure 99 : Spectres en mode scan de la fraction 52. Figure (a), spectre obtenu en ESI+. Figure (b), spectre obtenu en ESI-

### I.4.3. Analyses de confirmation par UHPLC/HRMS

Une analyse en spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) a pu être effectuée sur un appareil QExactive+ (Thermo Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) basé sur la technologie Orbitrap. Le système était équipé d'une source d'ionisation par électrospray à chaud HESI dont les conditions d'ionisation étaient les suivantes : mode négatif, tension électrique de nébulisation à 3 000 V, gaz gaine (sheath gaz) 45 ua, gaz auxiliaire 15 ua, température du capillaire à 320 °C, température de la sonde à 250 °C et niveau de radiofréquence de la lentille-S à 100 V. Les spectres de masse ont été obtenus par acquisition dépendante des données « full scan data dépendent MS/MS » (dd-MS<sup>2</sup>) avec les paramètres d'acquisition suivants :

- Pour l'analyse en full scan : résolution à 70 000, cible AGC à 3<sup>e</sup>6, IT maximum fixé à 100 ms, bornes du scan fixées entre 70 et 750 m/z ;
- Pour l'analyse dd-MS<sup>2</sup> : résolution à 17 500, cible AGC à 1<sup>e</sup>5, IT maximum fixé à 50 ms, fenêtre ciblée sur 2 m/z, nombre d'ions précurseurs fixé à 5 et énergie de collision normalisée à 30 V.

Le système précédemment décrit était couplé à une chaîne UHPLC Vanquish (Thermo Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). La séparation a été effectuée sur une colonne chromatographique Phenomenex Luna Omega Polar C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm ; 1,6 µm) chauffée à 40 °C et en utilisant 2 solvants : le solvant A (acide formique à 0,1 % dans l'eau) et le solvant B (acide formique à 0,1 % dans l'acétonitrile). Le débit était de 0,5 mL·min<sup>-1</sup> et a suivi le gradient présenté au Tableau 47.

Tableau 47 : Gradient utilisé pour les analyses en UHPLC/HRMS

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	99	1
11,5	60	40
12,5	5	95
14	5	95
15,5	99	1
16	99	1

La fraction purifiée 51 (page 279) et une solution du standard géoside (0) ont toutes les deux été analysées en UHPLC-HRMS (Figure 100). Pour les deux injections, un pic a été identifié au temps de rétention de 6,45 min. Le spectre en full scan (Figure 100a2 et Figure 100b2), à ce temps de rétention précis, a révélé la présence d'un ion de  $m/z = 503,1777 \pm 0,001$  auquel la formule brute C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>O<sub>13</sub> a pu être attribuée, en cohérence avec un adduit formiate d'un

diglycoside de l'eugénol formé d'un pentose et d'un hexose ( $\Delta m=3,6$  ppm). Plus encore, un autre ion avec un  $m/z = 457,1722 \pm 0,002$  a également été identifié dans les deux injections et a pu être attribué à la forme déprotonée de formule brute  $C_{21}H_{29}O_{11}$  ( $\Delta m=4,0$  ppm) de ce diglycoside. Cet ion précurseur a également été fragmenté dans l'expérience MS/MS en données dépendantes, au cours de laquelle l'énergie de collision normalisée était fixée à 30V. Les résultats de fragmentation (Figure 100a3 et Figure 100b3) ont clairement montré la formation d'un fragment avec un  $m/z = 163,0758 \pm 0,001$ , assimilable à l'aglycone eugénol, de formule brute  $C_{10}H_{11}O_2$  ( $\Delta m=2,8$  ppm), débarrassé de ses parties osidiques.

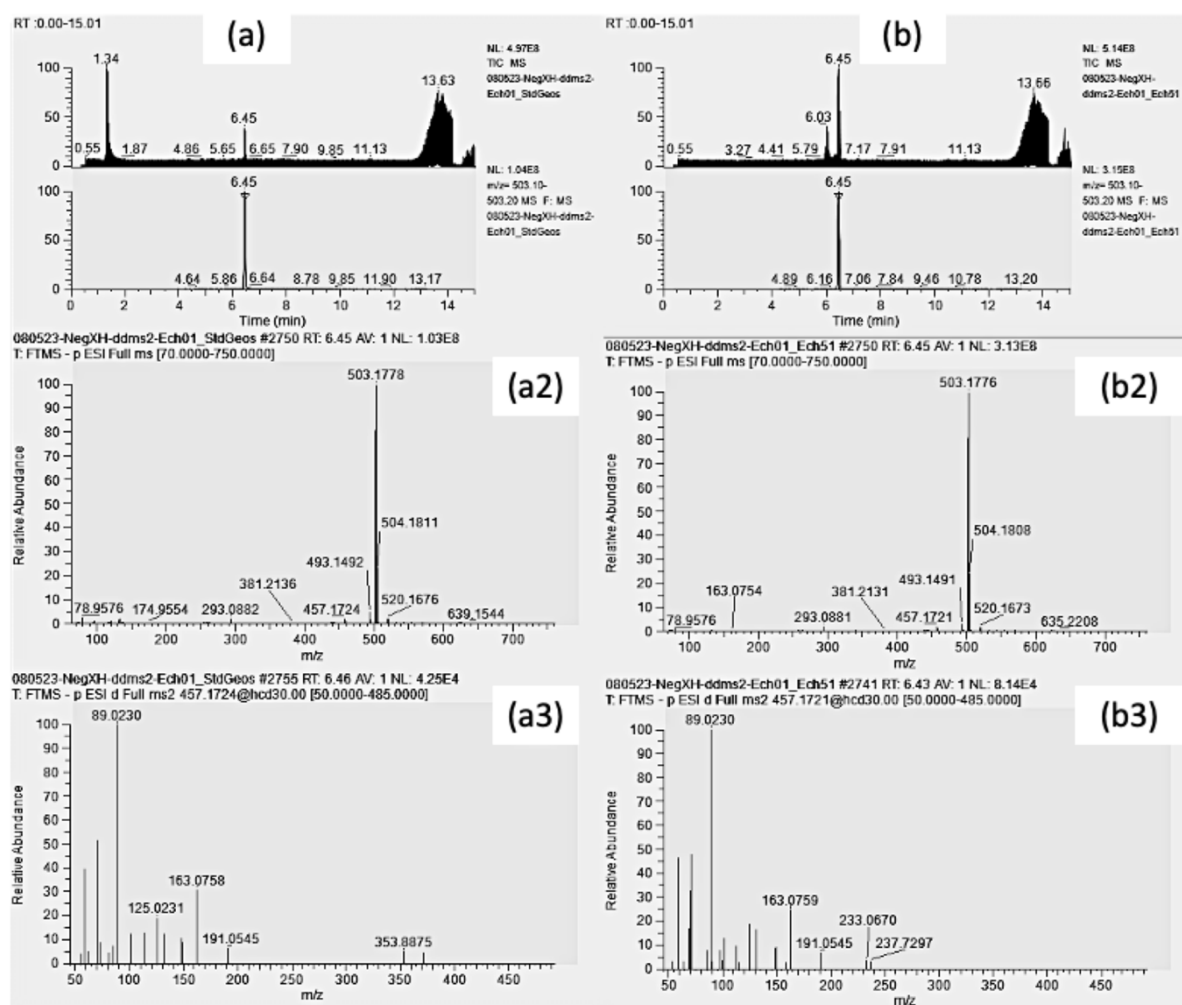


Figure 100 : Analyse UHPLC-HRMS du standard de géoside (a) et de la fraction 51 (b). Full scan (a2) et fragmentation MS/MS de l'ion avec le rapport  $m/z = 457,1724$  (a3) pour le standard de géoside. Full scan (b2) et fragmentation MS/MS de l'ion avec un rapport  $m/z = 457,1721$  (b3) pour le pic au temps de rétention 6,45 min dans la fraction 51

#### I.4.4. Comparaisons avec des standards commerciaux

Comme mentionné précédemment le ou les précurseurs de l'eugénol, au cours de la purification et de l'identification, est hydrolysé avec la préparation enzymatique Rapidase® Revelation Aroma. Cette préparation œnologique est décrite comme possédant plusieurs activités enzymatiques : glucosidase en premier lieu, mais aussi rhamnosidase, arabinofuranosidase et apiosidase. De plus l'arabinose (Figure 101b) et l'apiose (Figure 101d) présentent la même formule brute ( $C_5H_{10}O_5$ ) et sont tous les deux compatibles avec l'hypothèse d'un diglycoside de l'eugénol formé d'un hexose, probablement le glucose (Figure 101c) directement lié à l'eugénol en tant qu'aglycone, cas souvent décrit dans la littérature (Hjelmeland & Ebeler, 2015), et un pentose lié à ce glucose. Reste le rhamnose (Figure 101a), de formule  $C_6H_{12}O_5$  qui n'est pas compatible avec l'hypothèse présentée ici.

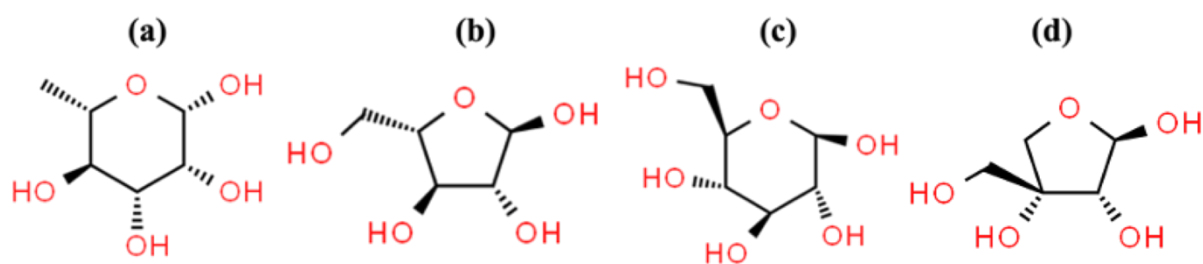


Figure 101 : Structures des principaux oses susceptibles d'entrer dans la composition de plusieurs précurseurs de l'eugénol. Figure (a),  $\alpha$ -L-rhamnopyranose. Figure (b),  $\alpha$ -L-arabinofuranose. Figure (c),  $\beta$ -D-glucopyranose. Figure (d),  $\beta$ -D-apiofuranose

Deux précurseurs de l'eugénol, disponibles dans le commerce, ont été achetés (Figure 102) : le géoside ou eugényl-6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (**1**) ainsi que l'eugényl-6-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**). Les caractéristiques de ces deux molécules sont disponibles dans la partie état de l'art de cette thèse (page 54). Cependant, concernant le composé **2**, après vérification par LC/MS, la pureté du produit commercial est apparue comme relativement faible. En effet 2 pics proches, par leur temps de rétention, ont été observés sur le chromatogramme. Toujours est-il que les composés **1** et **2** ont été comparés aux précurseurs de l'eugénol, obtenus après fractionnement, sur deux appareils de chromatographie liquide différents (LC/MS(QqQ) et LC/HRMS), avec 3 colonnes différentes [Luna Omega Polar C18 ( $50 \times 2,1$  mm ;  $1,6 \mu\text{m}$  Phenomenex), Kinetex Polar C18 ( $150 \times 2,1$  mm ;  $2,6 \mu\text{m}$  Phenomenex), Poroshell 120 EC C18 ( $150 \times 2,1$  mm ;  $2,7 \mu\text{m}$ , Agilent Technologies)], deux systèmes de phases mobiles différents, acide formique (solvant A acide formique à 0,1 % dans l'eau et

solvant B acide formique à 0,1 % dans l'acétonitrile) et formiate d'ammonium (solvant A 0,05 % (m/v) de formiate d'ammonium et 0,01 % (v/v) d'acide formique dans l'eau, solvant B 0,05 % (m/v) de formiate d'ammonium, 5 % (v/v) d'eau et 0,01 % (v/v) d'acide formique dans l'acétonitrile) ainsi que des gradients différents. Quelles que soient les conditions chromatographiques, le composé **1**, soit le géoside, et le principal précurseur de l'eugénol présentaient le même temps de rétention, une masse exacte proche, ainsi qu'un spectre de fragmentation similaire. Le composé **2** a également été retrouvé dans les extraits de Baco blanc mais en bien moindre proportions.

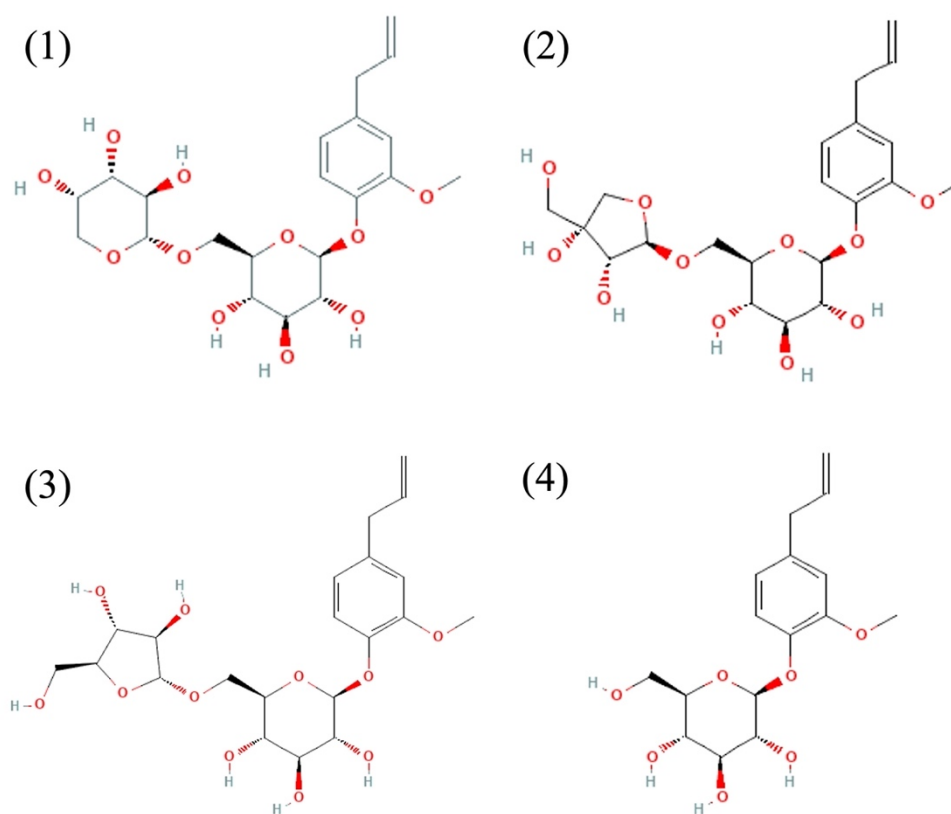


Figure 102 : Structures moléculaires des potentiels précurseurs de l'eugénol retrouvés dans le Baco blanc. Le composé **1** correspond au géoside (eugényl-6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) et le standard est disponible. Le composé **2** est l'eugényl-6-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside qui a également pu être acheté dans le commerce. Le composé **3** correspond à l'eugényl-6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside qui n'est pas disponible à l'achat. Le composé **4** est la citrusine C (eugényl  $\beta$ -D-glucopyranoside), hétéroside simple de l'eugénol dont le standard commercial est disponible

Avec l'ensemble de ces informations, formant un faisceau de preuves concordantes, il est possible de conclure que le principal précurseur de l'eugénole présent dans le Baco blanc est constitué par un enchaînement d'eugénole directement lié à un glucose, lui-même lié à un arabinose. Cependant un doute persiste quant à la cyclisation de l'arabinose : il peut tout aussi bien être présent sous forme pyrane (cycle à 6) que sous forme furane (cycle à 5). De plus, l'eugényl-6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (**3**) n'étant pas commercialement disponible (Figure 102), il n'a pas été possible de vérifier cette hypothèse. Il ne faut pas exclure la possibilité que **1** et **3** soient co-élus. L'analyse par RMN, qui n'a pas été effectuée dans ces travaux, pourrait permettre de confirmer ces hypothèses.

## II. Méthode de quantification des précurseurs de l'eugénole

Suite à la détermination de certains précurseurs de l'eugénole dans les pellicules de Baco blanc, une méthode de quantification de ces précurseurs a été développée. La méthode quantitative LC/MS développée permet de quantifier 2 molécules pour lesquelles il a été possible de se procurer les standards commerciaux sont disponibles (Figure 102) : le géoside (composé **1**), et la citrusine C (composé **3**). Concernant l'eugényl-6-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (composé **2**), le choix a été fait de ne pas considérer la quantification de ce composé comme étant fiable, en raison des deux pics observés lors de l'injection de ce standard commercial (Figure 103).

### II.1. Préparation des échantillons

Concernant cette préparation des échantillons, le choix a été fait de suivre un protocole simple et répétable. À ce titre, seule la première étape de SLE a été réalisée à une échelle miniaturisée. Chaque échantillon a été préparé en triplicata. À partir de 250 mg de poudre de pellicule qui ont été pesés dans un tube Eppendorf® de 2 mL, la SLE a été effectuée en utilisant successivement 800, 400 et 400  $\mu$ L d'un mélange acétone/eau : 1/1 sous agitation à 250 rpm sur table agitante IKA HS 501 (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France) durant 1 h. Se faisant le rapport solide-liquide décrit au page 271 a été légèrement modifié afin que le liquide puisse entièrement imbiber le solide. Chaque étape de la SLE a été suivie d'une centrifugation de 10 min à 3 000 g, réalisée grâce à une centrifugeuse de paillasse Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 8, équipée d'un rotor angulaire MicroClick pour microtubes 30  $\times$  2 mL (Thermo Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). L'ensemble des surnageants ainsi récupérés, a été rassemblé et centrifugé de nouveau dans un tube Eppendorf® de 2 mL durant

10 min à 3 000 g. L'extrait ainsi obtenu (~1,6 mL) a été dilué avec de l'eau milli-Q jusqu'à obtenir 5 mL puis a ensuite été vortexé. Cette étape de dilution, permettant d'obtenir un échantillon à 16 % d'acétone compatible avec le rapport des phases mobiles initial de la méthode d'analyse, a été préférée à l'étape de concentration sous pression réduite décrite au page 271, source d'un manque de répétabilité et de longueur de préparation entre échantillons. L'échantillon ainsi dilué a été injecté en LC-MS/MS.

## II.2. Méthode d'analyse quantitative

Pour chaque échantillon, 10  $\mu$ L ont été injectés sur une colonne Kinetex Polar C18 (150 mm (L)  $\times$  2,1 mm (di) ; 2.6  $\mu$ m de taille de particules) de Phenomenex (Le Pecq, France). La phase mobile A était constituée de 0,05 % (m/v) de formiate d'ammonium et de 0,01 % (v/v) d'acide formique dans de l'eau ultrapure, tandis que la phase mobile B était constituée de 0,05 % (m/v) de formiate d'ammonium, de 5 % (v/v) d'eau ultrapure et de 0,01 % (v/v) d'acide formique dans l'acétonitrile. Le débit utilisé était de 0,3 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. La séparation a été optimisée (Figure 103) et le gradient de phases mobiles retenu est résumé dans le Tableau 48. Avant l'injection de l'échantillon suivant, un temps d'équilibrage de la colonne de 6 min a été maintenu. Tout ceci pour une durée totale d'exécution de 39 min.

Tableau 48 : Gradient optimisé et retenu pour la séparation des différents standards des glycosides d'intérêt

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	90	10
1	90	10
17	85	15
18	85	15
23	0	100
28	0	100
33	90	10

La détection a été réalisée en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). La tension électrique du fragmenteur a été optimisée pour chaque ion parent. L'énergie de collision a été optimisée pour chaque transition ion parent – ion fils. La tension électrique d'accélération dans la cellule de collision a été fixée à 5 V. Le temps d'analyse de chaque transition (dwell time) a été fixé à 20 ms. Les caractéristiques des transitions recherchées sont condensées dans le Tableau 49.

Les temps de rétention sont 15,6 min pour le géoside et 16,1 min pour la citrusine C.



Tableau 49 : Paramètres des transitions ion parent – ion fils

Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension du fragmenteur (V)	Energie de collision (eV)	Polarité
344	165	82	4	Positif
349	349	130	0	Positif
349	185	130	16	Positif
476	295	120	5	Positif
476	165	120	18	Positif
476	163	120	10	Positif
476	133	120	10	Positif
481	481	200	0	Positif
503	457	120	4	Négatif
503	293	120	6	Négatif

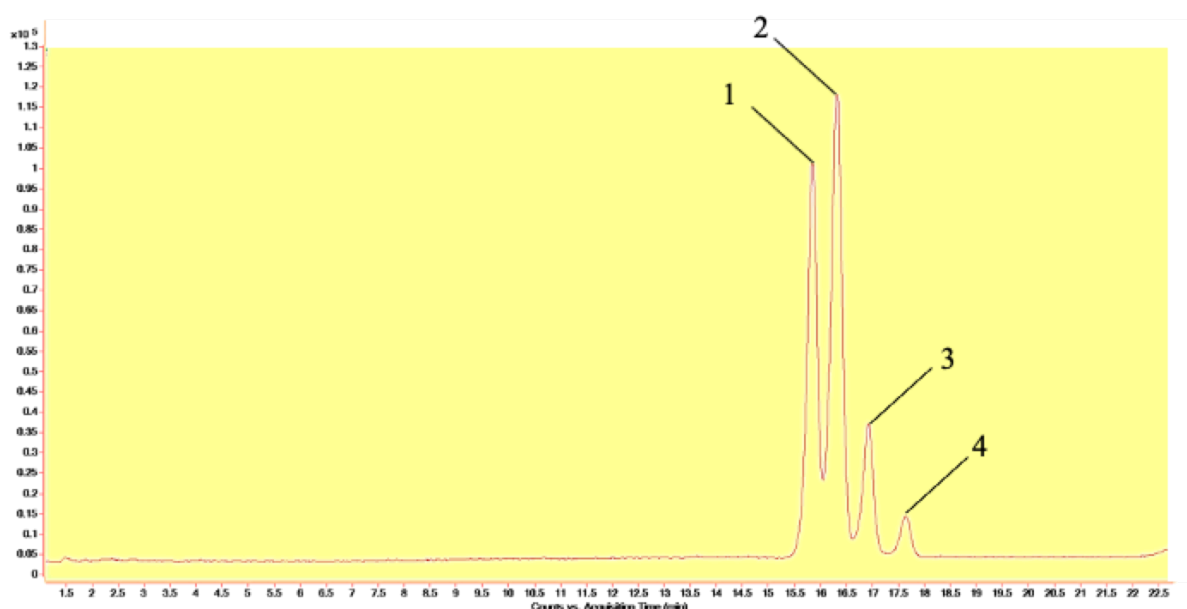


Figure 103 : Chromatogramme de la solution contenant les différents standards de précurseurs de l'eugénole : (1) géoside, (2) citrusine C, (3) premier pic de l'eugényl-6-O-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucopyranoside et (4) second pic de l'eugényl-6-O-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucopyranoside

### II.3. Performance de la méthode LC-MS/MS

La calibration de la méthode de quantification a été réalisée en injectant 10 points de gamme préparés par une dilution en cascade dans une solution aqueuse à 16 % (v/v) d'acétone. Ces 10 points de gamme ont varié en fonction du composé concerné : de 0,9 à 900  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le géoside équivalant donc de 0,018 à 18 mg du composé concerné par kg de pellicule de Baco blanc et, de 0,89 à 890  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour la citrusine C, équivalant de 0,018 à 17,8 mg de citrusine C par kg de pellicule de Baco blanc. Les points de gamme ont régulièrement (tous les deux jours)

été injectés pour assurer le contrôle qualité de l'analyse. Les droites de calibration se sont avérées très stables au cours du temps et avec des coefficients de détermination supérieurs à 0,99 comme en atteste leur superposition (Figure 104a, Figure 104b et Tableau 50).

Tableau 50 : Caractéristiques des gammes de calibrations (5 gammes répétées le même jour) et des limites de détection et de quantification pour le géoside et la citrusine C

gamme de calibration		équiv.	Équation	R <sup>2</sup>	LOD	équiv. LOD	LOQ	équiv. LOQ
µg·L <sup>-1</sup>		mg·kg <sup>-1</sup> pellicule	y = ax +b		µg·L <sup>-1</sup>	mg·kg <sup>-1</sup> pellicule	µg·L <sup>-1</sup>	mg·kg <sup>-1</sup> pellicule
géoside	0,9-900	0,018-18	a = 111,52 b = - 587,93	0,9989	1,6	0,032	5,2	0,104
citrusine C	0,89-890	0,018-17,8	a = 473,39 b = -2942,9	0,9987	0,7	0,014	2,4	0,048

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été calculées par la méthode de la régression linéaire suivant les formules suivantes :

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma}{a} \quad \text{LOQ} = \frac{10\sigma}{a}$$

Où  $\sigma$  est l'écart-type sur l'ordonnée à l'origine et -a- la pente de la droite de régression  $y = ax + b$ . Exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ces limites ont également été converties en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Pour cela, les 5 points les plus bas de la gamme de calibration ont été injectés 5 fois le même jour.

Les données de calibration et les limites de détection et quantification sont rassemblées dans le Tableau 50.

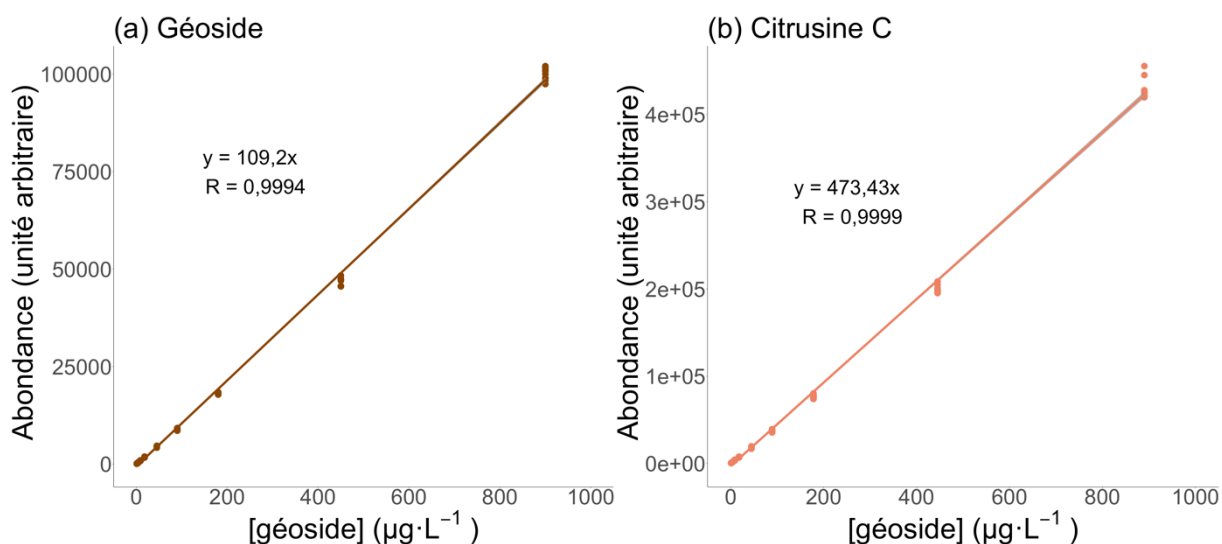


Figure 104 : Calibrations des potentiels précurseurs de l'eugénol réalisées sur 11 jours (n=9). Figure (a), calibration du géoside. Figure (b), calibration de la citrusine C

La répétabilité de la méthode d'analyse a été évaluée en injectant 10 fois le même extrait de poudre de pellicule. Ce dernier était injecté tel quel ou ajouté d'un mélange des 2 standards analytiques à 2 niveaux de concentrations : 36 et 180  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le géoside (équivalant donc à 0,72 et 3,6 mg de composé par kg de pellicule et 35,6 et 178  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (soit 0,71 et 3,6 mg de composé par kg de pellicule) pour la citrusine C. Cette étude a été réalisée sur chacune des quatre variétés étudiées ici, Baco blanc, Folle blanche, Ugni blanc et Graisse. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 51. Les coefficients de variation sont excellents, inférieurs à 5 % pour la citrusine C excepté pour l'analyse de l'échantillon de Baco blanc sans ajout (13 %) pour lequel la teneur est inférieure à la LOQ et inférieurs à 7 % pour le géoside excepté pour l'analyse de l'échantillon de Folle blanche sans ajout (11 %) pour lequel la teneur est inférieure à la LOQ. La répétabilité de la méthode d'analyse, extraction comprise, est évaluée lors de l'analyse d'échantillons extraits en triplicata et non supplémentés, en tenant compte de la variation sur la pesée. Les coefficients de variation s'étendent de 4,5 à 16,9 % pour la citrusine C et de 1,4 à 14,4 % pour le géoside.

Tableau 51 : Caractéristiques de la répétabilité et du recouvrement de la méthode de quantification des précurseurs de l'eugénol : géoside et citrusine C.  $[\bar{x}]$  = concentration moyenne ;  $\sigma$  = écart-type ; cv = coefficient de variation ; Rev = recouvrement

Variétés	Citrusine C						Géoside					
	$[\bar{x}]$	$\sigma$	$[\bar{x}]$	$\sigma$	cv	Rev	$[\bar{x}]$	$\sigma$	$[\bar{x}]$	$\sigma$	cv	Rev
	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		%	%	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		%	%
Baco blanc	1,6	0,2	0,032	0,004	13,5		174,1	4,4	3,5	0,1	2,5	
Baco blanc ajout 1	36,3	0,7	0,719	0,014	1,9	97	204,8	4,9	4,1	0,1	2,4	95
Baco blanc ajout 2	177,9	1,1	3,525	0,023	0,6	99	351,5	4,9	7,0	0,1	1,4	108
Folle blanche	<LOD	-	<LOD	-	-		2,9	0,3	0,1	0,0	11,1	
Folle blanche ajout 1	31,5	0,8	0,647	0,016	2,5	87	37,3	0,9	0,8	0,0	2,4	96
Folle blanche ajout 2	159,1	2,8	3,272	0,057	1,8	89	179,1	5,2	3,7	0,1	2,9	98
Ugni blanc	<LOD	-	<LOD	-	-		<LOD	-	<LOD	-	-	
Ugni blanc ajout 1	33,2	0,8	0,657	0,017	2,6	93	35,5	1,3	0,7	0,0	3,6	97
Ugni blanc ajout 2	170,7	1,9	3,384	0,038	1,1	96	179,1	4,3	3,6	0,1	2,4	99
Graisse	<LOD	-	<LOD	-	-		<LOD	-	<LOD	-	-	
Graisse ajout 1	31,3	0,9	0,638	0,018	2,8	87	36,6	1,2	0,7	0,0	3,2	100
Graisse ajout 2	144,5	6,2	2,948	0,126	4,3	81	166,1	11,9	3,4	0,2	7,2	92

Le recouvrement (Tableau 51), permettant d'évaluer la justesse de la méthode a été calculé sur la base des deux niveaux de concentrations utilisés lors de l'évaluation de la répétabilité. Ils sont également très corrects, entre 81 et 99 % pour la citrusine C et entre 92 et 108 % pour le géoside.

La fidélité intermédiaire de la méthode considérant le paramètre jour d'analyse différent, a été calculée en injectant 4 fois sur 9 jours le même échantillon de pellicule. Ce dernier était analysé tel quel ou ajouté d'un mélange des 2 standards commerciaux dans les mêmes concentrations que celles citées pour la répétabilité. Pour le géoside, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire s'étend de 7 à 14 % et pour la citrusine C de 8 à 12 %, pour 8 échantillons différents testés.

## Chapitre 2 : Le suivi des précurseurs de l'eugénol dans différentes variétés de raisin

Disposant désormais d'une méthode de quantification fiable de ces précurseurs, il est intéressant de les quantifier dans le Baco blanc au cours du développement de la baie de raisin. En effet une telle cinétique est déjà disponible pour l'eugénol lié, il sera alors particulièrement intéressant d'observer le comportement des différents précurseurs et d'évaluer l'influence de paramètres d'induction de ces composés. De plus, la quantification des précurseurs de l'eugénol dans le Baco blanc pourra être comparée à celles possiblement établies chez des variétés de *V. vinifera*.

### I. Comparaison avec des variétés *V. vinifera*

#### I.1. Choix et préparation des échantillons

Dans un premier temps, il a fallu vérifier une présence spécifique des précurseurs majoritaires de l'eugénol identifiés dans le Baco blanc. Pour cela, le géoside et la citrusine C ont également été quantifiés dans des variétés de *V. vinifera* utilisées en Armagnac : Ugni blanc, Folle blanche et Graisse. Les raisins ont été récoltés chez des producteurs d'Armagnac au cours du millésime 2020. Deux origines différentes de chaque variété ont été sélectionnées (producteurs différents) sauf pour le Baco blanc pour lequel 3 origines différentes ont pu être récoltées. L'ensemble des raisins a été récolté juste avant la vendange par les producteurs et donc à dates calendaires variables ainsi qu'à maturités technologiques différentes.

À partir des raisins congelés d'Ugni blanc, de Folle blanche, de Graisse et de Baco blanc, seules les pellicules ont été pulvérisées et extraites par le protocole décrit à la page 287 de cette partie.

#### I.2. Quantifications comparatives

La Figure 105 illustre les résultats de quantification des précurseurs de l'eugénol dans les pellicules de différentes variétés de vignes dont le Baco blanc. Les résultats sont exprimés en mg de composé par kg de pellicule. Pour ce qui est du géoside (Figure 105a), il apparaît clairement que cette molécule se concentre, comme attendu, de façon importante et significative dans le Baco blanc (en moyenne  $4,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  soit  $1,6 \text{ mg}$  équivalent eugénol  $\cdot \text{kg}^{-1}$ ). Il est à noter que la Folle blanche contient également significativement plus de géoside mais de manière

résiduelle (en moyenne  $0,07 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  soit  $0,02 \text{ mg}$  équivalent eugénol $\cdot\text{kg}^{-1}$ ) que l'Ugni blanc et le Graisse, sur lesquels aucune détermination du géoside n'a pu être possible. Pour ce qui est de la citrusine C (Figure 105b), le Baco blanc concentre significativement plus de cette molécule, bien qu'en concentration inférieure à la limite de quantification calculée, (en moyenne  $0,03 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  soit  $0,01 \text{ mg}$  équivalent eugénol $\cdot\text{kg}^{-1}$ ) que les autres variétés sur lesquelles aucune détermination de citrusine C n'a pu être possible.

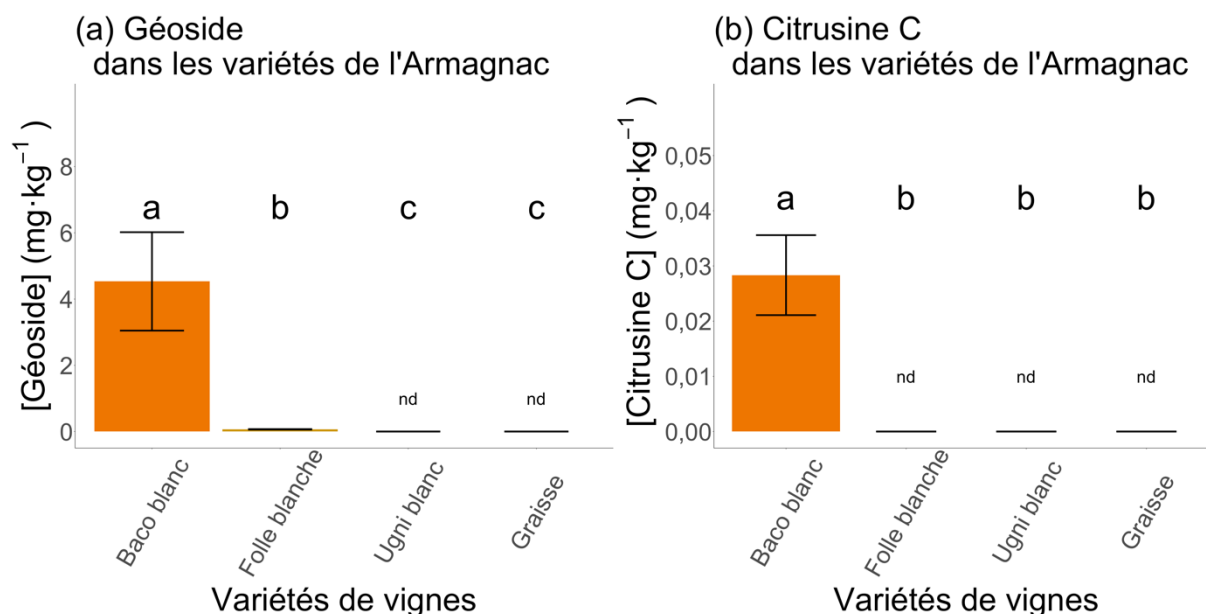


Figure 105 : Concentrations en précurseurs de l'eugénol quantifiables en fonction de la variété de vigne étudiée dans la région Armagnac. Figure (a), concentrations en géoside dans les différentes variétés de vignes étudiées. Figure (b), concentrations en citrusine C dans les différentes variétés de vignes étudiées. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Les histogrammes surmontés des lettres « nd » représentent des matrices où les concentrations en précurseurs de l'eugénol étaient inférieures à la LOD

De ces résultats, il ressort que le géoside semble être spécifique du Baco blanc et le précurseur majoritaire de l'eugénol par rapport à la citrusine C. En effet, il n'est pas retrouvé, ou seulement en très petite quantité, dans des variétés de *V. vinifera*. De plus, le géoside apparaît comme le précurseur majoritaire de l'eugénol dans le Baco blanc tandis que la citrusine C ne représente qu'une très faible fraction de l'eugénol lié chez le Baco blanc. Pour ces raisins récoltés juste avant la vendange, le rapport de ces deux composés est de 99 / 1 en équivalent molaire ou en équivalent eugénol, en faveur du géoside. Toutefois, une certaine hétérogénéité dans l'état de maturité de ces raisins analysés a pu être noté, nécessitant très prochainement de lever le doute quant à cette apparente spécificité du géoside chez le Baco blanc.

## **II. Cinétique des précurseurs de l'eugénol durant le développement de la baie de Baco blanc**

### **II.1. Échantillons de Baco blanc à différents stades de développement de la baie**

Lors des deux tests d'induction de l'eugénol aux champs sur Baco blanc (page 141), des grappes de raisins ont été régulièrement prélevées afin de suivre l'évolution de l'eugénol au cours du développement de la baie. Des cinétiques des différentes formes de l'eugénol ont ainsi pu être mises en évidence dont celle de l'eugénol lié (page 131). Ce dernier correspond à des composés précurseurs de l'eugénol dont certains ont pu être mis en évidence dans la présente partie de ces travaux. Pour envisager cette cinétique, le choix a été fait de travailler sur les échantillons de raisins récoltés lors du test d'éclaircissements partiels réalisé en 2022. Seuls les échantillons de la modalité « ec0 » du bloc 2 ont été préparés pour la quantification des précurseurs de l'eugénol. À partir de ces raisins congelés, seules les pellicules ont été pulvérisées et extraites par le protocole décrit au (page 287) de cette partie.

### **II.2. Cinétique des précurseurs de l'eugénol comparée à celle de l'eugénol lié**

La Figure 106 illustre l'absence de différence significative entre les concentrations molaires en géoside et en eugénol lié au cours du développement de la baie de Baco blanc, confortant ainsi la place de précurseur majoritaire de l'eugénol qu'occupe le géoside. Par soucis de lecture, l'ensemble des concentrations a été rassemblé dans le Tableau 52.

Le géoside et l'eugénol lié montrent les mêmes tendances d'évolutions (Figure 106 et Tableau 52). À savoir que leurs concentrations augmentent de fermeture de grappe jusqu'à véraison, pour ensuite diminuer tout du long de la maturité. La citrusine C présente un comportement différent : elle ne fait que diminuer tout au long du développement de la baie. Cependant, cette évolution est à prendre avec précautions étant donné que les valeurs sont inférieures à la LOQ à partir du stade véraison pour ce composé. De plus en observant sa concentration en équivalent eugénol, il est possible de noter qu'elle ne représente qu'une faible fraction des précurseurs de l'eugénol lié. Enfin à partir de la vendange, les concentrations en géoside semblent se stabiliser (aucune évolution entre vendange et post-vendange), l'eugénol lié, lui, semble diminuer légèrement entre vendange et post-vendange (-25 % en mg équivalent eugénol par kg de

pellicule). Toutefois, aucune différence significative entre eugénoles liées et géosides n'a pu être décelée à ces stades phénologiques.

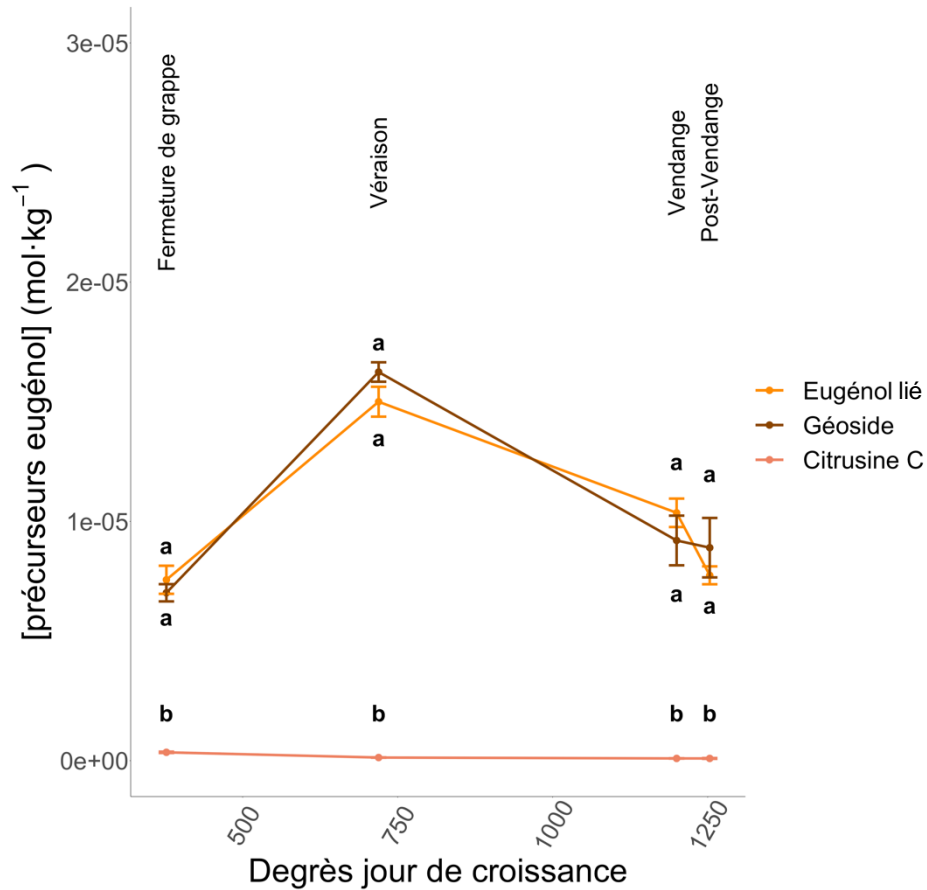


Figure 106 : Concentrations molaires de l'eugénoles liées et des précurseurs de l'eugénoles identifiés dans les pellicules au cours du développement de la baie. Les cinétiques de concentrations sont exprimées en fonction du nombre de degré de jour de croissance (quantité de chaleur accumulée par la vigne depuis la floraison). Les stades phénologiques correspondants sont inscrits au-dessus des courbes. Les lettres minuscules noires, situées au-dessus des points, sont issues de test de Newman-Keuls au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Ces statistiques ont été réalisées afin de comparer les composés entre eux à un stade phénologique donné



Tableau 52 : Évolutions des concentrations en eugénol lié, en géoside et en citrusine C au cours du développement de la baie de Baco blanc. Sont présentées les valeurs moyennes (n = 3) ± leurs écarts-types. Entre parenthèse sont indiqués les pourcentages d'évolution de la concentration par rapport au stade phénologique précédent. Les valeurs exprimées en mg eug·kg<sup>-1</sup> correspondent aux concentrations en mg d'équivalent eugénol par kg de pellicule

Stades phénologiques	Eugénol lié		Géoside		Citrusine C	
	mol·kg <sup>-1</sup>	mg eug·kg <sup>-1</sup>	mol·kg <sup>-1</sup>	mg eug·kg <sup>-1</sup>	mol·kg <sup>-1</sup>	mg eug·kg <sup>-1</sup>
Fermeture de grappe (377 DJC)	7,56E-6 ±	1,24 ±	7,02E-6 ±	1,15 ±	3,50E-7 ±	0,06 ±
	5,87E-7	0,10	3,60E-7	0,06	2,77E-8	0,005
Véraison (719,3 DJC)	1,50E-5 ±	2,46 ±	1,62E-5 ±	2,67 ±	1,32E-7 ±	0,02 ±
	6,25E-7	0,10	4,06E-7	0,07	5,98E-9	0,001
		(+98 %)		(+131 %)		(-62 %)
Vendange (1199,3 DJC)	1,04E-5 ±	1,70 ±	9,20E-6 ±	1,51 ±	9,44E-8 ±	0,02 ±
	5,87E-7	0,10	1,04E-6	0,17	5,74E-9	0,001
		(-31 %)		(-43 %)		(-28 %)
Post-vendange (1253,3 DJC)	7,75E-6 ±	1,27 ±	8,90E-6 ±	1,46 ±	9,40E-8 ±	0,02 ±
	5,87E-7	0,06	1,24E-6	0,20	1,59E-8	0,003
		(-25 %)		(-3 %)		(0 %)

### II.3. Influence antifongique du géoside et de la citrusine C

L'eugénol présente une propriété antifongique intéressante notamment contre *B. cinerea* (page 51). De la même manière, les stilbènes sont connus pour être efficaces contre les champignons. De plus, certains glycosides de stilbènes présentent également des activités antifongiques. C'est par exemple le cas du *trans*-picéide, glycoside du resvératrol, qui en s'accumulant dans les plantes du genre *Arabidopsis* participe à la résistance de ces plantes à *Polygonum cuspidatum* (Liu *et al.*, 2011).

Étant donné l'efficacité des glycosides de molécules antifongiques, il a été envisagé que les précurseurs glycosylés de l'eugénol pouvaient présenter eux aussi une certaine activité antifongique et notamment envers *B. cinerea*. De plus, l'accumulation de la forme glycosylée d'une molécule comme l'eugénol pourrait en fait correspondre à la mise en réserve de composés antifongiques, mobilisables rapidement en cas d'agressions biotiques (Gachon *et al.*, 2005; Vogt & Jones, 2000). Dans ce cadre, le géoside et la citrusine C ont été testés, *in vitro*, à plusieurs doses contre plusieurs isolats de *B. cinerea* avec pour objectif de déterminer leur CI<sub>50</sub>. Pour cela, un protocole classique de test *in vitro* a été suivi en dissolvant les molécules dans une solution aqueuse d'éthanol à 30 % (v/v). Les détails de cette expérimentation sont disponibles dans le Tableau 53.

Les doses (en ppm) des composés diffèrent car elles ont été déterminées en fonction des concentrations des solutions mères disponibles. À chaque fois, le pas entre chaque dose correspond à une échelle logarithmique.

Tableau 53 : Résumé des doses et des souches employées lors du test *in vitro* de la capacité antifongique des précurseurs de l'eugénol. La dose d0 correspond à un témoin ne contenant qu'une solution hydroalcoolique à 30 % (v/v)

Composés	Doses (ppm)				Isolats testés
	d0	d1	d2	d3	
Géoside	0	3,33	33,3	333	i et P
Citrusine C	0	1,78	17,8	178	i et V

Les graphiques de la Figure 107 exposent les résultats obtenus au cours du test *in vitro* des précurseurs de l'eugénol. Concernant le géoside (Figure 107a), aucune différence significative n'a pu être déterminée entre les différentes doses appliquées et ce, quel que soit l'isolat de *B. cinerea*. Toutefois, en tendance, des doses très faibles de géoside (3,33 ppm) ont permis l'inhibition de 73,9 % de la croissance mycélienne pour la souche de collection -i-. Cette inhibition ne fait que diminuer concomitamment à l'augmentation de la dose en géoside. En effet, pour 33,3 ppm appliquées l'inhibition n'est plus que de 46 % et pour 333 ppm appliquées, le géoside semble même favoriser la croissance mycélienne de 2,7 %. Concernant l'isolat populationnel -P-, il existe une favorisation de la croissance mycélienne dès la plus petite dose de géoside appliquée : 1,0 % pour 3,33 ppm. Pour des doses plus importantes, 33,3 et 333 ppm, la croissance mycélienne est favorisée, respectivement, de 10,2 et 52,2 %. Pour ce qui de la citrusine C (Figure 107b), encore une fois, aucune différence significative n'a pu être déterminée entre les différentes doses appliquées et ce, quel que soit l'isolat de *B. cinerea*. Pour la souche -i-, une tendance d'inhibition se dégage très légèrement. À 1,78 ppm, la croissance mycélienne est favorisée de 0,4 %. À 17,8 ppm, l'inhibition mycélienne est de 7,0 % et à 178 ppm, l'inhibition atteint les 15,2 %. En ce qui concerne l'isolat populationnel -V-, les résultats sont erratiques. Si une inhibition mycélienne de 15,5 % semble se dégager à 17,8 ppm, une favorisation mycélienne de 6,2 et 1,5 % apparaît au contraire pour des doses appliquées de citrusine C respectives de 1,78 et 178 ppm. Il s'agit ici de tendances, car aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

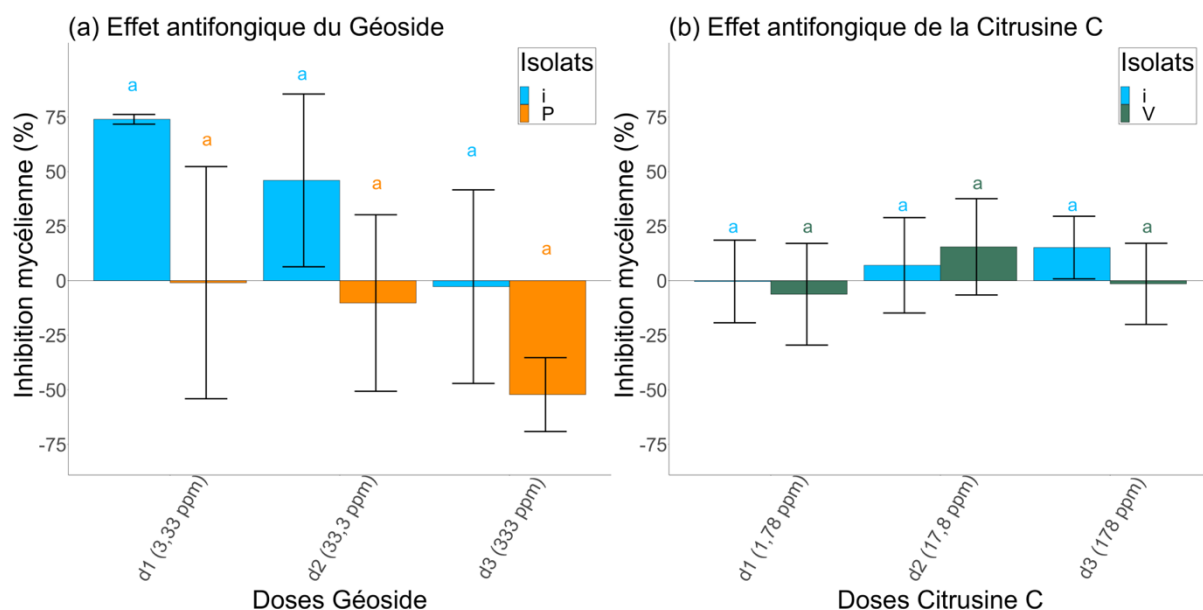


Figure 107 : Activités antifongiques des précurseurs de l'eugénol en fonction de la dose appliquée. Figure (a), effet antifongique du géoside en fonction des doses appliquées et des isolats de *B. cinerea* utilisés. Figure (b), effet antifongique de la citrusine C en fonction des doses appliquées et des isolats de *B. cinerea* utilisés. Les lettres minuscules bleues, oranges et vertes, situées au-dessus des histogrammes, sont issues de test de Kruskal-Wallis au risque  $\alpha$  de 5%. Des lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les modalités concernées. Ces statistiques ont été réalisées afin de comparer les doses appliquées d'un même produit en fonction d'un isolat de *B. cinerea*

Pour résumer les résultats de ces tests *in vitro*, il semblerait que les précurseurs de l'eugénol ne présentent pas d'activité antifongique puissante. À noter tout de même, l'efficacité de faibles doses de géoside (73,9 % d'inhibition à 3,33 ppm et 46 % à 33,3 ppm). Toutefois, si les précurseurs glycosylés peuvent être considérés comme des réserves de la molécule véritablement antifongique, les doses d'eugénol qui seraient alors en jeu seraient plus faibles (Tableau 54). Pour rappel les  $CI_{50}$  de l'eugénol déterminées dans ces travaux, varient de 242 à 263 ppm, en fonction de l'isolat utilisé. Il serait nécessaire de reconduire ces travaux préliminaires sur l'efficacité antifongique des précurseurs de l'eugénol en augmentant les doses afin d'atteindre des inhibitions plus importantes.

Tableau 54 : Équivalence des doses de précurseurs de l'eugénol appliquées, en eugénol potentiellement actif

Composés	Doses équivalent eugénol (ppm)			
	d0	d1	d2	d3
Géoside	0	1,19	11,9	119
Citrusine C	0	0,89	8,9	89



## Conclusions de la partie 4 : Les composés précurseurs de l'eugénol

Dans cette partie, des précurseurs de l'eugénol ont été recherchés grâce aux techniques d'extraction, de séparation et de fractionnement. Il apparaît qu'un précurseur soit très majoritaire parmi au moins 3 molécules sans pouvoir exclure l'existence d'autres formes. En comparant ce précurseur à des standards commerciaux, il a été possible de proposer une hypothèse de sa structure chimique. Ainsi, le précurseur principal de l'eugénol dans les raisins de Baco blanc, un hétéroside constitué d'arabinose, de glucose et d'eugénol, semble s'apparenter au géoside. Un doute subsiste quant à la forme pyrane ou furane de l'arabinose. La citrusine C, est un autre précurseur glycosylé de l'eugénol identifié, dans une moindre mesure, dans les raisins de Baco blanc.

Ces précurseurs de l'eugénol sont spécifiques du Baco blanc. Ils ont été quantifiés comparativement dans le Baco blanc mais également dans des variétés de *V. vinifera* utilisées en Armagnac telles que l'Ugni blanc, la Folle blanche et le Graisse. Si des traces de géoside sont retrouvées chez la Folle blanche, ce n'est pas le cas dans les autres cépages.

Au cours des expérimentations exposées dans la première partie de ce manuscrit, des cinétiques des différentes formes de l'eugénol ont pu être mises en évidence dont celle de la forme liée. Cette appellation « forme liée » était une hypothèse quant à l'existence de différents composés précurseurs de l'eugénol. Sur les mêmes raisins qui ont permis l'établissement de ces cinétiques, les précurseurs de l'eugénol ont été quantifiés et comparés à l'eugénol lié. Il s'est avéré que le géoside a présenté la même tendance d'évolution que l'eugénol lié. Plus encore, aucune différence significative n'a été déterminée entre concentrations molaires en géoside au cours du développement de la baie et concentrations molaires en eugénol lié, confortant ainsi le statut de précurseur majoritaire de l'eugénol pour le géoside.

Enfin l'eugénol dans le Baco blanc a été décrit comme un marqueur de la résistance ontogénique des baies. De plus, l'eugénol est un composé antifongique, efficace contre *B. cinerea*. À l'instar de formes glycosylées de certains composés, connus pour leur pouvoir antifongique, comme les stilbènes, il a été possible d'imaginer que les précurseurs de l'eugénol puissent présenter eux aussi, une activité antifongique. En boîte de Pétri, et face à plusieurs isolats de *B. cinerea*, le géoside a pu montrer à de très faibles doses une efficacité certaine contre une souche du champignon. À l'inverse, la citrusine C a montré un faible pouvoir inhibiteur de la même souche à des doses plus importantes.

Cependant, contre d'autres isolats, les mêmes précurseurs semblent favoriser la croissance du champignon. Bien qu'il faille reproduire ces expériences à plus large échelle et en utilisant des concentrations plus importantes des précurseurs, une première hypothèse de l'utilité des formes précurseurs peut être avancée. Ces dernières seraient une forme de conservation et de transport de l'eugénol.

Fondamentalement, il semblerait que ces travaux soient la première mention de précurseurs de l'eugénol dans le genre *Vitis*. Les hypothèses proposées concernant l'identification des précurseurs de l'eugénol, à savoir le géoside ou eugényl-6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-  $\beta$ -D-glucopyranoside, pourraient être confirmées par des analyses par RMN. Plus encore, d'autres pics chromatographiques, obtenus avec la méthode développée, ont semblé indiquer bien qu'en faible quantité, la présence d'autres précurseurs de l'eugénol dont aucune hypothèse de structure n'a pu être proposée pour l'instant. Enfin si l'eugényl-6-O- $\alpha$ -L-apiofuranosyl-  $\beta$ -D-glucopyranoside a semblé être un candidat intéressant comme précurseur de l'eugénol dans le Baco blanc, plusieurs vérifications seraient nécessaires afin de le confirmer.

L'identification des précurseurs de l'eugénol pourraient ainsi permettre d'améliorer l'optimisation de la concentration en eugénol dans les produits de Baco blanc : l'induction de ces précurseurs dans la plante, leur libération au cours de la vinification et leur comportement lors d'une distillation armagnacaise.

---

# Conclusion générale

---

*Animula vagula, blandula,  
Hospes comesque corporis,  
Quae nunc abibis in loca  
Pallidula, rigida, nudula,  
Nec, ut soles, dabis iocos*

Publius Aelius Hadrianus





L'eugénol, de par ses très nombreuses propriétés, son origine végétale et peut-être son odeur si familière, a été très étudié dans la littérature scientifique. Son étonnante concentration dans le Baco blanc, variété de vigne atypique de par sa génétique, sa tolérance et son utilisation originale en distillation de produits de grande qualité et appréciés, l'a placé au cœur de ces travaux de thèse. Plusieurs caractéristiques de l'eugénol ont donc été investiguées : son pouvoir antifongique, son statut d'arôme variétal, sa valorisation au cours de la fermentation et sa volatilité au cours du process de distillation. Plus encore, cette thèse s'est attachée à exploiter les différentes formes possibles de l'eugénol et notamment l'identification de précurseurs.

La seule tolérance du Baco blanc sur laquelle les observations scientifiques et techniques convergent est celle à *B. cinerea*. Malgré l'existence de très peu de travaux de recherche précédents, l'objectif de la thèse était de confirmer cette tolérance du Baco blanc à la pourriture grise et de préciser le rôle que pourrait occuper l'eugénol dans cette tolérance. Si cette tolérance a pu être démontrée en conditions contrôlées, le Baco étant apparu comme moins sensible au champignon que l'Ugni blanc et la Folle blanche, mais une certaine variabilité intra-variétale quant à la sensibilité à *B. cinerea* du Baco blanc a pu être observée. En effet les deux origines géographiques de Baco blanc n'ont pas réagi de la même manière à l'agression fongique. Cette variabilité de sensibilité intra-variétale a pu être travaillé plus précisément grâce à l'étude de 6 clones de Baco blanc disponibles, un seul étant autorisé à la production. De la même manière que précédemment les différentes accessions ont montré des profils de sensibilité différents face au champignon. Plusieurs paramètres chimiques ont été suivis sans qu'aucune différence notable n'ait pu être relevée entre les accessions. Seules les teneurs en eugénol dans les pellicules permettaient de les différencier. Il a donc été proposé un lien entre la teneur en eugénol dans les pellicules de raisin de Baco blanc et sa sensibilité à *B. cinerea*. Cette influence de l'eugénol sur la tolérance au pathogène a également été recherchée en conditions artificielles et contrôlées. L'eugénol a alors confirmé son efficacité vis-à-vis du pathogène par une dualité d'action : la molécule étant active lorsqu'elle est directement en contact avec le matériel fongique mais également en fumigation. Les doses d'eugénol permettant d'inhiber 10 % du champignon étaient du même ordre de grandeur que les teneurs en eugénol retrouvées dans les pellicules de Baco blanc, renforçant l'idée d'une influence particulière de l'eugénol dans la lutte contre *B. cinerea*. Enfin, des observations aux champs ont permis de mettre en évidence d'une part, la cinétique de l'eugénol au cours du développement de la baie et d'autre part, une inductibilité de l'eugénol par effeuillage des vignes.

Au cours de ces essais au vignoble, l'eugénol a montré un lien fort avec l'état de maturité des baies : plus celles-ci étaient mûres moins l'eugénol y était concentré. L'ensemble de ces travaux ont permis de proposer l'eugénol comme un marqueur biochimique de la résistance ontogénique du Baco blanc. Autrement dit, l'eugénol est une arme supplémentaire que possède le Baco blanc, à l'instar de la résistance mécanique de la pellicule, dans sa lutte contre *B. cinerea* sans toutefois être le facteur principal de sa tolérance.

Le pouvoir antifongique de l'eugénol a été défini mais les multiples propriétés de l'eugénol le caractérisent également comme une molécule aromatique et somesthésique. Cependant son influence directe orthonasale ou rétronasale dans la dégustation des eaux-de-vie blanches de Baco blanc a été écartée. De plus l'influence somesthésique de l'eugénol, déjà citée dans la littérature scientifique a également été éprouvée dans un contexte de dégustation des eaux-de-vie blanches mais aucun résultat probant n'a pu être mis en avant. L'action de l'eugénol dans l'arôme s'est par contre avérée riche d'intérêt. L'eugénol est en effet capable d'influer sur la perception de notes aromatiques fruitées de l'eau-de-vie blanche. Les notes de banane, représentées par l'acétate d'isoamyle, ont semblé particulièrement réactives, en présence d'eugénol. Elles sont retrouvées perçues plus intensément ou modifiées vers des variations plus cuites, plus lourdes, plus mûres. La mise en évidence de cette interaction perceptive qui pourrait être qualifiée d'accord de continuité a été rendue possible par un long travail mené avec le panel de professionnels sur la caractérisation aromatique des eaux-de-vie blanches. Afin de donner aux panélistes les meilleurs outils possibles pour décrire les eaux-de-vie blanches, la co-construction d'une fiche de dégustation propre à ces dernières a été entamée dès la première année de thèse. La génération de vocabulaire spécifique, le tri de ce vocabulaire par des références bibliographiques, la réduction du nombre de termes et le choix consensuel des descripteurs finaux ont été autant d'étapes nécessaires. Au-delà d'une meilleure description aromatique des eaux-de-vie blanches dégustées, elle a permis de préciser un vocabulaire propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Après une validation des principales étapes pour l'obtention de cette fiche, la discrimination des eaux-de-vie blanches de Baco blanc a été partielle réussie, notamment vis-à-vis des eaux-de-vie blanches d'Ugni blanc et de Folle blanche. Grâce à l'utilisation de cette fiche qui reste cependant perfectible, les panélistes professionnels ont progressé dans une appropriation du vocabulaire spécifique et dans la notation de l'intensité perçue pour chaque descripteur.

L'eugénol est définitivement un marqueur chimique des eaux-de-vie blanches de Baco blanc. En posant l'hypothèse que l'eugénol est donc nécessaire à leur caractérisation aromatique, un des objectifs majeurs de la thèse a été d'identifier les paramètres œnologiques et de distillation qui permettraient de favoriser la concentration de l'eugénol dans les vins et les eaux-de-vie blanches de Baco blanc. La première étape a été de dégager les grands facteurs qui pouvaient influencer la concentration en eugénol dans les vins. Pour cela, la technologie des plans d'expériences a été mise en œuvre afin de couvrir un nombre important de facteurs dont la maturité, le débouillage, l'action d'enzymes aromatiques, le temps passé sur lies et la quantité de ces lies. Les 32 microvinifications et les microdistillations double-chauffe attenantes ont permis d'identifier la maturité comme le facteur prépondérant dans la modulation de la concentration en eugénol des vins et des eaux-de-vie. Étant entendu, qu'une récolte précoce favorise la concentration en eugénol. L'utilisation d'enzymes libératrices d'arômes a également été identifiée comme un facteur important dans la libération de l'eugénol et prépondérante dans la modulation de sa concentration. Les différents types d'activités enzymatiques étudiés ont permis d'identifier la  $\beta$ -glucosidase comme étant la plus efficace et l'activité  $\alpha$ -arabinofuranosidase comme aussi très intéressante. Cette importance des activités enzymatiques libératrices d'arômes a conforté l'idée de l'existence d'une richesse peu exploitée en eugénol dont la forme restait à être précisée.

Se basant sur des protocoles d'extractions et de purifications déjà existants, ce travail d'identification de précurseurs potentiels de l'eugénol a été guidé par une stratégie mêlant des analyses HS-SPME-GC/MS, HPLC-QqQ-MS et UHPLC-HRMS. Le résultat le plus probant a été l'identification du géoside, hétéroside (arabinose + glucose) de l'eugénol comme le précurseur majoritaire probable, de l'eugénol dans le raisin de Baco blanc. Sa quantification a été possible pour s'assurer, avec succès, de sa spécificité dans cette variété. Sa cinétique au cours du développement de la baie a également pu être établie et parfaitement liée à l'eugénol lié (potentiel calculé après hydrolyse in-vitro).

Mais le Baco blanc est une variété de chaudière, uniquement destinée à la production d'eau-de-vie. Les différents paramètres de distillation influençant la concentration en eugénol dans les eaux-de-vie ont donc été étudiés. Une comparaison entre alambics continu et discontinu, réalisée grâce à la distillation d'un même lot de vin de Baco blanc, a confirmé d'une part, la place de produit de queue ou de produit intermédiaire qu'occupe l'eugénol, et d'autre part, le lien fort que l'eugénol entretient avec le TAV de coulage de l'eau-de-vie. Une approche plus

fondamentale des phénomènes de distillation continue a été menée en partenariat avec le CRITT-GTPE de Toulouse et a permis d'identifier les débits de coulage, de queues ou encore d'alimentation en vin comme des paramètres opératoires permettant de moduler le TAV de coulage et donc d'influer sur la concentration en eugénol.

Un surprenant effet masquant du cuivre sur l'eugénol a pu être mis en évidence au cours de ces travaux. L'hypothèse de complexation de l'eugénol par le cuivre a donc été avancée à partir de données bibliographiques. Les conséquences de cette chélation décelée dans les eaux-de-vie sont multiples. Le complexe formé entre l'eugénol et le cuivre est une molécule non-volatile, rendant ainsi l'eugénol indisponible pour un dosage par HS-SPME-GC/MS. L'ajout d'EDTA présentant une forte affinité avec le cuivre redonne à l'eugénol sa caractéristique volatile et donc quantifiable par la méthode développée en chromatographie en phase gazeuse. Mais de façon plus intéressante, l'implication de l'eugénol dans ce complexe cuprique a également été identifiée comme potentiellement dépréciatrice de la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Il s'agira donc de mettre en place des solutions pratiques de libération si on veut rendre disponible tout le potentiel de l'eugénol présent.

Véritablement pluridisciplinaires, ces travaux se sont évertués à comprendre le potentiel technologique d'une variété hybride vieille seulement d'un peu plus d'un siècle. Le Baco blanc se révèle être issu d'une tradition locale mais reste parfaitement moderne et un modèle digne d'intérêt pour sa résilience et son écho aux préoccupations environnementales et sociétales. Tout comme son objet d'étude, cette thèse a cultivé une double vision, dans la quête d'un savoir fondamental mais celle-ci, comme beaucoup d'autres en viticulture-œnologie, n'a pas perdu de vue les réponses qu'elle devait apporter à une filière en réflexion intense mais aussi en demande d'amélioration technique et adaptative.

---

# Perspectives

---

*Tout ce qui est dans la limite du possible doit être et sera accompli*

Jules Verne



Les recherches menées au cours de ce doctorat ont permis d'avancer sur des connaissances fondamentales, d'envisager également des transferts envers les praticiens, tout en constatant que des points restent à confirmer, voire à remettre en question. Les perspectives développées ici sont en lien avec ce travail qui a voulu aborder plusieurs thématiques dans une approche pluridisciplinaire.

Le panel de professionnels de l'Armagnac est devenu un outil au service d'un collectif qu'il faut voir perdurer. Continuer de faire progresser les qualités individuelles, tout en continuant d'améliorer la performance collective en intégrant régulièrement de nouveaux individus n'ayant pas l'expérience du groupe, sera donc nécessaire. Sur le contenu de ces futures dégustations, le rôle de l'eugénol en interaction devra être poursuivi. Il est tout à fait possible d'envisager que l'eugénol puisse entrer en interaction avec d'autres composés que l'acétate d'isoamyle pour construire et expliquer d'autres notes aromatiques d'eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Fort de ce nouvel outil que représente la fiche de dégustation, qu'il faudra sans doute perfectionner et améliorer vis-à-vis de son appropriation par les dégustateurs, l'objectif sera de mieux définir l'espace sensoriel propre aux eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Enfin, le rôle du cuivre dans une potentielle perte de typicité des eaux-de-vie, et l'influence encore peu connue du 4-vinylphénol doivent être investigués de manière importante à court terme.

Le développement d'un alambic continu pilote de taille réduite permettra la distillation de microvinifications et ainsi de pouvoir rendre compte au mieux des phénomènes se produisant dans un alambic continu, en conditions réelles. Ainsi, il sera plus facile d'affiner les paramètres de fermentation alcoolique ou de l'influence, encore peu appréhendée par les vinificateurs, de la fermentation malolactique sur la typicité des eaux-de-vie de Baco blanc. Cet alambic devra également servir pour d'autres intérêts autour d'une meilleure gestion de la distillation continue au service de la qualité de l'Armagnac.

La parcelle de clones de Baco blanc étudiée durant cette thèse fera l'objet en 2024 d'un suivi détaillé afin d'identifier le potentiel intérêt des autres accessions, autre la seule autorisée aujourd'hui et en imaginer l'agrément. La caractérisation génétique de ces 5 autres accessions permettra également de définir leur statut avéré de clones.

L'identification des précurseurs de l'eugénol permettra de tester leur efficacité et leur rôle dans la défense du Baco blanc face aux attaques fongiques.

Toutefois, la question de la détoxification de l'eugénol par *B. cinerea* reste encore sans réponse et devra faire l'objet de recherches complémentaires. Il est envisagé d'effectuer des analyses en RMN afin de confirmer définitivement la présence du géoside dans le Baco blanc. D'autres potentiels précurseurs de l'eugénol ont été détectés et des expérimentations complémentaires permettront de s'assurer de leur forme moléculaire. Plus généralement, le développement d'une méthode de quantification de ces précurseurs de l'eugénol doit devenir une analyse intéressante dans la caractérisation du Baco blanc. Enfin, les conclusions apportées sur l'éventuelle présence d'un ou plusieurs précurseurs glycosylés du 4-vinylphénol mériteraient d'être plus profondément explorées.

Si les professionnels de l'Armagnac ont bien identifié les vins de Baco blanc comme étant « foxés » aucune des quantifications des molécules responsables de cette caractéristique n'a pu être exploitées dans ce travail. La détection et la quantification de ces molécules, dans les vins et eaux-de-vie de Baco blanc, devront être menées afin de déterminer la place que les composés « foxés » occupent dans la caractérisation de ce Baco blanc. Il est aussi souhaitable de tenter d'identifier dans les eaux-de-vie de Baco blanc des molécules originales provenant de l'origine américaine du Baco blanc et pouvant être associées au terme « foxé », encore inconnues aujourd'hui.

En définissant l'eugénol comme un marqueur de qualité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc, différents résultats obtenus durant cette thèse peuvent faire l'objet de transferts pratiques dans la conduite du vignoble, de la vinification et de la distillation du Baco blanc afin de renforcer sa présence.

À ce titre, l'effeuillage semble souhaitable, en conditions de pression fongique fortes, afin de diminuer les dégâts causés par *B. cinerea* mais surtout pour l'induction de l'eugénol qu'il engendre. De la même manière, une récolte précoce des parcelles de Baco blanc devrait être envisagée afin de favoriser la concentration en eugénol. En vinification, l'utilisation d'enzymes aromatiques libératrices d'arômes semblerait également opportun afin d'optimiser la concentration en eugénol. Concernant la distillation, tous les paramètres opératoires de la conduite d'un alambic continu permettant un coulage des eaux-de-vie à bas TAV doivent être encouragés, dans l'optique de favoriser les teneurs d'eugénol dans les eaux-de-vie blanches de Baco blanc. Toutes ces recommandations visent à favoriser l'expression de la typicité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc.



Toutefois, l'ensemble de ces techniques viticoles, vinicoles et de procédés de distillation semblent également favoriser la concentration du 4-vinylphénol. Son influence sur la qualité des eaux-de-vie blanches de Baco blanc reste encore à déterminer. Dans le cas où le 4-vinylphénol serait plus négatif que positif pour cette qualité, les précédentes recommandations devront faire l'objet d'un compromis entre favoriser l'eugénol sans trop permettre une concentration importante du 4-vinylphénol. Il reste à définir le véritable rôle de la présence non négligeable et atypique du 4-vinylphénol dans la caractérisation des eaux-de-vie blanches de Baco blanc.



Να είναι καλύτερος άνθρωπος από τον πατέρα σου



---

# Bibliographie

---

*That the powerful play goes on and you may contribute a verse*

Walt Whitman

- Acree, T. E., Lavin, E. H., Nishida, R., & Watanabe, S. (1990). The serendipitous discovery of ortho-aminoacetophenone as the foxy smelling component of labruscana grapes. *Chem. and Eng. News*, 9, 80.
- Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2000). A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*, 100(6), 693-702.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80705-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80705-9)
- Ajouz, S. (2009). *Estimation du potentiel de résistance de Botrytis cinerea à des biofongicides* [Thèse de doctorat, Avignon]. <https://theses.fr/2009AVIG0622>
- Allamy, L. (2015). *Recherches sur les marqueurs moléculaires de l'arôme de « fruits cuits » des raisins et des vins rouges issus des cépages Merlot et Cabernet-Sauvignon : Approches sensorielle, analytique et agronomique* [Thèse de doctorat, Bordeaux]. <http://www.theses.fr/2015BORD0362>
- Alonso-Villaverde, V., Boso, S., Luis Santiago, J., Gago, P., & Martínez, M.-C. (2008). Relationship Between Susceptibility to *Botrytis* Bunch Rot and Grape Cluster Morphology in the *Vitis vinifera* L. Cultivar Albariño. *International Journal of Fruit Science*, 8(4), 251-265.  
<https://doi.org/10.1080/15538360802597481>
- Amerine, M. A., & Singleton, V. L. (1965). *Wine, an Introduction for Americans*. University of California Press.  
<https://doi.org/10.1525/9780520312654>
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A., & Bompeix, G. (2008). *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 13-19.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.022>
- Amiri, A., Mottaghipisheh, J., Jamshidi-Kia, F., Saedi, K., Vitalini, S., & Iriti, M. (2020). Antimicrobial Potency of Major Functional Foods' Essential Oils in Liquid and Vapor Phases : A Short Review. *Applied Sciences*, 10(22), 8103.  
<https://doi.org/10.3390/app10228103>
- André, M., Boursiquot, J. M., & Lacombe, T. (2020). Espèces sauvages et hybrides interspécifiques du genre *Vitis*. *Guide illustré de détermination des principaux représentants postcultureux en France*. Edition Société Botanique de Franche-Comté/CBNFC-ORI.
- Antalick, G., Perello, M.-C., & de Revel, G. (2010). Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121(4), 1236-1245.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.011>
- Antalick, G., Perello, M.-C., & Revel, G. de. (2014). Esters in Wines : New Insight through the Establishment of a Database of French Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(3), 293-304.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.2014.13133>
- Arnold, R. G., & Lindsay, R. C. (1969). Quantitative Determination of n-Methyl Ketones and o-Aminoacetophenone in Sterilized Concentrated Milk. *Journal of Dairy Science*, 52(7), 1097-1100.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86701-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86701-9)
- Arrêté du 18 avril 2008 relatif au Catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France (plants de vigne), (2008).

Association française de normalisation (Éd.). (2007). Analyse sensorielle : Recueil, normes, agroalimentaire (7<sup>e</sup> éd). AFNOR.

Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Chabanet, C., Langlois, D., Nicklaus, S., & Etiévant, P. (2005). Perceptual Interactions in Odour Mixtures : Odour Quality in Binary Mixtures of Woody and Fruity Wine Odorants. *Chemical Senses*, 30(3), 209-217.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/bji016>

Avenas, P. (2022). Clin d'œil éthymologique : À propos de l'eugénol. *L'Actualité Chimique*, 471, 5.

**B**aco blanc. (s. d.). Consulté 2 août 2023, à l'adresse <https://plantgrape.plantnet-project.org/fr/cepage/Baco%20blanc>

Baco, F. (Juillet 1899a). Nouvelle culture des greffes-boutures en pépinière. Plantation normale des greffés soudés racinés. *La Petite Gironde*.

Baco, F. (Août 1899b). Nouvelle culture des greffes-boutures en pépinière. Plantation normale des greffés soudés racinés. *La Petite Gironde*.

Baco, F. (1902). Comment il convient désormais de planter les vignes greffées-soudées-racinées. *La Petite Gironde*.

Baco, F. (1904). La reconstitution du vignoble dans les Landes et les Basses-Pyrénées par le greffage : Choix des variétés, établissement du vignoble, culture et fumure, accidents et maladies. *Éditions Teyssier*

Baco, F. (1909a). Étude expérimentale sur diverses greffes de vigne. *Revue bretonne de botanique pure et appliquée*, 49-72.

Baco, F. (1909b). Sur des variations de vignes greffées (p. 429-431) [Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences / publiés, conformément à une décision de l'académie par MM. les secrétaires perpétuels]. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k3102f>

Baco, F. (1911). Culture directe et greffage de la vigne : Études expérimentales au pays d'Orthe (Landes) sur le retour possible et désirable à la culture directe des viniféras démontré par le relèvement de vieilles vignes phylloxérées et le maintien de jeunes vignes franches de pied, et par les effets désastreux résultant du greffage des viniféras sur vignes américaines. *Imprimerie des Arts et manufactures*.

Baco, F. (1925). Précis complet de viticulture moderne et de vinification : Mes meilleures vignes hybrides franco-américaines : leurs principaux caractères : les meilleurs moyens pour les multiplier, les planter, les tailler, les cultiver, les vinifier. *Gounouilhou Bordeaux*.

Baco, F. (1926). De l'hybridation méthodique de la vigne, *Labatut, Chez l'Auteur*.

Baco, F. (1936a). Pour la défense de la viticulture. 2<sup>e</sup> fascicule : Sur les appellations d'origine du Cognac et de l'Armagnac et pour la défense de l'Armagnac : Historique de la distillation, historique du Cognac et de l'Armagnac, louanges sur l'Armagnac. Instructions supplémentaires. *Labatut, Chez l'Auteur*.

Baco, F. (1936b). Pour la défense de la viticulture : 1<sup>ère</sup> partie. Contribution à l'étude des moyens pouvant sauver la viticulture de sa grande détresse : 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> parties. Pour les meilleures transformations des vignes constituées par les cépages légalement interdits et par d'autres qui s'avèrent indésirables : Informations supplémentaires. *Imprimerie du commerce Angers*. <http://www.babordnum.fr/items/show/4465>

- Baek, H. H., Cadwallader, K. R., Marroquin, E., & Silva, J. L. (1997). Identification of Predominant Aroma Compounds in Muscadine Grape Juice. *Journal of Food Science*, 62(2), 249-252.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03978.x>
- Bailey, P. t., Ferguson, K. l., McMahon, R., & Wicks, T. j. (1997). Transmission of *Botrytis cinerea* by lightbrown apple moth larvae on grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3(2), 90-94.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00120.x>
- Bajec, M. R., & Pickering, G. J. (2008). Astringency : Mechanisms and Perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 858-875.  
<https://doi.org/10.1080/10408390701724223>
- Ballester, J., Dacremont, C., Fur, Y. L., & Etiévant, P. (2005). The role of olfaction in the elaboration and use of the Chardonnay wine concept. *Food Quality and Preference*, 16(4), 351-359.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.06.001>
- Ballester, J., Patris, B., Symoneaux, R., & Valentin, D. (2008). Conceptual vs. perceptual wine spaces : Does expertise matter ? *Food Quality and Preference*, 19(3), 267-276.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.08.001>
- Barbe, J.-C., Garbay, J., & Tempère, S. (2021). The Sensory Space of Wines : From Concept to Evaluation and Description. A Review. *Foods*, 10(6), Article 6.  
<https://doi.org/10.3390/foods10061424>
- Barceloux, D. G. (2008). *Medical Toxicology of Natural Substances : Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*. John Wiley & Sons.  
<https://doi.org/10.1002/9780470330319>
- Bena-Tzourou, I., Lanaridis, P., & Metafa, M. (1999). Influence of cluster thinning on the amino acids concentration of musts and wines of the variety Vilana. Effect on wine volatile compounds. *OENO One*, 33(3), 111.  
<https://doi.org/10.20870/oenone.1999.33.3.1023>
- Bende, M., & Nordin, S. (1997). Perceptual Learning in Olfaction : Professional Wine Tasters versus Controls. *Physiology & Behavior*, 62(5), 1065-1070.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00251-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00251-5)
- Berglund, B., Berglund, U., & Lindvall, T. (1976). Psychological processing of odor mixtures. *Psychological Review*, 83(6), 432-441.  
<https://doi.org/10.1037/0033-295X.83.6.432>
- Bertrand, A. (1988). Role of the continuous distillation process on the quality of Armagnac. In *Distilled Beverage Flavour. Recent Developments* (p. 97-117). Ellis Horwood Limited: Chichester, England.
- Bertrand, A. (2003). Armagnac and wine-spirits. *Fermented beverage production*, 213-238.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0187-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0187-9_10)
- Bertrand, A., & Ségur, M.-C. (1991). L'alambic armagnacais. In *Ier symposium international sur les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole : Bordeaux*, 26-30 juin 1990. Tec. & doc-Lavoisier.
- Bertrand, A., Barbe, J.-C., & Gazeau, O. (1997). Aromatisation de vins par différents produits élaborés à partir du bois de chêne. *Journal des sciences et techniques de la tonnellerie*, Volume 3, 37-59.



- Bertrand, A., & Ségur, M.-C. (2009). *Synthèse des travaux et réflexions concernant la teneur en cuivre dans les eaux-de-vie d'Armagnac* (p. 7) [Rapport interne du Bureau National Interprofessionnel de l'Armagnac].
- Bertsch, K. (1992). *Les eaux-de-vie d'Armagnac : Critères analytiques de la qualité, étude sur le carbamate d'éthyle* [Thèse de doctorat, Bordeaux 2]. <http://www.theses.fr/fr/1992BOR22006>
- Beverley, R. (2014). *The history and present state of Virginia : A new edition with an introduction by Susan Scott Parrish*. UNC Press Books.
- Blaich, R., Stein, U., & Wind, R. (1984). Perforationen in der cuticula von Weinbeeren als morphologischer Faktor der Botritisresistenz. *Vitis*, 23(4), 242-256.
- Boidron, J.-N., Chatonnet, P., & Pons, M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *OENO One*, 22(4), 275.  
<https://doi.org/10.20870/oenone.1988.22.4.1263>
- Boisbineuf, C. (2020). Le jardin paysan, miroir des transformations des sociétés rurales du début du XIXe siècle aux années 1960. L'exemple du Sud-ouest de la France. [These en préparation, Bordeaux 3].  
<https://theses.fr/s257354>
- Bonastre, J.-F. (1834). Journal de pharmacie et des sciences accessoires. *Gallica*, 20(1), 565-566.
- Bornet, A. (2006). *Utilisation de nouveaux auxiliaires technologiques en œnologie : Chitines, chitosanes et dérivés pour la clarification et la décontamination (plomb, cadmium, fer, cuivre, ochratoxine A) des moûts et des vins, effets préventifs de ces polysaccharides en présence ou absence de polyphénols sur l'athérosclérose précoce (modèle Hamster syrien doré)* [Thèse de doctorat, Montpellier 1].  
<https://www.theses.fr/2006MON13510>
- Boss, P. K., Davies, C., & Robinson, S. P. (1996). Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation. *Plant Physiology*, 111(4), 1059-1066.  
<https://doi.org/10.1104/pp.111.4.1059>
- Bowen, A. J., & Reynolds, A. G. (2012). Odor Potency of Aroma Compounds in Riesling and Vidal blanc Table Wines and Icewines by Gas Chromatography-Olfactometry-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(11), 2874-2883.  
<https://doi.org/10.1021/jf203314j>
- Brat, P., Yahia, A., Chillet, M., Bugaud, C., Bakry, F., Reynes, M., & Brillouet, J.-M. (2004). Influence of cultivar, growth altitude and maturity stage on banana volatile compound composition. *Fruits*, 59(2), 75-82.  
<https://doi.org/10.1051/fruits:2004007>
- Breslin, P. A. S., Gilmore, M. M., Beauchamp, G. K., & Green, B. G. (1993). Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses*, 18(4), 405-417.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/18.4.405>
- Brochet, F. (2000). *La dégustation : Étude des représentations des objets chimiques dans le champ de la conscience* [Thèse de doctorat, Bordeaux 2]. <https://theses.fr/2000BOR28743>
- Brossard, C., Rousseau, F., & Dumont, J.-P. (2007). Perceptual Interactions between Characteristic Notes Smelled above Aqueous Solutions of Odorant Mixtures. *Chemical Senses*, 32(4), 319-327.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjm002>

Brown, M. B., & Forsythe, A. B. (1974). Robust Tests for the Equality of Variances. *Journal of the American Statistical Association*, 69(346), 364-367. <https://doi.org/10.1080/01621459.1974.10482955>

Bulit, J., & Verdu, D. (1973, juillet 28). Annual variations in the aerial sporing of *Botrytis cinerea* in a vineyard. *Botrytis meeting*, Teresin, Poland.

Bureau National Interprofessionnel de l'Armagnac. (2010). *Maîtrise de l'énergie pour la production d'Armagnac* (p. 4) [Guide technique].

Burtles, S. M. (1990). Fundamental problems encountered when evaluating scotch whisky by sensory methods. In *Proceedings of the Third Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling*. Institute of Brewing, London (pp. 253-265).

Buttery, R. G., & Ling, L. C. (1995). Volatile Flavor Components of Corn Tortillas and Related Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1878-1882. <https://doi.org/10.1021/jf00055a023>

Cabanne, G. (1954). *Biographie de l'hybrideur François Baco*. In Galerie des Landais: Vol. Tome 6 (p. 31-47). Éditions Jean Lacoste.

Cain, W. S., & Drexler, M. (1974). Scope and Evaluation of Odor Counteraction and Masking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 237(1), 427-439. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb49876.x>

Caldeira, I., Belchior, A. P., Clímaco, M. C., & Bruno de Sousa, R. (2002). Aroma profile of Portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. *Analytica chimica acta*, 458(1), 55-62. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01522-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01522-7)

Caldeira, I., Mateus, A. M., & Belchior, A. P. (2006). Flavour and odour profile modifications during the first five years of Lourinhã brandy maturation on different wooden barrels. *Analytica chimica acta*, 563(1), 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.008>

Caldeira, I., Anjos, O., Portal, V., Belchior, A. P., & Canas, S. (2010). Sensory and chemical modifications of wine-brandy aged with chestnut and oak wood fragments in comparison to wooden barrels. *Analytica chimica acta*, 660(1), 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.059>

Camargo, U. A., & Ritschel, P. S. (2006, February). New table and wine grape cultivars : world scenario with emphasis on Brazil. In *International Symposium on Grape Production and Processing 785* (pp. 89-96). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.785.8>

Cameleyre, M. (2017). *Contribution à l'étude de l'expression aromatique fruitée des vins rouges : Importance du niveau pré-sensoriel dans les interactions perceptives*. [Thèse de doctorat, Bordeaux]. <https://theses.fr/2017BORD0947>

Candelson, M., Ballester, J., Uscidda, N., Blanquet, J., & Fur, Y. L. (2004). Sensory methodology developed for the investigation of Sciaccarello wine concept. *OENO One*, 38(2), Article 2. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2004.38.2.924>

Cantagrel, R., Lurton, L., Vidal, J.-P., & Galy, B. (1991). La distillation charentaise pour l'obtention des eaux-de-vie de Cognac. In *Ier symposium international sur les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole : Bordeaux*, 26-30 juin 1990. Tec. & doc-Lavoisier.

Capy, P., David, J. R., Carton, Y., Pla, E., & Stockel, J. (1987). Grape breeding *Drosophila* communities in Southern France: short range variation in ecological and genetical structure of natural populations. *Acta Oecol., Oecol. Gen.*, 8(3), 435-440.

Carr, W. E. S., Gleeson, R. A., & Trapido-Rosenthal, H. G. (1990). The role of perireceptor events in chemosensory processes. *Trends in Neurosciences*, 13(6), 212-215.  
[https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90162-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90162-4)

Catalogue officiel des variétés de vigne | FranceAgriMer-Établissement national des produits de l'agriculture et de la mer. (s. d.). Consulté 19 avril 2022, à l'adresse <https://www.franceagrimer.fr/filieres-Vin-et-cidre/Vin/Accompagner/Dispositifs-par-filiere/Normalisation-Qualite/Bois-et-plants-de-vigne/Catalogue-officiel-des-varietes-de-vigne>

Cebrián-Tarancón, C., Oliva, J., Cámara, M. Á., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2021). Analysis of Intact Glycosidic Aroma Precursors in Grapes by High-Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector. *Foods*, 10(1), 191.  
<https://doi.org/10.3390/foods10010191>

Chambers, K. R. (1993). Preventing bird damage on two table grape cultivars by covering the bunches with polyester sleeves. *Deciduous Fruit Grower*, 43(1), 30-35.

Chaput, M. A., El Mountassir, F., Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Le Bon, A. M., Perrut, A., Ferry, B., & Duchamp-Viret, P. (2012). Interactions of odorants with olfactory receptors and receptor neurons match the perceptual dynamics observed for woody and fruity odorant mixtures. *European Journal of Neuroscience*, 35(4), 584-597.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07976.x>

Charnock, H., Pickering, G., & Kemp, B. (2023). The impact of dosage sugar-type and aging on Maillard reaction-associated products in traditional method sparkling wines : This article is published in cooperation with IVAS 2022 (In Vino Analytica Scientia conference), 3-7 July 2022, Neustadt, Germany. *OENO One*, 57(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2023.57.2.7370>

Chatonnet, P. (1995). *Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne* [Thèse de doctorat, Bordeaux 2].  
<https://www.theses.fr/1995BOR20338>

Chatonnet, P., Barbe, C., Canal-Llauberes, R.-M., Dubourdieu, D., Boidron, J.-N., & Pons, M. (1992). Incidences de certaines préparations pectolytiques sur la teneur en phénols volatils des vins blancs. *OENO One*, 26(4), 253.  
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.1992.26.4.1187>

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., & Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(2), 191-202.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620213>

Christensen, L. (1981). Lighter pruning lessens bunch rot of Chenin Blanc grapes. *California Agriculture*, 35(3), 10-11.

Chung, S.-H. (1986). *Contribution à l'étude de la formation des composés volatils au cours de l'autolyse de levures de vinification* [Thèse de doctorat, Dijon]. <https://www.theses.fr/1986DIJOS059>

Ciliberti, N., Fermaud, M., Roudet, J., Languasco, L., & Rossi, V. (2016). Environmental effects on the production of *Botrytis cinerea* conidia on different media, grape bunch trash, and mature berries :

Sporulation patterns in *Botrytis cinerea*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(2), 262-270.  
<https://doi.org/10.1111/ajgw.12217>

Cipiciani, A., Onori, G., & Savelli, G. (1988). Structural properties of water-ethanol mixtures : A correlation with the formation of micellar aggregates. *Chemical Physics Letters*, 143(5), 505-509.  
[https://doi.org/10.1016/0009-2614\(88\)87404-9](https://doi.org/10.1016/0009-2614(88)87404-9)

Cliff, M., & Heymann, H. (1992). Descriptive analysis of oral pungency. *Journal of Sensory Studies*, 7(4), 279-290.  
<https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1992.tb00195.x>

Coley-Smith, J. R., Jarvis, W. R., & Verhoeff, K. (1980). *The Biology of Botrytis*. Academic Press.

Combrinck, S., Regnier, T., & Kamatou, G. P. P. (2011). In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 344-349.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.011>

Commenil, P., Brunet, L., & Audran, J.-C. (1997). The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *Journal of Experimental Botany*, 48(8), 1599-1607.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/48.8.1599>

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., & Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/6820>

Conner, J. M., Birkmyre, L., Paterson, A., & Piggott, J. R. (1998). Headspace concentrations of ethyl esters at different alcoholic strengths. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 121-126.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199805\)77:1<121::AID-JSFA14>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<121::AID-JSFA14>3.0.CO;2-V)

Cordonnier, R., & Bayonove, C. (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *CR Acad. Sci. Paris*, 278, 3387-3390.

Couteux, A., & Lejeune, V. (2008). Index phytosanitaire. Paris, France.

Couto, J. A., Campos, F. M., Figueiredo, A. R., & Hogg, T. A. (2006). Ability of Lactic Acid Bacteria to Produce Volatile Phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(2), 166-171.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.2006.57.2.166>

Cox, T. F., & Cox, M. A. A. (2000). *Multidimensional Scaling*, Second Edition. CRC Press.  
<https://doi.org/10.1201/9781420036121>

Cristinzio, G., Boselli, M., Scaglione, G., & Iannini, C. (2000). Effect of roostock on *Botrytis cinerea* susceptibility of *Vitis vinifera* cv. Falanghina. *Advances in horticultural science*, 14, 83-86.

**D**aifas, D. P., Smith, J. P., Tarte, I., Blanchfield, B., & Austin, J. W. (2000). Effect of Ethanol Vapor on Growth and Toxin Production by Clostridium Botulinum in a High Moisture Bakery Product. *Journal of Food Safety*, 20(2), 111-125.  
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2000.tb00292.x>

- D'Angelo, M., Onori, G., & Santucci, A. (1994a). Self-association behaviour of alcohols in diluted aqueous solutions. *Il Nuovo Cimento D*, 16(9), 1499-1514.  
<https://doi.org/10.1007/BF02462035>
- D'Angelo, M., Onori, G., & Santucci, A. (1994b). Self-association of monohydric alcohols in water : Compressibility and infrared absorption measurements. *The Journal of Chemical Physics*, 100(4), 3107-3113.  
<https://doi.org/10.1063/1.466452>
- Darrigan, J. (1924). Notice sur les hybrides Baco, comment ils ont été créés et sévèrement sélectionnés. *Dax, Labèque*
- De Bary, A. (1886). Ueber einige sclerotinien und sclerotienkrankheiten. *Botanische Zeitung*, 44, 377-474.
- De la Fuente Lloreda, M. (2018). Use of hybrids in viticulture. A challenge for the OIV. *OENO One*, 52(3), 231-234.  
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.3.2312>
- Deloire, A., Torregrosa, L., Jaillard, B., Pellegrino, A., Métaï, A., Ojeda, H., Lebon, É., & Abbal, P. (2015). *Traité de la vigne : Physiologie, terroir, culture* (A. Carbonneau, Éd.; 2e édition). Dunod.
- De Mendiburu Delgado, F. (2009). Una herramienta de análisis estadístico para la investigación agrícola. *Universidad Nacional de Ingeniería*. <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/2356485>
- Décret du 6 août 1936 - Définition - Appellation Contrôlée concernant les eaux-de-vie : « Armagnac », « Bas-Armagnac », « Ténarèze », « Haut-Armagnac », (1936).
- Décret du 27 mai 2005 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », (2005).
- Décret n° 2014-1642 du 26 décembre 2014 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Armagnac », 2014-1642 (2014).
- Décret n°87-854 du 22 octobre 1987 relatif à l'encépagement et au rendement des vignobles dans les exploitations produisant des vins, vins doux naturels et vins de liqueur à appellation d'origine, 87-854 (1987).
- Delas, J. (2000). *La fertilisation de la vigne*. Editions Féret.
- Delas, J., Molot, C., & Soyer, J. P. (1984). Effect of rootstock, load and excessive nitrogen fertilization on the behavior of Merlot in soil of Graves in Bordelais. *Agriculture and Viticulture*, 101, 136-139.
- Deloire, A. (2011). The concept of berry sugar loading. *Wynboer*, 257, 93-95.
- Demiglio, P., & Pickering, G. J. (2008). The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 6(3-4), 143-150.
- Deneulin, P., Danthe, E., Rebenaque, P., Bach, B., & Cleroux, M. (2020). Définition d'un espace sensoriel propre aux eaux-de-vie de Bérudge. 11. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture* | Vol. 52 (4): 206–215, 2020
- Depled, F. (2013). *Évaluation sensorielle : Manuel méthodologique* (3e éd. revue et augmentée [2e tirage]). Éd. Tec & doc.

Deytieux-Belleau, C., Geny, L., Roudet, J., Mayet, V., Donèche, B., & Fermaud, M. (2009). Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4), 551-563.

<https://doi.org/10.1007/s10658-009-9503-6>

Distel, H., Ayabe-Kanamura, S., Martínez-Gómez, M., Schicker, I., Kobayakawa, T., Saito, S., & Hudson, R. (1999). Perception of Everyday Odors—Correlation between Intensity, Familiarity and Strength of Hedonic Judgement. *Chemical Senses*, 24(2), 191-199.

<https://doi.org/10.1093/chemse/24.2.191>

Doneche, B. (1986). La nature des exsudats de raisins et leur rôle dans la germination des conidies de *Botrytis cinerea*. *Agronomie*, 6(1), 67-73.

<https://doi.org/10.1051/agro:19860105>

Drissi, R., Goutouly, J.-P., Forget, D., & Gaudillere, J.-P. (2009). Nondestructive Measurement of Grapevine Leaf Area by Ground Normalized Difference Vegetation Index. *Agronomy Journal*, 101(1), 226-231.

<https://doi.org/10.2134/agronj2007.0167>

Du Plessis, H. W., Steger, C. L. C., Du Toit, M., & Lambrechts, M. G. (2002). The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 1005-1013.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01616.x>

Dubos, B. (2002). *Maladies cryptogamiques de la vigne : Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne* (2. éd. revue et augmentée). Ed. Féret.

Dubos, B., & Roudet, J. (2003). Early evaluation of grape berry susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Bulletin OILB/SROP*, 26(8-1), 7-10.

Dumas, J.-B. (1844). *Traité de chimie appliquée aux arts* (Vol. 7). Béchet jeune.

**E**18 Committee. (2019). Practice for Determination of Odor and Taste Thresholds By a Forced-Choice Ascending Concentration Series Method of Limits. *ASTM International*.

<https://doi.org/10.1520/E0679-19>

Edlin, D. A. N., Narbad, A., Gasson, M. J., Dickinson, J. R., & Lloyd, D. (1998). Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(4), 232-239.

[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00169-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00169-5)

Egger, E., Lemmi, M., Mascarini, P., Cella, L., Ondradu, S., & Becciu, M. (1979). Studies on *Botrytis cinerea* attack on grapevines at Villasor, Sardinia. The effect of cultivar, rootstock, training system and season. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 32, 176-187.

Eibach, R. (1994). Defense mechanisms of the grapevine to fungus disease. *American Vineyard*, 1, 8-10.

Eichhorn, V. K. W., & Lorenz, D. H. (1977). Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 29(8), 119-120.

Elad, Y., & Shtienberg, D. (1995). *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables : Chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews*, 1(1), 15-29.

<https://doi.org/10.1007/BF00140331>



Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., & Elad, Y. (Éds.). (2007). *Botrytis : Biology, pathology and control*. Springer Science & Business Media.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3>

Elmer, P. A. G., & Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55(2), 155-177.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01348.x>

Elmer, P. A., & Michailides, T. J. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 243-272). Dordrecht: Springer Netherlands.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_14)

English, J. T., Kaps, M. L., Moore, J. F., & Nakova, M. (1993). Leaf removal for control of *Botrytis* bunch rot of wine grapes in the midwestern United States.  
<https://doi.org/10.1094/PD-77-1224>

Ezzahouani, A., & Williams, L. E. (2001). The effects of thinning and girdling on leaf water potential, growth and fruit composition of Ruby Seedless grapevines. *OENO One*, 35(2), 79.  
<https://doi.org/10.20870/oenone.2001.35.2.985>

**F**aith, N., & Guillard, M. (2016). *Encyclopédie du cognac : Vignes, alambics et chais* (Yvelin edition). Editions François Baudez.

Fedele, G., González-Domínguez, E., Si Ammour, M., Languasco, L., & Rossi, V. (2020). Reduction of *Botrytis cinerea* Colonization of and Sporulation on Bunch Trash. *Plant Disease*, 104(3), 808-816.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1593-RE>

Fenaroli, G., Burdock, G. A., Furia, T. E., & Bellanca, N. (1975). Fenaroli's handbook of flavor ingredients. CRC Press.

Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., & Elsner, M. (2013). Evaluating Pesticide Degradation in the Environment : Blind Spots and Emerging Opportunities. *Science*, 341(6147), 752-758.  
<https://doi.org/10.1126/science.1236281>

Fermaud, M. (1990). *Incidence des attaques larvaires d'Eudemis (Lobesia botrana) sur le développement de la pourriture grise (Botrytis cinerea) chez la vigne : Rôle des facteurs du milieu et mécanismes mis en jeu*. [Thèse de doctorat, INA-PG, INRA].

Fermaud, M., & Giboulot, A. (1992). Influence of *Lobesia botrana* larvae on field severity of *Botrytis* rot of grape berries. *Plant Disease*, 76(4), 404-409.  
<https://doi.org/10.1094/PD-76-0404>

Fermaud, M., & Le Menn, R. (1992). Transmission of *Botrytis cinerea* to grapes by grape berry moth larvae. *Phytopathology*, 82(12), 1393-1398.  
<https://doi.org/10.1094/Phyto-82-1393>

Fermaud, M., & Gaunt, R. E. (1995). Thrips obscuratus as a potential vector of *Botrytis cinerea* in kiwifruit. *Mycological Research*, 99(3), 267-273.  
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80896-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80896-4)

Fermaud, M., Limiñana, J. M., Froidefond, G., & Pieri, P. (2001). Grape cluster microclimate and architecture affect severity of *Botrytis* rot of ripening berries. *IOBC WPRS BULLETIN*, 24(7), 7-10.

Fermaud, M., Pieri, P., & Liminana, J.-M. (2001). *Botrytis* et microclimat : Propagation de *Botrytis cinerea* dans les grappes de raisin en conditions climatiques contrôlées : Vigne. *Phytoma, la défense des végétaux*, 543, 40-43.

Fermaud, M., Deytieux-Belleau, C., Roudet, J., Darrieutort, G., & Gény, L. (2011). Water activity at the fruit surface: a potential indicator of grape berry susceptibility to *Botrytis cinerea*. *IOBC WPRS Bull*, 67, 155-161.

Ferrari, G., Lablanquie, O., Cantagrel, R., Ledauphin, J., Payot, T., Fournier, N., & Guichard, E. (2004). Determination of Key Odorant Compounds in Freshly Distilled Cognac Using GC-O, GC-MS, and Sensory Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5670-5676.  
<https://doi.org/10.1021/jf049512d>

Ferreira, J. H. S., & Marais, P. G. (1987). Effect of Rootstock Cultivar, Pruning Method and Crop Load on *Botrytis cinerea* Rot of *Vitis vinifera* cv. Chenin blanc grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 8(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.21548/8-2-2313>

Ferreira, V. (2012a). Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative odour properties of simple odour mixtures : A flavour chemistry view. Part 1: intensity and detectability. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(2), 124-140.  
<https://doi.org/10.1002/ffj.2090>

Ferreira, V. (2012b). Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative odour properties of simple odour mixtures : A flavour chemistry view. Part 2: qualitative aspects. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(3), 201-215.  
<https://doi.org/10.1002/ffj.2091>

Ferreira, V., & Lopez, R. (2019). The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. *Biomolecules*, 9(12), 818.  
<https://doi.org/10.3390/biom9120818>

Feuillat, M., & Charpentier, C. (1982). Autolysis of Yeasts in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 6-13.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.1982.33.1.6>

Fillinger, S., & Yigal, E. (2016). *Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer International Publishing.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>

Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19(3), 286-291.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.08.004>

Fox, J., & Weisberg, S. (2018). *An R Companion to Applied Regression*. SAGE Publications.

Franc, C., Riquier, L., Hastoy, X., Monsanto, C., Noiville, P., Pelonniere-Magimel, E., Marchand, S., Tempère, S., Ségur, M.-C., & De Revel, G. (2023). Highlighting the varietal origin of eugenol in Armagnac wine spirits from Baco blanc, a hybrid grape variety. *Food Chemistry*, 136405.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136405>

**G**abler, F. M., Smilanick, J. L., Mansour, M., Ramming, D. W., & Mackey, B. E. (2003). Correlations of Morphological, Anatomical, and Chemical Features of Grape Berries with Resistance to



- Botrytis cinerea*. *Phytopathology*®, 93(10), 1263-1273.  
<https://doi.org/10.1094/PHTO.2003.93.10.1263>
- Gachon, C. M. M., Langlois-Meurinne, M., & Saindrenan, P. (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases : The emerging functional analysis. *Trends in Plant Science*, 10(11), 542-549.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.007>
- Gadrat, M., Lavergne, J., Emo, C., Teissedre, P. L., & Chira, K. (2022). Sensory characterisation of Cognac eaux-de-vie aged in barrels subjected to different toasting processes. *OENO One*, 56(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.20870/oenone.2022.56.1.4853>
- Gagné, S. (2007). *Implication de l'équilibre hormonal dans les mécanismes de maturation phénolique du raisin : Étude du rôle de l'acide abscissique sur la composition et la biosynthèse des tanins de la pellicule* [Thèse de doctorat]. Bordeaux 2.
- Galet, P. (1993). *Maladies et parasites de la vigne* (Tec&Doc Distribution, Vol. 1).
- Galet, P. (2015). *Dictionnaire encyclopédique des cépages et de leurs synonymes*. Libre & Solidaire.
- García-Falcón, M. S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines : Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, 105(1), 248-259.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.006>
- Garrier, G. (1989). *Le Phylloxéra: une guerre de trente ans, 1870-1900*. FeniXX.  
<https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k33620455>
- Gawel, R., Sluyter, S. V., & Waters, E. J. (2007). The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(1), 38-45.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2007.tb00070.x>
- Gayoso, C. W., Lima, E. O., Oliveira, V. T., Pereira, F. O., Souza, E. L., Lima, I. O., & Navarro, D. F. (2005). Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, 76(2), 247-249.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.12.005>
- Genovese, A., Gambuti, A., Lamorte, S. A., & Moio, L. (2013). An extract procedure for studying the free and glycosilated aroma compounds in grapes. *Food Chemistry*, 136(2), 822-834.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.061>
- Gildemeister, E., & Hoffmann, F. (1899). *Die aetherischen oele*. Julius Springer.  
<https://catalog.hathitrust.org/Record/008746956>
- Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N., & Gidley, M. (2011). Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chemistry*, 125(3), 823-834.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.062>
- Giraud, T., Levis, C., Fortini, D., Leroux, P., & Brygoo, Y. (1998). Plusieurs espèces cachées sous le nom de *Botrytis cinerea* : Etude de populations de *B. cinerea* sur vignes champenoises : Maladies de la vigne. *Phytoma, la défense des végétaux*, 504, 56-60.

- Gnekow, B., & Ough, C. S. (1976). Methanol in Wines and Musts : Source and Amounts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 1-6.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.1976.27.1.1>
- Goupy, J. (2016). Modélisation par les plans d'expériences. Techniques de l'ingénieur. *Mesures et contrôle*, RB1(R275).  
<https://doi.org/10.51257/a-v2-r275>
- Gracia-Moreno, E., Lopez, R., & Ferreira, V. (2015). Quantitative determination of five hydroxy acids, precursors of relevant wine aroma compounds in wine and other alcoholic beverages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(26), 7925-7934.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8959-9>
- Griset, P., & Laborie, L. (2017). *Démêlées identitaires. Sur la « renaissance » du vignoble de Cahors au XXe siècle*. In *Les petits vignobles* (p. 121-140). Presses universitaires François-Rabelais.  
<https://doi.org/10.4000/books.pufr.26060>
- Grossmann, M., & Rapp, A. (1988). Steigerung des sortentypischen weinbuketts nach enzyymbehandlung. *Deuts. Lebens. Rundschau*, 84, 35-37.
- Grossmann, M., Sukran, I., & Rapp, A. (1990). [Influence of technological measures on the bouquet of [wine] sorts]. *Weinwirtschaft-Technik* (Germany, FR).
- Gubler, W. D., Marois, J. J., Bledsoe, A. M., & Bettiga, L. J. (1987). Control of *Botrytis* bunch rot of grape with canopy management. *Plant disease*, 71(7), 599-601.  
<https://doi.org/10.1094/PD-71-0599>
- Guedes de Pinho, P. (1994). *Caractérisation des vins de la région de Vinhos Verdes au Portugal : Reconnaissance chimique et sensorielle des vins de cépages blancs non Vitis vinifera* [Thèse de doctorat, Bordeaux 2]. <http://www.theses.fr/1994BOR20308>
- Guedes de Pinho, P., Anocibar Beloqui, A., & Bertrand, A. (1997). Detection of a sulfur compound responsible for the typical aroma of some non *Vitis vinifera* wines. *Sciences des Aliments* (France).
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 857-862.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740360915>
- Gunata, Z., Dugelay, J., Sapis, J. C., Baumes, R., & Bayonove, C. (1993). Role of the enzyme in the use of the flavour potential from grape glycosides in wine making. *International symposium on flavour precursors*, Sep 1992, Wurzburg, Germany. 19 p.  
<https://hal.inrae.fr/hal-02844337>
- Guth, H. (1997). Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3022-3026.  
<https://doi.org/10.1021/jf9608433>
- H**ack, H., Bleiholder, H., Buhr, L., Meier, U., Schock-Fricke, U., Weber, E., & Witzemberger, A. (1992). Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen. - Erweiterte BBCH-Skala, Allgemein. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 44(12), 265-270.

Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P. (1999). *Phytochemical dictionary : A handbook of bioactive compounds from plants* (2nd edition.). Taylor & Francis.

He, Y., Jain, P., & Yalkowsky, S. H. (2010). *Handbook of aqueous solubility data*. CRC press.

Hectors, K., Van Oevelen, S., Geuns, J., Guisez, Y., Jansen, M. A. K., & Prinsen, E. (2014). Dynamic changes in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 152(2), 219-230.  
<https://doi.org/10.1111/ppl.12168>

Hérissey, H., & Cheymol, J. (1925). Extraction et propriétés de la géine, glucoside générateur d'eugénol contenu dans le *Geum urbanum*. *Bulletin de la Société de chimie biologique*, 7.

Hervé, E. (1996). *Qualité des eaux-de-vie d'Armagnac : Influence du pressurage du raisin, évaluation du vieillissement et prévention de l'instabilité physique* [Thèse de doctorat, Bordeaux 2].  
<https://www.theses.fr/1996BOR20431>

Hill, G., Stellwaag-Kittler, F., Huth, G., & Schlosser, E. (1981). Resistance of grapes in different developmental stages to *Botrytis cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 102(3/4), 328-338.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1981.tb03394.x>

Hjelmeland, A. K., & Ebeler, S. E. (2015). Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine : A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 1-11.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14104>

Holz, G., Coertze, S., & Basson, E. J. (1997). Latent infection of *Botrytis cinerea* in grape pedicels leads to postharvest decay. *Phytopathology*, 87, S43.

Holz, G. (2001). The occurrence and control of *Botrytis*. *Wynboer*, 9, 111-120.

Hoopman, T., Birch, G., Serghat, S., Portmann, M., & Mathlouthi, M. (1993). Solute-solvent interactions and the sweet taste of small carbohydrates. Part II : Sweetness intensity and persistence in ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*, 46(2), 147-153.  
[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90028-E](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90028-E)

Hughson, A. L., & Boakes, R. A. (2002). The knowing nose : The role of knowledge in wine expertise. *Food Quality and Preference*, 13(7), 463-472.  
[https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(02\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(02)00051-4)

Ilckes, C. M., & Cadwallader, K. R. (2017). Effects of Ethanol on Flavor Perception in Alcoholic Beverages. *Chemosensory Perception*, 10(4), 119-134.  
<https://doi.org/10.1007/s12078-017-9238-2>

Index acta biocontrôle : 2023 (7e édition). (2023). ACTA éditions.

Ishiguro, S., & Sugawara, S. (1978). Comparisons of Smoke Components in the Semivolatile Phase from Lamina and Midrib Cigarettes of Flue-cured Tobacco Leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(8), 1527-1531.  
<https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863199>

Jack, F. (2003). Development of Guidelines for the Preparation and Handling of Sensory Samples in the Scotch Whisky Industry. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(2), 114-119.  
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00139.x>

Janáčková, A., Sádecká, J., Kohajdová, Z., & Špánik, I. (2008). The Identification of Aroma-Active Compounds in Slovak Brandies Using GC-Sniffing, GC-MS and Sensory Evaluation. *Chromatographia*, 67(1), 113-121 <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0635-1>

Jarvis, W. R. (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* species : Taxonomy, physiology and pathogenicity - A guide to the literature. <http://hdl.handle.net/10214/15091>

Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., & Meunier, P. (1995). Production of the Phytoalexin Resveratrol by Grapes as a Response to Botrytis Attack Under Natural Conditions. *Journal of Phytopathology*, 143(3), 135-139.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1995.tb00246.x>

Jermi, M., Jelmini, G., & Gessler, C. (1986). Control of *Botrytis cinerea* on Merlot grapevine in Ticino. Role of latent infections. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic*, 18, 161-166.

Jesús Ibarz, Ma., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N., & Cacho, J. (2006). Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 217-229.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.020>

Johnson, K. E., & Mervis, C. B. (1997). Effects of varying levels of expertise on the basic level of categorization. *Journal of Experimental Psychology: General*, 126(3), 248-277.  
<https://doi.org/10.1037/0096-3445.126.3.248>

Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19(6), 596-607.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2008.03.005>

Kallio, H. (1976). Identification of vacuum steam-distilled aroma compounds in the press juice of arctic bramble, *Rubus arcticus* L. *Journal of Food Science*, 41(3), 555-562.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00669.x>

Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol-From the Remote Maluku Islands to the International Market Place : A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. *Molecules*, 17(6), 6953-6981.  
<https://doi.org/10.3390/molecules17066953>

Keller, M. (2020). *The science of grapevines* (3rd ed). Academic press.

Keller, M., Kummer, M., & Vasconcelos, M. C. (2001). Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(1), 12-18.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00188.x>

Klein, A. H., Carstens, M. I., & Carstens, E. (2013). Eugenol and carvacrol induce temporally desensitizing patterns of oral irritation and enhance innocuous warmth and noxious heat sensation on the tongue. *Pain*, 154(10), 2078-2087.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.025>

Kobayashi, H., Sasaki, K., Tanzawa, F., Matsuyama, S., Suzuki, S., Takata, R., & Saito, H. (2013). Impact of harvest timing on 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2H)-furanone concentration in 'Muscat Bailey A' grape berries. *Vitis*, 52(1), 9-11.

Koeduka, T., Suzuki, S., Iijima, Y., Ohnishi, T., Suzuki, H., Watanabe, B., Shibata, D., Umezawa, T., Pichersky, E., & Hiratake, J. (2013). Enhancement of production of eugenol and its glycosides in transgenic aspen plants via genetic engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(1), 73-78.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.060>

Kolor, M. G. (1983). Identification of an important new flavor compound in Concord grape : Ethyl-3-mercaptopropionate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(5), 1125-1127.  
<https://doi.org/10.1021/jf00119a052>

Kotseridis, Y. (1999). *Etude de l'arôme des vins de merlot et de cabernet sauvignon de la région bordelaise* [Thèse de doctorat, Bordeaux 2]. <https://www.theses.fr/1999BOR20652>

Kretschmer, M., Kassemeyer, H.-H., & Hahn, M. (2007). Age-dependent Grey Mould Susceptibility and Tissue-specific Defence Gene Activation of Grapevine Berry Skins after Infection by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 155(5), 258-263.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01216.x>

Kulminskaya, A. A., Thomsen, K. K., Shabalin, K. A., Sidorenko, I. A., Eneyskaya, E. V., Savel'Ev, A. N., & Neustroev, K. N. (2001). Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3-β-glucanase from *T. viride*. *European Journal of Biochemistry*, 268(23), 6123-6131.  
<https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02558.x>

Lagarde, G. (2022). *Caractérisation chimique de l'impact du collage par l'étude des polyphénols du vin et des précités de collage* [Thèse de doctorat, Bordeaux]. <https://theses.hal.science/tel-04059528>

Lagopodi, A. L., Cetiz, K., Koukounaras, A., & Sfakiotakis, E. M. (2009). Acetic Acid, Ethanol and Steam Effects on the Growth of *Botrytis cinerea* in vitro and Combination of Steam and Modified Atmosphere Packaging to Control Decay in Kiwifruit. *Journal of Phytopathology*, 157(2), 79-84.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01445.x>

Laing, D. G., & Francis, G. W. (1989). The capacity of humans to identify odors in mixtures. *Physiology & Behavior*, 46(5), 809-814.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90041-3)

Laing, D. G., & Livermore, B. A. (1992). Perceptual analysis of complex chemical signals by humans. In *Chemical Signals in Vertebrates 6* (pp. 587-593). Boston, MA: Springer US.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9655-1\\_90](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9655-1_90)

Langcake, P., & McCarthy, W. V. (1979). The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 18, 244-253.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91470-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91470-5)

Langcake, P. (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. And the production of the stress metabolites resveratrol, ε-viniferin, α-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, 18(2), 213-226.  
[https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(81\)80043-4](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(81)80043-4)

Latorre, B. A., Elfar, K., & Ferrada, E. E. (2015). Pudrición gris, causada por *Botrytis cinerea*, limita la producción de vid en Chile. *Ciencia e investigación agraria*, 42(3), 305-330.  
<https://doi.org/10.4067/S0718-16202015000300001>

Latunde-Dada, A. O. (2001). *Colletotrichum* : Tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 187-198.  
<https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00069.x>

Lawless, H. T. (1984). Flavor Description of White Wine by "Expert" and Nonexpert Wine Consumers. *Journal of Food Science*, 49(1), 120-123.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13686.x>

Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., & Neutelings, G. (2016). Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00735>

Lee, C. Y., Robinson, W. B., Buren, J. P. V., Acree, T. E., & Stoewsand, G. S. (1975). Methanol in Wines in Relation to Processing and Variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26(4), 184-187.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.1975.26.4.184>

Lee, K.-Y. M., Paterson, A., Piggott, J. R., & Richardson, G. D. (2000). Perception of Whisky Flavour Reference Compounds by Scottish Distillers. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(4), 203-208.  
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2000.tb00058.x>

Leeuwen, C. van, Barbe, J.-C., Darriet, P., Destrac-Irvine, A., Gowdy, M., Lytra, G., Marchal, A., Marchand, S., Plantevin, M., Poitou, X., Pons, A., & Thibon, C. (2022). Aromatic maturity is a cornerstone of terroir expression in red wine. *OENO One*, 56(2), 335-351.  
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.2.5441>

Lehtonen, M. (1983). Gas-Liquid Chromatographic Determination of Volatile Phenols in Matured Distilled Alcoholic Beverages. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 66(1), 62-70.  
<https://doi.org/10.1093/jaoac/66.1.62>

Lichter, A., Zutkhy, Y., Sonogo, L., Dvir, O., Kaplunov, T., Sarig, P., & Ben-Arie, R. (2002). Ethanol controls postharvest decay of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 24(3), 301-308.  
[https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00141-7)

Lindemann, B. (1996). Taste reception. *Physiological Reviews*, 76(3), 719-766.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.3.719>

Linné, C. von. (1753). *Species plantarum exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. Holmiae, Impensis Laurentii Salvii, Tomus II.  
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.59734>

Liu, Z., Zhuang, C., Sheng, S., Shao, L., Zhao, W., & Zhao, S. (2011). Overexpression of a resveratrol synthase gene (PcRS) from *Polygonum cuspidatum* in transgenic Arabidopsis causes the accumulation of trans-piceid with antifungal activity. *Plant Cell Reports*, 30(11).  
<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1110-2>

Livermore, A., & Laing, D. G. (1998a). The influence of chemical complexity on the perception of multicomponent odor mixtures. *Perception & Psychophysics*, 60(4), 650-661.  
<https://doi.org/10.3758/BF03206052>



Livermore, A., & Laing, D. G. (1998b). The influence of odor type on the discrimination and identification of odorants in multicomponent odor mixtures. *Physiology & Behavior*, 65(2), 311-320. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00168-1)

Loi du 22 juillet 1927 modifie la loi du 6 mai 1919-(Protection des Appellations d'Origine), (1927).

Loi du 24 décembre 1934 tendant à réaliser l'assainissement du marché des vins, (1934). <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGIARTI000006621029/1934-12-25/#LEGIARTI000006621029>

López, R., Aznar, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966(1-2), 167-177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00696-9)

Lorenz, D. H., Eichhorn, K. W., Bleiholder, H., Klose, R., Meier, U., & Weber, E. (1995). Growth Stages of the Grapevine : Phenological growth stages of the grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*)-Codes and descriptions according to the extended BBCH scale. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1(2), 100-103. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1995.tb00085.x>

Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Comparison of the Suitability of Different Hydrolytic Strategies To Predict Aroma Potential of Different Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2468-2480. <https://doi.org/10.1021/jf803256e>

Louis, C., Girard, M., Kuhl, G., & Lopez-Ferber, M. (1996). Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology*, 86(9), 934-939. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-934>

Louw, L., & Lambrechts, M. G. (2012). Grape-based brandies : Production, sensory properties and sensory evaluation. In *Alcoholic Beverages* (p. 281-298). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095176.3.281>

Lytra, G. (2012). *Importance des interactions perceptives dans l'expression de l'arôme fruité typique des vins rouges* [Thèse de doctorat, Bordeaux 2]. <https://theses.fr/2012BOR21986>

**M**achida, K., Nakano, Y., & Kikuchi, M. (1991). Phenolic glycosides from *Viburnum dilatatum*. *Phytochemistry*, 30(6), 2013-2014. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85058-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85058-8)

Mak, K.-K., Kamal, M., Ayuba, S., Sakirolla, R., Kang, Y.-B., Mohandas, K., Balijepalli, M., Ahmad, S., & Pichika, M. (2019). A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications : A transformation from ethnomedicine to industry. *Pharmacognosy Reviews*, 13(25), 1. [https://doi.org/10.4103/phrev.phrev\\_46\\_18](https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_46_18)

Malausa, T., Joly, E., Frerot, B., Marion-Poll, F., Thiéry, D., Martin, J.-C., Lefèvre, A., Navajas, M., Tabone, E., Rasplus, J.-Y., Ris, N., Ogier, J.-C., Pages, S., Givaudan, A., Gaudriault, S., Gatti, J.-L., Lavigne, C., Bouvier, J.-C., Mailleret, L., Brisset, M.-N. *et al.* (2018). Les conquêtes de l'INRA pour le biocontrôle. INRA Sciences & Impact. <https://hal.science/hal-01963048>

Marangoni, C. (1865). On the expansion of a drop of liquid floating on the surface of another liquid. *Tipographia dei fratelli Fusi, Pavia*.

- Marois, J. J., Nelson, J. K., Morrison, J. C., Lile, L. S., & Bledsoe, A. M. (1986). The Influence of Berry Contact within Grape Clusters on the Development of *Botrytis cinerea* and *Epicuticular Wax*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(4), 293-296.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.1986.37.4.293>
- Martin, S. R. (1990). Systematic management to minimize Botrytis bunch rot in three Victorian vineyards. *Australian & New Zealand Wine Industry Journal*, 5(3), 235-237.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., & Fermaud, M. (2003). Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(5), 479-488.  
<https://doi.org/10.1023/A:1024222206991>
- Mason, J. R., Clark, L., & Shah, P. S. (1991). Ortho-Aminoacetophenone Repellency to Birds : Similarities to Methyl Anthranilate. *The Journal of Wildlife Management*, 55(2), 334.  
<https://doi.org/10.2307/3809160>
- Matabos, B. (s. d.). François Baco. Centre culturel du pays d'orthe. Consulté 2 août 2023, à l'adresse <http://www.centrecultureldupaysdorthe.com/figures-du-pays-d-orthe/françois-baco/>
- Matabos, B. (2016). *Qui était François Baco ? In Patrimoine naturel, patrimoine culturel* (p. 21-33). Éditions Orthenses.
- McClellan, W. D., & Hewitt, W. B. (1973). Early *Botrytis* rot of grapes : Time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. In *Vitis vinifera* L. *Phytopathology*, 63, 1151-1157.  
<https://doi.org/10.1094/Phyto-63-1151>
- Meierhenrich, U. J. (2006). De la molécule à l'odeur. Les bases moléculaires des premières étapes de l'olfaction. Partie 1/2. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle*, 33(120), 19-23.
- Michailides, T. J., & Morgan, D. P. (1996). Effect of snail (*Helix aspersa*) damage on *Botrytis* gray mold caused by *Botrytis cinerea* in kiwifruit. *Plant Disease*, 80(10), 1141-1146.  
<https://doi.org/10.1094/PD-80-1141>
- Miranda, E. J. F., Nogueira, R. I., Pontes, S. M., & Rezende, C. M. (2001). Odour-active compounds of banana passa identified by aroma extract dilution analysis. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(4), 281-285.  
<https://doi.org/10.1002/ffj.997>
- Moio, L., Ugliano, M., Gambuti, A., Genovese, A., & Piombino, P. (2004). Influence of clarification treatment on concentrations of selected free varietal aroma compounds and glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) must and wine. *American journal of enology and viticulture*, 55(1), 7-12.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.2004.55.1.7>
- Molnar, I., Oura, E., & Suomalainen, H. (1981). Study of volatile substances produced during the autolysis of champagne yeast.
- Monsant, C. (2020). L'eugénol, spécificité des eaux-de-vie issues de Baco blanc en Armagnac [Rapport de stage de Master 2, Bordeaux].
- Mulkens, A., & Kapetanidis, I. (1988). Eugenylglucoside, a New Natural Phenylpropanoid Heteroside from *Melissa officinalis*. *Journal of Natural Products*, 51(3), 496-498.  
<https://doi.org/10.1021/np50057a006>



Murphy, C., & Cain, W. S. (1980). Taste and olfaction : Independence vs interaction. *Physiology & Behavior*, 24(3), 601-605.

[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(80\)90257-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(80)90257-7)

Mundy, D. C., & Beresford, R. M. (2007). Susceptibility of grapes to *Botrytis cinerea* in relation to berry nitrogen and sugar concentration. *New Zealand Plant Protection*, 60, 123-127.

<https://doi.org/10.30843/nzpp.2007.60.4636>

Murphy, C., Cain, W. S., & Bartoshuk, L. M. (1977). Mutual action of taste and olfaction. *Sensory Processes*, 1(3), 204-211.

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.

<https://doi.org/10.5344/ajev.1979.30.2.111>

Nair, N. G., & Parker, F. (1985). Midseason bunch rot of grapes : An unusual disease phenomenon in the Hunter Valley, Australia. *Plant pathology*, 34(2), 302-305.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1985.tb01365.x>

Nair, N. G., & Hill, G. K. (1992). Bunch rot of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *Plant diseases of international importance*, 3, 147-169.

National Toxicology Program. (1992). Institute of Environmental Health Sciences, *National Institutes of Health (NTP). National Toxicology Program Chemical Repository Database. Research Triangle Park, North Carolina.*

Nelson, R. R., Acree, T. E., Lee, C. Y., & Butts, R. M. (1977). Methyl Anthranilate as an aroma constituent of American wine. *Journal of Food Science*, 42(1), 57-59.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb01217.x>

Noble, A. C., Arnold, R. A., Masuda, B. M., Pecore, S. D., Schmidt, J. O., & Stern, P. M. (1984). Progress Towards a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), 107-109.

<https://doi.org/10.5344/ajev.1984.35.2.107>

Noble, A. C., Arnold, R. A., Buechsenstein, J., Leach, E. J., Schmidt, J. O., & Stern, P. M. (1987). Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(2), 143-146.

<https://doi.org/10.5344/ajev.1987.38.2.143>

Noiville, P. (2019). Contribution à la caractérisation chimique des eaux-de-vie blanches d'Armagnac [Rapport de stage de Master 2, Bordeaux].

Nolden, A. A., & Hayes, J. E. (2015). Perceptual Qualities of Ethanol Depend on Concentration, and Variation in These Percepts Associates with Drinking Frequency. *Chemosensory Perception*, 8(3), 149-157.

<https://doi.org/10.1007/s12078-015-9196-5>

Nurgel, C., & Pickering, G. (2006). Modeling of Sweet, Bitter and Irritant Sensations and Their Interactions Elicited by Model Ice Wines. *Journal of Sensory Studies*, 21(5), 505-519. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2006.00081.x>

**O**hloff, G. (1969). Chemie der Geruchs-und Geschmacksstoffe. In *Angewandte Chemie* (pp. 185-251). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0050693>

Okamura, S., & Watanabe, M. (1981). Determination of Phenolic Cinnamates in White Wine and Their Effect on Wine Quality. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(9), 2063-2070. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.45.2063>

Olea, A., Bravo, A., Martínez, R., Thomas, M., Sedan, C., Espinoza, L., Zambrano, E., Carvajal, D., Silva-Moreno, E., & Carrasco, H. (2019). Antifungal Activity of Eugenol Derivatives against *Botrytis Cinerea*. *Molecules*, 24(7), 1239. <https://doi.org/10.3390/molecules24071239>

Olsson, M. J. (1998). An Integrated Model of Intensity and Quality of Odor Mixtures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(1), 837-840. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10672.x>

O'Neil, M. J., Smith, A., & Heckelman, P. E. (2006). The Merck Index-An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals; Merck and Co. Inc.: Whitehouse Station, NJ, USA, 1204.

Onori, G., & Santucci, A. (1996). Dynamical and structural properties of water/alcohol mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 69, 161-181. [https://doi.org/10.1016/S0167-7322\(96\)90012-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7322(96)90012-4)

Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. (2014). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (Vol. 1).

**P**alamand, S. R., & Grigsby, J. H. (1974). Stale flavors in beer : Identification of *o*-aminoacetophenon and ethyl nicotinate in beer. *Brewers Digest*.

Pañitru-De la Fuente, C., Valdés-Gómez, H., Roudet, J., Verdugo-Vásquez, N., Mirabal, Y., Laurie, V. F., Goutouly, J. P., Acevedo Opazo, C., & Fermaud, M. (2020). Vigor thresholded NDVI is a key early risk indicator of *Botrytis* bunch rot in vineyards. *OENO One*, 54(2), 279-297. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.2.2954>

Park, S. K., Morrison, J. C., Adams, D. O., & Noble, A. C. (1991). Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 514-518. <https://doi.org/10.1021/jf00003a017>

Parks, O. W., Schwartz, D. P., & Keeney, M. (1964). Identification of *O*-Aminoacetophenone as a Flavour Compound in Stale Dry Milk. *Nature*, 202(4928), Article 4928. <https://doi.org/10.1038/202185b0>

Parr, W. V., Heatherbell, D., & White, K. G. (2002). Demystifying Wine Expertise : Olfactory Threshold, Perceptual Skill and Semantic Memory in Expert and Novice Wine Judges. *Chemical Senses*, 27(8), 747-755. <https://doi.org/10.1093/chemse/27.8.747>

Parr, W. V., White, K. G., & Heatherbell, D. A. (2004). Exploring the nature of wine expertise : What underlies wine experts' olfactory recognition memory advantage? *Food Quality and Preference*, 15(5), 411-420. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2003.07.002>

Parr, W. V., Mouret, M., Blackmore, S., Pelquest-Hunt, T., & Urdapilleta, I. (2011). Representation of complexity in wine : Influence of expertise. *Food Quality and Preference*, 22(7), 647-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2011.04.005>

Pedneault, K., & Provost, C. (2016). Fungus resistant grape varieties as a suitable alternative for organic wine production : Benefits, limits, and challenges. *Scientia Horticulturae*, 208, 57-77. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.016>

Pelonnier-Magimel, E. (2018). Caractérisation des eaux-de-vie blanches d'Armagnac : Approche sensorielle de trois cépages [Rapport de stage de Master 2, Bordeaux].

Pelonnier-Magimel, E. (2021). Les vins rouges de Bordeaux élaborés sans dioxyde de soufre : Approches de caractérisation sensorielle et chimique des vins de qualité [Thèse de doctorat, Bordeaux]. <https://theses.hal.science/tel-04055299>

Pelonnier-Magimel, E., Windholtz, S., Pomarède, I. M., & Barbe, J.-C. (2020). Sensory characterisation of wines without added sulfites via specific and adapted sensory profile. *OENO One*, 54(4), Article 4. <https://doi.org/10.20870/oenone.2020.54.4.3566>

Peña y Lillo, M., Latrille, E., Casaubon, G., Agosin, E., Bordeu, E., & Martin, N. (2005). Comparison between odour and aroma profiles of Chilean Pisco spirit. *Food Quality and Preference*, 16(1), 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.01.002>

Percival, D. C., Sullivan, J. A., & Fisher, K. H. (1993). Effect of cluster exposure, berry contact and cultivar on cuticular membrane formation and occurrence of bunch rot (*Botrytis cinerea*) with 3 *Vitis vinifera* L. cultivars. *Vitis*, 32(2), 87-97.

Percival, D. C., Fisher, K. H., & Sullivan, J. A. (1994). Use of Fruit Zone Leaf Removal With *Vitis vinifera* L. cv. Riesling Grapevines. II. Effect on Fruit Composition, Yield, and Occurrence of Bunch Rot (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.). *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(2), 133-140. <https://doi.org/10.5344/ajev.1994.45.2.133>

Péros, J.-P., Berger, G., Portemont, A., Boursiquot, J.-M., & Lacombe, T. (2011). Genetic variation and biogeography of the disjunct *Vitis* subg. *Vitis* (*Vitaceae*) : Biogeography of *Vitis* subg. *Vitis*. *Journal of Biogeography*, 38(3), 471-486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02410.x>

Perry, D., & Hayes, J. (2016). Effects of Matrix Composition on Detection Threshold Estimates for Methyl Anthranilate and 2-Aminoacetophenone. *Foods*, 5(4), 35. <https://doi.org/10.3390/foods5020035>

Pezet, R., & Pont, V. (1992). Differing biochemical and histological studies of two grape cultivars in the view of their respective susceptibility and resistance to *Botrytis cinerea*. *Recent advances in Botrytis research. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen*, 93-98.

Pezet, R., Viret, O., & Gindro. (2005). Plant microbe interaction : The *Botrytis* gray mold of grapes. In A. Hemantaranjan, *Advances in Plant Physiology* (Vol. 7). Scientific Publishers.

Picard, M., Tempere, S., de Revel, G., & Marchand, S. (2015). A sensory study of the ageing bouquet of red Bordeaux wines : A three-step approach for exploring a complex olfactory concept. *Food*

*Quality and Preference*, 42, 110-122.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.01.014>

Pickenhagen, W., Velluz, A., Passerat, J.-P., & Ohloff, G. (1981). Estimation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (FURANEOLA®) in cultivated and wild strawberries, pineapples and mangoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(11), 1132-1134.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740321114>

Pieri, P., & Fermaud, M. (2005). Effects of defoliation on temperature and wetness of grapevine berries. *Acta Horticulturae*, 689, 109-116.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.689.9>

Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M., & Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(1), 73-78.  
<https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.00886.x>

Pinney, T. (1989). *A history of wine in America : From the beginnings to prohibition*. University of California Press.

Planchon, J. E. (1887). Monographie des Ampélidées vraies. *Monographiae phanerogamarum*, 5, 452.  
<https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k982369>

Poisson, L., & Schieberle, P. (2008). Characterization of the Most Odor-Active Compounds in an American Bourbon Whisky by Application of the Aroma Extract Dilution Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5813-5819.  
<https://doi.org/10.1021/jf800382m>

Pouget, R. (2015). *Le phylloxéra et les maladies de la vigne : La lutte victorieuse des savants et des vignerons français, 1850-1900*. Édilivre.

Prudêncio Dutra, M. da C., de Souza, J. F., Viana, A. C., de Oliveira, D., Pereira, G. E., & dos Santos Lima, M. (2018). Rapid determination of the aromatic compounds methyl-anthranilate, 2'-aminoacetophenone and furaneol by GC-MS : Method validation and characterization of grape derivatives. *Food Research International*, 107, 613-618.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.020>

Puentes, C., Joulia, X., Vidal, J.-P., & Esteban-Decloux, M. (2018). Simulation of spirits distillation for a better understanding of volatile aroma compounds behavior : Application to Armagnac production. *Food and Bioprocess Technology*, 112, 31-62.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.08.010>

Quady, A. K., & Guymon, J. F. (1973). Relation of Maturity, Acidity, and Growing Region of 'Thompson Seedless' and 'French Colombard' Grapes to Wine Aroma and Quality of Brandy Distillate. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24(4), 166-175.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.1973.24.4.166>

Raja, M. C., Srinivasan, V., Selvaraj, S., & Mahapatra, S. K. (2015). Versatile and synergistic potential of eugenol : A review. *Pharm. Anal. Acta*, 6(5), 1-6.

Rapp, A., Knipser, W., Engel, L., Ullemeyer, H., & Heimann, W. (1980). Fremdkomponenten im Aroma von Trauben und Weinen interspezifischer Rebsorten 1. Die Erdbeernote. *Vitis*, 13 Pages.  
<https://doi.org/10.5073/VITIS.1980.19.13-23>

Rapp, A., Güntert, M., & Almy, J. (1985). Identification and Significance of Several Sulfur-Containing Compounds in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(3), 219-221.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.1985.36.3.219>

Rapp, A., Versini, G., & Ullemeyer, H. (1993). 2-Aminoacetophenon : Verursachende Komponente der „untypischen Alterungsnote“ („Naphthalinton“, „Hybridton“) bei Wein. *Vitis*, 32(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.5073/vitis.1993.32.61-62>.

Rapp, A., & Versini, G. (1996). Vergleichende Untersuchungen zum Gehalt von Methylantranilat („Foxton“) in Weinen von neueren pilzresistenten Rebsorten und *Vitis vinifera*-Sorten. *Vitis*, 35, 215-216

Rayleigh, Lord. (1916). On convection currents in a horizontal layer of fluid, when the higher temperature is on the under side. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 32(192), 529-546.  
<https://doi.org/10.1080/14786441608635602>

Redl, H. (1988). Ergebnisse zehnjähriger Untersuchungen über die Eignung der Eindrahterziehung für Weitraum-Hochkulturanlagen. *Vitis*, 27, 33-40.

Règlement (CEE) n° 823/87 du Conseil du 16 mars 1987 établissant des dispositions particulières relatives aux vins de qualité produits dans des régions déterminées, (1987).  
<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/afd4e017-1798-4f7e-9e14-b4bd1d12256f/language-fr/format-PDFA1B>

Règlement (UE) n° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil du 17 décembre 2013 portant organisation commune des marchés des produits agricoles et abrogeant les règlements (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n° 1037/2001 et (CE) n° 1234/2007 du Conseil, 347 OJ L (2013).  
<http://data.europa.eu/eli/reg/2013/1308/oj/fra>

Ribèreau-Gayon, P., & Stonestreet, E. (1965). Determination of anthocyanins in red wine. *Bulletin De La Societe Chimique De France*, 9, 2649-2652.

Ribèreau-Gayon, J., Riberau-Gayon, P., & Seguin, G. (1980). Botrytis cinerea in enology. *Biology of Botrytis*, edited by JR Coley-Smith, K. Verhoeff, WR Jarvis (p. 219-250). Academic Press.

Ribèreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology, Volume 1 : The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons.  
<https://doi.org/10.1002/0470010363>

Ribèreau-Gayon, P., Glories, Y., & Maujean, A. (2012). *Traité d'œnologie, Tome 2*. Dunod : La Vigne.

Richardson, J. T. E., & Zucco, G. M. (1989). Cognition and olfaction : A review. *Psychological Bulletin*, 105(3), 352-360.  
<https://doi.org/10.1037/0033-2909.105.3.352>

Rivière, L. (1640). *Praxis medica*. sumptibus O. de Varennes.

Rodin, J. O., Himel, C. M., Silverstein, R. M., Leeper, R. W., & Gortner, W. A. (1965). Volatile Flavor and Aroma Components of Pineapple. L. Isolation and Tentative Identification of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone. *Journal of Food Science*, 30(2), 280-285.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1965.tb00302.x>

- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., & Schneider, R. (2010). Evolution of S-Cysteinylylated and S-Glutathionylated Thiol Precursors during Oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc Musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4406-4413.  
<https://doi.org/10.1021/jf904164t>
- Romanazzi, G., & Droby, S. (2016). Control Strategies for Postharvest Grey Mould on Fruit Crops. In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (p. 217-228). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_11)
- Rosenquist, J. K., & Morrison, J. C. (1989). Some Factors Affecting Cuticle and Wax Accumulation on Grape Berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(4), 241-244.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.1989.40.4.241>
- Rychlik, M., Schieberle, P., & Grosch, W. (1998). Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants.
- Sarig, P., Zutkhi, Y., Lisker, N., Shkelerman, Y., & Ben-Arie, R. (1996). Natural and induced resistance of table grapes to bunch rots. *International Postharvest Science Conference Postharvest 96* 464, 65-70.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.464.6>
- Sasaki, I., & Nagayama, H. (1994).  $\beta$ -Glucosidase from *Botrytis cinerea* : Its Relation to the Pathogenicity of This Fungus. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(4), 616-620.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.58.616>
- Schoonbeek, H., van Nistelrooy, J. G. M., & de Waard, M. A. (2003). Functional Analysis of ABC Transporter Genes From *Botrytis cinerea* Identifies BcatrB as a Transporter of Eugenol. *European Journal of Plant Pathology*, 109(9), 1003-1011.  
<https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000003936.61182.14>
- Schreier, P., Drawert, F., & Winkler, F. (1979). Composition of neutral volatile constituents in grape brandies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(2), 365-372.  
<https://doi.org/10.1021/jf60222a031>
- Scott, K. (2005). Taste Recognition : Food for Thought. *Neuron*, 48(3), 455-464.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.015>
- Ségur, M., Pages, J., & Bertrand, A. (1991). Approche analytique de la dégustation des eaux-de-vie d'armagnac. *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole. Paris: Lavoisier*, 271-278., 26-30 juin 1990. Tec. & doc-Lavoisier.
- Segur, M. C., & Bertrand, A. (1992). La distillation continue armagnacais (continuous Armagnac distillation). *Elaboration et connaissances des Spiritueux (Elaboration and knowledge of spirit beverages)*. Tec. & doc-Lavoisier, Paris, 257-266.
- Ségur, M., & Chassin, M. (2008). Elaboration d'une méthodologie de dégustation adaptée au contrôle produit des appellations Blanche Armagnac et Armagnac. *Les Eaux-de-Vie Traditionnelles d'Origine Viticole*, 153-158.
- Seyb, A., Gaunt, R., Trought, M., Frampton, C., Balasubramaniam, R., & Jaspers, M. (2000). Relationship between debris within grape bunches and *Botrytis* infection of berries. *New Zealand Plant Protection*, 53, 451-451.  
<https://doi.org/10.30843/nzpp.2000.53.3682>



- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.  
<https://doi.org/10.2307/2333709>
- Sheldon, R. M., Lindsay, R. C., & Libbey, L. M. (1972). Identification of volatile flavor compounds from roasted filberts. *Journal of Food Science*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1972.tb05843.x>
- Shepherd, G. M. (2006). Smell images and the flavour system in the human brain. *Nature*, 444(7117), Article 7117.  
<https://doi.org/10.1038/nature05405>
- Shoseyov, O., Bravdo, B. A., Siegel, D., Goldman, A., Cohen, S., Shoseyov, L., & Ikan, R. (1990). Immobilized endo-beta-glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(6), 1387-1390.  
<https://doi.org/10.1021/jf00096a019>
- Shure, K. B., & Acree, T. E. (1994). Changes in the Odor-Active Compounds in *Vitis labruscana* Cv. Concord during Growth and Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(2), 350-353.  
<https://doi.org/10.1021/jf00038a022>
- Siddiqui, H., Qureshi, M. S., & Haque, F. Z. (2020). Biosynthesis of Flower-Shaped CuO Nanostructures and Their Photocatalytic and Antibacterial Activities. *Nano-Micro Letters*, 12(1), 29.  
<https://doi.org/10.1007/s40820-019-0357-y>
- Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2), 201-222.  
<https://doi.org/10.1128/mr.59.2.201-222.1995>
- Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1650-1661.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.02.031>
- Skrzydłowska, E. (2003). Toxicological and Metabolic Consequences of Methanol Poisoning. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 13(4), 277-293.  
<https://doi.org/10.1080/713857189>
- Slaghenaufi, D. (2012). *Contribution à la caractérisation des précurseurs d'arôme glycosylés du bois de chêne* [Thèse de doctorat, Bordeaux 2]. <https://www.theses.fr/2012BOR21987>
- Slegers, A., Angers, P., Ouellet, É., Truchon, T., & Pedneault, K. (2015). Volatile Compounds from Grape Skin, Juice and Wine from Five Interspecific Hybrid Grape Cultivars Grown in Québec (Canada) for Wine Production. *Molecules*, 20(6), 10980-11016.  
<https://doi.org/10.3390/molecules200610980>
- Solomon, G. E. A. (1990). Psychology of Novice and Expert Wine Talk. *The American Journal of Psychology*, 103(4), 495-517.  
<https://doi.org/10.2307/1423321>
- Solomon, G. E. A. (1997). Conceptual Change and Wine Expertise. *Journal of the Learning Sciences*, 6(1), 41-60.  
[https://doi.org/10.1207/s15327809jls0601\\_3](https://doi.org/10.1207/s15327809jls0601_3)

Sourabié, A. M., Spinnler, H.-E., Bonnarne, P., Saint-Eve, A., & Landaud, S. (2008). Identification of a Powerful Aroma Compound in Munster and Camembert Cheeses : Ethyl 3-Mercaptopropionate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4674-4680.  
<https://doi.org/10.1021/jf800307d>

Stamatopoulos, P., Frérot, E., Tempère, S., Pons, A., & Darriet, P. (2014). Identification of a New Lactone Contributing to Overripe Orange Aroma in Bordeaux Dessert Wines via Perceptual Interaction Phenomena. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2469-2478.  
<https://doi.org/10.1021/jf405397c>

Steel, C. C. (2001). Effects of altered UV light and climate change on the susceptibility of grapevines to fungal diseases. *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, 449, 13-15.

Straubinger, M., Knapp, H., Watanabe, N., Oka, N., Washio, H., & Winterhalter, P. (1999). Three Novel Eugenol Glycosides From Rose Flowers, *Rosa Damascena* Mill. *Natural Product Letters*, 13(1), 5-10.  
<https://doi.org/10.1080/10575639908048483>

Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* : A review. *Food Chemistry*, 102(1), 10-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>

Sun, Q., Gates, M. J., Lavin, E. H., Acree, T. E., & Sacks, G. L. (2011). Comparison of Odor-Active Compounds in Grapes and Wines from *Vitis vinifera* and Non-Foxy American Grape Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19), 10657-10664.  
<https://doi.org/10.1021/jf2026204>

Sun, Q., Sacks, G., Lerch, S., & Vanden Heuvel, J. E. (2011). Impact of Shoot Thinning and Harvest Date on Yield Components, Fruit Composition, and Wine Quality of Marechal Foch. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(1), 32-41.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.2010.10023>

Takei, Y., & Yamanishi, T. (1974). Flavor Components of Roasted Almond. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(12), 2329-2336.  
<https://doi.org/10.1080/00021369.1974.10861530>

Tatum, J. H., Nagy, S., & Berry, R. E. (1975). Degradation Products Formed in Canned Single-Strength Orange Juice During Storage. *Journal of Food Science*, 40(4), 707-709.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb00536.x>

Taylor, A. J., Tsachaki, M., Lopez, R., Morris, C., Ferreira, V., & Wolf, B. (2010). Odorant Release from Alcoholic Beverages. In *Flavors in Noncarbonated Beverages* (Vol. 1036, p. 161-175). *American Chemical Society*.  
<https://doi.org/10.1021/bk-2010-1036.ch012>

Teissedre, P.-L. (2018). Composition of grape and wine from resistant vines varieties. *OENO One*, 52(3), 211-217.  
<https://doi.org/10.20870/oenone.2018.52.3.2223>

Tempère, S. (2010). *Métrologie sensorielle olfactive et apprentissage olfactif appliqués à l'œnologie* [Thèse de doctorat, Lyon 2]. <https://theses.fr/2010LYO20111>



- Tempère, S., Cuzange, E., Schaaper, M. H., de Lescar, R., de Revel, G., & Sicard, G. (2014). "Brett character" in wine : Is there a consensus among professional assessors? A perceptual and conceptual approach. *Food Quality and Preference*, 34, 29-36.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.12.007>
- Tempere, S., Schaaper, M. H., Cuzange, E., De Lescar, R., De Revel, G., & Sicard, G. (2016). The olfactory masking effect of ethylphenols : Characterization and elucidation of its origin. *Food Quality and Preference*, 50, 135-144.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.02.004>
- This, P., & Boursiquot, J.-M. (1999). Essai de définition du cépage. *Progrès Agricole et Viticole*, 116(17), 359.
- Thomas, C. S., Marois, J. J., & English, J. T. (1988). The effects of wind speed, temperature, and relative humidity on development of aerial mycelium and conidia of *Botrytis cinerea* on grape. *Phytopathology*, 78(3), 260-265.  
<https://doi.org/10.1094/Phyto-78-260>
- Thomas-Danguin, T., Sinding, C., Romagny, S., El Mountassir, F., Atanasova, B., Le Berre, E., Le Bon, A.-M., & Coureaud, G. (2014). The perception of odor objects in everyday life : A review on the processing of odor mixtures. *Frontiers in Psychology*, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00504>
- Tikunov, Y. M., De Vos, R. C. H., Gonzaález Paramačs, A. M., Hall, R. D., & Bovy, A. G. (2009). A Role for Differential Glycoconjugation in the Emission of Phenylpropanoid Volatiles from Tomato Fruit Discovered Using a Metabolic Data Fusion Approach. *Plant Physiology*, 152(1), 55-70.  
<https://doi.org/10.1104/pp.109.146670>
- Tominaga, T., Guimbertau, G., & Dubourdieu, D. (2003). Role of Certain Volatile Thiols in the Bouquet of Aged Champagne Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1016-1020.  
<https://doi.org/10.1021/jf020755k>
- Tonsbeek, C. H. T., Plancken, A. J., & Weerdhof, T. v. d. (1968). Components contributing to beef flavor. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and its 2,5-dimethyl homolog from beef broth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(6), 1016-1021.  
<https://doi.org/10.1021/jf60160a008>
- Tressl, R., & Bahri, D. (1978). Diphenole und Caramelkomponenten in Röstkaffees verschiedener Sorten. II. 4.  
<https://doi.org/10.1007/BF01136139>
- Tsachaki, M., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2005). Dynamic Headspace Analysis of the Release of Volatile Organic Compounds from Ethanolic Systems by Direct APCI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8328-8333.  
<https://doi.org/10.1021/jf051202n>
- Tsachaki, M., Aznar, M., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2006). Dynamics of flavour release from ethanolic solutions. In *Developments in Food Science* (Vol. 43, p. 441-444). Elsevier.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80104-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80104-4)
- Tsao, R., & Zhou, T. (2000). Antifungal Activity of Monoterpenoids against Postharvest Pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), 113-121.  
<https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712057>

- Ulanowska, M., & Olas, B. (2021). Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol-A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3671. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- Upadhyaya, S., Behara, J., & Tewari, S. N. (2014). Synthesis and Biological Activity of Eugenol-Copper Complex. *Chemical Science Transactions*, 3, 213-20. <https://doi.org/10.7598/cst2014.703>
- Uselmann, V., & Schieberle, P. (2015). Decoding the Combinatorial Aroma Code of a Commercial Cognac by Application of the Sensomics Concept and First Insights into Differences from a German Brandy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 1948-1956. <https://doi.org/10.1021/jf506307x>
- Vail, M. E., & Marois, J. J. (1991). Grape Cluster Architecture and the Susceptibility of Berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 81(2), 188. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-188>
- Vail, M. E., Wolpert, J. A., Gubler, W. D., & Rademacher, M. R. (1998). Effect of Cluster Tightness on *Botrytis* Bunch Rot in Six Chardonnay Clones. *Plant Disease*, 82(1), 107-109. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.107>
- Valdès-Gómez, H. (2007). *Relations entre états de croissance de la vigne et maladies cryptogamiques sous différentes modalités d'entretien du sol en région méditerranéenne* [Thèse de doctorat, École nationale supérieure agronomique (Montpellier ; 1960-2006)]. <https://www.theses.fr/2007ENSA0012>
- Valdès-Gómez, H., Fermaud, M., Roudet, J., Calon nec, A., & Gary, C. (2008). Grey mould incidence is reduced on grapevines with lower vegetative and reproductive growth. *Crop Protection*, 27(8), 1174-1186. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.02.003>
- Valentin, D., Chollet, S., Beal, S., & Patris, B. (2007). Expertise and memory for beers and beer olfactory compounds. *Food Quality and Preference*, 18(5), 776-785. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.01.004>
- Van Den Ouweland, G. A. M., & Peer, H. G. (1975). Components contributing to beef flavor. Volatile compounds produced by the reaction of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and its thio analog with hydrogen sulfide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(3), 501-505. <https://doi.org/10.1021/jf60199a045>
- Van Jaarsveld, F. P., Hattingh, S., & Minnaar, P. (2009). Rapid induction of ageing character in brandy products. Part III, Influence of toasting. <http://hdl.handle.net/10019.1/8426>
- Van Jaarsveld, F. P., Hattingh, S., Minnaar, P., & Blom, M. (2009). Rapid Induction of Ageing Character in Brandy Products - Part I. Effects of Extraction Media and Preparation Conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 30(1). <https://doi.org/10.21548/30-1-1419>
- Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.029>

Vercesi, A., Locci, R., & Prosser, J. I. (1997). Growth kinetics of *Botrytis cinerea* on organic acids and sugars in relation to colonization of grape berries. *Mycological Research*, 101(2), 139-142.  
<https://doi.org/10.1017/S0953756296002286>

Vignault, A., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Fermaud, M., Roudet, J., Zamora, F., & Teissedre, P.-L. (2020). Oenological tannins to prevent *Botrytis cinerea* damage in grapes and musts : Kinetics and electrophoresis characterization of laccase. *Food Chemistry*, 316, 126334.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126334>

Vogt, T., & Jones, P. (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis : Characterization of a supergene family. *Trends in Plant Science*, 5(9), 380-386.  
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01720-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01720-9)

Wade, G. C., & Cruickshank, R. H. (1992a). Rapid Development of Resistance of Wounds on Immature Apricot Fruit to Infection with *Monilinia fructicola*. *Journal of Phytopathology*, 136(2), 89-94.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1992.tb01286.x>

Wade, G. C., & Cruickshank, R. H. (1992b). The Establishment and Structure of Latent Infections with *Monilinia fructicola* on Apricots. *Journal of Phytopathology*, 136(2), 95-106.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1992.tb01287.x>

Walker, N. J., & Manning, D. J. (1976). Components of the musty off-flavour of stored dried lactic casein. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*.

Wang, C., Zhang, J., Chen, H., Fan, Y., & Shi, Z. (2010). Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Tropical Plant Pathology*, 35(3).  
<https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000300001>

Webber, J., & Givvs, J. (2012). Insect dissemination of fungal pathogens of trees. In B. G. Luisa, *Insect-Fungus Interactions* (p. 161-189). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751800-8.50013-6>

Whitaker, J. R. (2018). *Principles of enzymology for the food sciences*. Routledge.

Wickham, H. (2009). *Ggplot2 : Elegant graphics for data analysis*. Springer.  
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>

Williams, A. (1972). Flavour effects of ethanol in alcoholic beverages. *Flavour Industry*, 3(12), 604-607.

Willich, A. F. M. (1821). *The Domestic Encyclopedia: Or, A Dictionary of Facts and Useful Knowledge, Chiefly Applicable to Rural and Domestic Economy: with an Appendix, Containing Additions in Domestic Medicine, and the Veterinary and Culinary Arts: the Whole Illustrated with Numerous Engravings and Cuts* (Vol. 2). Abraham Small.

Willner, B., Granvogl, M., & Schieberle, P. (2013). Characterization of the Key Aroma Compounds in Bartlett Pear Brandies by Means of the Sensomics Concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40), 9583-9593.  
<https://doi.org/10.1021/jf403024t>

Windholtz, S. (2020). *La réduction des sulfites en vinification et l'utilisation de levures à activité bioprotectrice : Approche microbiologique, chimique et sensorielle* [Thèse de doctorat, Bordeaux]. <https://www.theses.fr/2020BORD0289>

Winterhalter, P., Sefton, M. A., & Williams, P. J. (1990). Two-dimensional GC-DCCC analysis of the glycoconjugates of monoterpenes, norisoprenoids, and shikimate-derived metabolites from Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 1041-1048. <https://doi.org/10.1021/jf00094a028>

Withers, S. J., Piggott, J. R., Leroy, G., Conner, J. M., & Paterson, A. (1995). Factors affecting pungency of malt distillates and ethanol-water mixtures. *Journal of Sensory Studies*, 10(3), 273-283. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1995.tb00019.x>

Wolf, T. K., Baudouin, A. M., & Martinez-Ochoa, N. (1997). Effect of floral debris removal from fruit clusters on *Botrytis* bunch rot of Chardonnay grapes. *Vitis*, 36(1), 27-33.

Yamada, T., Aoki, H., Tamura, T., (the Late), & Sakamoto, Y. (1967). Studies on *Camellia sasanqua* Thunb : Part 1. Isolation and Structure of Sasanquin, a New Glycoside of *Camellia sasanqua*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(1), 85-91. <https://doi.org/10.1080/00021369.1967.10858765>

Yamaguchi, K., & Shibamoto, T. (1979). Volatile constituents of *Castanopsis* flower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(4), 847-850. <https://doi.org/10.1021/jf60224a025>

Yobrégat, O. (2018). Introduction to resistant vine types : A brief history and overview of the situation. *OENO One*, 52(3), Article 3. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.3.2220>

Zamora, M. C., Goldner, M. C., & Galmarini, M. V. (2006). Sourness-Sweetness Interactions in Different Media : White Wine, Ethanol and Water\*. *Journal of Sensory Studies*, 21(6), 601-611. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2006.00085.x>

Zhang, J., Ma, S., Du, S., Chen, S., & Sun, H. (2019). Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2611-2620. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03747-0>

Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2003). Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes : Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways. *Cell*, 112(3), 293-301. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00071-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00071-0)

Zhao, Y., Wang, Q., Wu, X., Jiang, M., Jin, H., Tao, K., & Hou, T. (2021). Unraveling the polypharmacology of a natural antifungal product, eugenol, against *Rhizoctonia solani*. *Pest Management Science*, 77(7), 3469-3483. <https://doi.org/10.1002/ps.6400>

Zoecklein, B. W., Wolf, T. K., Duncan, N. W., Judge, J. M., & Cook, M. K. (1992). Effects of Fruit Zone Leaf Removal on Yield, Fruit Composition, and Fruit Rot Incidence of Chardonnay and White Riesling (*Vitis vinifera* L.) Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(2), 139-148. <https://doi.org/10.5344/ajev.1992.43.2.139>

Zoecklein, B. W., Marcy, J. E., & Jasinski, Y. (1997). Effect of Fermentation, Storage Sur Lie or Post-Fermentation Thermal Processing on White Riesling (*Vitis vinifera* L.) Glycoconjugates. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(4), 397-402.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.1997.48.4.397>

---

# Annexes

---



Annexe 1 : Règles concernant les comptes d'âges des eaux-de-vie et correspondance avec les mentions de vieillissement présent sur l'étiquetage

Le contrôle de la conservation et du vieillissement (et de la maturation) a été délégué au BNIA par les pouvoirs publics (Arrêté du 14 mars 2007 relatif au stockage, au suivi des millésimes et au contrôle du vieillissement des eaux-de-vie d'Armagnac, 2007). Ce contrôle est réalisé sur les comptes d'âge, qui représentent le temps de vieillissement des eaux-de-vie. Les comptes d'âges sont régis par des règles :

- Le compte 00, pour les eaux-de-vie à partir du jour de distillation jusqu'au 31 mars qui suit. *NB : l'eau-de-vie « Blanche Armagnac » ne vieillit pas. La production annuelle s'ajoute à la réserve déjà existante, sans individualisation entre les différentes années de production.*
- Le compte 0, pour les eaux-de-vie de compte 00 logées sous bois à partir du 1<sup>er</sup> avril qui suit l'année de la récolte.
- Le compte n, pour les eaux-de-vie de compte n-1 logées sous bois à partir du 1<sup>er</sup> avril qui suit l'année de la récolte (*ie* les armagnac avec n années de vieillissements).
- Et ainsi de suite jusqu'au compte d'âge le plus ancien répertorié par le BNIA. De manière générale, au 1<sup>er</sup> avril suivant l'année de la récolte, les eaux-de-vie sont intégrées au compte d'âge immédiatement supérieur.

Les eaux-de-vie d'Armagnac peuvent également être millésimées. Autrement dit, le producteur peut faire apparaître l'année de la récolte sur l'étiquetage de son produit. Une telle eau-de-vie devra être issue d'une seule année (identifiée) de production (du raisin jusqu'à l'eau-de-vie) et ne pourra être assemblée avec d'autres. L'usage est également d'assembler plusieurs millésimes pour élaborer une eau-de-vie plus complexe. Les producteurs peuvent alors apposer certaines dénominations commerciales sur leurs produits, en fonction des assemblages qu'ils effectuent (Tableau I). À partir de 2010 les professionnels de l'Armagnac ont décidé de simplifier les catégories d'âges liées à ces dénominations commerciales.

Tableau I : Dénominations commerciales des eaux-de-vie en fonction du compte d'âge de la plus jeune eau-de-vie entrant dans l'assemblage. Un Hors d'Âge se distingue d'un XO par la moyenne d'âge des eaux-de-vie entrant dans l'assemblage qui est supérieure à 10 ans et par un âge minimal de l'eau-de-vie la plus jeune généralement plus important que 10 ans.

Catégories d'âges	Compte d'âge minimal
VS (Very Superior) - ***	1
VSOP (Very Superior Old Pale) - *	4
XO (Extra Old)	10
Hors d'Âge	≥ 10



### **Fiche de caractérisation professionnelle et personnelle**

Code dégustateur : .....

Courriel : .....

Téléphone (facultatif) : .....

Ce questionnaire est confidentiel : vos réponses ne seront pas divulguées hors du cadre de l'étude pour laquelle il est prévu

Qu'est ce qui pourrait influencer sur vos capacités olfacto-gustatives ?

**Vous êtes :**

Une femme

Un homme

**Des facteurs culturels :** Quelle est votre nationalité ? .....

**Votre âge :** Quel est votre âge ? .....

**Vos habitudes et compétences professionnelles :** Quelle est votre profession (actuelle ou antérieure si vous êtes retraité) ? .....

Avez-vous suivi des formations à la dégustation ?

CEnologue (Diplôme National d'Enologue)

BTSA Viticulture-CEnologie (Brevet de Technicien Supérieur Agricole)

DUAD (Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation)

Syndicat viticole - Précisez : .....

Stages - Précisez : .....

Club de dégustations

Autres : .....

NON

**Fumez-vous ?**

OUI, je fume des cigarettes, la pipe, le cigare

▶ Précisez si vous fumez :

Tous les jours - Nombre de cigarettes par jour : .....

Souvent

Occasionnellement

▶ Depuis combien de temps fumez-vous ?

J'ai arrêté de fumer - Précisez

▶ Combien de temps avez-vous fumé ? .....

▶ Depuis combien de temps avez-vous arrêté ? .....

Je n'ai jamais fumé

**Êtes-vous confronté aux problèmes de santé suivants de façon chronique ?**

- ▶ Troubles respiratoires, y compris asthme et allergies :
    - OUI - Le(s)quel(s) : .....
    - ▶ Depuis combien de temps (environ) ?
    - ▶ Prenez-vous des médicaments :
      - OUI - Précisez le(s)quel(s) : .....
      - NON
  - NON
- 

- ▶ Affections de la bouche, du nez, de la gorge, y compris un rhume chronique, sinusite chronique :
    - OUI - Laquelle ou lesquelles ? : .....
    - ▶ Depuis combien de temps (environ) ?
    - ▶ Prenez-vous des médicaments :
      - OUI - Précisez le(s)quel(s) : .....
      - NON
  - NON
- 

- ▶ Avez-vous ou avez-vous eu des difficultés bucco-dentaires (bouche sèche, mauvais goût dans la bouche, prothèse ...) ?
  - OUI - Laquelle ou lesquelles ? : .....
  - ▶ Depuis combien de temps (environ) ?
  - ▶ Prenez-vous des médicaments :
    - OUI - Précisez le(s)quel(s) : .....
    - NON
  - ▶ Votre traitement implique t-il des bains de bouche réguliers ?
    - OUI
    - NON
- NON

Questions diverses

**Quel est votre niveau d'étude ?**

- Sans diplôme
- CAP/BEP
- BAC
- BAC + 1
- BAC + 2
- BAC + 3
- BAC + 4
- BAC + 5 et plus

**Quelle est votre situation familiale ?**

- Célibataire
- Concubinage
- Marié(e)
- Pacsé(e)
- Séparé(e)
- Divorcé(e)
- Veuf/Veuve

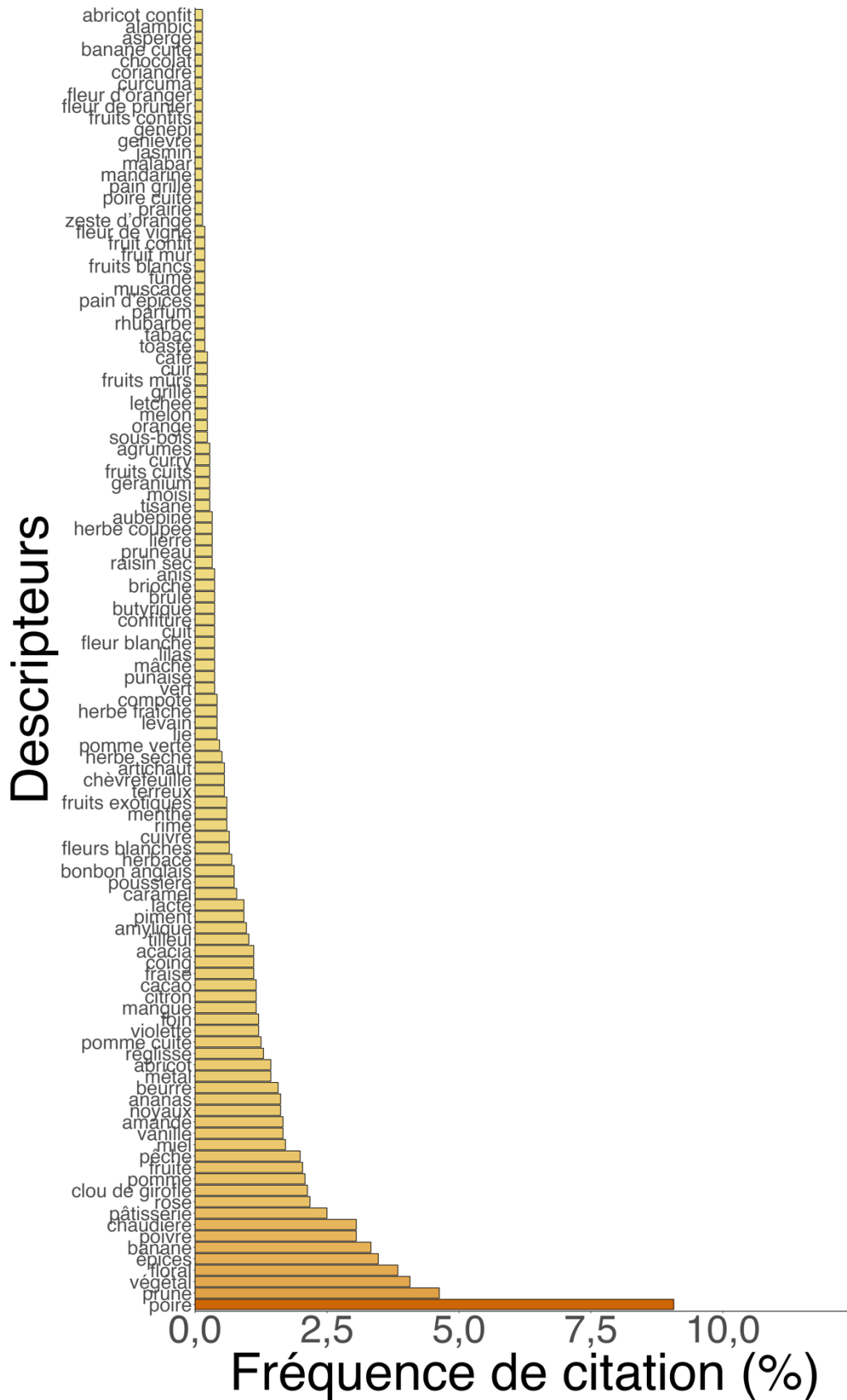
**Êtes-vous confronté à des problèmes de vue ?**

- OUI - Le(s)quel(s) ? :.....
  - ▶ Depuis combien de temps (environ) ?
  - ▶ Avez-vous une correction ? :
    - OUI - Précisez le(s)quel(s) : .....
    - NON
- NON

**Notes et remarques éventuelles :**

.....  
.....  
.....

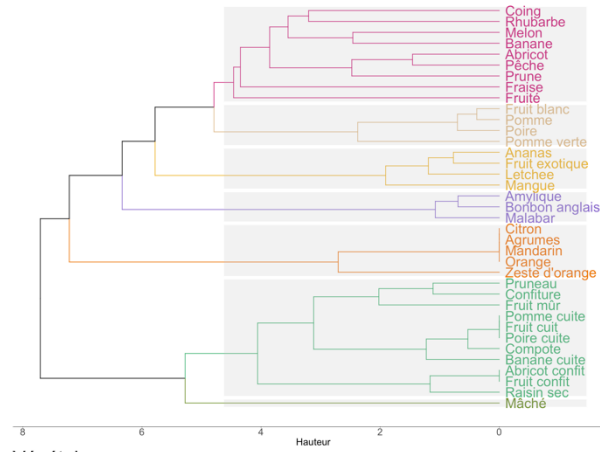
Annexe 3 : Fréquence de citation des 107 descripteurs retenus lors de la seconde étape de réduction du vocabulaire généré par les panélistes avant regroupement



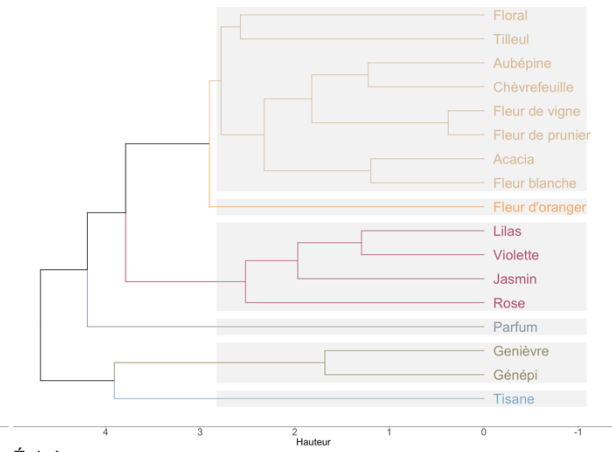


Annexe 5 : Classifications Ascendantes Hiérarchiques obtenues après réponses aux questionnaires par les panélistes. Chaque CAH représente 1 questionnaire

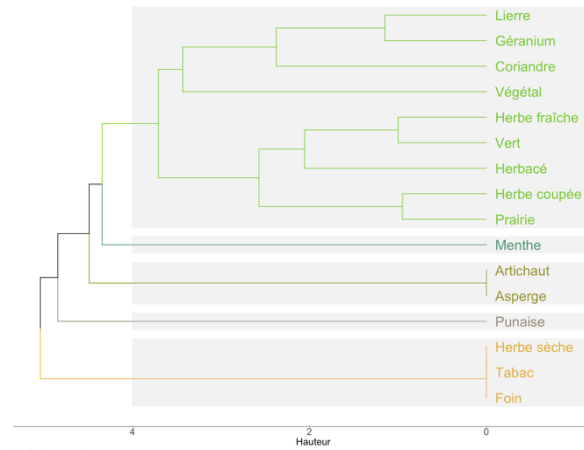
Fruité



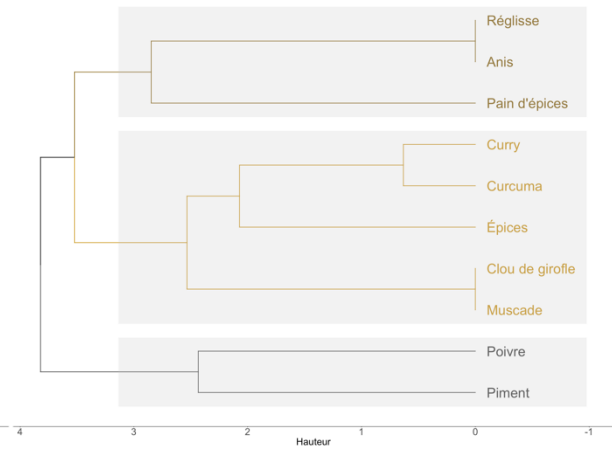
Floral



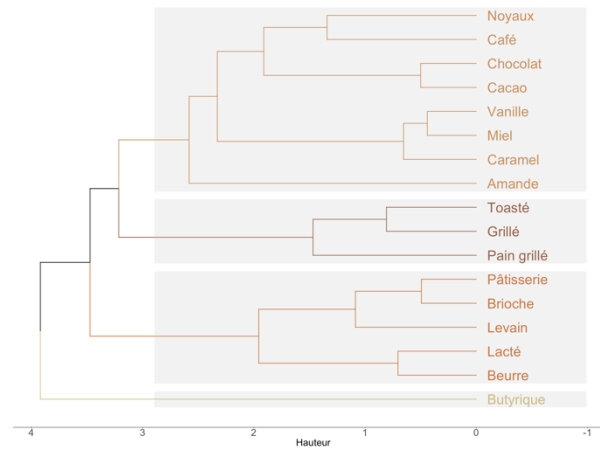
Végétal



Épicé



Pâtisserie

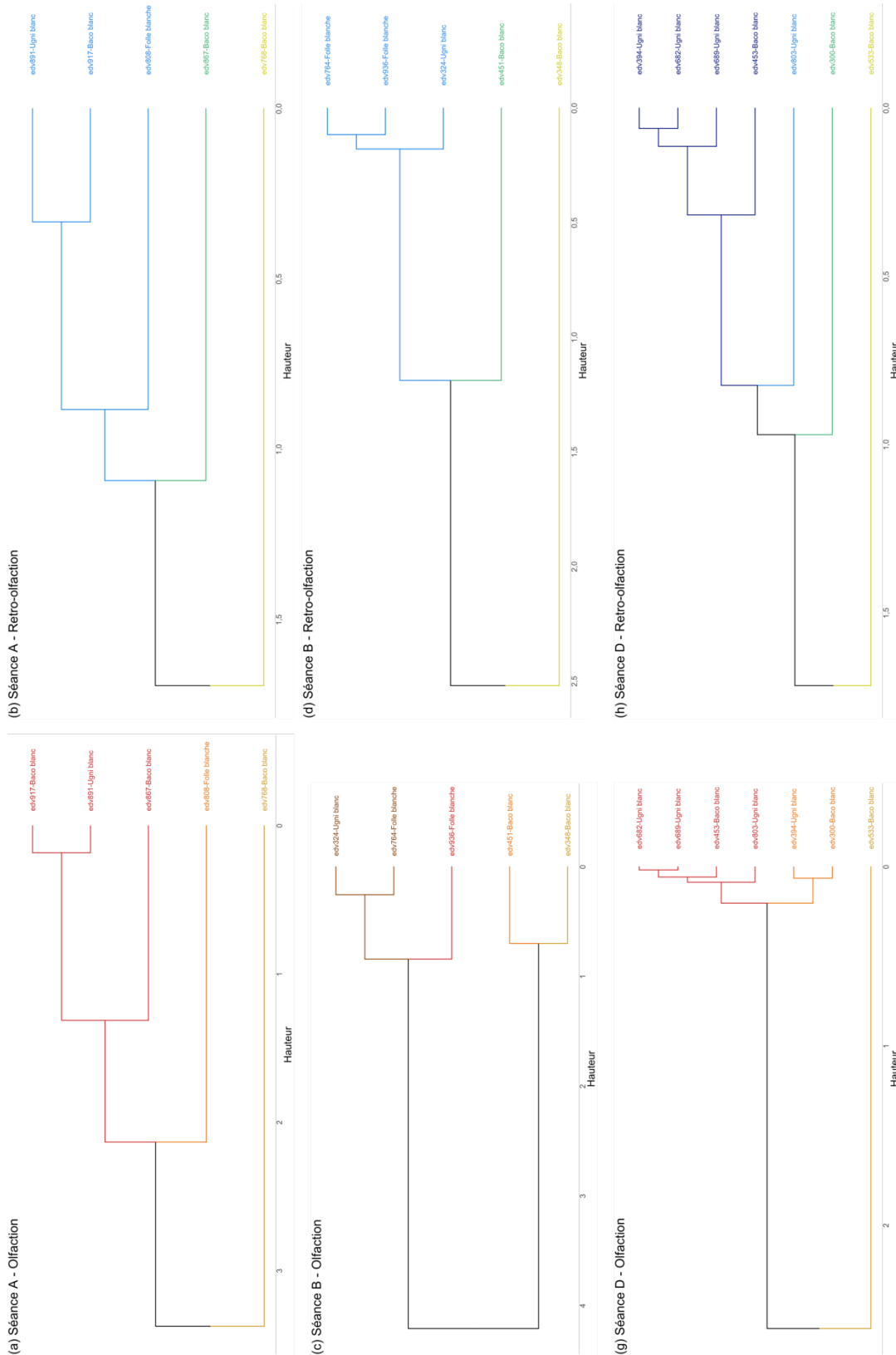


Annexe 6 : Fiche complémentaire à la fiche de dégustation propre aux eaux-de-vie blanches. Elle reprend l'ensemble des descripteurs regroupés autour de ceux présents sur la fiche de dégustation. Ce complément devait servir d'aide aux panélistes


## Annexe : description des familles aromatiques

Agrume :	Zeste d'orange Orange Mandarine Citron	Fleur blanche :	Aubépine Fleur de prunier Fleur de vigne Tilleul
Fruit exotique :	Banane Mangue Melon Litchi Ananas	Fleur capiteuse :	Acacia Chèvrefeuille Fleur d'oranger Jasmin Lilas Rose Violette
Fruit du verger :	Prune Pomme verte Fruit blanc Poire Pomme Pêche Abricot	Végétal frais :	Coriandre Géranium Herbe coupée Herbe fraîche Lierre Prairie Rhubarbe Végétal
Fruit surmûri			
Fruit confit :	Coing Raisin sec Pruneau Abricot confit		
Fruit cuit :	Poire cuite Banane cuite Compote Pomme cuite Confiture	Végétal sec :	Foin Herbe sèche Tabac Tisane
Confiserie :	Amylique Banane chimique Fraise Tagada Bubble gum	Anisé :	Anis Génépi Réglisse
Pâtissier :	Amande Brioche Caramel Levain Miel Pâtisserie Vanille	Epices :	Clou de girofle Curcuma Curry Muscade
Beurré :	Beurre Lacté	Empyreumatique :	Cacao Café Fumé Pain grillé Toasté

Annexe 7 : CAH pour la discrimination des eaux-de-vie blanches dégustées selon les descripteurs consensuels : pour la figure (a) = Agrumes, Beurré, Fruit cuit, Fruit surmûri, Fruit du verger, Fleur capiteuse, Végétal frais ; pour la figure (b) = Beurré, Fruit cuit, Fruit du verger ; pour la figure (c) = Fruit exotique, Confiserie, Végétal frais, Végétal sec, Anisé, Épicé ; pour la figure (d) = Fruit surmûri, Fruit cuit, Confiserie ; pour la figure (g) = Fruit exotique, Fruit surmûri, Confiserie, Fleur capiteuse, Épicé





	<b>INSTRUCTION</b> <b>MICRODISTILLATION</b>	<b>Réf : ILO 5020</b> <b>version 2</b> <b>Page : 1/2</b>
---	--	--

<b>Validation</b> : Kevin DUBOURDIEU	<b>Approbation</b> : Anne KABAKIAN 23/08/2021
--------------------------------------	--

**Objet / Domaine d'application :**

Ce document décrit les modalités pour mettre en place des microdistillations.

La microdistillation est une technique utilisée pour mettre en évidence, par la dégustation et/ou par l'analyse chromatographique, les défauts et qualités potentiels des vins destinés à la distillation.

**1. Matériels utilisés**

- Plaque chauffante
- Erlenmeyer de 2 L à rodage vis
- Erlenmeyer de 500 mL à rodage vis
- Fiole jaugée de 250 mL
- Flaçon marqué 124mL
- Flacons

**2. Produits consommables utilisés**

- pierre ponce
- anti mousse
- sulfate de cuivre


**3. Protocole**

Opérations préliminaires :

☞ Analyse du TAV du vin de distillation

☞ Détermination du volume de vin de distillation à prélever : **VVIN**

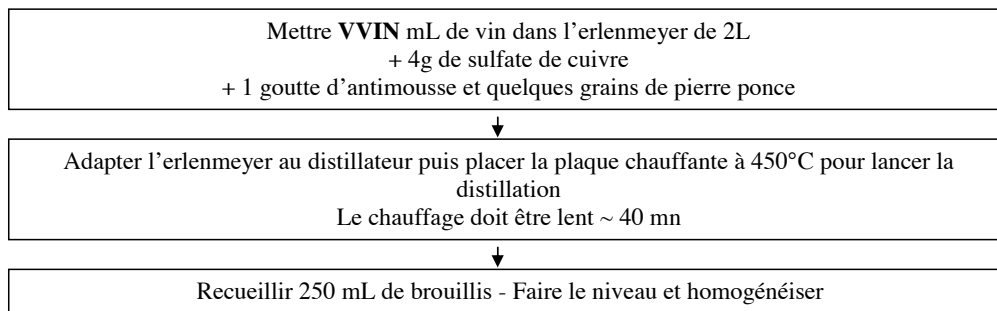
TAV %vol	Volume à distiller	TAV %vol	Volume à distiller	TAV %vol	Volume à distiller	TAV %vol	Volume à distiller	TAV %vol	Volume à distiller	TAV %vol	Volume à distiller
		8.0	877	9.0	779	10.0	700	11.0	645	12.0	591
		8.1	866	9.1	770	10.1	694	11.1	639		
		8.2	855	9.2	761	10.2	688	11.2	634		
		8.3	845	9.3	752	10.3	682	11.3	628		
		8.4	835	9.4	745	10.4	676	11.4	622		
7.5	937	8.5	825	9.5	737	10.5	670	11.5	617		
7.6	925	8.6	815	9.6	730	10.6	665	11.6	612		
7.7	912	8.7	805	9.7	722	10.7	660	11.7	606		
7.8	900	8.8	796	9.8	715	10.8	655	11.8	601		
7.9	889	8.9	787	9.9	707	10.9	650	11.9	596		

	<b>INSTRUCTION</b>  <b>MICRODISTILLATION</b>	<b>Réf : ILO 5020</b>  <b>version 2</b>  <b>Page : 2/2</b>
---	--	--

Essai :

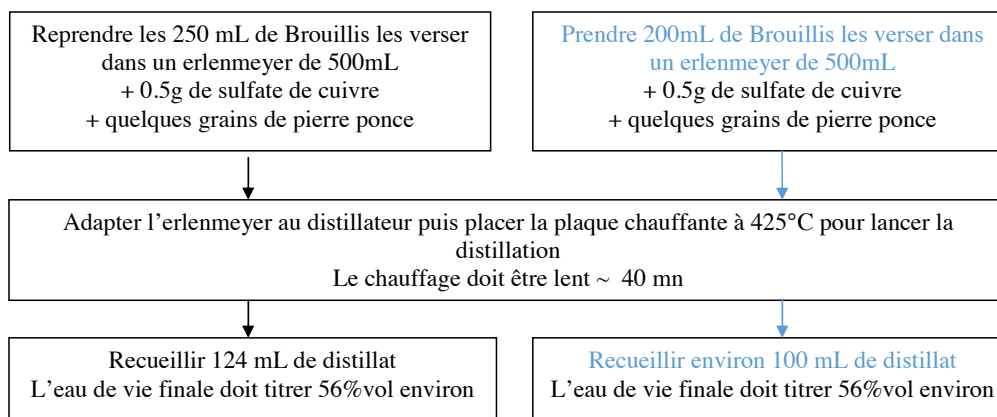
Faire chauffer la plaque à 500°C

**Chauffe du vin**



**\*Réalisation du degré du brouillis (via l'alcoomètre pour ne pas avoir de perte)**  
*Récupérer 50mL de brouillis dans un flacon identifié avec le degré obtenu*

**Chauffe du brouillis**



**4. Eaux de vie**

Une partie peut être destinée à l'analyse chromatographique (stabilisation pendant 12heures à T° ambiante) selon **ILO5012**.

L'autre partie est conservée dans un flacon identifié (Récupérer le fond du godet du DMA).

## L'eugénol, marqueur de qualité du raisin Baco blanc : de sa tolérance à *Botrytis cinerea* à la production d'eau-de-vie blanche d'Armagnac

Le Baco blanc (*Vitis vinifera* x *V. labrusca* x *V. riparia*), seul hybride autorisé dans une production AOC française, est une variété emblématique de l'Armagnac. Les raisins, les vins et les eaux-de-vie dont ils sont issus, sont spécifiquement concentrés en eugénol, un phénylpropène plutôt connu en œnologie pour être apporté par l'élevage en barrique. Molécule aromatique aux multiples propriétés, l'eugénol est en particulier identifié comme un composé antifongique.

Ces travaux ont confirmé l'action de l'eugénol sur *Botrytis cinerea*, par action directe en contact avec le champignon ou par fumigation, en conditions in vitro. Si les  $IC_{50}$  étaient trop élevées (environ 250 ppm) pour identifier dans l'eugénol un facteur majeur de résistance du Baco blanc à la pourriture grise, les  $IC_{10}$  déterminées étaient très proches des concentrations en eugénol dans les pellicules. Plus encore, la cinétique de l'eugénol dans les raisins de Baco blanc, établie au cours du développement de la baie, a permis d'identifier la véraison comme le stade phénologique où l'eugénol était le plus concentré. Le lien étroit que ce phénylpropène entretient avec la maturité et son induction par agression abiotique, a permis de poser l'hypothèse de l'eugénol comme marqueur biochimique de la résistance ontogénétique du Baco blanc à *B. cinerea*.

Plus qu'une simple barrière de défense au vignoble, l'eugénol a pu être identifié dans les eaux-de-vie blanches produites à partir de Baco blanc comme important dans leurs caractéristiques organoleptiques. Bien que non identifié directement dans l'aromatique de ces eaux-de-vie, ce phénylpropène participe sans doute à des phénomènes d'interactions perceptives. Il a été montré l'importance des esters fermentaires et notamment de l'acétate d'isoamyle dans ces interactions. Un travail avec un panel de professionnel a également permis la création d'une fiche de dégustation propre à ce type d'eau-de-vie. Cette approche a initié la discrimination des eaux-de-vie en fonction de la variété avec lesquelles elles sont produites et notamment d'approcher l'originalité aromatique du Baco blanc, dans une diversité de profils existants.

L'eugénol est un composé à valoriser au cours de la vinification des vins de base destinés à la distillation afin de renforcer le caractère spécifique des eaux-de-vie. Par ailleurs, l'existence des deux formes de l'eugénol, libre et liée, a permis d'entrevoir le potentiel encore inexploité. La maturité du raisin et l'utilisation de préparations enzymatiques libératrices d'arômes ont été identifiées comme les facteurs les plus déterminants dans les teneurs retrouvées en eugénol. Une récolte précoce a permis une plus grande concentration dans les vins et les eaux-de-vie. De la même manière, l'utilisation d'enzyme  $\beta$ -glucosidase a induit une augmentation de 35 % de la concentration en eugénol dans les eaux-de-vie. L'efficacité de certaines préparations enzymatiques libératrices d'arômes autres que les  $\beta$ -glucosidase a laissé entrevoir l'existence de plusieurs formes précurseurs de l'eugénol. Si aucune identification parfaite n'a pu être réalisée, le développement de méthodes d'identification putatives ainsi que le dosage de certains glycosides ont été mis en œuvre. Le géoside a pu être détecté comme un précurseur spécifique et majoritaire de l'eugénol dans les raisins de Baco blanc.

**Mots clefs : sensoriel, eugénol, variété, eau-de-vie, chimie analytique, pathologie**

## Eugenol, a quality marker for Baco blanc grapes : from tolerance to *Botrytis cinerea* to the production of Armagnac white spirits

Baco blanc (*Vitis vinifera* x *V. labrusca* x *V. riparia*) is the quintessential grape variety in Armagnac, and the only authorized hybrid grape variety within a French AOC (Appellation d'Origine Contrôlée). Grapes, wines, and spirits derived from this hybrid variety specifically exhibit concentrated levels of eugenol, a phenylpropene well-known in enology for its contribution and presence through barrel aging. Eugenol, an aromatic compound with versatile properties, is notably recognized for its antifungal qualities. This study reaffirms the impact of eugenol on *Botrytis cinerea*, either through direct interaction with the fungi or via fumigation under in vitro conditions. Although the identified  $IC_{50}$  values were relatively high (around 250 ppm) to consider eugenol in Baco blanc as a primary factor for grey mold resistance, the identified  $IC_{10}$  values were near the eugenol concentration in grape skins. Furthermore, an analysis of eugenol kinetics in Baco blanc grapes throughout their development revealed "véraison" as the phenological stage with the highest eugenol concentration. The strong connection that this phenylpropene has with the maturation process and its inducibility by abiotic stress allows us to propose the hypothesis of eugenol as a biochemical marker of the ontogenetic resistance of Baco blanc to *B. cinerea*. Eugenol has been identified in white spirits produced from Baco blanc as essential to their sensory characteristics, in addition to serving as a defensive barrier in the vineyard. While not directly discernible in the aromatics of these spirits, this phenylpropene undoubtedly plays a role in perceptual interactions. Studies with a panel of Armagnac professionals have also led to the creation of a specific tasting sheet for this type of wine spirits, facilitating the discrimination of spirits based on the variety used, and especially enhancing the understanding of Baco blanc's aromatic uniqueness among a range of existing profiles. Eugenol is a compound which deserves attention during the vinification of wines intended for distillation. The presence of both free and bound forms of eugenol hints at unexplored potential. Grape maturity and the use of enzyme preparations, used for aromas release, have been identified as crucial factors influencing eugenol levels. Early harvesting results in a higher eugenol concentration in wines and spirits. Similarly, the use of the enzyme  $\beta$ -glucosidase led to a 35% increase in eugenol concentration in spirits. The effectiveness of various enzymatic preparations, dedicated for aromas release, beyond  $\beta$ -glucosidase, suggests the presence of multiple eugenol forms. While a perfect identification remains to be achieved, this work has pioneered putative identification methods and the examination of certain glycosides. Among them, geoside stands out as a specific and significant precursor of eugenol in Baco blanc grapes. The geoside was detected as a specific precursor and the majority of eugenol in Baco blanc grapes.

**Keywords : sensorial analysis, eugenol, cultivar, wine spirit, analytic chemistry, pathology**

---

Unité Mixte de Recherche Œnologie

[ŒNOLOGIE, UMR 1366, ISVV, 210 Chemin de Leysotte, 33 882 Villenave d'Ornon]