



HAL
open science

Rôle des acides aminés et macromolécules dans les perceptions gustatives de vins blancs issus de quatre cépages du Sud-Ouest de la France : analyses chimiques et sensorielles croisées

Auriane Figué

► **To cite this version:**

Auriane Figué. Rôle des acides aminés et macromolécules dans les perceptions gustatives de vins blancs issus de quatre cépages du Sud-Ouest de la France : analyses chimiques et sensorielles croisées. Chimie organique. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSEP152 . tel-04916745

HAL Id: tel-04916745

<https://theses.hal.science/tel-04916745v1>

Submitted on 28 Jan 2025

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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à Toulouse INP

Rôle des acides aminés et macromolécules dans les perceptions gustatives de vins blancs issus de quatre cépages du Sud-Ouest de la France: analyses chimiques et sensorielles croisées

Thèse présentée et soutenue, le 13 décembre 2024 par

Auriane FIGUE

École doctorale

SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse

Spécialité

Chimie-Biologie-Santé

Unité de recherche

LCA - Laboratoire de Chimie Agro-industrielle

Thèse dirigée par

Frédéric VIOLLEAU

Composition du jury

M. Christian CHERVIN, Président, Toulouse INP

M. Jean-Christophe BARBE, Rapporteur, Université de Bordeaux

Mme Ana ESCUDERO, Rapporteuse, Universidad de Zaragoza

M. Jérémie PAROT, Examineur, SINTEF

M. Frédéric VIOLLEAU, Directeur de thèse, EI PURPAN

Membres invitées

Mme Mariane GOSSET, EI PURPAN

Résumé

La diversité des terroirs et le savoir-faire des vinificateurs confèrent aux vins du Sud-Ouest une identité sensorielle unique. Le vin, matrice complexe, est composé de multiples molécules influençant ses perceptions gustatives et olfactives. Si les acides aminés sont connus pour être des précurseurs de molécules volatiles telles que les thiols, contribuant à l'arôme des vins, leur rôle sur les perceptions gustatives reste peu étudié. À l'inverse, les macromolécules telles que les protéines, polyphénols et polysaccharides sont reconnues pour moduler le goût, particulièrement dans les vins rouges. Cependant, leur taille et leur diversité structurale rendent leur analyse complexe.

En raison du nombre limité d'études portant sur les cépages du Sud-Ouest, ce travail de thèse avait pour premier objectif de comprendre comment les acides aminés, reconnus pour leur influence sur les perceptions sensorielles d'autres aliments, impactent le goût des vins blancs du Sud-Ouest en prenant l'exemple de quatre cépages autochtones : le Len de l'el, le Mauzac, le Colombard et le Gros Manseng. Les résultats montrent que les profils aminés des vins obtenus par HPLC varient selon les cépages, avec des concentrations différenciées en proline et en acide glutamique, influençant ainsi les perceptions gustatives. La proline, en particulier, semble accroître la sensation de sucrosité dans les vins blancs, mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer son rôle.

Dans un second temps, le rôle des macromolécules, telles que les protéines, polyphénols et polysaccharides, a été étudié afin de mieux comprendre les différences gustatives des vins blancs du Sud-Ouest. Le défi consistait à sélectionner les vins exclusivement selon leurs propriétés gustatives, grâce à l'utilisation d'un pince-nez. Il s'agissait également d'adopter une approche analytique adaptée à la complexité de cette matrice : l'AF4. Nos résultats ont révélé des différences significatives entre les cépages Colombard et Mauzac, avec des compositions dominées respectivement par des protéines et mannoprotéines pour les vins de Colombard, et des mannoprotéines et polysaccharides pour les vins de Mauzac. Pour évaluer l'impact spécifique de ces macromolécules sur le goût, l'ultrafiltration a été employée. Les fractions obtenues ont ensuite été soumises à la dégustation par un panel entraîné. Toutefois, leur rôle spécifique sur les perceptions gustatives n'a pas été établi de façon exhaustive en raison des nombreuses limites inhérentes aux méthodes d'analyses retenues.

La teneur en protéines de ces deux cépages les distingue l'un par rapport à l'autre, mais l'AF4 présente une limite en ne séparant les macromolécules que par taille, entraînant l'élution simultanée de composés de même taille. Pour surmonter cet écueil, un système AF4-UHPLC permettant une séparation en deux dimensions : la taille (AF4) et l'hydrophobicité (UHPLC), a été développé. Ce dispositif novateur, évitant la perte d'échantillons grâce à l'utilisation de cartouches a été validé puis a permis de générer une carte d'identité spécifique pour chaque vin. Toutefois, ces analyses sont qualitatives, et un étalonnage via des standards serait nécessaire pour une quantification précise. L'amélioration future pourrait inclure un couplage avec un détecteur de spectrométrie de masse.

Abstract

The diversity of terroirs and the expertise of winemakers confer a unique sensory identity to wines from the South-West of France. Wine, a complex matrix, is composed of multiple molecules influencing its gustatory and olfactory perceptions. While amino acids are known to be precursors of volatile molecules such as thiols, contributing to wine aroma, their role in taste perception remains underexplored. In contrast, macromolecules such as proteins, polyphenols, and polysaccharides are recognized for modulating taste, particularly in red wines. However, their size and structural diversity make their analysis complex.

Due to the limited number of studies on South-Western grape varieties, the primary objective of this thesis was to understand how amino acids, known for their influence on the sensory perceptions of other foods, impact the taste of white wines from the South-West, using four indigenous grape varieties as examples: Len de l'el, Mauzac, Colombard, and Gros Manseng. The results show that the amino acid profiles of the wines, obtained by HPLC, vary according to grape variety, with differentiated concentrations of proline and glutamic acid, thereby influencing gustatory perceptions. Proline, in particular, seems to enhance the perception of sweetness in white wines, though further studies are needed to confirm its role.

Subsequently, the role of macromolecules, such as proteins, polyphenols, and polysaccharides, was investigated to better understand the gustatory differences in white wines from the South-West. The challenge was to select wines solely based on their gustatory properties, using a nose clip. It also involved adopting an analytical approach suited to the complexity of this matrix: AF4. Our results revealed significant differences between the Colombard and Mauzac grape varieties, with compositions dominated respectively by proteins and mannoproteins for Colombard wines, and mannoproteins and polysaccharides for Mauzac wines. To assess the specific impact of these macromolecules on taste, ultrafiltration was employed. The obtained fractions were then submitted for tasting by a trained panel. However, the specific role of these macromolecules in taste perception could not be comprehensively established due to the numerous limitations inherent in the chosen analytical methods.

The protein content of these two grape varieties distinguishes one from the other, but AF4 has a limitation as it separates macromolecules only by size, leading to the simultaneous elution of similarly sized compounds. To overcome this challenge, an AF4-UHPLC system enabling two-dimensional separation—by size (AF4) and hydrophobicity (UHPLC)—was developed. This innovative setup, which avoids sample loss through the use of cartridges, was validated and allowed for the generation of a specific identity map for each wine. However, these analyses are qualitative, and calibration with standards would be necessary for accurate quantification. Future improvements could include coupling with a mass spectrometry detector.

*À la mémoire de mes grands-parents,
Robert Figué et Marthe Mousquès,
dont l'amour et le soutien ont marqué
chaque étape importante de ma vie.*

Remerciements

Cette thèse aurait été bien différente sans le soutien inestimable de nombreuses personnes qui m'ont accompagné tout au long de ces trois années, et à qui j'exprime toute ma gratitude.

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur Frédéric Violleau, directeur de la recherche à l'École d'ingénieurs de PURPAN, pour la confiance qu'il m'a témoignée en me confiant cette thèse. Je lui suis profondément reconnaissante pour ses précieux savoirs et ses conseils avisés, ainsi que pour les nombreuses opportunités qu'il m'a offertes, notamment la participation à des congrès internationaux. Merci également pour son écoute bienveillante tout au long de cette période. Qu'il reçoive ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à ma co-encadrante de thèse, Marianne Gosset, pour son accompagnement attentif et sa disponibilité. Reprendre une thèse en cours de route n'est jamais chose aisée, et je la remercie vivement de m'avoir accordé sa confiance et soutenu tout au long de ce parcours. Sa patience, sa bienveillance et sa bonne humeur ont été d'un grand encouragement. Pour tout cela, je lui témoigne ma profonde gratitude.

Merci à Madame Ana Escudero, Professeur à l'Université de Saragosse (Espagne) et Monsieur Jean Christophe Barbe, Professeur à l'ISVV à Bordeaux, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. J'en suis très honorée et les remercie vivement.

A Monsieur Christian Chervin, Professeur à l'ENSAT (Toulouse), ainsi que Monsieur Jérémie Parot, chercheur au SINTEF (Trondheim, Norvège) d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail de thèse en tant qu'examineurs. Je leur suis très reconnaissante.

Mes remerciements s'adressent bien évidemment à toute l'équipe du laboratoire d'analyses physico-chimiques de l'École d'Ingénieurs de Purpan. Dans un premier temps, je voudrais remercier Flor, Marie et Michael, pour leur accompagnement et leur soutien tout au long de ces trois années de thèse. Leur patience, notamment lors des moments où nos paillasses étaient quelque peu désorganisées, a été précieuse. Merci également pour leur rigueur dans le maintien d'un environnement de travail propre et

optimal, qui nous a permis d'avancer dans les meilleures conditions. Et surtout merci pour tous ces moments de partage pendant ces 3 ans.

Je remercie ma stagiaire Eloïse pour sa contribution à ces travaux de thèse.

Je tenais à remercier la superbe team FFF. Marie H, merci pour tes conseils avisés, ta patience, ta bienveillance et ton écoute précieuse, tant sur le plan personnel que professionnel. Je te suis reconnaissante d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses interrogations, même lorsque je venais frapper à ta porte à l'improviste, ainsi que pour tes relectures attentives. Mireille, ma « maman du laboratoire », je te remercie infiniment pour ton soutien dès le début de ma thèse, en particulier pour m'avoir aidée à maîtriser l'AF4. Ta capacité d'écoute, que ce soit sur des sujets professionnels ou personnels, m'a été d'une grande aide. Je te remercie aussi pour nos échanges enrichissants, les délicieux gâteaux que tu as préparés et, surtout, pour les éclats de rire que nous avons partagés. Je souhaite également mentionner les petites jeunes de la plateforme : Léa, pour nos conversations et les nombreux moments passés autour de verres parfois un peu trop arrosés, ainsi que pour les souvenirs créés lors des congrès et de nos repas entre amis. Laura, je te remercie pour les moments agréables vécus à la fin de ma thèse et pour toutes les rigolades après le travail. Je te passe le relais et te souhaite tout le meilleur pour la suite. Enfin, Aurélien, ou devrais-je dire « Tac » (même si je ne sais plus qui est qui), merci d'avoir été mon binôme durant ces trois années. Merci pour tous tes conseils, ces fous rires, ton humour si particulier, nos karaokés spécial années 80. Surtout, merci d'avoir été présent lors de moments difficiles de cette thèse.

Je voudrais également remercier toute l'équipe d'enseignants-chercheurs et ingénieurs de recherche, Ana, Cyndel, Axel, Nicolas, Léa V, Loubnah ainsi les doctorants, Anais V, Jean B, Thomas B, Julien C, Ronan D, Maria ainsi que Marie D, ancienne post-doctorante au sein de l'école d'ingénieur de PURPAN. Merci pour tous ces bons moments, ces partages et pour votre aide.

Une petite mention spéciale pour le petit open-space : Amélie, William, Maylis, Dominique et Ezequiel. Merci pour tous ces instants passés ensemble, pour votre bonne humeur, les sessions rugby flag, les

verres après le travail, les différents repas organisés mais surtout pour tous ces moments de rires. Alors merci à vous, les amis, d'avoir rendu cette thèse plus légère.

Je souhaite également remercier toutes mes amies Paloises (Léa, Clara et Axelle) et d'enfance (Floriane, Julie, Laura, Lynn et Marie) m'ayant soutenu pendant ces trois années.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier mes proches.

Un immense merci à mes grands-parents, Papi Bernard et Mamie Reine, qui ont toujours été présents à chaque moment important de ma vie et ont toujours veillé sur moi avec soin et attention.

Merci à mes oncles, tantes, cousins et cousines pour leur encouragement constant tout au long de ma vie.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à mes parents, Patricia et Jean-François, pour leur soutien indéfectible tout au long de cette thèse et bien au-delà. Merci pour votre amour, votre patience et vos encouragements constants qui m'ont permis de traverser cette période avec plus de sérénité. Merci d'avoir toujours cru en moi.

Je tiens également à remercier chaleureusement mon frère Valentin et ma belle-sœur Camille pour le temps précieux qu'ils ont consacré à relire et corriger mes travaux. Votre appui quotidien a été inestimable. Et bien sûr, un mot spécial pour ma nièce Diane, véritable petit rayon de soleil, qui a su apporter une touche de légèreté et de bonheur en cette fin de thèse.

Merci également à mes beaux-parents, Didier et Odile, mes belles sœurs Coralie et Sarah, mon beau-frère Arnaud, sans oublier ma nièce Hortense, pour leur soutien, leur gentillesse et à leur intérêt porté à mon travail.

Et pour finir, merci à toi Hugo, ces trois années de thèse n'auraient définitivement pas été les mêmes sans ton amour, tes encouragements, ta patience, ta bienveillance et ton réconfort.

Valorisation des travaux de thèse

Publications scientifiques

Figué A, Gaucher M, Hennetier M, Gosset M, Violleau F (2024). AF4-UHPLC: Two-dimensional separation of macromolecules in four white wines from South-western France. *Journal of Chromatography A*, 1629 (acceptée). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465456>

Figué A, Gaucher M, Hennetier M, Gosset M, Violleau F (2024). Differentiation of Monovarietal White Wines from Four Autochthonous Grape Varieties of Southwest France: Gustatory (Flash profile) and Macromolecular Profiling (Asymmetrical Flow-Field Flow Fractionation). *Food Chemistry*. (en révision)

Figué A, Violleau F, Gosset M (2024). Wine amino acid profile: Factors that affect the taste of white wines from four autochthonous grape varieties from Southwest France. *Oeno-one*. (en révision)

Communications orales

International congress: *22th International Symposium on Field-and Flow-Based Separations 12-14th September 2022 University of California, Riverside* "Use of Asymmetrical Flow-Field-Flow Fractionation to characterize the macromolecular profiles of whites wines from Southwest of France", **Figué A**, Gaucher M, Hennetier M, Violleau F.

International congress: *24th International Symposium on Field-and Flow-Based Separations 3-6th June 2024 Cité des congrès, Nantes* "Differentiation of Monovarietal White Wines from Four Autochthonous Grape Varieties of Southwest France: Gustatory (Flash profile) and Macromolecular Profiling (Asymmetrical Flow-Field Flow Fractionation-UV-MALS. **Figué A**, Gaucher M, Hennetier M, Gosset M, Violleau F.

Journée scientifique du G4F, Nantes, France, 03/06/2022 : "Impact of amino acids, peptides and proteins on taste perceptions of white wines from Southwest". **Figué A**, Violleau F.

Journée scientifique du G4F, Nantes, France, 05/06/2022: "Use of Asymmetrical Flow-Field-Flow Fractionation to characterize the macromolecular profiles of whites wines from Southwest of France". **Figué A**, Violleau F.

Posters

International congress: *24th International Symposium on Field-and Flow-Based Separations 3-6th June 2024 Cité des congrès, Nantes* "AF4-UHPLC: Two-dimensional separation of macromolecules in four white wines from South-western France". **Figué A**, Gaucher M, Hennetier M, Gosset M, Violleau F. (Best poster award)

45e congrès mondial de la vigne et du vin, 14-18th October 2024, Dijon. « Differentiation of monovarietal wines from 4 autochthonous grape varieties combining sensory (Flash Profile) and analytical (AF4) studies". **Figué A**, Hennetier M, Gaucher M, **Gosset M**, Violleau F.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	I
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES ANNEXES.....	VII
INTRODUCTION GENERALE	1
PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
LES ACIDES AMINES ET MACROMOLECULES DU VIN BLANC : ETUDE DE LEUR INFLUENCE SUR LE GOUT ET METHODES DE CARACTERISATION SENSORIELLES ET ANALYTIQUES	6
I. Les cépages du Sud-Ouest	6
1. Notion de cépage	6
2. Importance du terroir	7
2.1. Caractéristiques géographiques.....	7
2.2. Propriétés pédologiques	7
3. Principaux cépages utilisés dans l'élaboration des vins blancs typiques du Sud-Ouest.....	8
3.1. Cépages utilisés pour l'élaboration des vins blancs des côtes de Gascogne	8
3.1.1. Colombard	8
3.1.2. Gros manseng	9
3.2. Cépages utilisés pour l'élaboration des vins blancs de Gaillac	9
3.2.1. Len de l'el	9
3.2.2. Mauzac.....	10
II. Le goût du vin : influence de sa composition macromoléculaire	11
1. Le goût, un processus complexe	11
1.1. Diversité des composés du goût.....	11
1.1.1. Composés responsables de la saveur sucrée	12
1.1.2. Composés responsables de la saveur amère.....	12
2. Composition du vin et influence sur les perceptions sensorielles	14
III. Acides aminés des moûts et des vins : propriétés, influence sur les perceptions sensorielles du vin et méthode de caractérisation analytique	15
1. Propriétés des acides aminés	15
1.1. Structure.....	15
1.2. Propriétés physico-chimiques	16
1.3. Classification des acides aminés	17
1.4. Rôle et importance des acides aminés dans le goût des aliments.....	17
2. Les acides aminés dans les moûts et les vins	19
2.1. Facteurs influençant la composition en acides aminés dans les moûts et dans les vins	20
2.2. Caractérisation des acides aminés par Chromatographie Liquide à Haute Performance	22
2.2.1. Principe de l'HPLC.....	22
2.2.1.1. Appareillage	23
2.2.1.1.1. Phase stationnaire dite inversée.....	23
2.2.1.1.2. Phase mobile	23

2.2.2.	Détecteurs couplés à HPLC	24
2.2.2.1.	Détecteur UV-visible	24
2.2.3.	Préparation préalable des échantillons : Etape de dérivation	25
IV.	Macromolécules des vins blancs : influence sur la perception gustative et méthode de caractérisation analytique.....	26
1.	Les macromolécules majoritaires des vins Blancs.....	27
1.1.	Les composés phénoliques des vins blancs.....	27
1.1.1.	Acides phénoliques	28
1.1.1.1.	Structure	28
1.1.1.2.	Acides hydroxycinnamiques.....	28
1.1.1.3.	Acides hydroxybenzoïques.....	29
1.1.2.	Flavonoïdes.....	30
1.1.3.	Tanins.....	32
1.1.3.1.	Tanins condensés	32
1.2.	Les polysaccharides des vins blancs	32
1.3.	Les protéines des vins blancs	33
2.	Influence sur la perception gustative	35
2.1.	Composés phénoliques : Tanins	35
2.2.	Les polysaccharides	36
2.3.	Les protéines	38
3.	L'AF4, une méthode prometteuse de caractérisation des macromolécules du vin.....	38
3.1.	Le Fractionnement par couplage Flux-Force	39
3.1.1.	Principe	39
3.1.2.	Fractionnement par Flux-Force Asymétrique	41
3.1.2.1.	Appareillage	41
3.1.2.2.	Différents modes d'éluion	43
3.1.2.2.1.	Mode normal ou Brownien	43
3.1.2.2.2.	Mode stérique.....	44
3.1.2.2.3.	Mode hyperlayer	45
3.1.2.3.	Principe de fonctionnement de l'AF4.....	46
3.1.2.3.1.	Injection et Focus de l'échantillon	46
3.1.2.3.2.	Etape de focus et relaxation	47
3.1.2.3.3.	Etape d'éluion	48
3.1.2.4.	Théorie de la Flow-FFF	49
3.1.2.4.1.	Rapport de rétention et temps de rétention (R_L et t_R)	49
3.1.2.5.	Les détecteurs couplés à l'AF4.....	53
3.1.2.5.1.	Détecteur à Fluorescence	53
3.1.2.5.2.	Détecteur MALS	53
V.	Évaluation gustative des vins blancs : méthodes et limites	55
VI.	Conclusion.....	56

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS SCIENTIFIQUES 57

DEUXIEME PARTIE : CONTEXTE EXPERIMENTAL GENERAL 62

I.	Réactifs et solvants utilisés	62
II.	Caractéristiques des vins de l'étude	63
1.	Analyses des paramètres œnologiques classiques	63
2.	Dosage du SO ₂ libre et total : Titromatic ©.....	64
3.	Dosage de l'azote ammoniacal et alpha aminé par méthode colorimétrique à 340 nm : l'analyse multiparamétrique Gallery©	64
4.	Traitement des données	64
III.	Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest.....	65
1.	Détermination des acides aminés libres dans le vin par HPLC	65
1.1.	Méthode de dérivation.....	65

1.2.	Instrumentation	66
1.3.	Traitement des données	66
2.	Analyse de l'impact de deux acides aminés sur les perceptions gustatives des vins blancs du Sud-Ouest de la France	67
2.1.	Conditions d'organisation de la séance d'analyse sensorielle.....	67
2.2.	Mise en place de l'essai sensoriel	67
2.3.	Traitement des données : test triangulaire.....	68
IV.	Différenciation sensorielle et caractérisation macromoléculaire des vins blancs de l'étude	68
1.	Echantillons	68
2.	Caractérisation gustative des vins blancs du Sud-Ouest par Profil Flash	69
3.	Caractérisation du profil macromoléculaire par Fractionnement par Flux-Force Asymétrique.....	70
3.1.	Instrumentation	70
3.2.	Collecte des fractions de vins par AF4.....	71
3.3.	Détermination de la masse molaire par MALS/dRI	71
3.4.	Identification des macromolécules présentes dans les différentes fractions par SDS-PAGE.....	72
4.	Ultrafiltration des vins	72
V.	AF4-UHPLC : Séparation bidimensionnelle de macromolécules	74
1.	Echantillons	74
2.	Instrumentation.....	74
2.1.	Analyse 1D : AF4 (fractionnement selon la taille).....	75
2.2.	Analyse bidimensionnelle par UHPLC	75
2.2.1.	Concentration des fractions AF4 sur cartouches	76
2.2.2.	Elution des composés sur colonne UHPLC	76
2.3.	Traitement des données 2D.....	76

TROISIEME PARTIE : CONTRIBUTION DES ACIDES AMINES AUX PROFILS SENSORIELS DES VINS BLANCS DU SUD-OUEST 79

CONTEXTE ET OBJECTIFS..... 79

CHAPITRE 1 : ETUDE PRELIMINAIRE DES VINS ETUDIES : ANALYSE DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES 80

I.	Du vignoble à la cave : Les éléments clés de l'élaboration des vins du Sud-Ouest	80
II.	États de connaissances des techniques analytiques mesurant paramètres physico-chimiques des vins ...	81
1.	Détermination des paramètres œnologiques standards	82
1.1.	Spectrométrie à transformée de Fourier.....	82
1.2.	Dosage du SO ₂ libre et total : Titromatic®	83
1.3.	Dosage de l'azote ammoniacal et alpha aminés : l'analyse multiparamétrique Gallery®	83
III.	Caractérisation des paramètres physico-chimique des vins : influence de différents facteurs.....	83
1.1.	Influence du cépage	84
1.2.	Influence du millésime.....	88
1.3.	Effet du stade de prélèvement de l'échantillon	89
IV.	Conclusion.....	89

CHAPITRE 2 : AMINOGRAMME DES VINS BLANCS MONOVARIETAUX ETUDIES : CLASSIFICATION PAR CEPAGE, REGION DE PRODUCTION ET MILLESIME 90

I.	Influence des acides aminés sur la caractérisation des vins : facteurs et études comparatives	90
II.	Etude du profil aminé de vins issus de 4 cépages autochtones du Sud-Ouest de la France	92
1.1.	Effet du millésime.....	95
1.2.	Effet du cépage	96
III.	Conclusion.....	101

CHAPITRE 3 : IMPACT DE LA PROLINE ET DE L'ACIDE GLUTAMIQUE SUR LES PERCEPTIONS GUSTATIVES DES VINS BLANCS DU SUD-OUEST 102

I.	État des connaissances de l'impact de la proline et l'acide glutamique sur les perceptions gustatives des vins	102
II.	Étude de l'impact de la proline et de l'acide glutamique sur les perceptions gustatives des vins de l'étude	103
CONCLUSION.....		106
 QUATRIEME PARTIE : SPECIFICITES GUSTATIVES (PROFIL FLASH) ET PROFILAGE MACROMOLECULAIRE (AF4 – UV-MALS-DRI) DES VINS BLANCS MONOVARIETAUX ISSUS DE QUATRE CEPAGES AUTOCHTONES DU SUD-OUEST DE LA FRANCE.....		
CONTEXTE ET OBJECTIFS.....		108
I.	Etat des connaissances de l'utilisation de l'AF4 sur le profil macromoléculaire des vins blancs	109
II.	Sélection d'échantillons basée sur le goût : Analyse sensorielle par Profil Flash.....	111
III.	Étude macromoléculaire des vins par AF4 : COL et MZ.....	113
IV.	Caractérisation chimique des vins COL et MZ par SDS-PAGE	116
V.	Spécificités gustatives des fractions de vin blanc ultrafiltrées	118
1.	Étude macromoléculaire des échantillons ultrafiltrés (COL et MZ) par AF4-UV-FLUO-MALS	118
1.1.	Cas du cépage COL	118
1.2.	Cas du cépage Mauzac.....	121
2.	Dégustation des échantillons ultrafiltrés.....	122
VI.	CONCLUSION	126
 CINQUIEME PARTIE : DEVELOPPEMENT D'UN COUPLAGE AF4-UHPLC: ANALYSE BIDIMENSIONNELLE DES MACROMOLECULES DANS QUATRE VINS BLANCS DU SUD-OUEST DE LA FRANCE		
CONTEXTE ET OBJECTIFS.....		129
I.	Introduction.....	130
II.	Validation du système 2D	132
III.	Application du système 2D à quatre variétés autochtones.....	134
IV.	Conclusion.....	141
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		142
 LITTERATURE CITEE		148

Liste des abréviations

AF4	Fractionnement par Flux-Force Asymétrique
AGP	Arabinogalactanes
Alac	Acide lactique
Amal	Acide malique
AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
AT	Acidité totale
Atart	Acide tartrique
AV	Acidité Volatile
B	Bouteille
CG	Chromatographie gazeuse
COL	Colombard
Cys	Cystéine
DAD	Détecteur à réseau de Diode
DEEMM	Diéthylé-(éthoxyméthylidène)propanedioate
DP	Degré de polymérisation
dRI	Détecteur à indice de réfraction ou réfractomètre
FA	Fermentation alcoolique
FFF	Fractionnement par Flux-Force
GABA	acide γ -aminobutyrique
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
GM	Gros manseng
His	Histidine
HPLC	Chromatographie à Haute Performance Liquide
IFTR	Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier
IFV	Institut Français de la Vigne et du Vin

IGP	Indication Géographique Protégée
Ile	Isoleucine
IPT	Indice des Polyphénols Totaux
IR	Infra-Rouge
LAP	Laboratoire d'analyse physico-chimique
Leu	Leucine
LL	Len de l'el
Lys	Lysine
MALS	Détecteur de diffusion statique de lumière
Met	Méthionine
MZ	Mauzac
Naa	azote alpha-aminé
Nnh	Azote ammoniacal
Orn	Ornithine
PCA	Analyse en Composantes Principales
PF	Profil Flash
Phe	Phénylalanine
PLSR	Régression par Moindres Carrés Partiels
Pro	Proline
QDA	Analyse Descriptive Quantitative
RC	Cellulose régénérée
RGI et II	Rhamnogalacturonane I et II
SDS-Pages	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
Ser	Sérine
SM	Spectrométrie de masse
SO ₂	Dioxyde de soufre
TAV	Taux d'alcool par volume
TFA	Acide trifluoroacétique
Thr	Thréonine
TLP	Thaumatine- like protein
Try	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UF	Ultrafiltration

UHPLC	Chromatographie Liquide à Ultra-Haute Performance
UV	Ultra-violet
Val	Valine

Liste des figures

Figure 1: Formule générale des acides α -aminés naturels	16
Figure 2 : Formes de l'acide α -aminé en solution aqueuse.....	16
Figure 3: Structure, valeurs de seuil de détection et qualités gustatives des 20 acides aminés L.....	18
Figure 4: Exemple de réaction d'alkylation par agent dérisatisant DEEMM.....	26
Figure 5: Acides phénoliques dans vins blancs : (a) acide cinnamique ; (b) acide benzoïque	28
Figure 6: Acides hydroxycinnamiques présents dans les raisins.....	29
Figure 7: Composés libérés pendant la FA à partir d'esters d'hydroxycinnamiques	29
Figure 8: Composés libérés pendant la FA à partir d'esters d'hydroxybenzoïques.....	30
Figure 9: Deux types de Flavonoïdes présents dans les vins blancs	30
Figure 10: Flavonoïdes majoritaires dans les vins blancs	31
Figure 11: Interaction Tanins-protéines salivaires.....	36
Figure 12: Principe de fonctionnement de FFF.....	40
Figure 13: Représentation d'un canal AF4.....	42
Figure 14: Mode normal ou Brownien	44
Figure 15: Mode stérique.....	45
Figure 16: Mode stérique/ hyperlayer.....	46
Figure 17: Étape d'injection et focus en AF4.....	47
Figure 18: Étape focus-relaxation en AF4	48
Figure 19: Etape d'éluion en AF4.....	49
Figure 20: Schéma synthétique des enjeux et des objectifs de cette thèse.....	60
Figure 21: Procédé d'ultrafiltration mis en place dans le cadre de la thèse dans le but de la dégustation des fractions	73
Figure 22: Schéma du système AF4-UHPLC	75
Figure 23: Analyse par arbre de classification et de régression réalisée à l'aide de tous les paramètres œnologiques mesurés dans les vins. COL : Colombar, GM : Gros Manseng, MZ : Mauzac, LL : Len de l'El, AT : acidité totale, Amal : acide malique.....	87
Figure 24: Pourcentage moyen de chaque acide aminé par rapport au total des acides aminés libres dans les vins COL, GM, MZ et LL.....	97
Figure 25: Arbre de classification et de régression réalisé avec tous les acides aminés mesurés dans les vins	100
Figure 26: Analyse Procrustéenne Généralisée (GPA) pour évaluer a) 12 vins de COL, GM, LL et MZ selon cinq descripteurs (acidité, salinité, amertume, sucrosité et viscosité) sélectionnés lors de la première session de la FP ; b) 11 vins après l'exclusion de l'échantillon GM.....	112
Figure 27: Fractogrammes AF4 : (a) distribution des masses molaires avec détecteur MALS, (b) détecteur UV et (c) détecteur dRI, pour les vins COL et MZ (F1, F2, F3 et F4 correspondant aux différentes fractions collectées dans l'AF4).....	113
Figure 28: SDS-PAGE des différentes fractions obtenus en AF4	117

Figure 29: Fractogrammes AF4 du vin initial et des 3 fractions ultrafiltrées du vin COL, obtenus à l'aide des détecteurs UV (a) et MALS (b).....	119
Figure 30: Spectres de fluorescence du vin Colombar initial et de ses fractions ultrafiltrées.....	119
Figure 31: Fractogrammes AF4 du vin MZ initial et de ses trois fractions ultrafiltrées (<100 kDa, < 50 kDa et < 10 kDa) à l'aide du détecteur UV	121
Figure 32: Spectres de fluorescence du vin initial Mauzac (a) et de ses fractions ultrafiltrées (b,c et d)	122
Figure 33: Analyse de Procruste généralisée (GPA) pour évaluer le vin COL initial et ses trois fractions ultrafiltrées (<100 kDa, < 50 kDa et < 30 kDa) en fonction des cinq descripteurs choisis lors de la première session de PF.....	123
Figure 34: Analyse de Procruste généralisée (GPA) pour évaluer les différentes fractions ultrafiltrées des vins MZ en fonction des différents descripteurs choisis lors du PF.	125
Figure 35: Signaux 1D et 2D de deux échantillons standards	133
Figure 36: Signaux 1D et 2D du cépage Colombar	135
Figure 37: Signaux 1D et 2D du cépage Gros manseng	137
Figure 38: Signaux 1D et 2D du cépage Len de l'el.....	138
Figure 39: Signaux 1D et 2D du cépage Mauzac.....	140
Figure 40: Synthèse des travaux réalisés au cours de la thèse.....	147

Liste des tableaux

Tableau 1: Composés majoritaires présents dans les vins ainsi que leur ordre de grandeur (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020).....	14
Tableau 2: Acides aminés couramment identifiés dans le moût et le vin.....	19
Tableau 3: Tableau récapitulatif des conditions analytiques (type de colonnes, phases mobiles) utilisées par divers chercheurs pour l'analyse des acides aminés dans les moût et vins.....	24
Tableau 4: Gradient d'éluion pour la détermination par HPLC des acides aminés dans les vins blancs (Gómez-Alonso et al., 2007).....	66
Tableau 5: Tableau récapitulatif des paramètres œnologiques classiques de tous les échantillons utilisés dans l'étude.....	69
Tableau 6: Tableau récapitulatif des paramètres œnologiques classiques de tous les échantillons utilisés dans l'étude AF4-UHPLC.....	74
Tableau 7: Gradient d'éluant pour la détermination par UHPLC des macromolécules dans les vins blancs.....	76
Tableau 8: Paramètres physico-chimiques des différents cépages étudiés.....	84
Tableau 9: Paramètres physico-chimiques des différents millésimes étudiés.....	88
Tableau 10: Paramètres physico-chimiques des différents vins étudiés prélevés à différents stades : FA et B.....	89
Tableau 11: Tableau synthétique des données de l'étude de De La Presa-Owens et al (1995).....	92
Tableau 12: Concentrations minimales et maximales (mg.L ⁻¹) d'acides aminés libres dans les vins issus de quatre cépages blancs (n=69 ± écart-type).....	93
Tableau 13: Les données représentent la moyenne des différents échantillons provenant d'une variété de vigne ± écart-type.....	94
Tableau 14: Concentration (mg.L ⁻¹) en acides aminés libres dans les 69 vins étudiés en fonction du millésime.....	95
Tableau 15: Résultats des tests triangulaires en fonction des deux modalités Glu et Pro (n=30).....	103
Tableau 16: Tableau synthétique du test sensoriel (test triangulaire) étudiant l'impact de Glu sur les perceptions gustatives d'un vin blanc issu du cépage COL.....	104
Tableau 17: Tableau synthétique du test sensoriel (test triangulaire) étudiant l'impact de la Pro sur les perceptions gustatives d'un vin de MZ.....	105
Tableau 18: Aire (en pixels) des différentes macromolécules présentes dans les différents cépages.....	136

Liste des Annexes

Annexe 1.A : Fractogrammes AF4 : (a) détecteur UV, (b) détecteur MALS et (c) détecteur dRI, pour les vins COL (COL 1,2 et 3)

Annexe 1.B : Fractogrammes AF4 : (a) détecteur UV, (b) détecteur MALS et (c) détecteur dRI, pour les vins MZ (MZ 1,2 et 3)

Introduction générale

La qualité gustative d'un vin dépend étroitement de la composition du raisin et est sublimée par le savoir-faire des vinificateurs. La recherche œnologique étudie les processus chimiques, biologiques et sensoriels liés à la production du vin afin d'améliorer sa qualité et de maîtriser son élaboration.

Depuis de nombreuses années, les recherches sur les arômes ont conduit à la caractérisation moléculaire de composés volatils appartenant à des familles chimiques très diverses et intervenant dans la qualité comme dans les défauts des vins (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Les composés non-volatils ont également été l'objet de nombreuses études afin de préciser leur rôle dans la perception des vins en bouche.

La qualité d'un vin repose non seulement sur son profil aromatique, mais aussi sur son équilibre gustatif, notamment les saveurs acide, amère, salée, sucrée et umami (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Cette diversité de saveurs est en partie due à la variété des composés gustatifs, tels que les acides aminés (Roudot-Algaron, 1996). Présents dans les vins, ces derniers sont des précurseurs de nombreuses molécules volatiles, comme les thiols, qui influencent les propriétés sensorielles du vin (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Leur concentration est fortement impactée par divers facteurs, tels que le cépage (Kliewer, 1970; Stines et al., 2000), les techniques de fertilisation (Garde-Cerdán et al., 2014), ou encore l'ajout d'azote lors de la fermentation alcoolique (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). En raison de l'influence de ces facteurs, de nombreuses recherches ont été menées pour différencier les moûts ou les vins en fonction de leur profil en acides aminés (Martínez-Pinilla et al., 2013; Mirás-Avalos et al., 2020; Pérez-Álvarez et al., 2019; Sartor et al., 2021). Cependant leur rôle sur les perceptions gustatives des vins reste encore peu étudié.

En revanche, de nombreuses études ont examiné l'influence des macromolécules, telles que les polyphénols et les polysaccharides, sur les perceptions gustatives des vins (Gawel et al., 2018). Par exemple, la perception tactile des vins peut être modifiée par la structure des tanins, responsables en grande partie de la sensation de sécheresse et de resserrement en bouche, connue sous le nom d'astringence. Ces composés interagissent avec les protéines salivaires, formant des précipités qui

diminuent la lubrification buccale (Baxter et al., 1997). Le degré de polymérisation (DP) des tanins (Vidal, Francis, et al., 2004) et leur concentration modulent la perception de l'astringence (Vidal, Courcoux, et al., 2004).

Les polysaccharides constituent une part importante des macromolécules présentes dans les vins (Pellerin et al., 1995). Ils incluent divers types, tels que le rhamnogalacturonane II (RG-II) et les polysaccharides riches en arabinose et galactose (PRAGs), comme les protéines arabinogalactanes (AGP), les arabinogalactanes et les arabinanes, provenant des parois cellulaires du raisin (Pellerin et al., 1995), ainsi que les mannoprotéines (MPs), issues des parois cellulaires des levures de fermentation.

Dans les vins, ces polysaccharides ont la capacité d'interagir avec les tanins, réduisant ainsi la perception de l'astringence dans des solutions modèles (Vidal, Francis, et al., 2004) et dans le vin rouge (Boulet et al., 2016). Cette réduction de l'astringence peut être liée à leur capacité à interagir avec les tanins (Riou et al., 2002), à inhiber la formation d'agrégats tanins-protéines salivaires (Carvalho et al., 2006) ou à former des complexes solubles ternaires tanins-protéines-polysaccharides (Scollary et al., 2012).

Les protéines, bien que présentes en plus faible quantité dans les vins (Cheynier & Sarni-Manchado, 2010), sont principalement de type Thaumatine-like et Chitinase (Ferreira et al., 2001). Leur rôle dans les perceptions gustatives reste encore peu connu. Elles sont surtout réputées pour contribuer à l'instabilité des vins, en induisant un phénomène de trouble, particulièrement dans les vins blancs, généralement appelé 'casse protéique' (Ferreira et al., 2001; Lamikanra & Inyang, 1988; Waters et al., 2005). Pour résoudre ce problème, les vins sont traités avec des agents de collage (la bentonite), une pratique ayant un fort intérêt économique. Le défi de découvrir de nouvelles méthodes de collage plus économiques et ayant moins d'effets négatifs sur le vin est d'une grande importance pour l'économie locale de la région du Sud-Ouest de la France. Cette région est l'un des principaux producteurs et exportateurs de vins blancs secs en France, utilisant une grande variété de cépages typiques pour la production de leur vin. La diversité des terroirs de la région lui confère une richesse en cépages, permettant de créer des vins aux propriétés sensorielles et gustatives uniques.

Les vins du Sud-Ouest possèdent chacun une identité sensorielle distincte. Dans le but de différencier les vins, certaines études (Mirás-Avalos et al., 2020; Pérez-Álvarez et al., 2019; Sartor et al., 2021) ont eu recours à l'analyse des profils aminés. Étant donné leur rôle connu dans la perception du goût des aliments et le peu d'études portant sur leur influence dans les vins, cette recherche vise à explorer leur impact sur les perceptions gustatives de ces derniers. Le premier objectif de cette thèse sera donc d'examiner le profil aminé de ces vins du Sud-Ouest afin de les distinguer selon leurs caractéristiques et d'établir un éventuel effet des acides aminés sur leurs propriétés sensorielles.

De plus, compte tenu de l'impact significatif des diverses macromolécules sur les perceptions gustatives et de la complexité de leurs interactions, le deuxième objectif de cette thèse sera de mieux les caractériser et d'explorer leur rôle spécifique dans ces vins. Afin d'explorer leur profil macromoléculaire, une méthode non conventionnelle sera employée : le Fractionnement par Flux-Force Asymétrique couplé à un système de multidétection (UV-visible, MALS, dRI), qui s'est déjà avéré efficace pour analyser le profil macromoléculaire des bières (Choi et al., 2017; Tügel et al., 2015) et des vins rouges (Marassi et al., 2021; Pascotto et al., 2020, 2021). Puis, grâce à une approche sensorielle descriptive originale basée uniquement sur le goût, nous tenterons de mieux comprendre leur rôle spécifique dans les propriétés gustatives des vins blancs du Sud-Ouest.

L'AF4 est une technique qui offre de nombreux avantages tels que la séparation de macromolécules selon leur taille sans les dénaturés. Cependant, des macromolécules de taille similaire peuvent être éluées simultanément, rendant leur différenciation impossible (par exemple, les protéines).

Ainsi, le dernier objectif de cette thèse sera de développer un nouveau système afin de fractionner un échantillon de vin et d'isoler les différentes protéines présentes en fonction de leur hydrophobicité, en utilisant un système 2D couplant AF4 et Chromatographie Liquide à Ultra-Haute Performance (UHPLC), afin de pouvoir les identifier.

Afin de répondre à ces objectifs scientifiques, la thèse s'articule en cinq parties :

La Partie I synthétise l'étude bibliographique sur la diversité des perceptions gustatives des vins du Sud-Ouest, influencées par divers composés tels que les acides aminés, les polyphénols et les

polysaccharides. Les méthodes de caractérisation de ces composés, ainsi que leurs limites, y sont également discutées.

La Partie II présente les matériels, techniques et méthodes utilisées au cours de cette étude.

La Partie III (divisée en 3 chapitres) examine l'influence des paramètres intra- et inter- variétaux sur les caractéristiques œnologiques et l'aminogramme des vins blancs, obtenu par Chromatographie à Haute Performance Liquide (HPLC). Elle étudiera également le rôle de certains acides aminés sur les perceptions gustatives de vins blancs.

La Partie IV se concentre sur l'influence des macromolécules sur les perceptions gustatives des vins blancs. Le fractionnement par AF4, la caractérisation des fractions et leur analyse sensorielle permettent de mener à bien cette partie.

Enfin, la Partie V aborde le développement d'un nouveau système AF4-UHPLC destiné à la séparation des protéines, afin de faciliter leur identification.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie : Étude Bibliographique

LES ACIDES AMINES ET MACROMOLECULES DU VIN BLANC : ETUDE DE LEUR INFLUENCE SUR LE GOUT ET METHODES DE CARACTERISATION SENSORIELLES ET ANALYTIQUES

I. Les cépages du Sud-Ouest

1. Notion de cépage

Un cépage est une forme de vigne cultivée appartenant à la famille botanique des plantes grimpantes ligneuses appelée Vitaceae et au genre botanique *Vitis* comprenant 60-70 espèces. La plupart des espèces de *Vitis* sont originaires d'Amérique du Nord et d'Asie orientale, où les raisins sont parfois vilipendés, mais la grande majorité des vins du monde sont élaborés (Aradhya et al., 2008) à partir de la seule espèce indigène d'Eurasie (Aradhya et al. 2008, Ibid.), *vitis vinifera sativa*, qui signifie "raisin à vin", et qui a constamment prouvé sa supériorité en termes de qualité et d'arôme des vins. Elle se subdivise en milliers de variétés, appelées cépages ou cultivars, qui résultent de croisements naturels ou de sélection (Grainger & Tattersall, 2005). Aujourd'hui dans le monde, il existe entre 8 000 et 10 000 cépages cultivés, dont 6000 cépages dédiés à l'espèce *V. vinifera sativa* (Maul & Töpfer, 2015). Une minorité de ces cépages joue un rôle dans la production mondiale de vin (Frankel 2013, Grainger et Tattersall 2005). De plus, de nombreux cépages sont utilisés comme variétés accessoires dans les assemblages, comme curiosités régionales, ou bien sont en voie d'extinction. En France sur les 250 cépages répertoriés issus de l'espèce *Vitis vinifera*, seulement 10 d'entre eux assurent plus ou moins 75% de la production nationale (Frankel, 2013) : Merlot, Grenache, Ugni blanc, Syrah, Cabernet-sauvignon, Carignan, Chardonnay, Cabernet franc, Gamay et Sauvignon blanc.

Certains cépages ont une vocation internationale, s'adaptant à une large gamme de climats et de sols. D'autres sont au contraire très liés à leur terroir et doivent y être cantonnés pour donner des vins de qualité tels que les cépages du Sud-Ouest.

2. Importance du terroir

La notion de terroir se réfère à l'ensemble des facteurs environnementaux et humains qui influencent la qualité, le caractère et les spécificités du vin. Cette notion englobe les caractéristiques géographiques (climat, relief, altitude, exposition au soleil), les propriétés pédologiques (composition et texture des sols) et les pratiques agricoles (méthodes de culture, les techniques de vinification, et le savoir-faire traditionnel des producteurs) (Anglade & Puisais, 1987).

2.1. Caractéristiques géographiques

Le climat et les conditions météorologiques jouent un rôle crucial dans la qualité et le style du vin produit (Esteves & Manso Orgaz, 2001). Un climat doux avec un printemps avancé est bénéfique pour les cépages à débourrement précoce et à cycle de croissance long. À l'inverse, certains cépages nécessitent une maturation rapide, ce qui est adapté aux régions où l'arrière-saison est courte et marquée par des pluies ou des brouillards automnaux. De plus, au sein même d'un territoire, des facteurs tels que l'altitude, l'orientation du versant par rapport au soleil, ainsi que la proximité d'une rivière ou d'une forêt, créent des microclimats qui influencent la maturation des raisins (Pereira et al., 2006) et la composition aromatique des vins (Martin et al., 2016). D'autres facteurs peuvent influencer la qualité et le style de vin tels que la pente de la parcelle et le relief.

2.2. Propriétés pédologiques

Le sol est un facteur crucial dans la production de raisins de qualité appropriée pour la vinification. Différents types de sols peuvent être exploités en fonction du cépage à cultiver : sols argilo-calcaires, limoneux, crayeux, graveleux (Mackenzie & Christy, 2005).

Le type de sol a un impact majeur sur la qualité des raisins, et *in fine* le style du vin. Au sein d'un même vignoble, les terroirs peuvent être morcelés avec de nombreux types de sols dans un espace restreint,

impactant les conditions de croissance de la vigne. Cette diversité enrichit le vignoble et contribue à justifier la large gamme de cépages. Pour bien saisir l'importance de cette diversité pédologique, il est essentiel de considérer son interaction avec les conditions climatiques locales, qui façonnent encore davantage la personnalité des vins. En France, différentes régions viticoles bénéficient de microclimats particuliers, notamment le vignoble du Sud-Ouest. S'étendant des reliefs du Massif central aux Pyrénées, et de la Garonne au Pays basque, cette région se distingue par une grande diversité de terroirs (Hinnwinkel & Lavaud, 2009). Les sols variés, allant des landes sableuses aux plaines fluviales, en passant par les contreforts montagneux et les coteaux en pente douce, bénéficient d'un réseau hydrique important et d'un excellent ensoleillement. De plus, les climats de la région (océanique, montagnard et méditerranéen) sont typiques des zones propices à la culture de la vigne. Cette grande diversité de terroirs se traduit par une grande diversité de cépages, plus de 300 dont 120 sont indigènes, ou autochtones. Dans cette région du Sud-Ouest, deux zones principales de productions de vins se distinguent : le Gers (20 362 hectares, 2022) et le Tarn (6274 hectares, 2022) (Agreste, 2022). Ces deux départements produisent des vins blancs secs à partir de cépages indigènes.

3. Principaux cépages utilisés dans l'élaboration des vins blancs typiques du Sud-Ouest

Dans le Gers, les cépages Colombard (COL) et Gros Manseng (GM) sont principalement utilisés pour produire les vins des Côtes de Gascogne (une indication géographique protégée (IGP)). Dans le Tarn, les vins blancs de Gaillac (une appellation d'origine protégée (AOP)) sont principalement élaborés à partir des cépages Len de l'el (LL) et Mauzac (MZ). Chacun de ces cépages ont une origine et des caractéristiques viticoles et gustatives propres.

3.1. Cépages utilisés pour l'élaboration des vins blancs des côtes de Gascogne

3.1.1. Colombard

Le COL est un cépage originaire de la région Charente, résultant d'un croisement entre le Gouais blanc et le Chenin blanc. Son appellation tirerait son origine du terme « colombe », soit en raison de la teinte

pâle de ses baies, soit parce que ses raisins attirent les colombes et les pigeons migrateurs en automne. Il est principalement cultivé dans le Gers, où près de 5 000 hectares lui sont consacrés (Frankel, 2013).

Le cépage COL présente de nombreux atouts viticoles, tels que sa fertilité, sa vigueur et sa productivité. Cependant, il est particulièrement vulnérable à la pourriture grise, au mildiou, à l'oïdium, ainsi qu'aux attaques d'acariens. Cette sensibilité incite les viticulteurs à procéder à une récolte précoce pour atténuer ces problèmes.

Le COL est reconnu pour produire des vins à faible teneur en alcool et dotés d'une belle acidité. De surcroît, ce cépage se distingue par son caractère très aromatique, offrant des notes de pamplemousse, de citron vert et de fruits exotiques. Ces caractéristiques sensorielles s'expliquent en partie par la forte concentration de thiols présents dans ce cépage, qui sont révélés par l'action des levures lors de la fermentation alcoolique (FA) (Dournes et al., 2022).

3.1.2. Gros manseng

Le cépage GM est apparenté au Petit manseng. En plus d'être présent dans les côtes de Gascogne, il est majoritairement implanté dans le Béarn (Sud-ouest de la France). La particule « manseng » découlerait du mot médiéval « manse », désignant une exploitation rurale. Le « Gros » désignerait la taille légèrement supérieure des baies par rapport à celle du petit manseng ainsi que son plus haut rendement.

C'est un cépage vigoureux dont le débourrement est précoce. Il est également sensible à l'oïdium, mais est très résistant à la pourriture grise. Il est adapté au climat océanique et pluvieux. Cependant, il a besoin de chaleur pour venir à maturité. Un sol argileux-sableux est recommandé pour ce cépage.

Le GM donne des vins riches en alcool avec une bonne acidité, se mélangeant avec des arômes de coing, d'abricot, d'agrumes et de notes florales et épicées.

3.2. Cépages utilisés pour l'élaboration des vins blancs de Gaillac

3.2.1. Len de l'el

Ce cépage est principalement cultivé dans la région de Gaillac, d'où il est originaire. Le cépage « len de l'el » signifie « Loin de l'œil » en occitan. Son nom proviendrait du fait que ses grappes se forment loin de la base du rameau, typiquement au niveau de son sixième bourgeon ou « œil » contrairement aux autres cépages (troisième ou quatrième). De plus, le pédoncule de la grappe est particulièrement long, l'éloignant alors de l'œil.

Le cépage LL est très vigoureux. Ses forts rendements sont appréciés, bien qu'ils doivent être jugulés pour obtenir un raisin de qualité. Ce cépage est quant à lui sensible aux acariens et à la pourriture grise. Afin d'éviter cette dernière, le cépage LL doit être cultivé sur des côteaux bien drainés où la vigne est asséchée par le vent. Un sol riche en potassium est également préféré dû aux forts rendements.

Le LL donne des vins secs fins, alcoolisés et suffisamment acides pour exprimer de la fraîcheur avec un léger piquant qui permet de l'identifier aisément. Les arômes de fleurs blanches, de petits fruits rouges, d'agrumes, de poivrons font partie de la palette aromatique de ces vins (J. Robinson et al., 2012).

3.2.2. Mauzac

Ce cépage serait originaire de la vallée du Tarn et sans doute du village de Meauzac d'où il porterait son nom.

Il est productif, ce qui nécessite une taille courte pour obtenir un vin de qualité. Il est peu sensible à l'oïdium et au mildiou mais présente une grande sensibilité vis-à-vis des acariens et des vers de la grappe. Ses grappes étant compactes, il craint également la pourriture grise en fin de saison, d'autant plus qu'il tarde à mûrir. Il apprécie les sols calcaires. Cependant, ce cépage est très sensible à la sécheresse, son terroir de prédilection est plutôt argilo-calcaire (permet de retenir l'humidité).

Le MZ donne des vins relativement riches en alcool, adaptés à la surmaturation, ce qui le rend idéal pour la production de vins doux et liquoreux. Cependant, lorsqu'il est récolté tôt, il conserve une acidité suffisante pour être utilisé dans l'élaboration de vins effervescents. Il donne également des vins blancs secs, bien qu'ils aient tendance à s'oxyder rapidement. Les principaux arômes du MZ sont ceux de

pomme mûre et de poire avec des notes florales de jasmin, d'acacia et de violette en arômes secondaires. Pour les vins moelleux, des arômes de coing, de fruits confits et de miel peuvent apparaître.

Chaque cépage possède une identité sensorielle et gustative distincte, influencée par divers facteurs tels que le terroir et la conduite du vignoble. Les caractéristiques du vin reflètent l'empreinte unique des raisins où les cépages sont cultivés et sont également influencés par les procédés de vinification.

Pour appréhender les variations gustatives des vins, il est nécessaire de définir ce qu'est le goût du vin et d'identifier les molécules qui en sont les facteurs responsables.

II. Le goût du vin : influence de sa composition macromoléculaire

1. Le goût, un processus complexe

Par définition (Larousse, 2021), le goût est une saveur perceptible par le sens gustatif. L'être humain peut percevoir et distinguer cinq saveurs que sont l'acide, l'amer, le salé, le sucré et l'umami (Brondel et al. 2013, Kurihara 2009). C'est l'un des sens essentiels pour le choix des aliments. Le sens du goût nous informe sur la présence de nutriments essentiels mais également sur la présence de composés nocifs tels que des molécules toxiques (Laffitte et al., 2016). En effet, la saveur sucrée est associée à une alimentation riche en nutriments et au goût plaisant (Schlienger & Monnier, 2014) au contraire de la saveur amère souvent associée à des signes de toxicité ou de présence de poison (Chandrashekar et al., 2000).

Il existe une grande complexité sensorielle due à la diversité des composés du goût, de leurs interactions ainsi que des mécanismes de transduction de leurs récepteurs jusqu'au cerveau, ainsi que des différences de perception et de sensibilité inter-individuelles liées à la génétique de l'être humain.

1.1. Diversité des composés du goût

Il existe une grande diversité de composés responsables des différentes saveurs. Les molécules qui confèrent la saveur umami sont généralement des acides aminés tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique. La saveur salée est principalement due à certains cations comme Na^+ , tandis que la saveur

acide est provoquée par la présence de protons (Roudot-Algaron, 1996). Il existe une plus grande diversité structurale pour les saveurs sucrée et amère que nous allons développer maintenant.

1.1.1. Composés responsables de la saveur sucrée

Les molécules sucrées identifiées à ce jour appartiennent à des familles chimiques très diverses. Parmi les composés naturellement sucrés, la classe des hydrates de carbone (Lindemann, 2001), tels que le saccharose, constitue la majorité des composés au goût sucré. D'autres composés non volatils sont également présents tels que les polyols (Belloir et al., 2017), des glycosides de terpénoïdes (Rao et al., 2012), des protéines (Gibbs, Alli et Mulligan 1996, Faus et Sisniega 2003), certains acides aminés (Acree et al., 1971), ainsi que des composés phénoliques tels que les flavonoïdes (Kim et al., 2016) et des pro anthocyanidines (Olneo & Kardono, 1993). Pour remédier aux problèmes de santé liés à la consommation de sucre, tels que le diabète, l'utilisation d'édulcorants artificiels a été la première solution envisagée. Certains sont produits par synthèse tel que l'aspartame (Mazur, 1976) et d'autres sont naturellement présents dans les plantes telle que la stévia (Gerwig et al., 2016).

La perception de la saveur sucrée est fortement influencée par le patrimoine génétique individuel. Les variations dans les allèles codant pour les récepteurs gustatifs entraînent non seulement une diversité dans la perception du goût, mais affectent également les mécanismes de transduction des signaux.

Le goût sucré peut également être modifié par l'action de protéines qui ne sont pas initialement sucrées mais qui peuvent interagir avec les récepteurs gustatifs et d'autres composés sapides. Par exemple, la miraculine est une protéine qui, en se liant aux récepteurs du goût sucré et en interagissant avec des acides, confère une saveur sucrée à tous les aliments consommés (Gibbs et al., 1996).

1.1.2. Composés responsables de la saveur amère

Il existe une très grande diversité moléculaire en ce qui concerne la saveur amère tels que des sels (ALQtaishat et al., 2022), certains acides aminés et peptides (Roudot-Algaron, 1996), certains acides gras (Stephan & Steinhart, 2000), lactones et les terpènes (Brockhoff et al., 2007), les phénols et

polyphénols (Laaksonen et al., 2010) dont les flavonoïdes (Li et al., 2014) et les alcaloïdes (Serra Bonvehí & Ventura Coll, 2000).

Les plantes sont la principale source de molécules amères dans l'alimentation humaine. En effet, de nombreux légumes tels que les endives (Filippo D'Antuono et al., 2016), les asperges (Dawid & Hofmann, 2012) ont un goût amer. Certaines boissons préparées à partir de plantes sont également connues pour leur amertume, comme le café (Drewnowski, 2009), le thé vert (Deng et al., 2022; Drewnowski, 2009), le vin (Noble, 1994), la bière (Habschied et al., 2021) ou le cacao (Serra Bonvehí & Ventura Coll, 2000). Certains composés peuvent également provenir du traitement des aliments, par exemple à travers leur fermentation par des microorganismes, notamment pour la production de bière, de vin ou de fromage.

Au-delà des molécules amères d'origine naturelle, certains composés peuvent également résulter de la production de molécules amères par des réactions chimiques survenant pendant le traitement des aliments, telles que la réaction de Maillard induite par un traitement thermique (Birlouez-Aragon, 2008).

Le goût amer est généré par probablement des dizaines de milliers de molécules amères différentes. La sensibilité individuelle au goût amer varie fortement chez les humains et peut être partiellement expliquée par les polymorphismes génétiques de certains récepteurs du goût amer. Par exemple, des grandes différences de perception au propylthiouracil (PROP) et au phénylthiocarbamide (PTC) entre les individus ont été mises en évidence dans plusieurs travaux (Badoud et al., 2010). Ces composés sont perçus comme intensément amers par certaines personnes alors que d'autres n'y sont pas sensibles. Ces différences proviennent essentiellement de la variabilité des allèles pour chaque gène codant pour un récepteur de l'amertume (Adler et al., 2000). Ce polymorphisme est souvent héréditaire et spécifique à chaque composé (Reed et al., 2006).

Compte tenu de la diversité des composés responsables du goût, il est légitime de se demander si le goût du vin peut être influencé par différentes macromolécules présentes dans le vin pouvant être à l'origine de la diversité des saveurs du vin.

2. Composition du vin et influence sur les perceptions sensorielles

Le vin est une matrice complexe composée en majorité d'eau et d'éthanol. Il est également composé d'acides organiques (acides tartrique, malique et lactique), de carbohydrates, minéraux, composés phénoliques ainsi que de substances azotées telles que les acides aminés et les protéines (**Tableau 1**)

Tableau 1: Composés majoritaires présents dans les vins ainsi que leur ordre de grandeur (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020).

Composés majoritaires présents dans le vin	Ordre de grandeur dans les vins
Eau	80-85 %
Ethanol	8-15 %
Acides organiques	0,3-1 %
Carbohydrates	0,1-20 %
Minéraux	0,1-0,2 %
Composés phénoliques	0,1-0,5 %
Substances azotées	0,01 % à 0,05 %

Ces macromolécules sont connues pour leur impact direct sur les propriétés sensorielles lorsqu'elles sont ajoutées individuellement aux vins ou aux solutions modèles aqueuses. Par exemple, l'éthanol, outre l'eau, est le composé le plus abondant dans le vin (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Du fait de sa concentration importante, il peut modifier la perception aromatique des vins (Grosch, 2001). De plus, les effets de l'éthanol sur les sensations en bouche ont été étudiés (Nurgel & Pickering, 2005). Il a un effet dit réducteur sur la perception de l'astringence des vins rouges (Fontoin et al., 2008). De plus, Il est également un composé gustatif actif. Son rôle dans la perception du goût amer du vin blanc a également été étudié, révélant sa capacité à influencer cette sensation en raison des interactions sensorielles avec d'autres constituants (Cretin et al., 2018). Il peut également induire des sensations de brûlures associées à des concentrations plus élevées (Gawel et al., 2007; Jones et al., 2008).

De plus, les composés phénoliques ont un impact général sur la sensation en bouche en contribuant à la viscosité, l'astringence, la chaleur et l'amertume du vin (Gawel et al., 2018). Leur large influence résulte probablement de leur diversité structurelle, ce qui leur permet d'activer plusieurs mécanismes sensoriels impliqués dans la perception de la sensation en bouche.

À l'inverse, les polysaccharides ont un effet modulateur mineur sur la perception de l'astringence et de la chaleur (Gawel et al., 2018). Du fait de la grande complexité du vin, les différentes macromolécules agissent sur les propriétés sensorielles mais souvent par le biais d'interactions entre différents composants.

Cependant le rôle des substances azotées telles que les acides aminés sur les perceptions gustatives a été peu étudié dans les vins. En revanche, de larges études ont été menées sur le rôle de ces acides aminés sur le goût des aliments (Delompré et al., 2019)

En raison de l'influence de certains composés du vin tels que les acides aminés et les macromolécules, l'étude de ces composés présente un intérêt gustatif pour mieux comprendre les spécificités des différents cépages. C'est pourquoi la nature de ces composés leur rôle sur les perceptions gustatives ainsi que leur caractérisation par analyses chimiques vont être approfondis.

III. Acides aminés des moûts et des vins : propriétés, influence sur les perceptions sensorielles du vin et méthode de caractérisation analytique

Le vin est une matrice complexe, englobant des centaines de composés qui contribuent à son goût final. Parmi eux, les acides aminés représentent une proportion importante, ce qui explique l'intérêt croissant qu'ils suscitent ces dernières années. Ces molécules constituent la principale forme d'azote total dans le moût de raisin et le vin, avec une concentration totale d'acides aminés libres variant entre 1 et 4 g.L⁻¹ selon les millésimes (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020).

1. Propriétés des acides aminés

1.1. Structure

Les acides aminés sont des molécules possédant une fonction acide carboxylique COOH (extrémité C-terminale) ainsi qu'une fonction amine NH₂ (extrémité N-terminale) toutes deux liées au même carbone appelé carbone α . De plus, le radical R (**Figure 1**) est une portion variable qui peut se composer de différents éléments (carbone, soufre, azote).

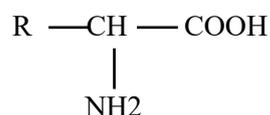


Figure 1: Formule générale des acides α -aminés naturels

1.2. Propriétés physico-chimiques

Le carbone α lié aux radicaux fonctionnels et au radical R est chiral. Cette propriété confère aux acides aminés une asymétrie, une caractéristique commune aux molécules biologiquement importantes. Tous les acides aminés naturels possèdent une configuration L-authentique. Leur activité optique dépend du type de radical R, mais aussi du solvant, et même du pH de la solution (Meister, 1965).

De plus, en fonction du type d'acides aminés, le radical R peut être relié à des chaînes latérales chargées (acides ou basiques). Par exemple, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont des acides aminés acides, tandis que la lysine, l'histidine, l'ornithine, la citrulline et l'arginine sont des acides aminés basiques. En raison de la présence simultanée des deux fonctions acide et base, les acides aminés ont un comportement amphotère (**Figure 2**) : l'état de la molécule va dépendre du pH.

Lorsque le radical R des acides aminés est constitué de chaînes latérales polaires non chargées, telles que des groupes hydroxyles (comme dans la sérine, la thréonine et la tyrosine) ou des groupes thiols ou sulfures (comme dans la cystéine et la méthionine), cela confère aux acides aminés un rôle important dans les propriétés catalytiques des enzymes.

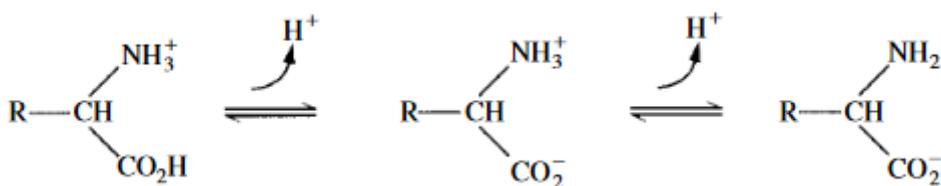


Figure 2 : Formes de l'acide α -aminé en solution aqueuse

1.3. Classification des acides aminés

Les acides aminés se trouvent être indispensables à la structure et au fonctionnement de la quasi-totalité des cellules qui composent notre corps. Bien que l'on puisse recenser près de 20 acides aminés fréquemment présents au sein des protéines, ils sont généralement répartis en deux catégories distinctes: les acides aminés essentiels et les acides aminés non essentiels (Dietzen, 2018).

- **Les Acides Aminés Essentiels** : Ces acides aminés doivent être acquis via l'alimentation, car notre organisme se trouve dans l'incapacité de les synthétiser de manière autonome. Parmi eux figurent des acides aminés tels que la leucine, la valine et la méthionine. Ils revêtent une importance capitale pour la croissance, la réparation tissulaire et la synthèse des protéines.
- **Les Acides Aminés Non Essentiels** : Notre organisme est apte à produire des acides aminés par ses propres moyens. On y dénombre la glycine, la glutamine et l'alanine, entre autres. Bien que leur présence ne soit pas impérative dans notre alimentation, ils jouent un rôle vital dans une myriade de processus biologiques.

Les nombreuses fonctions biologiques importantes que remplissent les acides aminés ont concentré les recherches au cours des dernières décennies sur le rôle physiologique de ces composés. Récemment, les aspects moins fondamentaux tels que le goût et la saveur ont suscité un intérêt croissant (Delompré et al., 2019; Roudot-Algaron, 1996).

1.4. Rôle et importance des acides aminés dans le goût des aliments

C'est en 1909 que la contribution des acides aminés au goût des aliments a été révélée pour la première fois par Ikeda (1909). Il a démontré que l'acide glutamique était l'un des éléments essentiels au goût des aliments traditionnels japonais, tels que le saké, le miso et la sauce soja. Ce goût était supposé provenir des acides aminés libérés par les protéines au cours de la fermentation. Au fil des années, des expériences psychophysiques ont montré que la plupart des acides aminés et leurs sels ont un goût (**Figure 3**). Cependant, la littérature sur ce sujet reste controversée (Berg, 1953; Meister, 1965; Schiffman & Dackis, 1975; Shallenberger & Acree, 1971; Solms et al., 1965; Yoshida & Saito, 1969). La plupart des études

ont initialement suggéré que les isomères optiques des acides aminés présentaient des différences de goût, les formes L étant généralement amères ou insipides, tandis que les formes D sont perçues comme sucrées. Cependant, cette généralisation a été révisée par Schiffman & Sennewald (1981). Par exemple, certaines paires d'énantiomères comme la L- et D-sérine et la L- et D-alanine présentent des qualités sucrées similaires. D'autres paires d'énantiomères ont des goûts très différents, comme la L-proline qui a une composante sucrée et la D-proline qui est amère. De plus, Schiffman & Sennewald (1981), ont décrit sept acides aminés de configuration L comme ayant une saveur sucrée : L-alanine, L-glycine, L-leucine, L-proline, L-phénylalanine, L-sérine, L-glutamine. En ce qui concerne la saveur amère, sept acides aminés ont également été identifiés : L-isoleucine, L-tryptophane, L-tyrosine, L-arginine, L-histidine, L-méthionine et L-asparagine. L'acide L-cystéine a quant à lui été décrit comme un acide aminé sulfureux. Certains acides aminés, tels que la L-lysine, continuent de susciter des divergences d'opinion, étant décrits comme ayant des saveurs sucrées, amères et salées, tandis que la L-thréonine et la L-valine sont associées à des saveurs sucrées et amères.

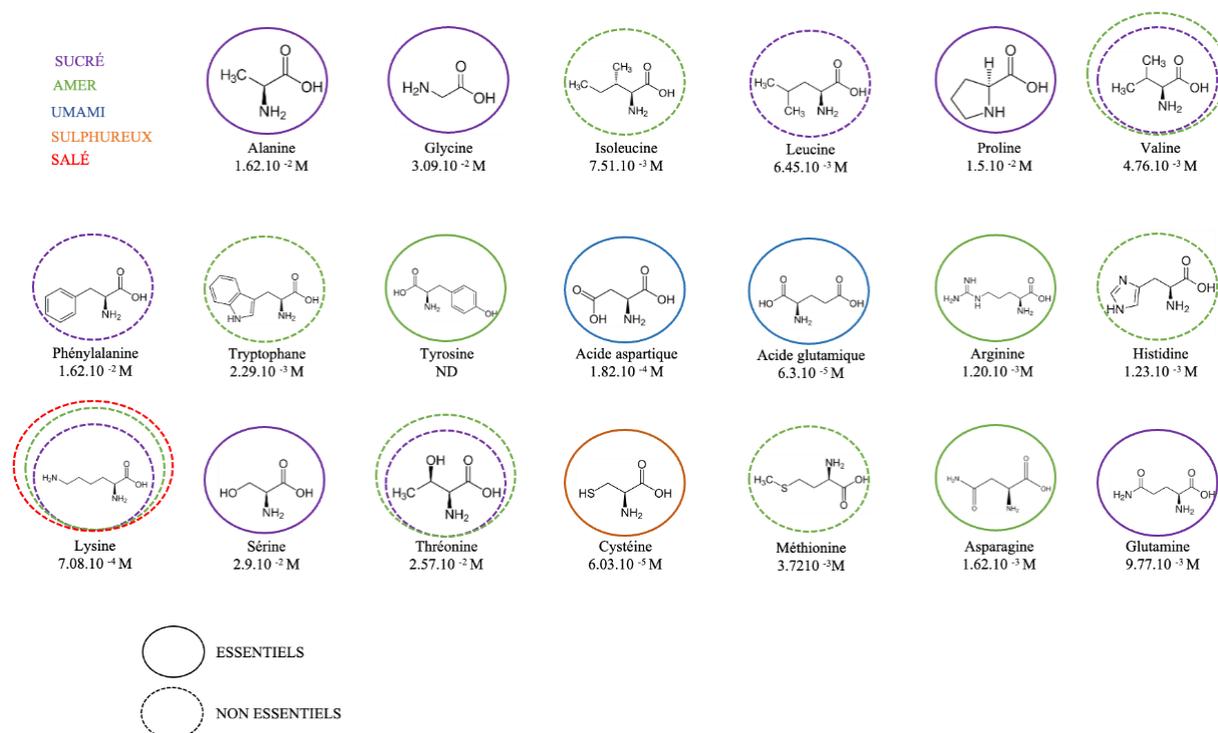


Figure 3: Structure, valeurs de seuil de détection et qualités gustatives des 20 acides aminés L

Les acides aminés ont été classifiés selon leur disponibilité pour l'organisme. ND, Non Déterminé

Source : Figure réalisée par l'auteurice

Les acides aminés de forme L, essentiels à notre alimentation quotidienne et généralement présents dans des aliments comme la viande, le lait et les œufs, se trouvent aussi dans le vin, où ils jouent un rôle significatif.

2. Les acides aminés dans les moûts et les vins

Dans les raisins mûrs, les acides aminés représentent généralement 30 à 40 % de l'azote total. Ces derniers sont consommés par les levures pendant la FA et peuvent donner lieu à la formation d'alcools supérieurs, d'aldéhydes, d'esters et d'autres composés volatils (Rapp & Versini, 1995), influençant ainsi le bouquet final du vin. La concentration totale en acides aminés, contrairement à l'ammonium, est déterminée dans le vignoble. Les acides aminés individuellement couramment présents dans le raisin entier et le vin sont répertoriés dans le **Tableau 2** :

Tableau 2: Acides aminés couramment identifiés dans le moût et le vin

Acides aminés	Moût	Vins
	Plages de concentrations retrouvées dans la littérature (en mg.L ⁻¹) (Bell & Henschke, 2005)	Plage de concentration retrouvés dans la littérature (en mg.L ⁻¹) (Martínez-Pinilla et al., 2013; Mirás-Avalos et al., 2020; Sartor et al., 2021; Soufleros et al., 2003)
Alanine	10-227	2 – 238
Arginine	20-2322	0,4 – 1075
Asparagine	1-171	0,2 -45
Acides aspartique	10-138	1,7 – 75
Cystéine	1-8,2	0,1 – 16
Glutamine	9- 4499	0,1 – 40
Acide glutamique	27-454	1 – 140
Glycine	1-20	1,4 – 15
Histidine	5-197	1,0 – 79
Isoleucine	1-117	0,3 – 20
Leucine	2-160	1,5 – 45
Lysine	0,7-45	2 – 79
Méthionine	1-33	0,4 – 15
Ornithine	0,1-27,2	0,4 – 17
Phénylalanine	2,8-138	1,5 – 53
Proline	9-2257	21 – 1938
Sérine	13-330	1,2 – 47
Thréonine	9-284	0,8 – 63

	Moût	Vins
Acides aminés	Plages de concentrations retrouvées dans la littérature (en mg.L ⁻¹) (Bell & Henschke, 2005)	Plage de concentration retrouvés dans la littérature (en mg.L ⁻¹) (Martínez-Pinilla et al., 2013; Mirás-Avalos et al., 2020; Sartor et al., 2021; Soufleros et al., 2003)
Tryptophane	0,2-11	0,3 – 10
Tyrosine	2-33	0,2 - 16,2
Valine	7-116	1,7 – 38
GABA	0,06-13,5	0,9 – 444

Les plages de concentrations pour la majorité des acides aminés varient énormément. L'arginine et la proline constituent généralement la plus grande proportion de la concentration totale d'acides aminés présents dans le raisin (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Cependant, dans les vins, les concentrations en acides aminés sont plus faibles. En effet, les acides aminés servent de nutriments pour les levures et sont consommés pour garantir une fermentation complète et prévenir les arrêts de fermentation. Par exemple, l'arginine est une source d'azote importante pour les levures et les bactéries lactiques. La proline, quant à elle, ne peut pas être assimilée par les levures en conditions fermentaires; ainsi à l'issue de la FA du moût de raisin, la proportion relative de proline est plus élevée dans le vin (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2020).

La concentration et la composition des acides aminés dans les moûts et les vins sont influencées tout au long du processus, de la vigne jusqu'au chai.

2.1. Facteurs influençant la composition en acides aminés dans les moûts et dans les vins

La concentration et la composition des acides aminés dans les moûts sont influencées par de nombreux facteurs tels que le cépage (Kliewer, 1969, 1970; Stines et al., 2000) et le terroir (Bouzas-Cid et al., 2018) notamment à travers le type de sol (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018), la température et les variations saisonnières (A. L. Robinson et al., 2014). En effet, le type de sol joue un rôle essentiel en influençant le développement de la vigne selon sa teneur en nutriments, tels que l'azote (N). De plus, la température, le régime hydrique et l'ensoleillement (Gladstones, 2016) influencent directement la maturité des raisins, affectant ainsi la concentration en sucres, en acides et en composés phénoliques. Par ailleurs, la

maturation des raisins (Bell & Henschke, 2005; Stines et al., 2000) implique notamment l'accumulation d'acides aminés, comme l'arginine et la proline, accompagnée d'une diminution de l'ammonium.

Les pratiques viticoles telles que l'application d'azote (fertilisation azotée), le type de palissage, les techniques d'entretien des sols et même l'infection par *Botrytis*, sont également des déterminants importants de la composition et de la concentration des acides aminés du raisin (Garde-Cerdán et al., 2014; Miele et al., 2000; Rodriguez-Lovelle & Gaudillère, 2002).

Par exemple, la fertilisation azotée est souvent utilisée pour prévenir une carence en azote de la vigne liée aux caractéristiques du sol ou au climat. Elle a un effet significatif sur l'achèvement réussi de la FA, en raison de l'augmentation de l'azote assimilable induit dans les baies (Garde-Cerdán et al., 2014). L'azote assimilable correspond à la fraction d'azote présente dans le moût de raisin que les levures peuvent utiliser pour leur croissance et leur métabolisme pendant la FA. Il se divise principalement en deux formes : l'azote ammoniacal (NH_4^+) et l'azote aminé (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Essentiel pour le bon déroulement de la FA, cet azote constitue un nutriment clé pour les levures. De nombreuses études ont montré que la fertilisation azotée induit des concentrations d'azote (N) dans les raisins plus importantes, augmentant ainsi la concentration d'acides aminés dans les vins (Bell & Henschke, 2005; Gutiérrez-Gamboa et al., 2017).

Dans les vins, les itinéraires de vinification (comme les paramètres de fermentation, le type de levure...) et d'élevages, les réactions d'amination et de transamination des aldéhydes et cétones impactent la composition des acides aminés (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2020). De plus, l'ajout de sels ammoniacaux au moût est une pratique courante qui influence la concentration en acides aminés dans les vins (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). En effet, lorsque les moûts sont carencés en azote ($60\text{-}120 \text{ mg.L}^{-1}$) (Gutiérrez-Gamboa et al., 2022), cet ajout permet de sécuriser l'activité des levures et donc les cinétiques fermentaires en limitant les risques d'arrêts de fermentation, ou de fermentations languissantes (Sablayrolles et al., 1996; Van Leeuwen, 2010). Par ailleurs, la métabolisation des composés azotés par la levure est connue pour être à l'origine de divers composés secondaires de la FA (Vilanova et al., 2012), lesquels ont un impact sur l'arôme des vins blancs.

Malgré l'influence de nombreux paramètres sur la concentration et la composition des acides aminés dans les moûts, plusieurs études (Mirás-Avalos et al., 2020; Pérez-Álvarez et al., 2019; Sartor et al., 2021) ont examiné les profils d'acides aminés des moûts ou des vins pour les différencier et les classer selon les cépages, les conditions de gestion et les régions viticoles.

2.2. Caractérisation des acides aminés par Chromatographie Liquide à Haute Performance

Au cours des dernières années, l'évolution de l'analyse instrumentale a permis la détection et la quantification d'un nombre croissant d'acides aminés libres avec une sensibilité et une précision toujours plus grande. Pour être optimale, la détermination des acides aminés dans les moûts et les vins doit répondre à plusieurs critères : elle doit permettre la détection simultanée des acides aminés primaires et secondaires, comme la proline, présenter une faible limite de détection et avoir un temps d'analyse court (Herbert et al., 2000).

Plusieurs techniques différentes sont utilisées dans l'analyse des acides aminés dans les vins tels que la chromatographie ionique avec détection par UltraViolet (UV), la séparation des dérivés d'acides aminés volatils par Chromatographie en phase Gazeuse (CG) avec Détection par Ionisation de Flamme (FID) et/ou Spectrométrie de Masse (SM) et la séparation des dérivés d'acides aminés par Chromatographie à Haute Performance Liquide (HPLC) et leur détection par fluorescence (Callejón et al., 2010). La majorité des études étudiant le profil aminé des moûts ou des vins (Burin et al., 2016; Martínez-Pinilla et al., 2013; Mirás-Avalos et al., 2020; Pérez-Álvarez et al., 2019; Portu et al., 2014; Sartor et al., 2021) utilisent l'HPLC couplée à un détecteur UV ou fluorescent.

2.2.1. Principe de l'HPLC

L'HPLC est une technique séparative permettant de séparer les composants d'un mélange. Les composés à séparer (solutés) sont dissous dans un solvant, formant ainsi un mélange qui est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). En chromatographie, les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces (noté K) entre deux phases non miscibles : phase mobile et phase stationnaire. La phase stationnaire est disposée dans une colonne. La majorité des phases stationnaires utilisées sont des phases stationnaires dites normales ou inversées. En fonction des analytes à étudier, l'une ou l'autre

des colonnes est utilisée (Bélangier et al., 1997; Nollet & Toldrá, 2013). Dans le cas de l'analyse des acides aminés, la majorité des études (Burin et al., 2016; Martínez-Pinilla et al., 2013; Mirás-Avalos et al., 2020; Pérez-Álvarez et al., 2019; Portu et al., 2014; Sartor et al., 2021) utilisent la chromatographie en phase inverse (**Tableau 3**).

2.2.1.1. Appareillage

2.2.1.1.1. Phase stationnaire dite inversée

Le mode en phase inversée est applicable aux analytes polaires et hydrophobes tels que les acides aminés, et il se prête aisément à une utilisation en mode gradient en raison de l'équilibre qui s'établit rapidement. En chromatographie en phase inversée, la majorité des colonnes sont constituées de particules de silice modifiées comportant des chaînes carbonées allant de C8 à C18, conférant ainsi à la phase stationnaire une polarité inférieure à celle de la phase mobile. Cette dernière, dans ce mode, est composée d'eau et de solvants organiques (polaires) et est délivrée en mode isocratique ou en mode gradient. Les interactions des composés hydrophiles sont plus fortes avec la phase stationnaire que celles des composés hydrophobes. C'est pourquoi ces derniers sont élués et détectés à des temps de rétention plus courts. Le temps de rétention peut être modifié en fonction de divers paramètres tels que la modification de la phase stationnaire, de la phase mobile ainsi que la température de la colonne (Bélangier et al., 1997; Nollet & Toldrá, 2013).

Pour l'analyse des acides aminés, l'utilisation d'une phase stationnaire en mode inversé et d'une phase mobile polaire est la plus appropriée.

2.2.1.1.2. Phase mobile

La phase mobile, mise en mouvement par une pompe sous haute pression, traverse le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté et transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors en fonction de leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire (Bélangier et al., 1997; Nollet & Toldrá, 2013). Les analytes élués sont ensuite analysés à l'aide de différents détecteurs. Le détecteur ultraviolet (UV) reste le détecteur le

plus utilisé. D'autres détecteurs peuvent être utilisés tels que Détecteur à Réseau de Diodes (DAD), réfractomètre (dRI) et détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) (Swartz, 2010).

Tableau 3: Tableau récapitulatif des conditions analytiques (type de colonnes, phases mobiles) utilisées par divers chercheurs pour l'analyse des acides aminés dans les moût et vins

Etudes	Type de colonnes	Phases mobiles
Etude 1 (Mirás-Avalos et al., 2020)	Apolaire (C18)	Polaire A : tampon B : méthanol/acétonitrile
Etude 2 (Portu et al., 2014)	Apolaire (C18)	Polaire A : tampon B : méthanol/acétonitrile/eau
Etude 3 (Sartor et al., 2021)	Apolaire (C18)	Polaire A : tampon B : méthanol/acétonitrile/eau

2.2.2. Détecteurs couplés à HPLC

Différents détecteurs sont utilisés afin de mesurer les propriétés physiques ou chimiques du soluté ou de la phase mobile : détecteur UV/visible, détecteur à fluorescence, détecteur dRI, etc. Dans la grande majorité des cas, le détecteur UV-visible est utilisé car de nombreux composés d'intérêt absorbent dans la région UV (ou visible) (de 190 à 600 nm).

2.2.2.1. Détecteur UV-visible

La concentration de l'échantillon, exprimée en absorbance, est déterminée par la fraction de lumière transmise à travers la cellule de détection, selon la loi de Beer :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon bc \quad (eq1)$$

où **A** est l'absorbance, **I₀** est l'intensité de la lumière incidente, **I** est l'intensité de la lumière transmise, **ε** est le coefficient d'extinction molaire de l'échantillon (L.mol⁻¹.cm⁻¹), **b** est la longueur du chemin optique dans la cellule (en cm), et **c** est la concentration molaire de l'échantillon (mol.L⁻¹).

L'absorption UV résulte de la transition des électrons entre les orbitales moléculaires $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ ou $n \rightarrow \sigma^*$. La plupart des composés aromatiques absorbent fortement à ou en dessous de 260 nm, les composés avec une ou plusieurs doubles liaisons (par exemple, les carbonyles, oléfines) à environ 215 nm, et les composés aliphatiques à environ 205 nm. Les acides aminés quant à eux absorbent majoritairement à 280nm (Burin et al., 2016; Mirás-Avalos et al., 2020). Le choix du solvant de phase mobile et du tampon est également important pour une sensibilité et une linéarité UV optimales ; les coupures UV (la longueur d'onde à laquelle le solvant absorbe) deviennent particulièrement significatives à des longueurs d'onde faibles (Swartz, 2010).

2.2.3. Préparation préalable des échantillons : Etape de dérivation

Seuls les acides aminés aromatiques présentent une absorption dans la région UV. Cela est dû au fait que la détection par UV requiert la présence d'un groupement chromophore dans la molécule, qui est généralement constitué d'une séquence de doubles liaisons conjuguées. Pour exploiter l'HPLC avec un détecteur UV, il est essentiel de coupler un chromophore aux amines biogènes grâce à un agent dérivatisant. Il en existe plusieurs types en fonction de la matrice étudiée. Dans le cas des vins, l'agent le plus couramment utilisé est l'Ortho-PhtAldehyde (OPA) pour les analyses en chromatographie liquide en phase inversée (Portu et al., 2014). Cependant, il réagit principalement avec les groupes amines primaires des acides aminés mais pas avec les amines secondaire tels que la proline (Callejón et al., 2010).

Afin d'avoir une analyse globale du contenu en acides aminés de nos vins, le diéthyl éthoxyméthylène malonate (DEEMM) est utilisée (Mirás-Avalos et al., 2020; Sartor et al., 2021). Ces agents dérivatisants, par le biais de réactions chimiques, rendent visibles les amines biogènes pour le détecteur à réseau de diodes. Concernant le DEEMM, une réaction d'alkylation a lieu (**Figure 4**). Une fois l'étape de dérivation effectuée, l'analyse par HPLC peut débuter.

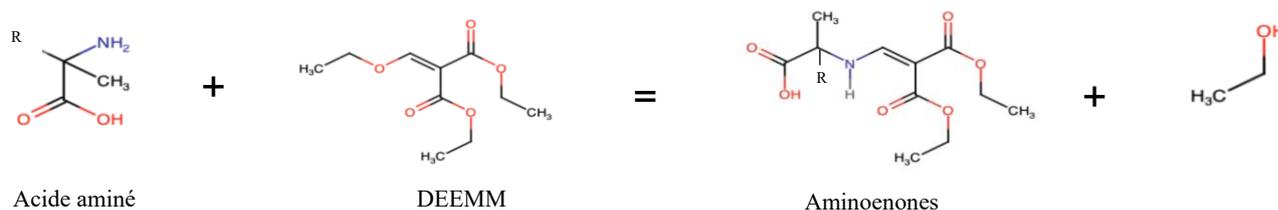


Figure 4: Exemple de réaction d'alkylation par agent désatisant DEEMM

Source : Figure réalisée par l'auteurice

Les acides aminés présents dans les moûts et les vins jouent un rôle crucial dans les propriétés sensorielles des vins, en particulier lors de la FA. En effet, ils sont en partie consommés par les levures pour produire des composés volatils odorants, comme les thiols, qui influencent l'arôme du vin. Ces acides aminés sont affectés par divers facteurs, tels que le cépage, le millésime, les pratiques viticoles et les méthodes de vinification. Dans la littérature, l'analyse des profils aminés de vins par HPLC a permis de mettre en évidence l'influence de certains facteurs, tels que le cépage, sur la composition en acides aminés des moûts et des vins. Cela suggère que cette méthode analytique pourrait constituer un outil efficace pour différencier les vins.

Cependant, peu d'études se sont spécifiquement concentrées sur les vins blancs, en particulier ceux provenant des vignobles du Sud-Ouest de la France. De plus, bien que les acides aminés dans l'alimentation soient reconnus pour leur contribution à la saveur, leur impact direct sur le goût du vin a été peu exploré, contrairement aux macromolécules comme les polyphénols ou les polysaccharides, qui ont fait l'objet de nombreuses recherches, surtout dans les vins rouges.

IV. Macromolécules des vins blancs : influence sur la perception gustative et méthode de caractérisation analytique

Lors de la dégustation d'un vin, différentes sensations peuvent être ressenties telles que la viscosité, l'astringence/sécheresse d'ordres tactile et trigéminal, ainsi que la chaleur, le picotement et la pétillance

d'origine chimio-sensorielle (Oberholster et al., 2009; Pickering & Demiglio, 2008). D'autres attributs en bouche, comme le goût métallique (Jones et al., 2008) et l'aigreur en bouche (Gawel et al., 2013), probablement liés à l'amertume, ont également été observés. La sensation en bouche peut donc être définie comme « l'ensemble des saveurs et sensations tactiles, irritantes et thermiques résultant de l'activation des récepteurs chimio-sensoriels et somatosensoriels dans la cavité buccale sous l'effet des stimuli chimiques du vin » (Gawel et al., 2018).

Ces variations gustatives sont générées par la présence de certaines macromolécules tels que des composés phénoliques, les polysaccharides et bien d'autres encore.

1. Les macromolécules majoritaires des vins Blancs

Il a été montré de manière empirique que la présence de diverses macromolécules du vin contribue au profil gustatif ou à la "sensation en bouche" qui caractérise les vins blancs renommés du monde entier. Parmi elles, les composés phénoliques sont les plus souvent cités pour leur rôle dans le goût et la sensation en bouche.

1.1. Les composés phénoliques des vins blancs

Il existe une grande diversité de composés phénoliques dans les vins tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les dérivés de stilbènes, les coumarines, les dérivés du phénylpropanol ou encore les lignanes et les néolignanes. Ces composés phénoliques possèdent des propriétés bactéricides, antioxydantes et vitaminiques (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Ces molécules proviennent de différentes parties des grappes de raisin (des pépins, des rafles ou de la pellicule) et sont extraites au cours de la vinification (Cheynier, 2005). La variété de raisin et sa maturité, les facteurs environnementaux (climat, sol), ainsi que les conditions de fermentation et de vieillissement (Fang et al., 2008) sont autant de facteurs impactant la composition phénolique des vins.

Les vins rouges sont généralement plus riches en composés phénoliques que les vins blancs en raison de l'étape de macération, qui permet un contact prolongé entre la peau des raisins, riche en ces composés,

et le jus (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Les composés phénoliques majoritaire dans les vins blancs sont les acides phénoliques (Gawel et al., 2018).

1.1.1. Acides phénoliques

1.1.1.1. Structure

Dans les raisins et les vins, les formes d'acides phénoliques les plus courantes sont les acides cinnamiques et benzoïques (**Figure 5**). Dans les vins blancs, ces composés sont retrouvés à des concentrations de 10 à 20 mg.L⁻¹ (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Selon la substitution de leur cycle benzénique, différents types d'acides peuvent être distingués. Parmi eux, les formes les plus courantes sont les acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques ainsi que leurs dérivés (Garrido & Borges, 2013).

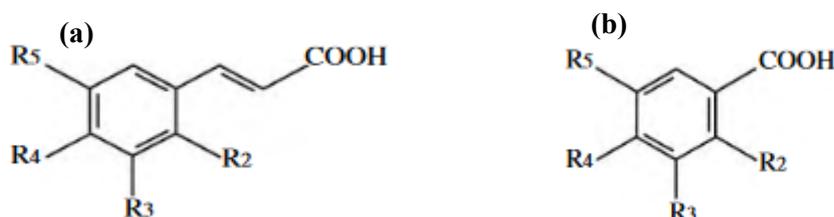


Figure 5: Acides phénoliques dans vins blancs : (a) acide cinnamique ; (b) acide benzoïque

1.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques sont caractérisés par la présence d'un groupe éthylène entre le noyau benzoïque et le groupement carboxylique (**Figure 6**). Ils se trouvent principalement sous forme d'esters tartriques, notamment ceux de l'acide caféique (caftarique), de l'acide p-coumarique (coutarique) et de l'acide férulique (fertarique)(Gawel et al., 2018). La présence d'une double liaison sur le côté latéral donne lieu à l'existence de deux formes isomériques. L'acide caftarique trans et l'acide férulique trans sont principalement localisés dans la pulpe, et lors du pressurage des raisins, ils sont rapidement libérés dans le jus. En revanche, les isomères trans et cis de l'acide p-coumarique sont moins extractibles car ils

sont principalement localisés dans la pellicule du raisin. Ces composés sont connus pour être partiellement responsables des propriétés astringentes des raisins et du vin (Garrido & Borges, 2013).

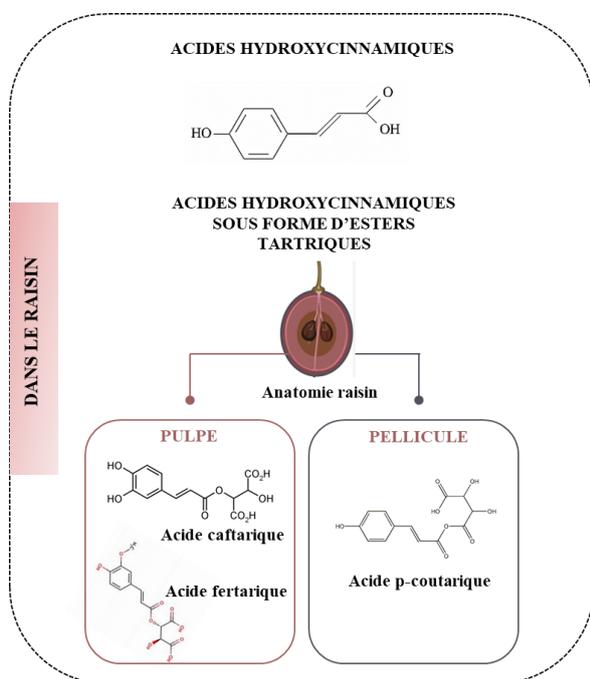


Figure 6: Acides hydroxycinnamiques présents dans les raisins

Source : Figure réalisée par l'auteurice

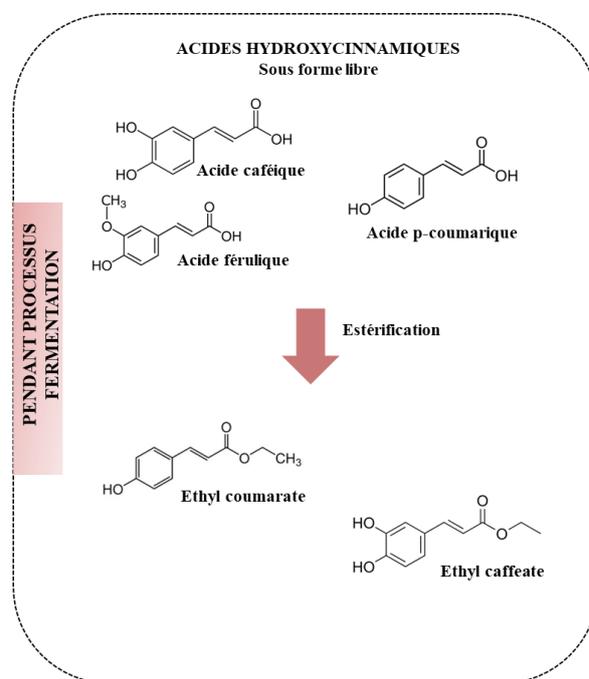


Figure 7: Composés libérés pendant la FA à partir d'esters d'hydroxycinnamiques

Source : Figure réalisée par l'auteurice

Pendant la FA (**Figure 7**), une hydrolyse partielle de ce type d'esters se produit, donnant des acides hydroxycinnamiques libres, qui sont ensuite transformés en esters éthyliques, à savoir l'éthyl coumarate et l'éthyl caffeate (Pozo-Bayón et al., 2003).

1.1.1.3. Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques se composent d'un seul noyau benzénoïde et d'un groupe hydroxyle, mais se caractérisent par une substitution supplémentaire avec un groupe acide carboxylique (**Figure 8**). Les acides hydroxybenzoïques les plus répandus dans le vin blanc sont les acides gallique, gentsique, p-hydroxybenzoïque, syringique et salicylique (Monagas et al., 2005). Ils se trouvent principalement sous leur forme libre.

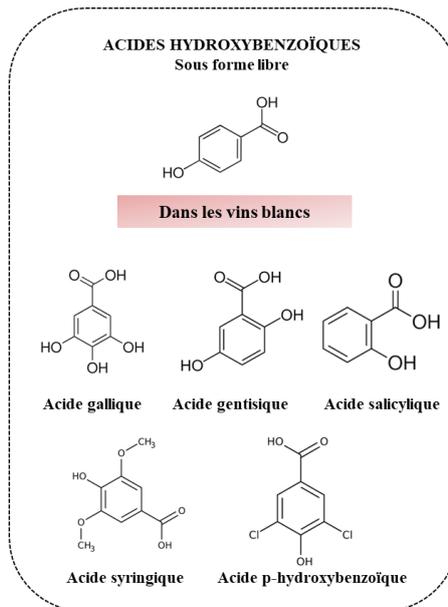


Figure 8: Composés libérés pendant la FA à partir d'esters d'hydroxybenzoïques

Source : Figure réalisée par l'auteurice

Dans les vins blancs en plus des acides phénoliques, des flavonoïdes peuvent être retrouvés.

1.1.2. Flavonoïdes

Ce sont des pigments jaunes plus ou moins intenses, dont la structure est caractérisée par deux cycles benzéniques liés par un hétérocycle oxygéné, dérivé soit du noyau 2-phényl chromone (flavones et flavonols), soit du noyau 2-phényl chromanone (flavanones et flavanonols) (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020) (**Figure 9**).

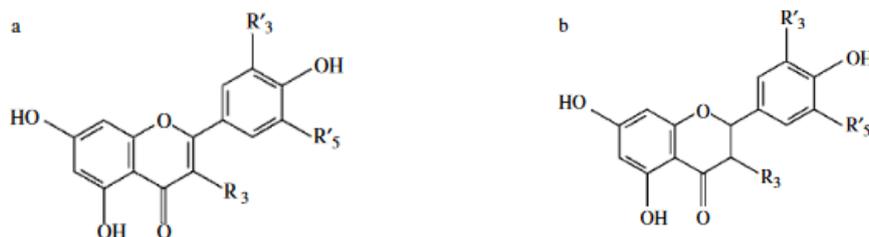


Figure 9: Deux types de Flavonoïdes présents dans les vins blancs

(a) flavone ($R_3 = H$) et flavonol ($R_3 = OH$); (b), flavanone ($R_3 = H$) et flavanonol ($R_3 = OH$)

Les composés les plus répandus dans les raisins sont les flavonols (**Figure 10**), pigments jaunes présents dans les pellicules des raisins (Rodríguez Montealegre et al., 2006). Dans les vins blancs, les flavonols sont présents sous forme glycosylée et glucuronique (Castillo-Muñoz et al., 2007) : le kaempférol ($R'_3 : H ; R'_4 : H$), la quercétine ($R'_3 : OH ; R'_4 : H$). Ils sont présents dans le vin à des concentrations variant de 1 à 3 $mg.L^{-1}$ selon le cépage (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020).

Les flavanols, quant à eux, se trouvent principalement dans les couches hypodermiques des pellicules et dans le parenchyme des pépins. Le (C)-catéchine et son diastéréoisomère (i)-épicatechine sont les flavanols dominants dans le vin blanc (Di Lecce et al., 2014).

Des flavanols glycosylés ont été identifiés dans la pellicule et les rafles, les 3-O rhamnosides de dihydroquercétine (astilbine) et de dihydrokaempférol (engéletine) étant les plus significatifs dans le vin blanc (Masa et al., 2007; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Leur concentrations varient entre 1 et 13 $mg.L^{-1}$ (Vitrac et al., 2002).

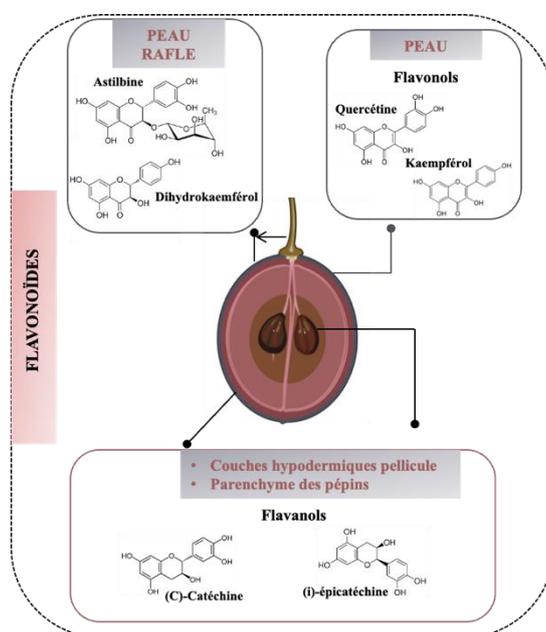


Figure 10: Flavonoïdes majoritaires dans les vins blancs

Source : Figure réalisée par l'auteur

Il est également possible de retrouver certains tanins dans les vins blancs (les flavan-3-ols), bien qu'ils soient moins concentrés que dans les vins rouges.

1.1.3. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques capables de provoquer la précipitation des protéines. Ils se divisent principalement en deux classes : les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables ou condensés. Les tanins naturels présents dans les raisins et le vin sont surtout du type condensés (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020).

1.1.3.1. Tanins condensés

Les tanins condensés, ou proanthocyanidines, sont des composés polymères dérivés des anthocyanidines (Ribéreau-Gayon, Dubourdiou, et al., 2020). Ils peuvent être classifiés selon le nombre d'unités flavanols qu'ils contiennent (Degré de polymérisation ou DP). Généralement on distingue classiquement les oligomères (de 2 à 10 unités flavanols) et les polymères (au-delà de 10 unités flavanols). On les trouve en faibles quantités dans les composants solides des raisins (pellicule, pépins) ainsi que dans la pulpe (Garrido & Borges, 2013). La quantité, la structure et le DP des proanthocyanidines varient en fonction de leur localisation dans les tissus du raisin, mais également pendant la maturation du raisin et sont transférés dans le moût pendant la vinification. Les procyanidines et prodelphinidines sont les tanins condensés les plus abondants dans les raisins et les vins (Garrido & Borges, 2013).

L'étude des proanthocyanidines est cruciale en œnologie car elles influencent fortement les caractéristiques sensorielles du vin, telles que la couleur, le goût, l'astringence et l'amertume (Gawel et al., 2018; Vidal, Francis, et al., 2003; Vilela, 2016).

1.2. Les polysaccharides des vins blancs

Les polysaccharides présents dans le vin blanc proviennent à la fois des raisins et de l'activité des levures pendant et après la FA. Ce sont des macromolécules dont le poids moléculaire varie entre 8 et 800 kDa, ce qui en fait, dans leur ensemble, les composés de plus haut poids moléculaire trouvés dans le vin blanc (Jones-Moore et al., 2021). Les polysaccharides du vin se répartissent en trois grandes familles :

- Les arabinogalactanes (AGP) qui sont caractérisés par une haute proportion de résidus d'arabinose et de galactose et associées à un noyau protéique contenant une forte proportion

d'hydroxyproline (Fincher et al., 1983). Ils sont présents dans les espaces vacuolaires intracellulaires des raisins et sont donc facilement extraits lors de l'extraction du jus et au début de la fermentation (Guadalupe & Ayestarán, 2007).

- Les rhamnogalacturonanes II (RGII) qui sont libérés des pectines intégrées dans la paroi cellulaire des raisins, se caractérisent par leur faible poids moléculaire (<20 kDa), une proportion relativement élevée d'acide galacturonique et de résidus de rhamnose, ainsi que la présence des sucres spécifiques fucose et apiose (Pellerin et al., 1996). Ces sucres ont la particularité d'être nommé « sucres diagnostiques » car leur présence caractéristique permet d'identifier certaines structures ou fonctions biologiques spécifiques (Jones-Moore et al., 2021; Vidal, Williams, et al., 2003).
- Les mannoprotéines constituent la troisième catégorie de polysaccharides. Elles sont libérées des parois cellulaires des levures pendant la FA et au cours de l'autolyse où les cellules de levure inactives (lies de levure) entrent en contact avec le vin durant l'élevage. Elles se caractérisent par une haute teneur en mannose par rapport aux autres monosaccharides, mais présentent une large distribution de poids moléculaires, suggérant l'existence de plusieurs populations de mannoprotéines selon leur origine (Gonçalves et al., 2002; Jones-Moore et al., 2021; Vidal, Williams, et al., 2003).

1.3. Les protéines des vins blancs

Les protéines sont des composantes fondamentales, à la fois structurelles et fonctionnelles, de tous les organismes vivants. Ces macromolécules (poids moléculaire >10 kDa) sont formées de chaînes précises d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Les vins blancs et rosés ont des concentrations en protéines plus importantes que les vins rouges. En effet dans ces derniers, les protéines sont précipitées par les tanins (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020).

Dans les vins (Ferreira et al., 2001; Okuda et al., 2006), la majorité des protéines sont des thaumatines-like (TLP) et chitinases (20 à 30 kDa) mais ne sont pas présentes en grande quantité (concentrations maximales allant jusqu'à 300 mg.L⁻¹ dans les vins non collés)(Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020).

Ces protéines sont retrouvées dans la pulpe et la pellicule de raisin (Ribéreau-Gayon, Glories, et al.,

2020). La teneur en protéines des vins dépend de plusieurs facteurs, notamment la variété ainsi que la maturité du raisin et le processus de vinification (Sauvage et al., 2010). Elles s'accumulent pendant la maturation en même temps que les sucres.

Les protéines du vin sont principalement connues pour jouer un rôle important dans l'instabilité du vin, notamment dans un phénomène appelé "trouble protéique" (Ferreira et al., 2001; Lamikanra & Inyang, 1988; Waters et al., 2005). Ce phénomène entraîne la formation de trouble dans les bouteilles exposées à la chaleur (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Les composés phénoliques interagissent avec les protéines du vin (TLP) et des chitinases (Ferreira et al., 2001), provoquant la formation de trouble qui peut s'aggraver au fil du temps lors du stockage ou du transport (Van Sluyter et al., 2015). Il est important de noter que ce phénomène ne présente aucun risque pour la santé (Marangon et al., 2011) et n'affecte pas les caractéristiques olfactives et gustatives du vin (Peng et al., 1997).

Pour résoudre ce problème, les vignerons utilisent principalement la bentonite comme agent de collage (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Cette argile chargée négativement interagit de manière non spécifique avec les protéines, qui présentent une charge positive au pH acide du vin, provoquant ainsi leur sédimentation (Vernhet et al., 2020). Cependant, ce processus est coûteux et présente plusieurs inconvénients pour la qualité, ce qui incite à la recherche d'alternatives (Mierczynska-Vasilev et al., 2022).

Leur impact sur la perception du goût a été peu étudié à ce jour (Ferreira et al., 2001) malgré le fait que la TLP présentent une homologie de séquence avec les thaumatines, un groupe de protéines extrêmement sucrées issues du fruit d'un arbuste africain, le *Thaumatococcus daniellii*.

Les différentes macromolécules présentes dans le vin, telles que les composés phénoliques, les polysaccharides et les protéines, jouent un rôle fondamental non seulement dans la composition chimique du vin, mais aussi dans ses propriétés organoleptiques. Ces éléments influencent directement la texture, le goût, et la sensation en bouche, contribuant ainsi à l'expérience sensorielle globale du vin blanc.

Il est donc essentiel d'examiner plus en détail comment la composition des vins blancs impacte spécifiquement leur perception en bouche.

2. Influence sur la perception gustative

2.1. Composés phénoliques : Tanins

Les polyphénols sont le plus souvent cités pour leur impact sur le goût et la sensation en bouche dans le vin, et affectent ces attributs de manière significative en augmentant l'astringence. Cette dernière est généralement définie comme l'ensemble des sensations tactiles ressenties dans la bouche, y compris le rétrécissement, le plissement et le resserrement de la surface buccale (Soares et al., 2020). Elle peut être stimulée par les sels de cations métalliques multivalents, des agents déshydratants comme l'éthanol, des acides minéraux et organiques, des tanins et de petits polyphénols (Bajec & Pickering, 2008). Cependant dans le vin, l'astringence est principalement due aux proanthocyanidines, également appelées tanins condensés (Brandão et al., 2014). En effet, les tanins ont la capacité de se lier et de précipiter avec les protéines salivaires (Gawel et al., 2018a; Soares et al., 2020; Vilela, 2016) (**Figure 11**). La perte de lubrification dans la cavité buccale, y compris sur la langue, se produit lorsque les tanins se lient aux protéines salivaires, formant des précipités insolubles de tanins-protéines, augmentant ainsi la friction et provoquant la sensation d'astringence (Baxter et al., 1997). Les interactions ont notamment lieu entre les tanins et une certaine famille de protéines salivaires, dite protéines riches en proline (PRPs) (Padiglia et al., 2018). Plus récemment l'implication d'autres protéines salivaires dans les interactions avec les tanins et la perception de l'astringence a été mise en évidence, notamment les stathérines, le peptide P-B, également riche en proline et qui présente des similarités structurales avec les stathérines (Soares et al., 2016) ou encore les mucines (Brandão et al., 2017) qui sont des constituants majeurs du mucus qui tapisse l'épithélium buccal et contribuent à la viscosité de la salive (Strous & Dekker, 1992).

La formation de complexes tanins-protéines solubles (Baxter et al., 1997; Sarni-Manchado & Cheynier, 2002) et insolubles (Charlton et al., 2002) augmente avec le DP des tanins de même que leur astringence (Vidal, Francis, et al., 2003). Ces propriétés pourraient être liées à une augmentation de la solubilité (Pianet et al., 2008) qui favoriserait l'établissement d'interactions avec les protéines.

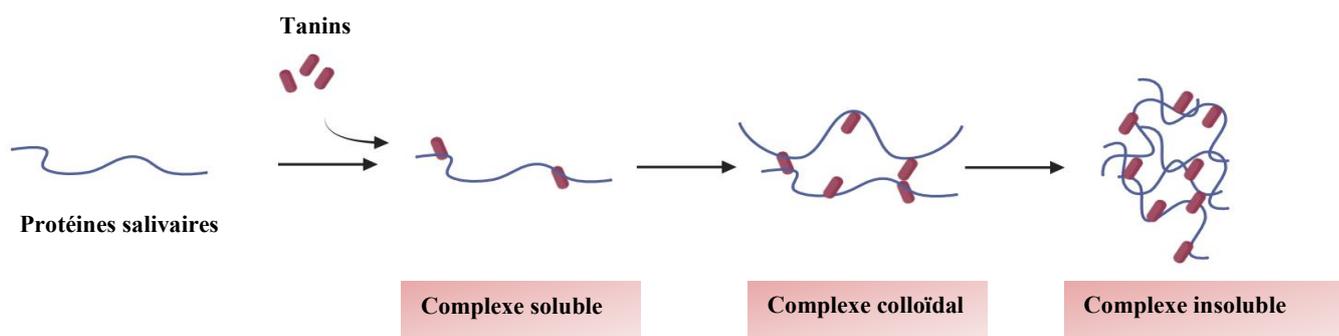


Figure 11: Interaction Tanins-protéines salivaires

Source : Figure réalisée par l'auteur

Cependant, les fractions de polyphénols de faible poids moléculaire composées de monomères et de dimères ne se lient pas bien aux cellules épithéliales orales, malgré la présence simultanée de protéines salivaires. Cela suggère que les polyphénols de faible poids moléculaire tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques ne contribuent pas à l'astringence. De plus, les acides phénoliques, bien qu'ils soient connus pour affecter le goût dans d'autres matrices (amertume) (Vidal, Francis, et al., 2003), présentent des concentrations dans le vin inférieures à leur seuil de détection, ce qui n'entraîne aucune modification perceptible du goût (Vilela, 2016).

Les interactions entre les protéines et les tanins peuvent être influencées par plusieurs paramètres, tels que leurs caractéristiques structurales, la concentration en éthanol, la force ionique, le pH, la température et la présence de polysaccharides (Gawel et al., 2018). Les polysaccharides contrebalancent l'astringence mais ont également d'autres effets qui seront examinés plus en détail par la suite.

2.2. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont parmi les principales macromolécules du vin, connus pour influencer les propriétés organoleptiques. La diversité et la complexité des structures des polysaccharides du vin leur confèrent la capacité de former des associations intermoléculaires avec d'autres composants du vin responsables des sensations en bouche, soit par des liaisons hydrogène, soit par des interactions hydrophobes (Gawel et al., 2018). Par exemple, les polysaccharides ont la capacité d'inhiber ou de réduire les interactions entre les protéines salivaires et les tanins entraînant une diminution de la perception de l'astringence, de l'amertume et de la chaleur causées dans les vins blancs (Brandão et al., 2020). Différents types d'interactions entre polysaccharides et protéines salivaires ont été décrites : des interactions hydrophobes entre le noyau protéique de certains polysaccharides et l'anneau des protéines salivaires, ou des liaisons hydrogène entre les résidus de monosaccharides sur les polysaccharides et les groupes hydroxyles des protéines salivaires (Coupland & Hayes, 2014; Vidal, Francis, et al., 2004). L'impact des polysaccharides sur les perceptions gustatives des vins varie selon leur nature.

En effet, les RG II sont plus associés dans la diminution de la perception de l'astringence que les AGPs qui agissent plus sur la réduction de l'amertume des vins (Brandão et al., 2020). De plus, au-delà du rôle central de la structure des polysaccharides, les structures des protéines et des tanins sont également cruciales pour l'effet de ces polysaccharides.

Par ailleurs, les polysaccharides du vin portent des charges négatives au pH du vin et sont donc fortement hydratés (Gawel et al., 2016). L'immobilisation partielle de l'eau autour des grandes molécules de polysaccharides peut perturber les structures locales d'eau-eau et d'eau-éthanol, ce qui peut *in fine* affecter la viscosité de la solution et la perception de la chaleur de l'alcool (Gawel et al., 2016). En outre, ces changements dans la structure globale de l'éthanol aqueux sont susceptibles d'être influencés par le pH via l'ionisation des groupes carboxyles sur les résidus d'acide uronique contenus dans les AGPs et les RGII (Gawel et al., 2016).

Dans les vins, les mannoprotéines constituent la troisième catégorie de polysaccharides. Elles contribuent également à la modulation de l'astringence et à la rondeur des solutions de vins modèles grâce à leur structure chimique (principalement glycosidique avec des polymères de mannose) (Rinaldi et al., 2012).

2.3. Les protéines

L'impact des protéines de type TLP sur les perceptions sensorielles des vins blancs a déjà fait l'objet d'études (Peng et al., 1997). Cependant, bien que ces protéines présentent une certaine homologie avec la thaumatine issues de l'arbre fruitier *Thaumatococcus daniellii*, elles n'ont pas été identifiées comme ayant un goût sucré. Elles peuvent néanmoins interagir avec des complexes qui influencent le goût (Curioni et al., 2008).

Les macromolécules présentes dans le vin blanc influencent directement les perceptions gustatives. Les vins issus du vignoble du Sud-Ouest se distinguent nettement par leurs saveurs. Il apparaît donc essentiel d'étudier leur composition macromoléculaire pour mieux comprendre les différences sensorielles et établir un lien avec leur profil macromoléculaire.

3. L'AF4, une méthode prometteuse de caractérisation des macromolécules du vin

La composition macromoléculaire des vins a été principalement étudiée et caractérisée par des techniques analytiques conventionnelles.

Les protéines du vin sont souvent étudiées à l'aide de différentes techniques analytiques tels que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Le Bourse et al., 2011; Okuda et al., 2006), la chromatographie liquide rapide des protéines par échange d'ions (Waters et al., 1993), l'HPLC (Marangon et al., 2009), la chromatographie par exclusion de taille (SEC) (López-Barajas et al., 1998) et bien d'autres encore. Cependant, l'isolement, la séparation et la caractérisation des protéines des moûts et des vins sont des tâches difficiles en raison de leur faible concentration et de leur forte interaction avec les polyphénols endogènes et d'autres composés non protéiques. Par conséquent, les procédures d'extraction et de concentration conventionnelles peuvent entraîner la précipitation des protéines par les phénols et les oxydases, ainsi que leur dégradation et/ou modification sans précipitation.

Les composés phénoliques, tanins condensés (proanthocyanidines), pigments et tanins dérivés, quant à eux, peuvent être identifiés par le biais de différentes techniques analytiques basées sur l'absorbance des

polyphénols dans l'UV-visible. Cependant, ces techniques ne donnent pas d'information sur la structure ni sur la masse molaire ou la distribution des polyphénols.

La technique de diffusion dynamique de la lumière est une candidate intéressante pour pallier ces problèmes en déterminant le profil macromoléculaire du vin (protéines, polyphénols et polysaccharides) en fournissant des informations sur la taille des particules (Poncet-Legrand et al., 2003). Cependant, cette méthode n'offre aucune information sur la composition chimique du vin (Podzimek, 2011). La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) a également été utilisée pour déterminer la distribution de la masse molaire des colloïdes chromophoriques du vin (Coelho et al., 2017; Gonçalves et al., 2002; Guadalupe et al., 2012). Bien que la SEC soit largement utilisée, elle présente une limitation majeure : les polymères de masse molaire supérieure à 10^6 g.mol⁻¹ peuvent se dégrader par cisaillement (alors que la majorité de la matière colloïdale dans les vins a une masse molaire supérieure à 10^6 g.mol⁻¹) (Podzimek, 2011).

Pour surmonter ces inconvénients, plusieurs projets ont promu une méthode non conventionnelle, le Fractionnement par Flux-Force Asymétrique (AF4) pour séparer et caractériser les macromolécules dans la bière (Choi et al., 2017; Tügel et al., 2015), les vins rouges (Marassi et al., 2021; Pascotto et al., 2020, 2021; Vernhet et al., 2011) et les vins blancs (Coelho et al., 2017; Osorio-Macías et al., 2022).

3.1. Le Fractionnement par couplage Flux-Force

Les techniques de Fractionnement par Flux-Force (FFF) ont été élaborées dans les années 1960 par Calvin Giddings. Elles ont longtemps pâti de l'invention, au cours de la même décennie, de la SEC, méthode alors plus largement adoptée. Cependant, au cours des trente dernières années, les utilisateurs se sont tournés vers la FFF du fait des nombreuses limites associées à la SEC. La FFF constitue une technique de séparation utilisée pour distinguer et caractériser un vaste ensemble de macromolécules et de particules pour une large gamme de tailles allant de 1 nm à des diamètres de particules de quelques μm .

3.1.1. Principe

Par définition (Schimpf et al., 2000), les techniques de FFF reposent sur le déplacement différentiel d'entités de taille nanométrique et/ou micrométrique, induit par un champ de force appliqué au sein d'une phase mobile dans un canal inerte et dépourvu de phase stationnaire interne.

Dans cette technique, la phase mobile s'écoule en régime laminaire à l'intérieur d'un canal dont l'épaisseur (w) est assez fine (quelques centaines de μm) (**Figure 12.a**). Cette particularité de régime laminaire entraîne des vitesses maximales au centre du canal et minimale, voire nulle, près des parois, en raison de la traînée de friction exercée par ces dernières sur le fluide. Lors de l'injection des particules dans le canal, la première étape est l'application d'un champ de force perpendiculaire au flux laminaire. Selon le type de champ de force appliqué (gradient de température, force centrifuge, flux d'éluant, etc.), les particules seront orientées vers la paroi d'accumulation en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, telles que la taille, la densité ou la charge. La vitesse de déplacement des analytes résulte de l'interaction entre le champ de force et les analytes, équilibrée par le pouvoir de diffusion de ces derniers. Ce pouvoir de diffusion est d'autant plus élevé que les analytes sont petits.

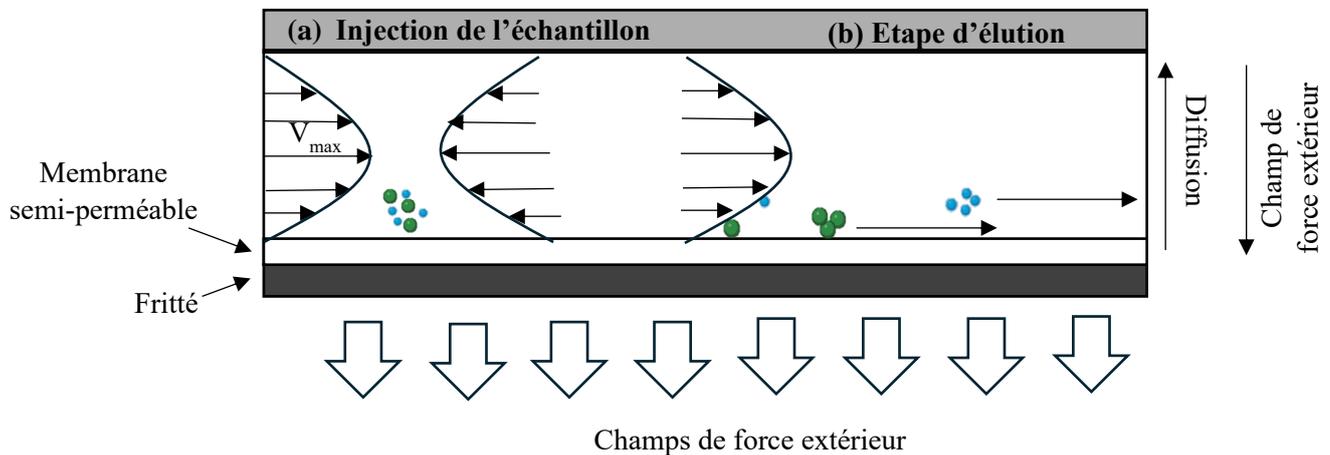


Figure 12: Principe de fonctionnement de FFF

(a) Etape d'injection de l'échantillon – (b) Etape d'éluion

Source : Figure réalisée par l'auteur

En conséquence, les particules de petite taille se déplacent vers des positions moyennes plus éloignées du mur d'accumulation dans le profil de vitesse, où cette dernière est plus élevée, tandis que les

particules plus grandes restent dans des zones où la vitesse est moindre. Une fois que les particules ont atteint leur équilibre, le flux laminaire appliqué sépare les molécules et les particules selon leur taille hydrodynamique. Ainsi, les particules plus petites, ayant des coefficients de diffusion plus importants, sont éluées avant les particules plus grosses (**Figure 12.b**) (Schimpf et al., 2000).

En fonction des analytes à étudier, différentes natures de champ de force peuvent être appliquées telles qu'un flux d'éluant, une force centrifuge ou encore un champ thermique.

Plusieurs sous techniques utilisent différentes natures de champ de force appliqué :

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

La technique du Flow FFF est l'une des techniques les plus utilisés. Il existe deux sous-techniques de Flow FFF : la Flow FFF symétrique (SF4) et la Flow-FFF Asymétrique (AF4). La différence entre ces deux sous-techniques réside dans l'anatomie du canal ainsi que le type de force fluidique. De plus, la SF4 est complexe techniquement parlant et conduit à une faible répétabilité et reproductibilité. L'AF4 est souvent majoritairement utilisée du fait de sa meilleure résolution et séparation grâce à la configuration de son canal. De plus, la plupart des études sur les matrices alimentaires (Choi et al., 2017; Coelho et al., 2017; Marassi et al., 2021; Osorio-Macías et al., 2022; Pascotto et al., 2020; Tügel et al., 2015), comme le vin et la bière, utilisent cette sous-technique. C'est pourquoi nous avons choisi d'adopter cette méthode dans cette thèse.

3.1.2. Fractionnement par Flux-Force Asymétrique

3.1.2.1. Appareillage

Dans cette technique, le flux d'écoulement laminaire (ou flux détecteur, V_d) ainsi que le champ de force (ou flux croisé, V_x) sont tous deux sous forme liquide et sont générés à partir de la phase mobile employée (Schimpf et al., 2000). Le canal de séparation (**Figure 13**) est composé :

- D'un bloc imperméable sur la partie supérieure du canal et d'un fritté sur le bloc inférieur.
- D'une membrane dite d'ultrafiltration, déposée sur le bloc inférieur. Le flux croisé appliqué va entraîner un effet de pression permettant le passage de la phase mobile via la membrane. Différentes natures de membranes existent tels que des membranes en cellulose régénérée (RC), en polyethersulfone (PES), polysulfone (PSU). De plus, en fonction de la taille des particules à étudier, différents seuils de coupures existent (5, 10, 30 kDa, etc.). Les particules ayant une taille inférieure au seuil de coupure de la membrane passeront à travers et ne seront pas analysées.
- Un « spacer », de forme trapézoïdale, est déposé sur la membrane. Ce dernier, majoritairement composé de Teflon ou Mylar, permet de définir l'épaisseur du canal déterminant le volume disponible de la zone de fractionnement du canal. Son épaisseur peut varier de 127 et 508 μm ainsi que sa forme qui peut être plus ou moins large selon les échantillons et les objectifs de l'étude.

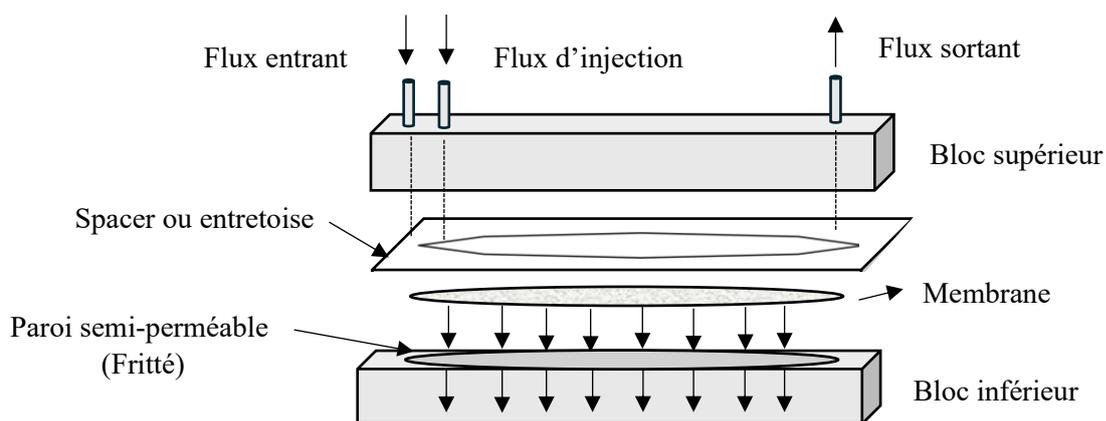


Figure 13: Représentation d'un canal AF4

Source : Figure réalisée par l'auteur

Comme énoncé précédemment, les particules se positionnent dans le canal en fonction de leur coefficient de diffusion grâce à l'application d'un flux croisé. Cette distribution des différents composés

tout au long du canal détermine leur ordre d'élution, leur sélectivité, l'élargissement des bandes et d'autres caractéristiques de séparation. En fonction de la taille des analytes, l'interaction entre le champ de force et la distribution des analytes peut varier, entraînant différents types de séparations.

3.1.2.2. Différents modes d'élution

En FFF, il existe différents types de séparation : le mode normal ou Brownien, le mode stérique et le mode lift-hyperlayer (Beckett et al., 1987; Koch & Giddings, 1986; Podzimek, 2011; Schimpf et al., 2000).

3.1.2.2.1. Mode normal ou Brownien

Ce mode d'élution permet la séparation des particules selon leur coefficient de diffusion et donc leur capacité à diffuser contre le champ de force fluide appliqué, ici flux croisé (**Figure 14**). Lorsque les particules sont entraînées vers la paroi d'accumulation par l'application du flux croisé, leur concentration augmente, créant un gradient de concentration qui provoque la diffusion des particules loin de la paroi. Plus les analytes ont un coefficient de diffusion élevé, plus ils peuvent diffuser à contre-courant du flux croisé, ce qui les éloigne davantage de la paroi d'accumulation. Ils se retrouvent alors au niveau des lignes rapides du profil de flux parabolique, entraînant leur élution plus rapide. Ainsi, les particules ayant un coefficient de diffusion plus élevé migrent plus rapidement que celles ayant un coefficient de diffusion plus faible. Ce dernier est inversement lié à la force exercée sur les particules par le champ, force qui augmente généralement avec la taille des particules. Ainsi, en mode normal, les plus petites particules migrent presque toujours plus rapidement et s'éluent plus tôt que les particules plus grosses.

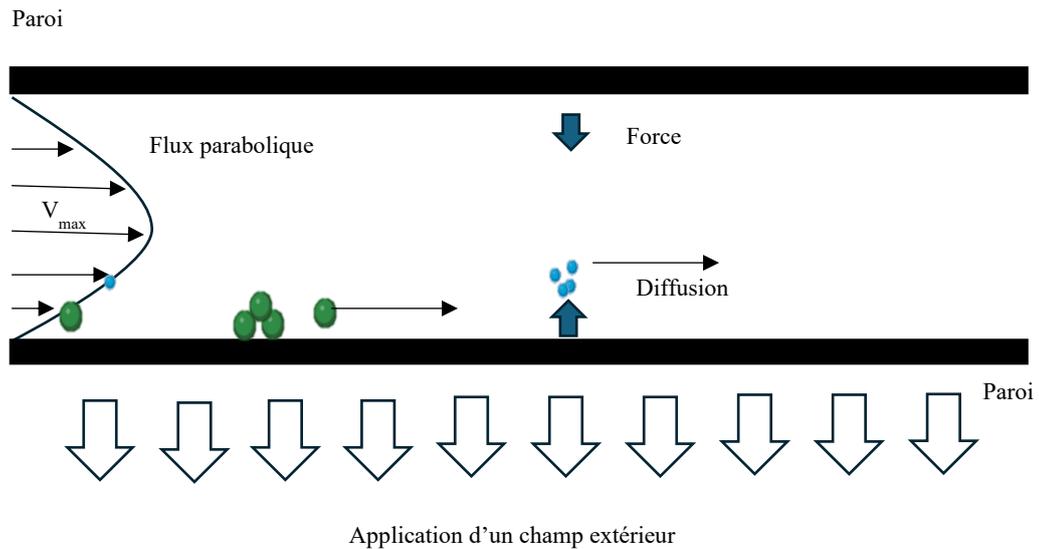


Figure 14: Mode normal ou Brownien

Source : Figure réalisée par l'auteurice

3.1.2.2.2. Mode stérique

Ce mode s'applique aux particules ayant un diamètre supérieur à $1 \mu\text{m}$. Étant donnée leur taille importante, la diffusion des analytes contre le champ devient négligeable (**Figure 15**). Les particules plus grosses sont directement entraînées par le flux croisé vers la paroi d'accumulation. Une fois arrêtées par la barrière physique de la paroi, ces particules forment une fine couche épousant la paroi. Les particules plus grosses forment des couches plus épaisses en raison de leur taille et de leurs rayons plus importants. En raison de leur élévation moyenne plus importante et de leur position plus élevée dans le profil de flux parabolique, les particules plus grosses sont déplacées plus rapidement par le flux du canal que les particules plus petites. Ainsi, les particules plus grosses s'éluent avant les plus petites, ce qui est l'opposé de l'éluion en mode normal.

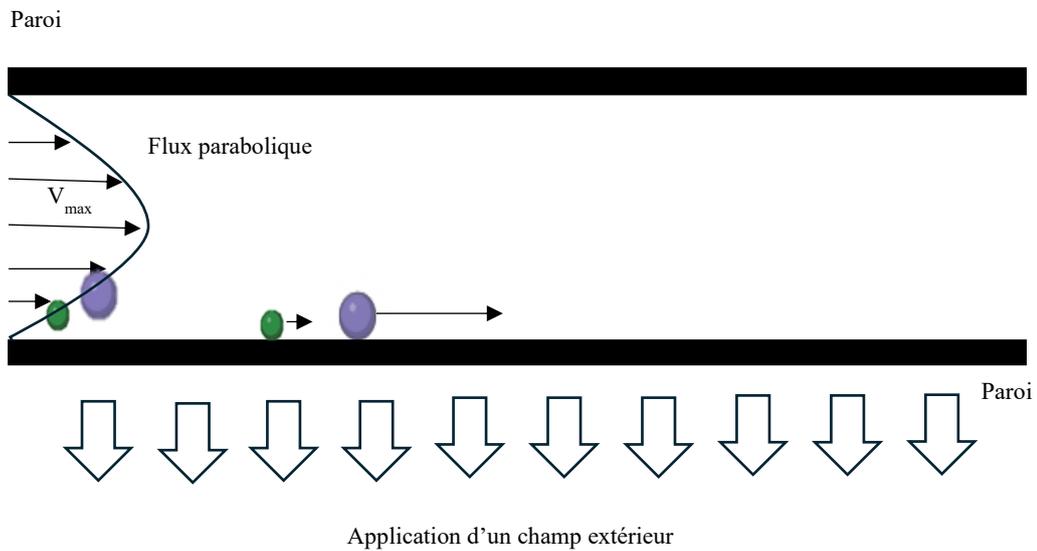


Figure 15: Mode stérique

Source : Figure réalisée par l'auteur

3.1.2.2.3. Mode hyperlayer

Les particules de tailles importantes éluées en mode stérique peuvent être soumises à une force de répulsion entre elles et la membrane (**Figure 16**). Cette force s'oppose à celle du champ de force. Plus l'analyte est de grande taille et plus cette force d'opposition est importante. Le même ordre d'éluution que le mode stérique se présente : les grosses molécules étant plus sujettes à cette force de répulsion, vont être placées sur les lignes de vitesses du flux laminaire plus importantes et vont donc être éluées les premières.

Il existe une similitude entre ces deux derniers modes d'éluution, qui permet de les grouper et de leur donner une appellation commune « mode stérique/ hyperlayer ».

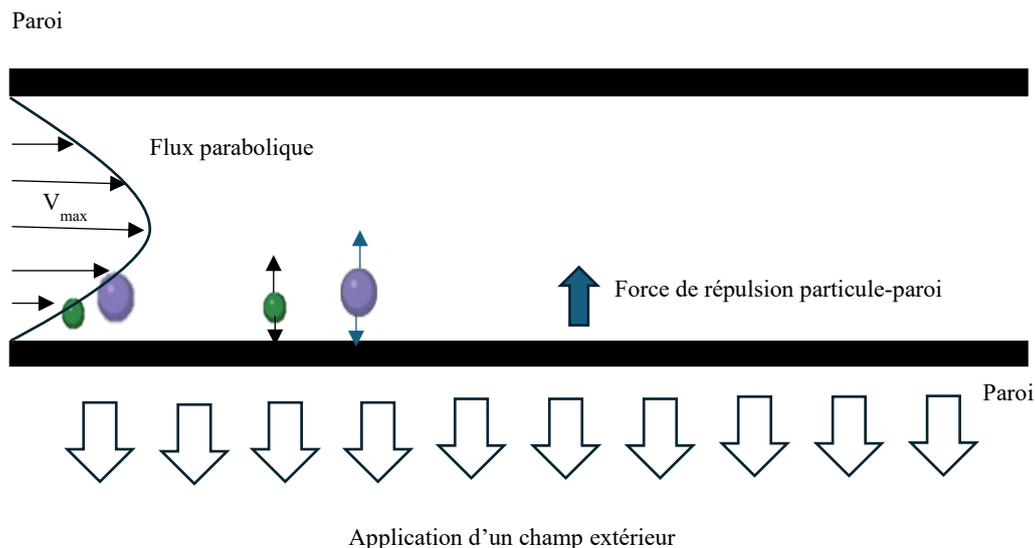


Figure 16: Mode stérique/ hyperlayer

Source : Figure réalisée par l'auteur

Le mode d'élution en mode normal régit la migration de la plupart des particules submicroniques et de pratiquement toutes les macromolécules. Il s'agit du mode de fonctionnement le plus largement utilisé, ayant été employé plus souvent par le passé que tous les autres modes combinés. Ce mode d'élution a donc été privilégié dans le cadre de la thèse.

3.1.2.3. Principe de fonctionnement de l'AF4

La séparation en AF4 se décompose en différentes étapes : dans un premier temps l'injection et le focus de l'échantillon, sa relaxation puis son élution (Podzimek, 2011; Schimpf et al., 2000).

3.1.2.3.1. Injection et Focus de l'échantillon

Pendant cette étape (**Figure 17**), l'échantillon est prélevé à l'aide d'une seringue d'injection de volume variable, puis injecté dans le canal via une boucle d'injection. Différents volumes de boucles d'injection sont disponibles en fonction du volume d'échantillon à injecter (de 1 μL à quelques millilitres). Le flux d'injection se mélange ensuite au flux laminaire constitué de la phase mobile. Un mode de « focus » est appliqué pour éviter la dispersion des analytes lors de l'injection. Pour ce faire, un second flux, opposé

au flux axial de la phase mobile, est appliqué à un débit plus élevé, permettant ainsi de préconcentrer l'échantillon à l'entrée du canal sur une ligne dite de « focus ».

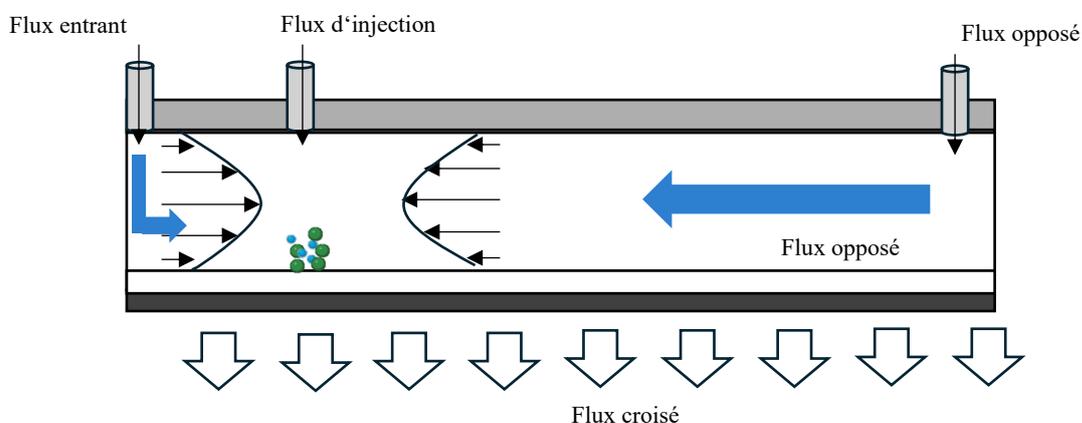


Figure 17: Étape d'injection et focus en AF4

Source : Figure réalisée par l'auteur

3.1.2.3.2. Etape de focus et relaxation

Pendant cette étape (**Figure 18**), le focus se poursuit en interrompant le flux d'injection pendant une durée variable selon le type et le volume d'échantillon. L'échantillon est alors préconcentré à l'entrée du canal et se relaxe. Durant cette phase de relaxation, le flux croisé crée un gradient de concentration de l'échantillon depuis la membrane. La diffusion des analytes en mode normal s'oppose à ce gradient. Le pouvoir de diffusion des particules est influencé par plusieurs facteurs, notamment leur taille. Plus les particules sont petites, plus elles diffusent facilement. Ainsi, la position moyenne des petites molécules se trouvent plus en hauteur dans le canal par rapport aux grosses molécules, qui restent plus proches de la membrane.

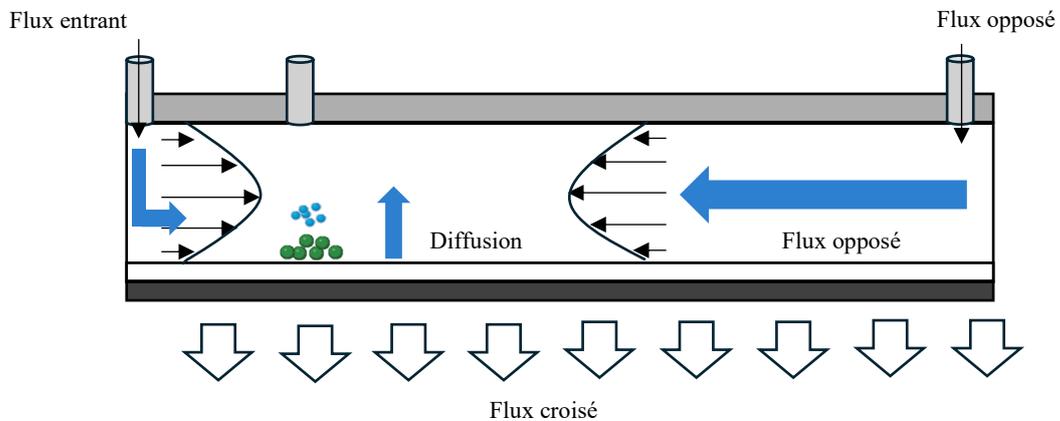


Figure 18: *Étape focus-relaxation en AF4*

Source : Figure réalisée par l'auteur

3.1.2.3.3. Etape d'éluion

Seul le flux tangentiel à la membrane, s'écoulant en régime laminaire, et le flux croisé, appliqué perpendiculairement à ce flux, sont maintenus le long du canal (**Figure 19**). Le profil de vitesse parabolique du flux tangentiel traduit la différence de hauteur des analytes par rapport à la paroi d'accumulation en une différence de vitesse de transport le long du canal. En d'autres termes, les composants les plus éloignés de la paroi d'accumulation (les plus petites molécules) sont transportés plus rapidement vers l'aval du canal que ceux qui en sont proches (les plus grosses molécules), qui se trouvent dans des flux de vitesse plus faible. Ce processus permet ainsi une séparation des composés selon leur taille croissante.

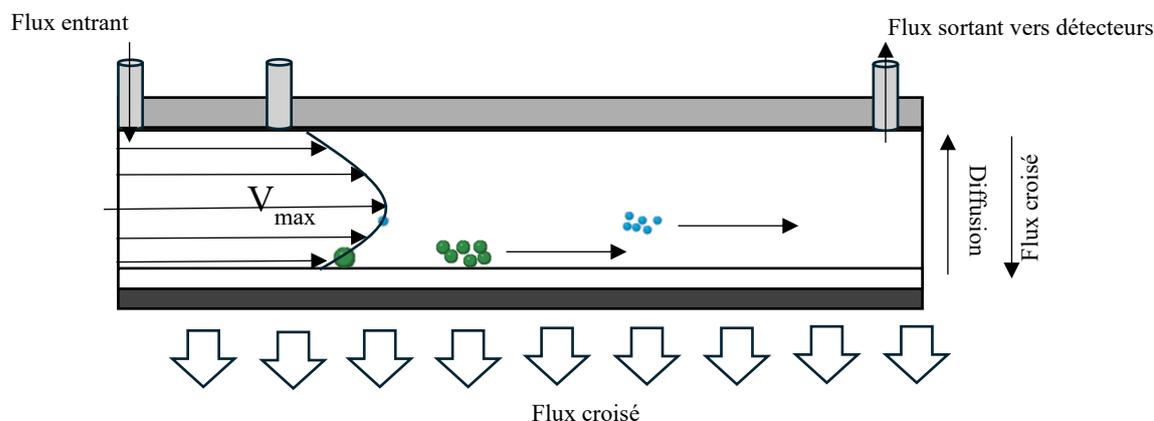


Figure 19: Etape d'éluion en AF4

Source : Figure réalisée par l'auteurice

Plusieurs paramètres, tels que le coefficient de diffusion, influencent le fractionnement des analytes long du canal. L'étude de la théorie de la FFF est donc primordiale pour comprendre l'influence de ces paramètres dans le but de définir un fractionnement optimal.

3.1.2.4. Théorie de la Flow-FFF

Dans les années 80, les fondements de la FFF ont été établis. Ces fondements ont été particulièrement bien décrits dans la littérature (Schimpf et al., 2000). Dans ce paragraphe seront résumées brièvement les principales équations relatives aux techniques d'AF4 permettant de définir un fractionnement convenable. Cette théorie est basée sur les lois classiques de la physique tels que le mouvement brownien, les écoulements laminaires et bien d'autres encore.

3.1.2.4.1. Rapport de rétention et temps de rétention (R_L et t_R)

Le rapport R_L est un facteur physique permettant de décrire le retard d'éluion d'un analyte dû à sa compression sous l'effet de la force du champ de force. Il est décrit par l'équation suivante (eq2) :

$$R_L = \frac{t_r}{t_0} \quad (\text{eq2})$$

Où t_r (en s) correspond au temps de rétention de l'analyte, c'est-à-dire le temps nécessaire pour qu'il traverse le canal et t_0 (en s) correspond au temps mort. Dans le cas de l'utilisation d'un canal trapézoïdal en AF4, t_0 peut s'exprimer de la manière suivante :

$$t_0 = \frac{V_0}{V_x} \ln \left[1 + \frac{V_x}{V_d} \left(1 + \frac{w(b_0 z' - \frac{b_0 - b_L}{2L} z' z - y)}{V^0} \right) \right] \quad (eq3)$$

où V_0 et w correspondent respectivement au volume et à l'épaisseur du canal. Les termes b_0 , b_L , z' et y définissent la géométrie du canal : b_0 et b_L sont les largeurs du trapèze aux extrémités d'entrée et de sortie, L à la longueur du canal et z à la distance entre l'extrémité de l'entrée du canal jusqu'au point de focus. V_d correspond quant à lui au débit du flux d'écoulement allant vers les détecteurs et V_x au débit du flux détecteur.

Le niveau de rétention R_L peut être directement lié au paramètre de rétention λ par l'équation suivante :

$$R_L = \frac{1}{6\lambda} \quad (eq4)$$

Et le paramètre de rétention λ est lui-même défini par :

$$\lambda = \frac{l}{w} \quad (eq5)$$

où l représente les distances des centres de gravité des populations de particules de la paroi d'accumulation et w représente la hauteur du canal.

De plus, le centre de gravité, noté l , est quant à lui régi par l'équation suivante :

$$l = \frac{D}{U} \quad (eq6)$$

Où D correspond au coefficient de diffusion de l'échantillon et U à la vitesse du flux croisé à la surface de la membrane.

Donc,

$$\lambda = \frac{D}{Uw} \quad (eq7)$$

D'où

$$RL = \frac{Uw}{6D} = \frac{t_r}{t_0} \quad (eq8)$$

$$tr = \frac{Uwt_0}{6D} \quad (eq9)$$

Il est possible d'exprimer U (vitesse de flux croisé) en débit V_x , une grandeur connue :

$$U = \frac{V_x w}{V_0} \quad (eq10)$$

Par conséquent, le temps de rétention t_r s'exprime par l'équation :

$$t_r = \frac{t_0 V_x w^2}{6DV_0} \quad (eq11)$$

Or,

$$V_d = \frac{V_0}{t_0} \quad (eq12)$$

Donc,

$$tr = \frac{w^2 V_x}{6DV_d} \quad (eq13)$$

D'après eq13, le temps de rétention des analytes dépend de la hauteur du canal (qui correspond à l'épaisseur de spacer), du rapport des flux et du coefficient de diffusion (D). Cette relation met bien en évidence que si V_x augmente et que les autres paramètres restent constants, alors, le t_r augmente. De plus, le coefficient de diffusion (D), peut permettre de remonter au rayon hydrodynamique (Rh) des particules, à partir de données expérimentales en remplaçant D dans l'équation 13 par la relation de Stroke-Einstein :

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h} \quad (eq14)$$

Où

En combinant les équations 13 et 14, t_r peut s'exprimer de la façon suivante

$$t_r = \frac{w^2\pi\eta RhV_x}{kTV_d} \quad (eq15)$$

Le Rh peut donc être obtenu de la façon suivante :

$$Rh = R_L \frac{kTV_0}{\pi\eta w^2 V_x} \quad eq(16)$$

Le fractionnement des analytes est dépendant de plusieurs paramètres tels que la géométrie du canal, les flux appliqués, et la composition de la phase mobile. De plus, des interactions attractives et répulsives peuvent se produire avec la membrane. L'épaisseur du « spacer », définissant la hauteur du canal, est souvent approximative. En effet, ceci s'explique par la compressibilité de la membrane d'ultrafiltration (i.e. matériau, seuil de coupure) ainsi que du taux d'interaction entre particules-membrane. La membrane constitue donc un point faible de la technique AF4, rendant la définition de l'épaisseur du canal approximative, ce qui impacte l'estimation du Rh théorique.

Afin d'avoir des informations sur la nature des macromolécules composant notre échantillon, l'AF4 est souvent couplée à différents types de détecteurs tels que UV/Visible, MALS etc..

3.1.2.5. Les détecteurs couplés à l'AF4

Dans cette thèse, différents détecteurs ont été utilisés dans le but d'analyser la composition macromoléculaire des vins blancs : UV/Visible, Fluorescent (FL), diffusion statique de la lumière (MALS) et dRI. Dans cette partie, seulement les détecteurs MALS et FL sont décrits (le détecteur UV ayant été préalablement décrit dans la partie 1 (III.2.2.2.1)).

3.1.2.5.1. Détecteur à Fluorescence

Les détecteurs de fluorescence (FLD) mesurent la lumière émise par les molécules après excitation à une longueur d'onde plus élevée. Ils sont très sensibles aux composés fluorescents naturels ou rendus fluorescents par dérivatisation. La source lumineuse est généralement une lampe à éclats de deutérium ou de xénon à large spectre. La longueur d'onde d'excitation, souvent proche du maximum UV, est toujours plus courte (énergie plus élevée) que la longueur d'onde d'émission. Les détecteurs de fluorescence sont jusqu'à 100 fois plus sensibles que les détecteurs UV, ce qui les rend idéaux pour les analyses en traces ou les échantillons à faible concentration. Il est crucial de bien sélectionner et entretenir les composants de la phase mobile, car certains tampons ou solvants peuvent provoquer une fluorescence de fond, et des solvants mal dégazés peuvent entraîner un quenching, affectant ainsi la sensibilité (Swartz, 2010).

3.1.2.5.2. Détecteur MALS

Le détecteur MALS est relativement récent. Il permet de déterminer des masses molaires des composés ainsi que le rayon de gyration (R_g). La quantité de lumière diffusée par une solution contenant des macromolécules dépend, entre autres, de la concentration des macromolécules, de l'angle de la lumière incidente, de l'angle de diffusion, de la masse molaire et de la taille des macromolécules. L'équation de base qui relie l'intensité de la lumière diffusée aux propriétés des macromolécules en solution est :

$$\frac{R_{\theta}}{Kc} = MP(\theta) - 2A_2cM^2P^2(\theta) + \dots \quad (eq17)$$

Où \mathbf{R} est le rapport de Rayleigh, qui est proportionnel à la quantité de lumière diffusée à l'angle, c est la concentration de la particule en solution, \mathbf{M} est la masse molaire, $\mathbf{P}(\theta)$ est une fonction dépendant de l'angle θ . \mathbf{K} est une constante optique, \mathbf{A}_2 est le second paramètre de Viriel donnant l'interaction soluté-solvant.

Lorsque nous travaillons en flux continu et en milieu dilué, l'approximation du second terme est négligeable devant 1, du fait de la très faible valeur de A_2 . Dans ce cas, la relation (eq17) peut être simplifiée :

$$\frac{R_{\theta}}{Kc} = MMP(\theta) \quad eq(18)$$

De plus la constante K , affectée entre autres, par la longueur d'onde de la lumière entrante et l'indice de réfraction du solvant s'exprime par l'équation suivante :

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda_0^4 N_a} \quad (eq19)$$

où n_0 est l'indice de réfraction du solvant à la longueur d'onde incidente, λ_0 est la longueur d'onde de la radiation incidente dans le vide, N_a est le nombre d'Avogadro, et dn/dc est l'incrément différentiel de l'indice de réfraction entre le solvant et les analytes.

Théoriquement, la masse molaire peut être obtenue en mesurant l'intensité de la lumière diffusée à l'angle 0 du rayon incident, puisqu'à $\theta = 0$, $R = KMMc$, comme l'indique l'équation 18. Cependant, il est impossible de mesurer ce paramètre expérimentalement. Le principe du MALS repose donc sur la mesure de la lumière diffusée aux angles >0 afin d'estimer par extrapolation, l'intensité de lumière diffusée à l'angle 0. Cette extrapolation est effectuée via le graphe de Debye qui peut être construit selon trois méthodes : Debye, Zimm et Berry. Par exemple, le graphique de Debye selon le formalisme de Zimm peut être obtenu avec la relation suivante : (eq20)

$$\frac{Kc}{R_{\theta}} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \frac{1}{MM} R_g^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (eq20)$$

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

L'AF4 possède un bon potentiel pour fractionner ces macromolécules dans les vins. En effet, cette technique est une méthode prometteuse pour séparer et caractériser la fraction colloïdale des vins blancs sans qu'il soit nécessaire d'apporter de préparation spécifique aux échantillons (Coelho et al., 2017).

Pour caractériser sensoriellement ces fractions, il est nécessaire de mettre en place des méthodes d'analyse sensorielle adaptées.

V. Évaluation gustative des vins blancs : méthodes et limites

Plusieurs méthodes permettent d'analyser les propriétés sensorielles des vins : les méthodes descriptives (profil flash (PF), test analyse descriptives quantitatives (QDA)), les tests discriminants (test triangulaire), et bien d'autres.

Dans la majorité des travaux étudiant l'influence des acides aminés et macromolécules dans les vins, la méthode QDA est majoritairement utilisée. Cependant, bien que précises, elle repose sur l'implication d'un panel sensoriel expert (ou bien entraîné). Pour pallier ce problème, de nombreuses études (J. Liu et al., 2016; Paup et al., 2021; Smith & McSweeney, 2019) ont adopté des méthodes descriptives plus rapides telles que le PF (Bredie et al., 2018) pour évaluer rapidement les différences sensorielles entre les vins. Le test du PF se divise en deux séances. Lors de la première séance, chaque participant établit sa propre liste provisoire d'attributs en réponse à une série de stimuli ou de produits. Les participants doivent lister les caractéristiques sensorielles qui décrivent le mieux les différences entre les échantillons, en évitant les termes hédoniques. Pour aider au développement du vocabulaire, les participants sont invités à regrouper les termes par modalité sensorielle (apparence, son, texture, goût, etc.). Ils peuvent réexaminer les produits autant de fois qu'ils le souhaitent et prendre le temps nécessaire.

Les participants doivent faire des pauses entre les expositions aux stimuli pour minimiser les effets de transfert, comme l'adaptation. La génération des attributs dure environ 30 à 45 minutes et implique l'évaluation de tous les échantillons. La durée peut varier selon le nombre et le type de produits à évaluer. A la fin de la séance, une phase de mise en commun et de discussion est menée entre les panélistes de manière à retenir des descripteurs communs faisant consensus (*ISO*, 2016).

Lors de la séance suivante, les participants classent les échantillons (les mêmes que ceux dégustés lors de la première séance) en fonction des descripteurs communs retenus, selon le niveau d'intensité perçu.

Cependant, la plupart de ces études portant sur le rôle des macromolécules dans la perception gustative n'ont pas recours à des méthodes permettant de se focaliser exclusivement sur le goût, comme l'utilisation du pince-nez.

VI. Conclusion

Les macromolécules, telles que les polyphénols et les polysaccharides, jouent un rôle essentiel dans la perception en bouche des vins blancs. La plupart des études portant sur l'impact de ces macromolécules se sont concentrées sur la bière ou le vin rouge, mais peu d'entre elles ont exploré leur influence dans les vins blancs.

De plus, l'AF4 se révèle être une méthode analytique prometteuse pour l'identification du profil macromoléculaire des vins blancs sans dégrader les échantillons. Cependant, elle présente des limites, notamment dans l'identification des macromolécules de tailles similaires. Le recours à des techniques complémentaires, couplées à l'AF4, pourrait permettre une meilleure séparation et caractérisation de ces macromolécules de taille proche. La partie 5 apportera des éléments de réponse à cette problématique.

Problématique et objectifs scientifiques

Cette première partie de la revue bibliographique a mis en évidence la diversité gustative des quatre cépages blancs emblématiques du Sud-Ouest : COL, GM, LL et MZ. Ce vignoble, riche en terroirs variés, produit des cépages aux caractéristiques distinctes. Par exemple, les vins issus du COL et du GM présentent une forte acidité, contrairement à ceux du MZ et du LL. Ces différences gustatives s'expliquent souvent par la grande diversité structurale des composés responsables du goût de leur concentrations et proportions, tels que les acides aminés, protéines, polysaccharides, polyphénols, et bien d'autres encore présents dans les vins blancs.

Les acides aminés des moûts et des vins jouent un rôle crucial dans leurs propriétés sensorielles. En effet, durant la FA, une partie de ces acides aminés est utilisée par les levures pour produire des composés volatils odorants, tels que les thiols. Les concentrations en acides aminés dans les moûts et les vins sont grandement influencées par divers facteurs, notamment le cépage, le millésime, les pratiques viticoles (comme la fertilisation azotée), ainsi que les procédés de vinification, comme l'ajout d'azote sous différentes formes dans les moûts. Pour mieux comprendre l'impact de ces facteurs sur le profil aminé des vins, plusieurs études ont utilisé l'HPLC pour analyser leur composition en acides aminés. Parmi ces recherches, le cépage est apparu comme le facteur principal influençant directement la composition en acides aminés.

Peu d'études se sont penchées sur l'influence des acides aminés sur les perceptions gustatives des vins, bien que ces composés soient reconnus pour contribuer à des saveurs distinctes dans l'alimentation.

Étant donné l'influence du cépage sur l'aminogramme des vins et le rôle encore mal compris des acides aminés dans les propriétés gustatives des vins, une première question de recherche peut être posée : **Comment les acides aminés, reconnus pour influencer les perceptions sensorielles, affectent-ils spécifiquement les perceptions gustatives des vins blancs du Sud-Ouest ?**

Pour répondre à cette question, plusieurs axes vont être abordés :

- Étudier **l'influence du cépage, du millésime et du stade de prélèvement de l'échantillon** sur les **caractéristiques physico-chimiques des vins issus** des cépages typiques du Sud-Ouest (COL, GM, LL et MZ).
- Déterminer le **profil aminé des vins de chaque cépage** à l'aide d'une méthode analytique par **HPLC**, et les discriminer.
- Explorer le **rôle de certains acides aminés** sur les perceptions gustatives des vins blancs du Sud-Ouest

Contrairement aux acides aminés, les macromolécules telles que les polyphénols et les polysaccharides ont déjà fait l'objet d'études pour leurs contributions aux caractéristiques gustatives des vins notamment dans les vins blancs, rouges, ainsi que dans les bières. Les composés phénoliques ont été décrits comme influençant grandement la viscosité, l'astringence, la chaleur et l'amertume du vin (Gawel et al., 2018) de par leur diversité structurelle leur permettant d'activer plusieurs mécanismes sensoriels impliqués dans la perception de la sensation en bouche. À l'inverse, les polysaccharides ont été décrits comme ayant un effet modulateur mineur sur la perception de l'astringence et de la chaleur (Gawel et al., 2018). Du fait de la grande complexité du vin, les différentes macromolécules agissent sur les propriétés sensorielles mais souvent par le biais d'interactions entre différents composants.

Afin de pouvoir identifier et étudier ces macromolécules, une nouvelle approche analytique a été utilisée sur les vins de l'étude : l'AF4. Cette technique est une méthode prometteuse pour séparer et caractériser la fraction colloïdale des vins blancs sans qu'il soit nécessaire d'apporter de préparation spécifique aux échantillons (Coelho et al., 2017). Cette méthode nous permettra-t-elle de discriminer le profil macromoléculaire des 4 cépages de l'étude ?

Les cépages du Sud-Ouest ayant chacun une identité gustative spécifique et l'impact des macromolécules sur les perceptions gustatives des vins étant connu, la deuxième question de recherche posée est la suivante : **Comment les macromolécules présentes dans les vins peuvent influencer les perceptions gustatives et tactiles des vins blancs ?**

Pour répondre à cette question de recherche, plusieurs objectifs seront établis :

- Discriminer les échantillons en fonction de leur **profil gustatif** à l'aide de **pince-nez**.
- Déterminer le **profil macromoléculaire** des vins discriminés gustativement grâce à la méthode de l'**AF4**.
- Collecter les différentes fractions **macromoléculaires** obtenues en AF4 afin de les **identifier**.
- Développer une méthode d'**ultrafiltration** pour isoler ces composés et étudier leur **impact gustatif** en conditions '**food grade**'.

L'analyse du profil macromoléculaire par AF4 possède de nombreux avantages. Cette technique offre des informations précieuses sur la composition des échantillons, cependant la séparation des macromolécules en fonction de leur taille pose un défi pour l'étude des protéines dans les vins, notamment parce que la majorité d'entre elles présentent des tailles similaires. De plus, l'isolement, la séparation et la caractérisation des protéines dans les moûts et les vins sont des tâches difficiles en raison de leur faible concentration et des interactions prononcées avec les polyphénols endogènes et d'autres composés non protéiques. À ce jour, une seule étude (Yohannes et al., 2007) a examiné l'intégration de l'AF4 dans les analyses HPLC, un système prometteur pour séparer les protéines selon leur taille et leur hydrophobicité. Cependant, cette technique présente plusieurs inconvénients, notamment la perte d'échantillon et la dilution des échantillons entre le fractionnement AF4 et l'analyse HPLC. De plus, les analyses en HPLC sont longues et coûteuses.

Afin de pallier ce problème, la question adressée est la suivante : « **Comment intégrer efficacement les méthodes d'AF4 et d'HPLC afin de remédier aux problèmes de dilution et de perte d'échantillon tout en garantissant un temps d'analyse optimal ?** »

Pour cela, différents objectifs ont été définis :

- Développer **un système bidimensionnel intégrant l'AF4 et l'UHPLC** pour améliorer la séparation des échantillons en fonction de leur taille et éviter la perte d'échantillon
- Valider **le système développé** pour garantir sa fiabilité et son efficacité avant de l'appliquer à des échantillons complexes.

- Appliquer le **système validé à la matrice du vin** dans le but de différencier des vins monovariétaux issus de quatre cépages en fonction de leurs profils macromoléculaires.

Pour répondre à ces objectifs (**Figure 20**), dont le périmètre a été défini dans la première partie bibliographique du manuscrit, la structure de ce travail est organisée en une partie centrée sur le contexte expérimental de l'étude (Partie II), puis en trois parties de résultats :

La partie III, qui inclut les chapitres 1, 2 et 3, se concentrera sur le rôle des acides aminés dans les perceptions gustatives des vins blancs.

La partie IV examinera l'influence des macromolécules sur les perceptions gustatives et tactiles des vins blancs, en utilisant une double approche, sensorielle (PF) et analytique (AF4).

Enfin, la partie V décrira le développement d'un nouveau système analytique, combinant AF4 et UHPLC, pour l'analyse des macromolécules de type protéines.

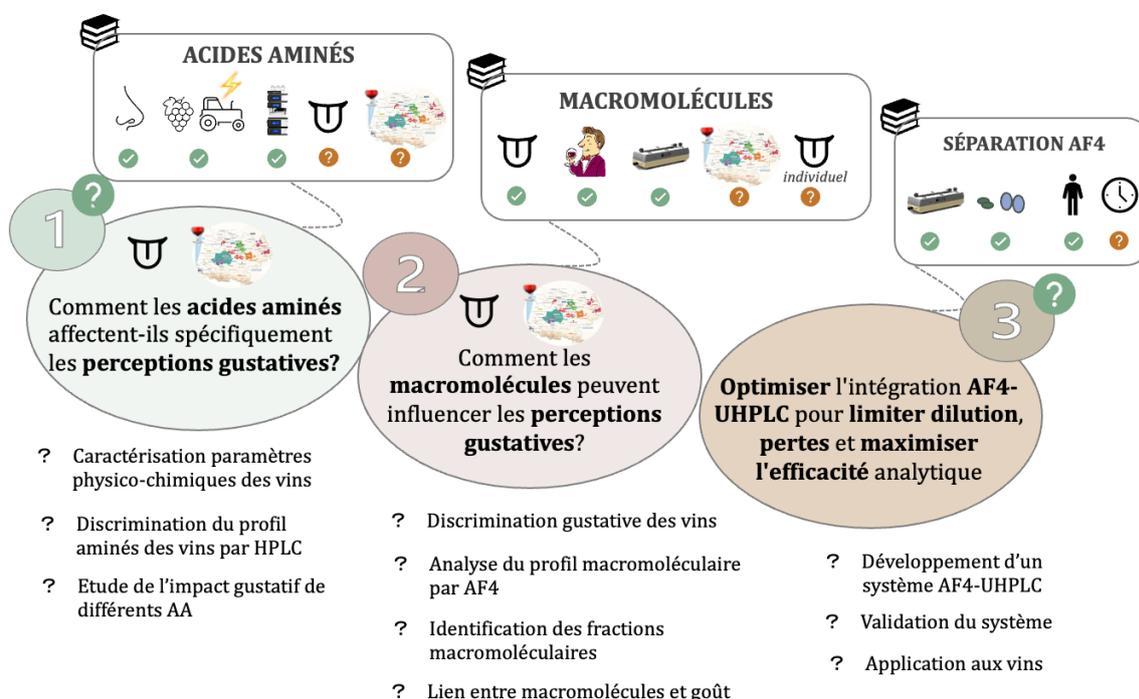


Figure 20: Schéma synthétique des enjeux et des objectifs de cette thèse

Source : Figure réalisée par l'auteurice

Deuxième partie

CONTEXTE EXPERIMENTAL GENERAL

Deuxième partie : Contexte expérimental général

Durant ces trois années de thèse, de nombreuses techniques analytiques ont été employées pour réaliser l'analyse physico-chimique des échantillons de vins, les fractionner et identifier les macromolécules présentes dans ces extraits. Parallèlement, diverses méthodes d'analyse sensorielle ont été mises en œuvre afin d'évaluer l'impact de ces macromolécules sur les perceptions sensorielles des vins blancs.

I. Réactifs et solvants utilisés

Dans le cadre de ces travaux, l'eau ultrapure a été produite à l'aide d'un système MilliQ Integral 15, présentant une résistivité de 18,2 M Ω .cm (Merck©, France). L'acétonitrile, le méthanol et l'éthanol, tous de qualité HPLC et d'une pureté industrielle de 99 %, ainsi que l'acide formique de même qualité et pureté, ont été utilisés (Carlo-Erba©, France). L'hydroxyde de potassium provenait de Merck© (USA). L'acide trifluoroacétique (TFA) de grade HPLC et de pureté 99 % a été fourni par Fischer Chemical© (Allemagne). Enfin, une solution d'azide de pureté 95 % a également été employée (Sigma Aldrich©, USA).

L'acide L-aspartique (Asp), l'acide L-glutamique (Glu), la L-proline (Pro), la L-cystéine (Cys), la L-leucine (Leu), la L-phénylalanine (Phe), la L-lysine (Lys), la L-histidine (His), la L-arginine (Arg), la L-tyrosine (Tyr), la L-valine (Val), la L-sérine (Ser), la L-glutamine (Gln), la L-ornithine (Orn), le L-tryptophane (Try), la L-asparagine (Asn), la L-thréonine (Thr), l'acide γ -aminobutyrique (Gaba), la L-isoleucine (Ile), la L-méthionine (Met), la L-glycine (Gly), la L-Alanine (Ala), l'acide L-aminoadipique et le DEEMM ont été achetés chez Merck© (Darmstadt, Allemagne).

Le pullulan, 10 kDa, a été acheté chez Merck©, USA et préparé à 4 mg.mL⁻¹ dans une solution modèle de vin (12 % d'éthanol, pH = 3,2).

II. Caractéristiques des vins de l'étude

Soixante-neuf vins monovariétaux provenant de deux principales régions productrices de vins blancs dans le Sud-Ouest de la France, les Côtes de Gascogne et Gaillac ont été sélectionnés. Les vins, des millésimes 2016, 2020 et 2021, ont été collectés auprès de différents domaines viticoles. Les échantillons ont été prélevés à deux étapes de la vinification : (i) directement depuis la cuve après la fermentation alcoolique (FA) et (ii) après embouteillage (B). Quatre cépages de raisins blancs du Sud-Ouest sont représentés : COL (25 échantillons), GM (9 échantillons), LL (20 échantillons), et MZ (15 échantillons). Un vin de référence a servi à garantir la répétabilité de chaque analyse. Le vin de référence contenait un assemblage de différentes variétés de raisins, dont la plupart étaient des variétés du Sud-Ouest.

1. Analyses des paramètres œnologiques classiques

Le Laboratoire d'analyses physico-chimiques (LAP) de l'École d'Ingénieurs de PURPAN a réalisé ces analyses en collaboration avec Plaimont ainsi que Vinovalie. Les paramètres physico-chimiques de base de chaque vin (titre alcoométrique volumique (TAV), pH, acidité totale (AT), et concentrations des acides malique (A_{mal}), lactique (A_{lac}) et tartrique (A_{tart}) ont été déterminés par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IFTR) en utilisant deux analyseurs de vin WineScan© (Foss, France SAS) et Bacchus© (Thermo scientific, France) selon la résolution OIV/OENO 390/2010.

L'analyseur WineScan© est équipé d'un logiciel FOSS Integrator©, qui utilise les techniques PCA (Analyse en Composantes Principales) et PLSR (Régression par Moindres Carrés Partiels) spécialement calibrées pour les vins issus des cépages typiques du Gers. Pour chaque analyse, un volume de 7 mL de vin prélevé manuellement est requis.

L'analyse Bacchus© est un dispositif utilisant une source infrarouge moyenne Everglo™ à haute énergie refroidie par air, avec une gamme spectrale allant de 350 cm^{-1} à 7800 cm^{-1} et une résolution inférieure à $0,4\text{ cm}^{-1}$. Le logiciel intégré est spécialement calibré pour les vins issus des cépages

typiques de Gaillac. Les échantillons sont prélevés automatiquement dans des tubes à essai pouvant contenir 12 mL de vin.

2. Dosage du SO₂ libre et total : Titromatic ©

Le LAP de l'École d'Ingénieurs de PURPAN a réalisé ces analyses en collaboration avec Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV). Le tritromatic 1S© comprend trois pompes péristaltiques, deux intégrées pour l'ajout de réactif acide et alcalin et une pompe externe pour l'arasement automatique des échantillons. Il comprend un passeur automatique. Le logiciel de traitement de données est TiCom©.

3. Dosage de l'azote ammoniacal et alpha aminé par méthode colorimétrique à 340 nm : l'analyse multiparamétrique Gallery©

Le LAP de l'École d'Ingénieurs de PURPAN a réalisé ces analyses en collaboration avec IFV. L'analyseur multiparamétrique Gallery© (Thermo Electron Corporation®, Waltham, USA) est équipé d'un spectrophotomètre permettant des mesures à 340 nm. Les kits Ammonia Infinity et Alpha Amino Nitrogen (Thermo Fisher Scientific©, Waltham, USA) ont été utilisés respectivement pour doser l'azote ammoniacal total et l'azote aminé total. Un volume de 1 mL de vin a été introduit dans des cuvettes de 2 mL, puis placé directement dans l'analyseur multiparamétrique. Les résultats des concentrations en azote ammoniacal (Nnh) et aminé (Naa) sont exprimés en mg.L⁻¹.

4. Traitement des données

Les données ont été analysées à l'aide de la procédure PROC MIXED du logiciel SAS (SAS® OnDemand for Academics, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) via une ANOVA. Le cépage, le stade d'échantillonnage et leur interaction, ainsi que le millésime, ont été considérés comme des effets fixes, tandis que le vignoble a été considéré comme un effet aléatoire. Les degrés de liberté ont été ajustés selon la procédure de Kenward-Rodgers (Loughin, 2006). La séparation des moyennes a été réalisée a posteriori par le test de Tukey, et le seuil de signification a été fixé à $p \leq 0,05$, tandis que les tendances

ont été considérées avec $0,05 < p \leq 0,10$. La normalité des résidus a été vérifiée par un QQ-plot et le test de Kolmogorov-Smirnov. En cas de distribution non normale, la variable a été transformée logarithmiquement et les résultats ont été présentés après une transformation inverse.

III. Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

1. Détermination des acides aminés libres dans le vin par HPLC

1.1. Méthode de dérivation

La teneur en acides aminés libres a été déterminée en duplicat par HPLC en suivant une méthode de dérivation décrite précédemment et légèrement modifiée à partir d'une réaction de dérivation antérieure (Gómez-Alonso et al., 2007; Organisation internationale de la Vigne et du Vin, 2022).

Un tampon borate a été préparé au préalable : 31 g d'acide borique ont été ajoutés à 400 mL d'eau ultrapure dans une fiole de 500 mL. Le tampon a été ajusté à un pH de 9 en utilisant une solution de NaOH à 4 M. Le volume a ensuite été ajusté à 500 mL avec de l'eau ultrapure.

L'analyse des acides aminés a été réalisée selon la méthode décrite par Gómez-Alonso et al (2007). Quelques modifications mineures ont été apportées à la méthode de dérivation. Les dérivés d'aminocétones ont été déterminés après réaction dans un tube à bouchon vissé pendant 30 minutes dans un bain à ultrasons avec 1,75 mL de tampon borate 1 M (pH = 9,0), 750 μ L de méthanol (Carlo Erba©, France), 1 mL de vin échantillon sans prétraitement, 40 μ L de standard interne (acide L-2-aminoadipique, $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Merck©, Darmstadt, Allemagne), et 30 μ L de réactif de dérivation, le DEEM (Merck©, Darmstadt, Allemagne). Les échantillons ont été agités au vortex toutes les 5 minutes pendant les 30 minutes de chauffage (soit six fois). Les échantillons ont ensuite été recouverts de papier aluminium et placés dans un bain-marie à 70 °C pendant une heure pour permettre la dégradation complète de l'excès de DEEM et des sous-produits du réactif. Une fois revenus à température ambiante, les échantillons ont été transférés dans des flacons pour analyse. Le volume injecté était de 50 μ L.

1.2. Instrumentation

L'HPLC a été réalisée en utilisant un instrument Ultimate 3000 Series (ThermoFisher®, France). La séparation a été effectuée à l'aide d'une colonne Zorbax Eclipse AAA (C18), taille de particule 5 µm (250 mm × 4,6 mm, Agilent®) avec une pré-colonne (Zorbax Eclipse AAA, 12,5 mm × 4,6 mm, Agilent®), thermostatée à 17°C.

Deux éluants ont été utilisés comme phases mobiles : la phase mobile A consistait en un tampon acétate 25 mM (pH = 5,8) avec 0,4 g d'azotate de sodium (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA), et la phase mobile B en un mélange d'acétonitrile (Carlo Erba®, France) et de méthanol (80:20, v/v) (Carlo Erba®, France) (Gómez-Alonso et al., 2007). Tous les réactifs ont été filtrés à travers un filtre PTFE Millipore de 0,1 µm (Merck®, Darmstadt, Allemagne). La même méthode de gradient utilisée par Gómez-Alonso et al (2007) a été appliquée (**Tableau 4**). Cependant, 7 minutes supplémentaires ont été ajoutées pour reconditionner la colonne à son état initial.

Tableau 4: Gradient d'éluant pour la détermination par HPLC des acides aminés dans les vins blancs (Gómez-Alonso et al., 2007).

Temps (min)	0	20,0	30,5	33,5	65,0	73,0	78,0	82,0	85,0	90,0
Eluant A (%)	90	90	83	83	60	28	18	0	0	90
Eluant B (%)	10	10	17	17	40	72	82	100	100	10

Un détecteur UV a été utilisé pour la détection à 280 et 292 nm. Ces conditions chromatographiques ont permis la séparation, l'identification et la quantification de 22 acides aminés, y compris la proline. Les composés suivants ont été identifiés en fonction de leurs temps de rétention et des caractéristiques spectrales UV-vis des dérivés des standards correspondants : l'acide L-Asp, l'acide L-Glu, la L-Gly, la L-Ala, la L-Cys, la L-Leu, la L-Phe, la L-Lys, la L-His, la L-Arg, la L-Tyr, la L-Val, la L-Ser, la L-Gln, la L-Orn, le L-Try, la L-Asn, la L-Thr, GABA, la L-Iso, la L-Pro et la L-Met. La quantification a été réalisée en utilisant la méthode du standard interne.

1.3. Traitement des données

Les données ont été analysées à l'aide de la procédure PROC MIXED du logiciel SAS (SAS® OnDemand for Academics, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) via une ANOVA. Le cépage ainsi que le millésime, ont été considérés comme des effets fixes, tandis que le vignoble a été considéré comme

un effet aléatoire. Les degrés de liberté ont été ajustés selon la procédure de Kenward-Rodgers (Loughin, 2006). La séparation des moyennes a été réalisée a posteriori par le test de Tukey, et le seuil de signification a été fixé à $p \leq 0,05$, tandis que les tendances ont été considérées avec $0,05 < p \leq 0,10$. La normalité des résidus a été vérifiée par un QQ-plot et le test de Kolmogorov-Smirnov. En cas de distribution non normale, la variable a été transformée logarithmiquement et les résultats ont été présentés après une transformation inverse.

2. Analyse de l'impact de deux acides aminés sur les perceptions gustatives des vins blancs du Sud-Ouest de la France

2.1. Conditions d'organisation de la séance d'analyse sensorielle

L'évaluation sensorielle a été effectuée uniquement par des tests triangulaires, conformément à la norme UNI ISO 4120 (ISO, 2021). La salle de test était maintenue à une température de 22 °C, sans odeurs ni bruits extérieurs. Le panel de dégustation était composé de 30 juges naïfs et experts âgés de 20 à 64 ans. Ils ont été invités à s'abstenir de manger pendant une heure avant la dégustation. Aucune approbation éthique n'a été obtenue, mais tous les participants ont fourni un consentement éclairé écrit avant de participer à l'étude. Afin de se concentrer uniquement sur le goût, les panélistes portaient des pince-nez pendant la séance de dégustation.

2.2. Mise en place de l'essai sensoriel

Les 30 juges ont participé à une session comprenant deux tests triangulaires successifs de deux produits. Pour la première série du test triangulaire, le stimulus était l'acide Glu (Ajinomoto foods Europe SAS©, Paris) et pour la seconde série, le stimulus était la L-Pro (Merck©, Allemagne). Leur impact sur le goût a été évalué dans un vin blanc sec. Pour l'acide Glu, le vin sélectionné était un COL faiblement concentré en acide Glu (15 mg.L^{-1} , $\text{pH} = 3,2$, $\text{ABV} = 11 \%$) et pour la Pro le vin était un MZ faiblement concentré en Pro (38 mg.L^{-1} , $\text{pH} = 3,3$, $\text{ABV} = 13 \%$). Pour chacun de ces acides aminés, la concentrations maximales retrouvées dans les vins après quantification en HPLC a été ajouté dans les vin appauvri en Glu et Pro soit respectivement 55 mg.L^{-1} pour l'acide Glu et 1655 mg.L^{-1} pour la Pro.

Pour chaque test triangulaire, trois échantillons (10 mL) ont été présentés dans des verres à vin et identifiés par des groupes de trois valeurs aléatoires. Chaque juge devait goûter chaque échantillon en utilisant uniquement son sens du goût, afin de percevoir lequel des trois produits échantillonnés était différent des deux autres puis noter la différence perçue selon leur propre descripteur. Les échantillons ont été testés selon un plan en blocs complets randomisés. Aucune information sur l'origine des échantillons n'a été fournie aux évaluateurs. Les résultats de l'évaluation sensorielle ont été analysés selon la norme UNI ISO 4120 (ISO, 2021).

2.3. Traitement des données : test triangulaire

Les données sensorielles (la moyenne de chaque attribut évalué par les juges) ont été exportées vers Microsoft Excel. Un test triangulaire utilisant un modèle de Thurstone a été utilisé. Des différences statistiquement significatives entre les vins ont été déterminées en considérant une valeur de p inférieure à 0,05.

IV. Différenciation sensorielle et caractérisation macromoléculaire des vins blancs de l'étude

1. Echantillons

Cette étude a porté sur quatre cépages issus de deux régions viticoles du Sud-Ouest de la France : COL, GM, MZ et LL. Pour éviter tout biais, douze échantillons de vins blancs (trois pour chaque cépage) ont été sélectionnés en fonction de leurs paramètres physico-chimiques de base [TAV, pH, AT, et la concentration en A_{mal} , A_{lac} et A_{tart}] pour des études sensorielles et analytiques (**Tableau 5**). Les vins sont issus du millésime 2021 et ont été prélevés dans diverses propriétés viticoles. Les échantillons ont été prélevés directement à partir des cuves après la FA.

Tableau 5: Tableau récapitulatif des paramètres œnologiques classiques de tous les échantillons utilisés dans l'étude

Echantillons	Zone de production du vin	TAV	AT	pH	Atart	Amal	Alac
		%	g.L ⁻¹ en tant qu'acide tartrique		g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹
COL 1	GERS	11,0	5,2	3,2	1,7	5,3	0,0
COL 2	GERS	11,0	5,5	3,2	1,9	5,3	0,0
COL 3	GERS	12,0	5,4	3,1	2,0	5,3	0,0
GM 1	GERS	10,0	5,3	3,1	2,1	5,4	0,0
GM 2	GERS	13,0	5,1	3,1	2,7	3,6	0,0
GM 3	GERS	12,0	5,2	3,2	1,9	4,6	0,0
LL 1	TARN	13,0	3,8	3,3	1,6	2,8	0,6
LL 2	TARN	12,0	2,6	3,4	1,5	0,1	1,7
LL 3	TARN	13,0	3,2	3,3	2,2	1,5	0,7
MZ 1	TARN	12,0	3,4	3,2	2,0	2,1	0,3
MZ 2	TARN	12,0	3,3	3,3	1,6	2,2	0,5
MZ 3	TARN	12,0	2,9	3,4	1,5	1,0	1,0

2. Caractérisation gustative des vins blancs du Sud-Ouest par Profil Flash

Les panélistes (n = 12) ont été recrutés parmi les étudiants de deuxième année du diplôme national d'œnologie (DNO) de l'Université de Toulouse, France. Aucune approbation éthique n'a été obtenue, mais tous les participants ont fourni un consentement éclairé écrit avant de participer à l'étude. Afin de se concentrer uniquement sur le goût, les panélistes portaient des pince-nez pendant les séances de dégustation. Une méthode de FP a été utilisée pour distinguer les échantillons en fonction de la gustation. Ce test comprenait deux sessions où les 12 échantillons étaient présentés simultanément. Lors de la première session, les évaluateurs devaient individuellement identifier les caractéristiques sensorielles différenciant le mieux les échantillons sans utiliser de termes hédoniques. Ensuite, les panélistes ont collaboré pour établir un consensus sur cinq descripteurs communs. Lors de la deuxième session, le panel a goûté les mêmes vins en les classant sur une échelle graduée de « faible intensité » à « forte intensité ». Des résultats avec des scores identiques étaient autorisés dans le classement. Toutes les données ont été analysées par une Analyse Procrustéenne Généralisée (GPA). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2015.4.01.22368, Addinsoft™).

Les vins différenciés gustativement ont été par la suite analysés en AF4.

3. Caractérisation du profil macromoléculaire par Fractionnement par Flux-Force Asymétrique

En raison de leur distinction sur le plan gustatif, deux cépages ont été sélectionnés : COL 1 et MZ 1.

3.1. Instrumentation

Un système HPLC Thermo Scientific© Ultimate 3000, comprenant un dégazeur, une pompe isocratique, un auto-échantillonneur et un collecteur de fractions, a été utilisé pour injecter des échantillons et transporter la phase mobile à travers le système. La pompe était couplée à un système Eclipse AF4 (Wyatt Technology©, Santa Barbara, USA), qui régula le flux dans le canal de séparation AF4 (long canal, Wyatt Technology©, Santa Barbara, USA). La hauteur du canal a été fixée à 490 μm , et ses dimensions L , b_0 et b_L étaient respectivement de 23,5 cm, 2,1 cm et 0,6 cm. Une membrane semi-perméable en cellulose avec un seuil de masse moléculaire de 5 kDa (Wyatt Technology©, Santa Barbara, USA) a été utilisée. Ce système était couplé à un système de détection multiple : un détecteur UV-visible Ultimate 3400 RS, un détecteur de fluorescence 3100, MALS et dRI (Wyatt Technology©, Santa Barbara, USA). Le détecteur UV-visible était réglé à $\lambda = 220$ nm, le détecteur de fluorescence à des spectres d'émission ($\lambda_{\text{excitation}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{émission}} = 300\text{--}450$ nm), la lampe MALS émettait à $\lambda = 664,2$ nm et la lampe dRI émettait à $\lambda = 658$ nm avec une cellule thermostatée à 25 °C. Le logiciel Chromeleon© 7 a été utilisé pour contrôler les flux de l'injecteur automatique, la pompe et de l'Eclipse (flux détecteur, flux croisé), ainsi que pour acquérir les données de fluorescence. L'acquisition des données UV ($\lambda = 220$ nm), MALS et dRI a été réalisée à l'aide du logiciel Astra© 8.2.2.

Le système AF4 a été calibré en utilisant une solution de pullulan avec une masse moléculaire de 10 kDa (4 mg.mL⁻¹), préparée dans une solution modèle de vin. La phase mobile comprenait 88 % d'eau (v/v) et 12 % d'éthanol (v/v). De l'acide formique a été ajouté pour ajuster le pH à 3,2, et du sel de potassium a été incorporé à 1 g.L⁻¹ (équivalent K⁺).

Le processus de séparation AF4 impliquait plusieurs étapes, avec un flux détecteur maintenu constant à $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, tandis que le gradient de flux croisé varie. L'injection de l'échantillon commence à 3 minutes pour une durée de 5 minutes avec un débit de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. L'étape de concentration commence à 2 minutes et dure 9 minutes avec un débit de flux croisé de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. À la fin de l'étape de concentration, l'étape d'éluion commence avec un débit de flux croisé fixé à $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ puis réduit linéairement pendant 56 minutes jusqu'à un flux transversal constant de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Ensuite, ce flux a été maintenu à $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 20 minutes. À la fin du parcours, le flux transversal a été réduit à $0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2. Collecte des fractions de vins par AF4

La méthode de séparation a permis de collecter quatre fractions des deux vins (COL 1 et MZ 1) : collections au sommet des pics pendant 3 minutes. Les fractions ont été récupérées à la sortie du canal à l'aide d'un sampler-collecteur (Thermo Scientific©, France). Les temps de rétention des pics ont préalablement été repérés en réalisant 4 injections sur le système AF4-UV-MALS-dRI. Ensuite, tous les détecteurs, sauf l'UV ont été court-circuités. Les temps de collecte de chaque fraction ont été adaptés pour chaque échantillons, mais peuvent approximativement être considéré entre 17 – 20min, 24 – 27min, 36 – 39min et entre 41 – 44min, pour les fractions F1, F2, F3 et F4, respectivement. Afin d'obtenir suffisamment de matière dans les fractions pour les différentes analyses prévues, douze injections consécutives de $850 \mu\text{L}$ ont été effectuées pour les deux vins. Les diverses fractions ont ensuite été conservées à 4°C .

3.3. Détermination de la masse molaire par MALS/dRI

Le calcul de la masse molaire moyenne (M_w) a été effectué à l'aide du logiciel Astra selon le formalisme de Zimm. La valeur de dn/dc utilisée pour calculer la M_w des fractions protéiques (F1-F2) est égale à $0,185 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$. La valeur de dn/dc utilisée pour calculer la M_w des fractions de tanins (F3) est égale à $0,247 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ (Vernhet et al., 2011). Pour la fraction polysaccharidique (F4), la valeur de dn/dc utilisée pour la M_w du RG-II est égale à $0,165 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ (Doco & Brillouet, 1993), et celle utilisée pour les PRAG et MPs est de $0,146 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ (Redgwell et al., 2005).

3.4. Identification des macromolécules présentes dans les différentes fractions par SDS-PAGE

Chaque fraction collectée en AF4 a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Pour identifier la composition macromoléculaire de chaque fraction, différents étalons naturellement présents dans les vins blancs ont été préparés : la protéine thaumatine (Merck©, USA ; 0,05 mg.mL⁻¹), les mannoprotéines (Martin Vialatte©, France ; 3 mg.mL⁻¹) et les polysaccharides (Martin Vialatte©, France ; 2 mg.mL⁻¹) ont été préparés dans l'éluant AF4 (solution de vin modèle, 12 % d'éthanol, pH = 3,2). Un volume de 10 µL des différentes fractions et des étalons a été dilué dans 10 µL de tampon d'échantillon Laemmli (Bio-Rad Laboratories©, Hercules, CA, USA) dans un tube Eppendorf. Chaque échantillon a ensuite été immergé pendant 5 minutes dans un bain-marie sec à 95°C (Benchmark Scientific©, France). Ensuite, les tubes Eppendorf ont été centrifugés (Eppendorf©, Allemagne) pendant 1 minute à 1400 tours/min et à 23°C. Par la suite, 10 µL de chaque échantillon ont été déposés sur un gel pré-coulé Mini-Protean TGX 12% sans coloration (Bio-Rad Laboratories©, France), à l'exception de l'étalon Precision Plus Protein Standard à large spectre (intervalle 10–250 kDa, Bio-Rad Laboratories©, France), qui a d'abord été dilué à 10 % dans le tampon d'échantillon Laemmli. 3 µL de la solution obtenue ont été déposés sur le gel. Les protéines ont ensuite été colorées en utilisant la méthode de coloration à l'argent (Thermo Scientific©, USA).

Afin d'évaluer l'influence des macromolécules présentes dans les différentes fractions obtenues par AF4 d'un point de vue gustatif, il est nécessaire d'analyser ces fractions. Cependant, pour des raisons de sécurité, il est impossible de les déguster directement après l'AF4, car le solvant utilisé n'est pas de qualité alimentaire. C'est pourquoi les vins initiaux ont été ultrafiltrés avec différents seuils de coupure, dans le but de reproduire la collecte de fractions et de permettre leur dégustation par un panel expert.

4. Ultrafiltration des vins

L'ultrafiltration a été réalisée à l'aide d'une cellule Amicon de 50 mL (Merck©, USA) (**Figure 21**).

Procédé d'ultrafiltration

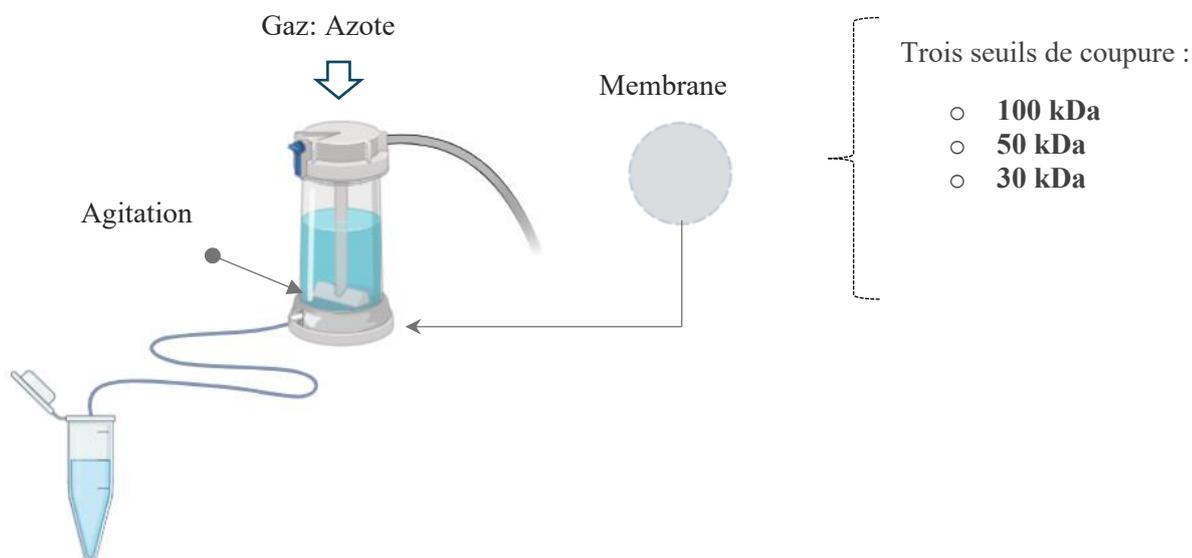


Figure 21: Procédé d'ultrafiltration mis en place dans le cadre de la thèse dans le but de la dégustation des fractions

Source : Figure réalisée par l'auteurice

Trois membranes avec des seuils de coupure différents ont été utilisées : 100 kDa - Polyéthersulfone (PES) (Merck©, USA), 50 kDa - PES (Merck©, USA) et 30 kDa - Cellulose régénérée (RC) (Merck©, USA). L'azote a été utilisé comme gaz porteur. Une bouteille Falcon® a été placée à l'extrémité du tuyau pour recueillir le filtrat. Chaque vin a subi trois filtrations, du seuil de coupure le plus haut au seuil le plus faible.

Le volume initial de vin était de 2,25 L. Étant donné que les vins initiaux provenaient directement de fin de FA et étaient non filtrés, ils ont d'abord été filtrés à l'aide d'un filtre de 0,1 μm . Lors des ultrafiltrations avec différents seuils de coupure (30, 50 et 100 kDa), un volume de 375 mL de chaque filtrat (3 par cépages) a été conservé pour la dégustation par le panel entraîné du DNO. Lors de la première filtration (100 kDa), le filtrat a été récupéré et transféré pour une 2^{de} filtration avec une nouvelle membrane de 50 kDa. Le protocole a été répété avec une troisième membrane neuve de 30 kDa. Les échantillons ont ensuite été rendus inertes à l'aide d'azote et stockés dans une pièce froide à 4 °C.

Les fractions ont été injectées dans l'instrument AF4 en utilisant la même méthode que celle décrite précédemment (IV.3.1) et dégustées par le panel entraîné en utilisant les 5 descripteurs retenus lors du premier test PF.

V. AF4-UHPLC : Séparation bidimensionnelle de macromolécules

1. Echantillons

Dans cette étude, quatre échantillons de vins blancs provenant de quatre variétés de raisin indigènes du Sud-Ouest de la France ont été analysés. Ces échantillons ont été sélectionnés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques — TAV%, pH, AT, et concentrations en A_{mal} , A_{lac} et $A_{\text{tartrique}}$ — afin d'éliminer tout biais dans les évaluations analytiques (**Tableau 6**). Les vins monovariétaux issus des 4 cépages indigènes, COL, GM, MZ et LL, tous de la récolte 2021, ont été obtenus de différentes caves. Les échantillons ont été prélevés directement dans les cuves après la FA.

Tableau 6: Tableau récapitulatif des paramètres œnologiques classiques de tous les échantillons utilisés dans l'étude AF4-UHPLC

Cépages	Zone de production du vin	TAV	AT	pH	$A_{\text{tartrique}}$	A_{mal}	A_{lac}
		%	g.L ⁻¹ sous forme d'acide tartrique		g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹
COL	GERS	12	5,44	3,1	1,95	5,27	0
GM	GERS	12	5,17	3,2	1,92	4,59	0
LL	TARN	13	3,81	3,3	1,64	2,79	0,6
MZ	TARN	12	3,10	3,4	1,51	1,56	0,75

2. Instrumentation

Pour déterminer la composition macromoléculaire de différentes variétés de raisin, un système AF4-UHPLC bidimensionnel a été développé (**Figure 22**). L'objectif était de fractionner l'échantillon à l'aide de l'AF4 afin de collecter les fractions à des intervalles d'une minute à partir du fractogramme sur des cartouches, facilitant ainsi la concentration des différentes fractions. Celles-ci seront ensuite désorbées

sur une colonne UHPLC. Le système AF4-UHPLC a été assemblé à partir d'un dispositif AF4, d'un système HPLC, et d'une vanne haute pression à 10 ports et deux positions (C2-1000EP, VICI Valco).

Pour valider le système, deux standards ont été injectés : la protéine Thaumatine (Merck©, USA) et la mannoprotéine (Martin Vialatte©, France).

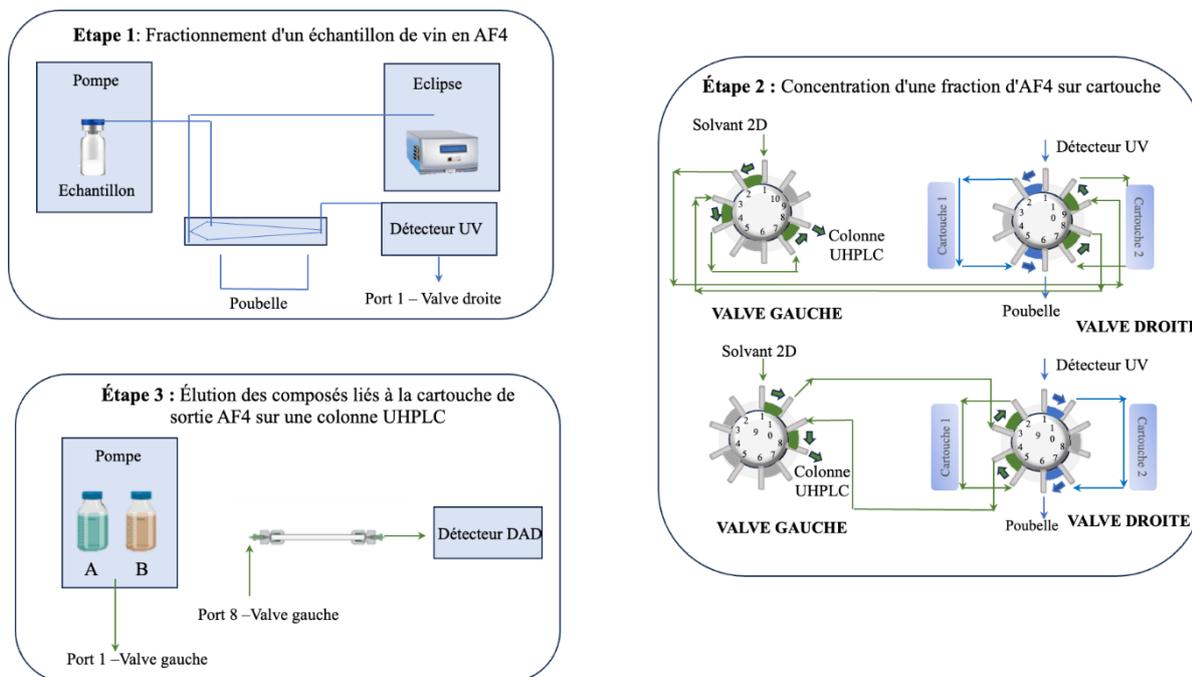


Figure 22: Schéma du système AF4-UHPLC

Source : Figure réalisée par l'auteurice

2.1. Analyse 1D : AF4 (fractionnement selon la taille)

En ce qui concerne le fractionnement à l'aide de l'AF4, la même méthode détaillée dans la section ci-dessus (IV.3.1) a été appliquée. Pour intégrer les systèmes unidimensionnel (1D) et bidimensionnel (2D), le système 1D était connecté à la sortie UV au port numéro 1 de la vanne d'interface (C2-1000EP, VICI Valco). Le logiciel Chromeleon© 7 a été utilisé pour contrôler l'autosampler, la pompe et les flux Eclipse, ainsi que pour activer l'analyse 2D.

2.2. Analyse bidimensionnelle par UHPLC

2.2.1. Concentration des fractions AF4 sur cartouches

Pour concentrer les fractions AF4, deux boucles, chacune composée d'une cartouche (C8, 2,1 mm x 4,6 mm ID, Kinetex®), ont été placées sur la vanne sélective (**Figure 22**). Chaque minute du fractogramme, une fraction de l'AF4 était injectée dans le port d'entrée de la vanne de sélection (port 1). Ensuite, la fraction était concentrée dans une cartouche. Pendant que la première cartouche libérait le matériau concentré, la seconde cartouche était remplie avec la nouvelle fraction. Les échantillons concentrés étaient ensuite élués sur la colonne UHPLC.

2.2.2. Elution des composés sur colonne UHPLC

La teneur en macromolécules a été déterminée par UHPLC en utilisant une méthode modifiée (Marangon et al., 2009): conversion de la HPLC à l'UHPLC. La modification de la méthode HPLC avait pour objectif de réduire le temps d'analyse. Par conséquent, le temps d'analyse de la méthode initiale, qui était de 35 minutes, a été réduit à 1,30 seconde. L'UHPLC a été réalisée avec un instrument Ultimate 3000 Series (ThermoFisher®, France). La séparation a été effectuée à l'aide d'une colonne Kinetex® (C8), taille de particules 100 Å (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) thermostatée à 35°C.

Deux éluants ont été utilisés comme phases mobiles : la phase mobile A consistait en 80 % d'acétonitrile, 20 % d'eau mQ avec 0,1 % de TFA, et la phase mobile B consistait en 8 % d'acétonitrile, 92 % d'eau mQ et 0,1 % de TFA. Le débit était de 0,86 mL.min⁻¹. Le **Tableau 7** montre le profil du gradient. Un détecteur DAD, surveillant à 220 nm, a été utilisé pour la détection.

Tableau 7: Gradient d'éluant pour la détermination par UHPLC des macromolécules dans les vins blancs

Temps (min)	0	0,08	0,23	0,29	0,90	0,98	1,00	1,30
%A	17	49	57	65	81	81	17	17
%B	83	51	43	35	19	19	83	83

2.3. Traitement des données 2D

Pour traiter toutes les données, chacune des fractions 2D collectées à l'aide de Chromelon® a été exportée sous forme de fichier texte, puis traitée avec le logiciel LC x LC image (2024). Une fois les

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

fractions importées dans le logiciel, l'image 2D apparaît. Tout d'abord, la correction de la ligne de base avec la commande 'Correction de la ligne de base' est nécessaire. Les zones des différents blots ont été analysées grâce à la fonction 'Blot' du logiciel.

Troisième partie

Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Comme évoqué précédemment, les acides aminés jouent un rôle clé dans les perceptions sensorielles des vins blancs, mais leur influence spécifique sur le goût reste encore peu explorée. Cette section vise à répondre à la question suivante : « Comment les acides aminés, reconnus pour moduler les perceptions sensorielles, influencent-ils les perceptions gustatives des vins blancs du Sud-Ouest ? »

- Dans un premier temps, une analyse des paramètres œnologiques classiques des vins sera réalisée. Cette étude préliminaire est cruciale pour identifier les différences entre les cépages et les distinguer en fonction des pratiques viticoles et des méthodes de vinification.
- Une fois les facteurs les plus déterminants pour la différenciation des cépages identifiés, la composition en acides aminés de chaque cépage sera étudiée. Pour cela, une méthode de dérivatisant et HPLC va être appliquée sur les 69 vins de l'étude.
- Les acides aminés permettant de discriminer les cépages seront ensuite analysés pour évaluer leur impact sensoriel à l'aide de tests spécifiques.

CHAPITRE 1 : ETUDE PRELIMINAIRE DES VINS ETUDIES : ANALYSE DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES

Les caractéristiques physico-chimiques des vins provenant exclusivement du Sud-Ouest vont être examinées dans ce chapitre dans le but d'évaluer l'influence de paramètres clés tels que le cépage, le millésime, non seulement sur les paramètres œnologiques classiques (pH, TAV, AT), mais aussi sur la concentration en azote alpha-aminé des vins. Pour cette étude, 69 vins ont été sélectionnés dans deux régions productrices, le Gers et le Tarn, représentant quatre cépages distincts : COL, GM, MZ, et LL.

I. Du vignoble à la cave : Les éléments clés de l'élaboration des vins du Sud-Ouest

Les cépages autochtones du Sud-Ouest de la France, tels que le COL, le GM, le MZ et le LL, présentent chacun des caractéristiques sensorielles et gustatives uniques, influencées notamment par les pratiques viticoles et les méthodes de vinification.

Selon le style de vin recherché, les viticulteurs récoltent les raisins à des niveaux de maturités différents, influencés par de nombreux facteurs (Gladstones, 2016). Certaines appellations viticoles, telles que l'IGP Côtes de Gascogne, sont réputées pour leur acidité marquée (J. Robinson et al., 2012; Frankel, 2013). Cette acidité marquée implique des vendanges précoces.

De plus, le type de sol constitue un facteur fondamental (Chapitre 1,I.2.2). Il est étroitement lié à la nature des roches sous-jacentes (Van Leeuwen, 2010). Selon le style de vin recherché, certains cépages doivent être cultivés sur des sols spécialement adaptés. Pour les vins des Côtes de Gascogne, le cépage COL s'adapte mieux aux sols argilo-calcaires. En effet, ce cépage étant sensible au stress hydrique, il requiert des sols capables de conserver l'humidité en été, d'où ces sols argilo-calcaires qui réduisent les risques de sécheresse. Le GM trouve une meilleure adéquation avec les sols argilo-sableux (Frankel, 2013), car il nécessite de la chaleur pour atteindre sa maturité. Par ailleurs, ce cépage apprécie une humidité constante, d'où l'importance d'un sol profond avec une bonne proportion d'argile, capable de maintenir cette humidité sans qu'elle ne disparaisse complètement. Pour les vins du Tarn, plus spécifiquement de l'AOP Gaillac, le MZ s'adapte également mieux aux sols argilo-calcaires. En revanche, le cépage LL, apprécié pour sa capacité à développer la pourriture noble, est mieux adapté à des coteaux bien drainés

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest où les vignes sont asséchées par le vent. De plus, ce cépage nécessite un sol riche en potassium, car ses rendements élevés tendent à épuiser rapidement cet élément (Frankel, 2013).

Les pratiques viticoles, incluant la gestion du vignoble et les méthodes de récolte, impactent également la qualité et la composition des raisins (Partie 1,III.2.1). Certains vins, tels que les vins des Côtes de Gascogne, sont très réputés pour leurs arômes typiques d'agrumes et de fruits exotiques, dus à la présence de thiols volatils (J. Robinson et al., 2012). Ils proviennent principalement de précurseurs inodores présents dans les raisins, tels que la S-cystéine, qui sont principalement libérés par l'activité enzymatique des levures pendant la FA (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Présents en très faibles concentrations dans les raisins (ppb)(Peña-Gallego et al., 2012), ces précurseurs de thiols peuvent voir leurs concentrations modifiées par les pratiques viticoles tels que la fertilisation azotée ainsi que l'ajout de sel ammoniacaux pendant la FA (Dournes et al., 2022). Par exemple, il a été démontré qu'un statut azoté élevé dans le vignoble augmentait la concentration de précurseurs cystéinylés d'un facteur quatre (Choné et al., 2006), ainsi que la concentration de thiols variétaux dans les vins finis correspondants (Bruwer et al., 2019).

Par ailleurs, les techniques de vinification, comme les opérations pré fermentaires (macérations à froid...) et de clarification, et l'ajout de levures ou d'enzymes, modifient les propriétés chimiques et sensorielles du vin. De plus, l'élevage, qu'il soit réalisé en cuve, en fût de chêne ou en bouteille, contribue à l'évolution des caractéristiques organoleptiques du vin en influençant des paramètres tels que l'acidité, les tanins et les arômes. Tous ces éléments combinés définissent la composition finale du vin, influençant ainsi son goût, son arôme et sa flaveur.

Ces paramètres influencent directement les caractéristiques physico-chimiques des vins. Cette étude vise à différencier des vins monovariétaux provenant de deux régions viticoles et de trois millésimes. Pour ce faire, différents paramètres œnologiques ont été analysés à l'aide de différentes techniques analytiques afin de fournir une première indication des différences observées.

II. États de connaissances des techniques analytiques mesurant paramètres physico-chimiques des vins

Pour déterminer les paramètres œnologiques classiques de vin blanc, diverses techniques analytiques physico-chimiques peuvent être employées.

1. Détermination des paramètres œnologiques standards

1.1. Spectrométrie à transformée de Fourier

Des outils analytiques utilisant le principe de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IFTR), tels que Winescan® et Bacchus®, sont largement utilisés dans le domaine viticole pour analyser la composition du vin à toutes les étapes de sa production. La spectrométrie IFTR permet de mesurer divers paramètres œnologiques tels que le TAV, le pH, l'AT, ainsi que les concentrations en A_{tart} , A_{mal} et A_{lac} , l'indice des polyphénols totaux (IPT) et l'acidité volatile (AV). Ces équipements, qui ne requièrent aucune préparation préalable des échantillons, se distinguent par leur automatisation, leur précision et leur rapidité d'exécution (Moreira & Santos, 2004).

L'IFTR est une technique non destructive fournissant des informations structurales sur les caractéristiques moléculaires d'une large gamme de composés. Le principe de l'IFTR repose sur la mesure des fréquences absorbées par les liaisons chimiques entre les groupes fonctionnels tels que C-C, C-H, O-H, C=O et N-H présents dans un échantillon sous l'effet d'un rayonnement infra-rouge (IR). Ces liaisons asymétriques avec un moment dipolaire absorbent le rayonnement IR dans la région IR moyen, généralement définie comme allant de 4000 à 400 cm^{-1} , ou en d'autres termes, de 2 500 à 25 000 nm (Soriano et al., 2007).

Pour établir une corrélation entre la réponse spectrale d'un échantillon et les données de composition obtenues par des méthodes de laboratoire, les outils analytiques utilisant la spectroscopie IFTR sont combinés à un logiciel de calibration, basé sur des techniques en PCA et régression par moindres carrés partiels (PLSR)(Bauer et al., 2008). Ce logiciel de calibration est spécifiquement conçu pour l'analyse spécifique des raisins et vins. Cependant, les différentes variétés de vins qui ne sont pas incluses dans la série d'étalonnage peuvent introduire des mécanismes d'interférences qui affectent la précision des résultats. Par conséquent, l'extension de la base de données pour inclure des échantillons réels, la gamme

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest et l'échelle de valeurs les plus larges possibles pour le paramètre analysé, et la modification de l'étalonnage sont nécessaires pour que chaque laboratoire développe un étalonnage robuste.

1.2. Dosage du SO₂ libre et total : Titromatic®

Cette technique est principalement utilisée pour le dosage du dioxyde de soufre (SO₂) libre et total dans les vins.

Le taux de SO₂ dans le vin est déterminé grâce à un appareil appelé Titromatic® qui dose automatiquement le SO₂ libre et total à l'aide de la méthode de Ripper (L. M. Gonçalves et al., 2010; Vahl et al., 1980). Cette méthode consiste dans un premier temps à acidifier et titrer avec une solution d'iode l'échantillon de vin afin de déterminer le taux de SO₂ libre en utilisant l'amidon comme indicateur. Dans un deuxième temps, afin de doser le SO₂ total, l'échantillon est traité avec de l'hydroxyde de sodium pour libérer le SO₂ combiné.

1.3. Dosage de l'azote ammoniacal et alpha aminés : l'analyse multiparamétrique Gallery®

L'analyseur multiparamétrique Gallery® a été utilisé pour le dosage de l'azote ammoniacal et alpha aminé par méthode colorimétrique à 340 nm.

L'azote ammoniacal est dosé par méthode enzymatique. Les ions ammoniums réagissent avec l' α -cétoglutarate et réduisent le Nicotinamide Adénosine Dinucléotide Phosphate (NADPH) pour donner le L-glutamate et du NADP. Cette réaction est catalysée par la glutamate déshydrogénase. L'oxydation du NADPH, mesuré par la décroissance de l'absorbance à 340 nm, est proportionnelle à la quantité d'ions ammonium.

L'azote aminé total est quant à lui dosé par la méthode NOPA (Nitrogen by Ortho-Phtalaldéhyde) (Schaan & Hughes, 2024). Celle-ci consiste à faire réagir l'azote avec l'Ortho-Phtalaldéhyde (OPA) en présence de N-acétyl cystéine. La réaction est mesurée à 340 nm.

III. Caractérisation des paramètres physico-chimique des vins : influence de différents facteurs

Les quatre cépages étudiés présentent des caractéristiques physico-chimiques distinctes influencées par différents paramètres tels que le cépage, le millésime ainsi que l'étape de prélèvement.

1.1. Influence du cépage

Selon le **Tableau 8**, le cépage influence la majorité des variables ($p < 0,001$), à l'exception de certains paramètres tels que l'Atart, le SO_2 libre, et l'azote ammoniacal. Les concentrations d'azote ammoniacal ne sont pas indiquées dans le **Tableau 8**, car elles se situent majoritairement en dessous du seuil défini par la méthode analytique.

Tableau 8: Paramètres physico-chimiques des différents cépages étudiés.

Les données sont les valeurs moyennes des erreurs standard. Les valeurs p-values pour le facteur cépages sont indiquées. Les différences significatives entre les données pour différents paramètres sont indiquées par des lettres différentes selon le test HSD de Tukey.

Cépages	TAV	pH	AT	Atart	Amal	Alac	SO_2 libre	SO_2 total	Azote organique
	%		g.L ⁻¹ sous forme d'acide tartrique	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
COL (n=25)	11,5 ± 0,3 c	3,02 ± 0,05 b	5,01 ± 0,21 a	2,41 ± 0,17	3,96 ± 0,32 a	0,01 ± 0,003 b	24,24 ± 3,50	117 ± 7 a	58 ± 6 a
GM (n=9)	13,2 ± 0,3 a	3,23 ± 0,06 a	4,44 ± 0,24 b	2,39 ± 0,20	3,06 ± 0,36 b	0,13 ± 0,006 b	27,68 ± 3,77	111 ± 9, a	46 ± 7 ab
LL (=20)	12,2 ± 0,2 b	3,29 ± 0,04 a	3,21 ± 0,18 c	2,15 ± 0,15	0,99 ± 0,28 c	0,67 ± 0,003 a	26,44 ± 3,18	90 ± 6 b	43 ± 5 b
MZ (n=15)	12,4 ± 0,2 ab	3,25 ± 0,04 a	3,14 ± 0,19 c	2,14 ± 0,16	0,63 ± 0,28 c	0,81 ± 0,004 a	22,06 ± 3,04	82 ± 7 b	37 ± 6 b
Facteur									
Cépage p-values	<0,001	<0,001	<0,001	0,335	<0,001	<0,001	0,476	0,001	0,011

Pour le TAV, les vins issus du cépage GM ont un TAV (13,2 % ± 0,3, n=9) relativement proche de celui des vins issus des cépages MZ (12,4 % ± 0,2, n= 15) qui présente des caractéristiques communes avec le cépage LL (12,2 % ± 0,2 n= 20) mais éloigné des vins issus des cépages COL (TAV =11,5 % ± 0,3, n= 25). De plus, la variété COL présente la plus forte AT et le pH le plus bas. Comme évoqué plus haut, ces caractéristiques sont souvent recherchées et liées à la récolte précoce des raisins pour obtenir des rendements élevés (J. Robinson et al., 2012). De ce fait, les raisins vendangés de cépage COL sont généralement moins mûrs que ceux des autres cépages. En ce qui concerne les données recueillies pour les acides malique et lactique, les cépages COL et GM ont tendance à présenter une forte concentration en acide malique ($A_{\text{mal (COL)}} = 3,96 \pm 0,32 \text{ g.L}^{-1}$; $A_{\text{mal (GM)}} = 3,06 \pm 0,36 \text{ g.L}^{-1}$) mais une faible concentration en acide lactique ($A_{\text{lac (COL)}} = 0,01 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}$); $A_{\text{lac (GM)}} = 0,13 \pm 0,006 \text{ g.L}^{-1}$),

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

contrairement aux cépages LL et MZ ($A_{\text{mal (LL)}} = 0,99 \pm 0,28 \text{ g.L}^{-1}$; $A_{\text{mal (MZ)}} = 0,63 \pm 0,28 \text{ g.L}^{-1}$; $A_{\text{lac (LL)}} = 0,67 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}$; $A_{\text{lac (MZ)}} = 0,81 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1}$). La réalisation de la fermentation malolactique (FML) pour ces deux derniers cépages explique ce résultat. Cette réaction biologique permet de transformer l'acide malique, un diacide, en acide lactique, un monoacide, diminuant ainsi l'acidité du vin. Comme la fraîcheur et l'acidité sont des éléments clés dans les vins de GM et de COL, la fermentation malolactique a été volontairement arrêtée. De plus, pour éviter le développement de l'acide lactique, les vignerons ajoutent des doses plus élevées de SO_2 (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2020). Cela s'explique par la teneur totale en SO_2 plus élevée pour les cépages COL et GM ($\text{SO}_{2(\text{COL})} = 117 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$; $\text{SO}_{2(\text{GM})} = 111 \pm 9 \text{ mg.L}^{-1}$) que pour les cépages MZ et LL ($\text{SO}_{2(\text{LL})} = 90 \pm 6 \text{ mg.L}^{-1}$; $\text{SO}_{2(\text{MZ})} = 82 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$).

La teneur en azote organique varie également en fonction du cépage ($p = 0,011$). La teneur en azote organique dans le COL ($58 \pm 6 \text{ mg.L}^{-1}$) était relativement similaire à celle du GM ($46 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$). Ce dernier présente également une teneur en azote organique similaire à celle des vins de MZ ($43 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$) et de LL ($37 \pm 6 \text{ mg.L}^{-1}$). L'azote aminé, composé d'acides aminés primaires, est la forme la plus courante d'azote organique dans les vins (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020) influencée par de nombreux facteurs tels que les pratiques viticoles (traitements azotés foliaires). Les raisins de COL, dont les vins sont réputés pour leurs arômes thiolés, sont souvent soumis à l'application d'azote au vignoble. Ce phénomène semble apparaître dans la présente étude, puisque l'azote organique dans les vins COL étudiés est proche du cépage GM, reconnu également pour sa richesse en précurseurs de thiols et issu du même bassin de production que les vins de COL. Ainsi, cette concentration en azote organique dans les vins de COL est plus importante que dans les vins de MZ et de LL.

Ces résultats préliminaires indiquent une influence des cépages en lien avec les stratégies de conduite des vignobles sur divers paramètres œnologiques. Par ailleurs, il apparaît que les cépages COL et GM présentent des similitudes plus marquées en termes de paramètres œnologiques comparés aux cépages MZ et LL. De plus, l'analyse discriminante réalisée sur l'ensemble des données a permis de visualiser les différences entre les cépages à l'aide d'un arbre de classification. Cet arbre, présenté **Figure 23**, montre comment les différentes variables discriminantes, telles que l'AT, la concentration en Amal et le

pH permettent de séparer efficacement les classes observées. Chaque nœud de l'arbre représente un point de décision basé sur la valeur d'une variable, et chaque branche correspond à une bifurcation qui dirige vers une classification spécifique. En suivant les branches de l'arbre, les caractéristiques clés qui distinguent chaque groupe peuvent être identifiées, ce qui facilite l'interprétation des facteurs les plus influents dans la différenciation des classes étudiées. Par exemple, l'AT semble être la variable la plus discriminante pour séparer les cépages issus des côtes de Gascogne et les vins issus du Tarn. En effet, les cépages COL présentent des valeurs plus importantes pour ce facteur. Comme mentionné précédemment, le cépage COL est récolté très tôt pour préserver toute son acidité. En revanche, le cépage GM est récolté plus tard tout en conservant une bonne acidité, qui est une caractéristique distinctive de ce cépage. En outre, ces cépages font souvent l'objet de traitements foliaires pour augmenter le taux d'azote dans les moûts ainsi que les rendements de récolte. L'application d'azote a également pour effet de réduire le niveau de maturité, entraînant une augmentation de l'AT (Dufourcq et al., 2010). De plus, les vins issus des cépages LL et MZ sont différenciés en fonction de leur concentration en A_{mal} . En effet, ces vins sont soumis à la fermentations malolactique.

Ainsi, les vins des Côtes de Gascogne et du Tarn se distinguent à la fois par les cépages utilisés, mais également par les stratégies retenues par les viticulteurs, pour la conduite du vignoble et les itinéraires de vinification. Le climat ayant un impact significatif sur la maturation des raisins, trois millésimes ont été analysés afin d'évaluer leur influence sur les paramètres œnologiques classiques.

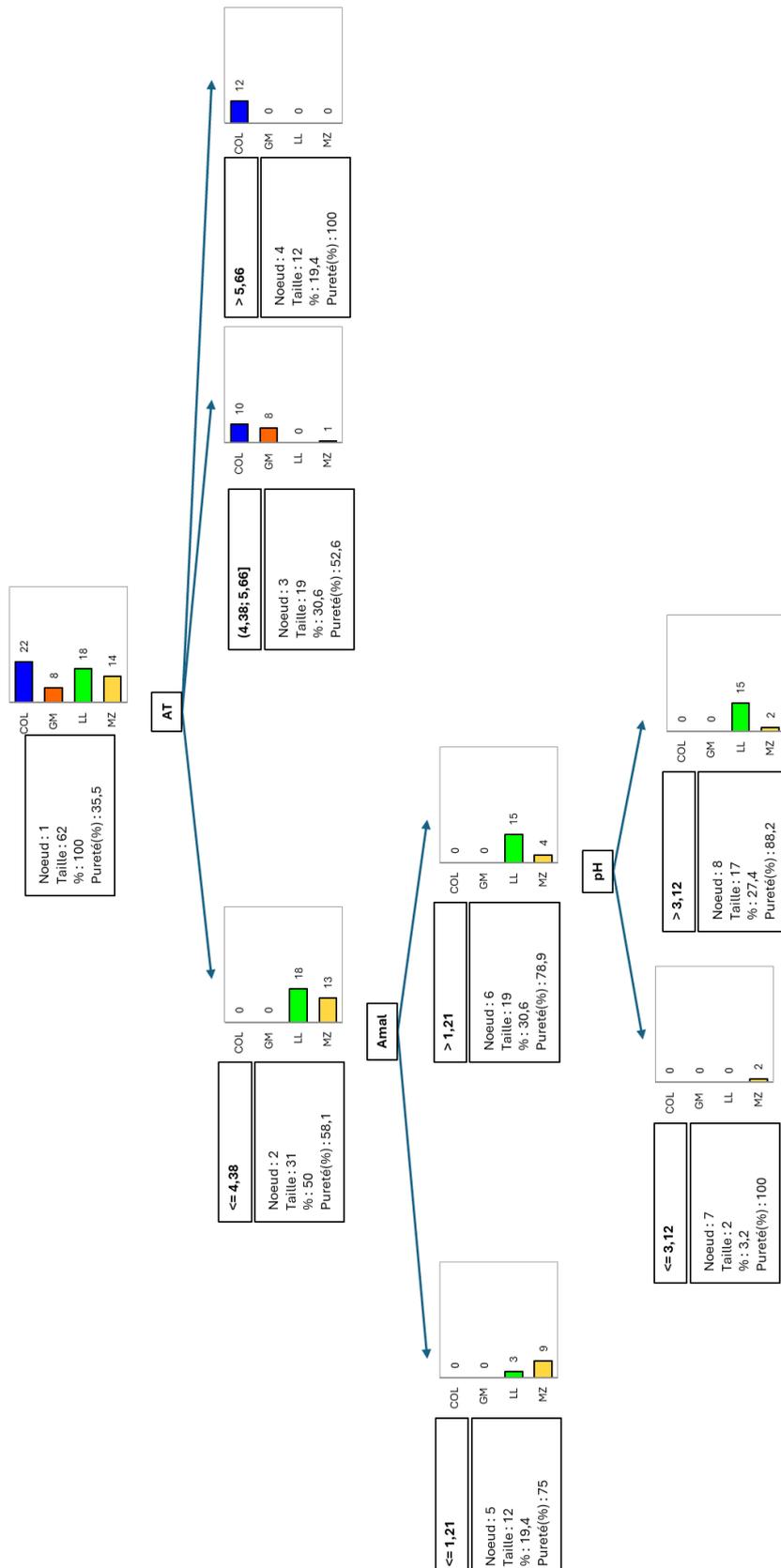


Figure 23: Analyse par arbre de classification et de régression réalisée à l'aide de tous les paramètres œnologiques mesurés dans les vins. COL : Colombard, GM : Gros Manseng, MZ : Mauzac, LL : Len de l'El, AT : acidité totale, Amal : acide malique.

1.2. Influence du millésime

Le millésime influence directement l'AT (p -value=0,20) et la concentration en acide malique des vins (p -value=0,001) (**Tableau 9**).

Tableau 9: Paramètres physico-chimiques des différents millésimes étudiés.

Les données sont les valeurs moyennes des erreurs standard. Les valeurs p -values pour le facteur millésime sont indiquées. Les différences significatives entre les données pour différents paramètres sont indiquées par des lettres différentes selon le test HSD de Tukey

Millésime	TAV	pH	AT	Atart	Amal	Alac	SO ₂ libre	SO ₂ total	Azote organique
	%		g.L ⁻¹ sous forme d'acide tartrique	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
Millésime 16 (n=7)	12,1 ± 0,3	3,15± 0,07	3,76 ± 0,27 b	2,22± 0,23	1,63 ± 0,39 b	0,29 ± 0,006	22,35 ± 5,12	95 ± 9	41 ± 8
Millésime 20 (n=8)	12,9 ± 0,3	3,27± 0,06	3,63 ± 0,26 b	2,39 ± 0,22	1,80 ± 0,39 b	0,35± 0,007	27,76 ± 4,09	102 ± 10	58 ± 8
Millésime 21 (n=54)	12,0 ± 0,2	3,18± 0,03	4,25 ± 0,14 a	2,20 ± 0,10	3,04 ± 0,26 a	0,25± 0,001	25,20 ± 1,59	102 ± 3	39 ± 5
Facteur									
Millésime p -values	0,080	0,363	0,020	0,726	0,001	0,576	0,680	0,759	0,129

Le millésime 2021 affiche une AT plus élevée que les millésimes 2016 et 2020. En effet, 2021 a été marqué par des perturbations environnementales telles que des gelées printanières et un été frais et pluvieux entraînant des maladies ainsi qu'une maturité des baies moins avancée (Météo France, 2021). En comparaison, 2020 et 2016 étaient des années plus chaudes avec des conditions climatiques généralement favorables à la maturation des baies (Météo France, 2020; Météo France, 2016). Ainsi, les raisins de 2021 étaient probablement moins mûrs que ceux des années 2020 et 2016. La concentration plus élevée en acide malique en 2021 peut également être attribuée à ce moindre degré de maturité puisqu'il est présent en grande quantité dans les raisins après la véraison et est progressivement métabolisé au cours de leur maturation, réduisant ainsi sa concentration à mesure que les baies mûrissent (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2020).

Cependant, la majorité des échantillons issus des millésimes 2016 et 2020 sont essentiellement des vins de MZ et de LL, généralement récoltés plus tard (AT plus faible) et dont les itinéraires techniques impliquent la réalisation de la FML.

Le climat influence la classification des vins, notamment en ce qui concerne leur acidité totale. Cependant, dans notre étude, l'impact semble davantage lié aux variations de l'échantillonnage qu'au climat lui-même. Le stade de prélèvement peut également exercer une influence. Afin d'étudier ce paramètre, les vins prélevés en fin de FA (n=30) et les vins prélevés en bouteilles (n=39) ont été étudiés.

1.3. Effet du stade de prélèvement de l'échantillon

L'étape de prélèvement des échantillons influence grandement les concentrations d'A_{lac} dans les vins (**Tableau 10**). En effet, les concentrations d'A_{lac} sont plus élevées dans les vins en bouteille (B) comparés à ceux prélevés à la fin de la FA, phénomène une nouvelle fois lié à l'étape de FML. Le stade de prélèvement peut également fluctuer au sein d'un même cépage.

Tableau 10: Paramètres physico-chimiques des différents vins étudiés prélevés à différents stades : FA et B.

Les données sont les valeurs moyennes des erreurs standard. Les valeurs p-values pour le facteur étape de prélèvement sont indiquées. Les différences significatives entre les données pour différents paramètres sont indiquées par des lettres différentes selon le test HSD de Tukey

Etape de prélèvement	TAV	pH	AT	Atart	Amal	Alac	SO ₂ libre	SO ₂ total	Azote organique
	%		g.L ⁻¹ sous forme d'acide tartrique	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
FA (n=30)	12,2 ± 0,3	3,22 ± 0,05	3,85 ± 0,21	2,14 ± 0,17	2,25 ± 0,31	0,22 ± 0,003	22,32 ± 3,31	96 ± 7	51 ± 6
B (n=39)	12,4 ± 0,20	3,18 ± 0,04	3,89 ± 0,16	2,41 ± 0,13	2,07 ± 0,26	0,38 ± 0,002	27,89 ± 2,48	104 ± 5	41 ± 5
Facteur									
Etape de prélèvement (FA/B) p-values	0,601	0,487	0,845	0,163	0,563	0,019	0,129	0,280	0,13

IV. Conclusion

Dans la présente étude, les cépages diffèrent tous et ont été soumis à différents processus viticoles et œnologiques sur des millésimes différents, ce qui induit la variabilité observée en termes de paramètres œnologiques. La teneur en azote organique est corrélée au cépage. La majeure partie de cet azote organique est constituée d'acides aminés. De nombreuses études ont été consacrées aux profils en acides aminés des raisins et des moûts de divers cépages. Cependant, aucune recherche n'a encore porté sur les cépages examinés dans ce travail, et encore moins sur les vins issus de ces cépages.

CHAPITRE 2 : AMINOGRAMME DES VINS BLANCS MONOVARIETAUX ETUDIÉS : CLASSIFICATION PAR CEPAGE, REGION DE PRODUCTION ET MILLESIME

Ce chapitre analyse les profils aminés de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France, en explorant l'influence de divers facteurs tels que le cépage, la maturité du raisin et les pratiques viticoles, notamment la fertilisation azotée, sur la composition en acides aminés. Dans cette étude, 69 vins ont été analysés par HPLC en utilisant une méthode d'analyse modifiée.

I. Influence des acides aminés sur la caractérisation des vins : facteurs et études comparatives

Comme évoqué dans la partie 1 (III.2), les acides aminés représentent 30 à 40 % de l'azote total dans les raisins mûrs. La majorité de ceux présents dans les moûts sont utilisés comme nutriments pour la croissance des levures pendant la FA et amènent à la formation de molécules volatiles contribuant aux propriétés organoleptiques des vins (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). De plus, il est généralement admis que les acides aminés peuvent agir comme nutriments pour la croissance bactérienne pendant les fermentations secondaires (Lonvaud-Funel, 2001).

Les acides aminés dans le vin ont diverses origines. Au-delà de ceux présents dans le raisin et qui peuvent être partiellement ou totalement métabolisés par les levures durant la phase de croissance, certains sont excrétés par les levures vivantes à la fin de la fermentation, d'autres sont libérés par protéolyse lors de l'autolyse des levures mortes, et d'autres encore sont produits par dégradation enzymatique des protéines du raisin (Soufleros et al., 2003). De plus, un ajout d'azote organique ou minérale peut être apporté au moût afin d'apporter une quantité et qualité suffisante d'azote dans le but d'améliorer le processus de FA mais également dans certains cas de former des arômes positifs (par exemple thiols dans le cas des vins issus des côtes de Gascogne)(Jiranek et al., 1995). En outre, il est bien connu que la teneur des raisins en acides aminés dépend de la fertilisation, des conditions climatiques et de la durée de la macération des pellicules dans le moût (Etiévant et al., 1988).

Les paramètres de vinification (par exemple, la température ou la turbidité) peuvent également influencer le contenu en acides aminés du vin (Rapp & Versini, 1995).

Malgré l'effet de nombreux paramètres sur la concentration et la composition des acides aminés dans les moûts et les vins, plusieurs études (Mirás-Avalos et al., 2020; Pérez-Álvarez et al., 2019; Sartor et al., 2021) ont examiné les profils d'acides aminés des moût et vins pour les différencier et les classer selon les cépages, les conditions de gestion et les régions viticoles. Par exemple, Pérez-Álvarez et al (2019) ont étudié quatre millésimes afin de déterminer l'influence du type de sol sur la teneur en acides aminés de moûts de Tempranillo. Leurs résultats ont montré que la concentration en acides aminés libres permettait de distinguer les moûts issus de sols différents. De plus, en analysant 22 acides aminés, Sartor et al (2021) ont différencié trois cépages non traditionnellement utilisés dans la production de vins effervescents (Niagara, Manzoni Bianco et Goethe) d'un cépage traditionnel (Chardonnay). Ils ont démontré que le profil d'acides aminés peut être influencé par les caractéristiques variétales, étant donné que tous les moûts ont subi le même processus de clarification lors de la phase pré-fermentaire. Ils ont également analysé les acides aminés présents dans les vins de base issus des mêmes cépages. Bien que les concentrations d'acides aminés soient plus faibles que dans les moûts, ils ont tiré la même conclusion : le cépage influence fortement la concentration d'acides aminés dans les vins. Cette conclusion a également été tirée des travaux de Mirás-Avalos et al (2020), qui ont différencié des vins blancs issus de trois cépages autochtones galiciens en analysant 22 acides aminés. Ces vins blancs ont été vinifiés dans des conditions identiques et contrôlées. Ils ont alors démontré que la composition en acides aminés des raisins et des vins pouvait être influencée par plusieurs facteurs tels que le cépage, la localisation géographique ou le millésime. De plus, Soufleros et al (1998) ont réussi à classer les vins français de différentes régions (Bordeaux, Bourgogne, Alsace, Champagne) en fonction de leur origine, type et vieillissement par analyse de 21 acides aminés, amines biogènes et substances volatiles indépendamment des conditions de vinifications. Une autre étude (De La Presa-Owens et al., 1995) a permis de caractériser des vins blancs issus de la région de Penedès en Espagne. Il a été démontré que certains acides aminés étaient plus caractéristiques de certains facteurs tels que le cépage, l'origine géographique et le millésime. Ces conclusions sont synthétisées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11: Tableau synthétique des données de l'étude de De La Presa-Owens et al (1995)

Facteur de caractérisation	Cépages	Origine géographique	Millésime
Acide aminés			Tyr
	Tyr		GABA
	Ile	Asn	Ala
	Gly	Pro	Asn
	Ala	Lys	His
			Met

Afin de différencier et d'identifier les acides aminés en fonction de différents facteurs tels que le cépage ou le millésime, des analyses multivariées sont généralement réalisées dans les vins (Seeber et al., 1991; Vasconcelos & Das Neves, 1990).

Par ailleurs, plusieurs techniques peuvent être utilisées pour quantifier les acides aminés dans les vins, mais la plus couramment employée reste l'HPLC associée à une méthode de dérivation.

Toutes ces études montrent que des paramètres tels que le cépage influence la composition en acides aminés des moûts et des vins. Le profil en acides aminés pourrait donc être un bon moyen de différencier les divers profils de vin. Cependant, peu d'études se sont concentrées sur les vins blancs, et en particulier sur ceux issus des vignobles du Sud-Ouest de la France.

II. Etude du profil aminé de vins issus de 4 cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

Pour différencier le profil des acides aminés de nos 69 vins blancs de la région du Sud-Ouest, la méthode analytique développée par Gómez-Alonso et al (2007) a été utilisée. Cette méthode a permis d'identifier et de quantifier vingt-deux acides aminés dans les échantillons de vins issus des quatre cépages COL, GM, LL et MZ. Les concentrations moyennes totales en acides aminés libres dans les vins des quatre cépages étudiés varient de $104 \pm 4,19$ à 2928 ± 114 mg.L⁻¹ (**Tableau 12**). Les mêmes acides aminés sont

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

présents dans chacun des quatre groupes de vins (c'est-à-dire les vins issus des quatre cépages), mais leurs concentrations diffèrent.

Tableau 12: Concentrations minimales et maximales ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) d'acides aminés libres dans les vins issus de quatre cépages blancs ($n=69 \pm \text{écart-type}$).

Acides aminés	COL (25 échantillons)		GM (9 échantillons)		LL (20 échantillons)		MZ (15 échantillons)	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Asp	8,43 ± 0,64	60,4 ± 2,48	15,6 ± 1,29	54,8 ± 3,12	7,76 ± 0,23	34,0 ± 2,67	3,91 ± 0,08	49,3 ± 1,10
Glu	5,72 ± 0,03	70,0 ± 0,72	18,6 ± 1,13	48,5 ± 0,33	4,05 ± 0,21	22,4 ± 2,05	3,48 ± 0,12	17,6 ± 0,59
Pro	179 ± 12,4	817 ± 64,1	736 ± 8,84	1693 ± 80,9	56,7 ± 5,20	254 ± 16,3	7,04 ± 0,26	323 ± 23,4
Asn	5,09 ± 0,46	28,7 ± 1,95	11,8 ± 14,0	22,7 ± 2,89	3,65 ± 0,33	13,8 ± 1,49	2,42 ± 0,11	12,8 ± 1,07
Ser	8,27 ± 0,07	32,7 ± 2,24	16,9 ± 0,33	42,1 ± 2,80	4,84 ± 0,37	19,0 ± 0,19	5,38 ± 0,08	22,8 ± 0,36
Gln	0,52 ± 0,27	28,5 ± 1,18	5,64 ± 0,29	29,1 ± 0,58	2,74 ± 0,04	10,5 ± 0,84	2,10 ± 0,09	16,1 ± 0,50
His	20,0 ± 0,82	81,9 ± 61,74	19,5 ± 1,09	85,6 ± 6,40	10,9 ± 0,29	32,4 ± 0,83	11,6 ± 0,23	40,4 ± 1,65
Gly	5,65 ± 0,05	37,9 ± 2,24	15,2 ± 1,13	39,4 ± 1,07	5,22 ± 0,23	19,3 ± 1,04	4,48 ± 0,29	21,4 ± 0,77
Thr	5,55 ± 0,09	26,3 ± 1,57	10,2 ± 0,50	28,3 ± 1,91	5,15 ± 0,34	14,8 ± 2,25	4,34 ± 0,12	18,2 ± 1,51
Arg	15,5 ± 1,05	52,3 ± 12,9	28,8 ± 1,59	146 ± 7,68	7,10 ± 0,65	78,6 ± 2,62	8,56 ± 0,12	157 ± 4,04
Ala	10,4 ± 0,77	171 ± 17,7	23,8 ± 0,43	85,6 ± 4,76	5,55 ± 0,48	54,8 ± 0,36	6,99 ± 0,12	63,9 ± 0,16
GABA	1,55 ± 0,10	7,67 ± 0,52	2,47 ± 0,15	7,39 ± 0,39	1,61 ± 0,10	4,59 ± 0,03	1,00 ± 0,05	5,98 ± 0,07
Tyr	5,60 ± 0,03	35,6 ± 2,75	13,5 ± 0,34	40,2 ± 1,23	5,60 ± 0,34	19,6 ± 0,80	3,49 ± 0,01	26,3 ± 0,96
Val	4,65 ± 0,31	24,4 ± 0,56	9,26 ± 0,28	23,2 ± 0,88	2,81 ± 0,10	15,5 ± 1,92	2,38 ± 0,04	18,1 ± 0,36
Met	1,32 ± 0,03	10,0 ± 0,37	3,46 ± 0,22	7,03 ± 0,17	1,00 ± 0,05	3,03 ± 0,17	0,73 ± 0,05	4,09 ± 0,27
Cys	15,0 ± 1,02	129 ± 1,65	23,5 ± 1,56	129 ± 3,21	8,29 ± 0,54	73,4 ± 5,59	10,8 ± 0,89	70,4 ± 2,59
Ile	4,51 ± 0,15	25,7 ± 1,69	10,4 ± 0,06	33,3 ± 2,04	3,52 ± 0,08	19,1 ± 1,81	3,16 ± 0,51	18,7 ± 1,26
Try	1,34 ± 0,04	11,2 ± 0,86	1,85 ± 0,13	12,9 ± 0,01	0,88 ± 0,66	4,99 ± 0,11	0,72 ± 0,01	6,09 ± 0,05
Leu	9,46 ± 0,70	64,7 ± 4,34	19,7 ± 1,60	83,0 ± 6,96	6,95 ± 0,41	53,5 ± 4,94	5,94 ± 0,26	46,9 ± 0,88
Phe	7,49 ± 0,14	41,8 ± 2,0	11,9 ± 0,01	46,0 ± 2,30	5,08 ± 0,40	21,8 ± 4,01	3,25 ± 0,21	32,3 ± 0,28
Orn	2,73 ± 0,49	69,8 ± 8,32	7,23 ± 0,23	64,9 ± 2,40	1,95 ± 0,01	68,0 ± 2,69	1,95 ± 0,09	59,4 ± 1,85
Lys	21,0 ± 0,97	172 ± 12,6	10,5 ± 0,35	206 ± 12,0	11,9 ± 0,50	77,5 ± 4,85	9,86 ± 0,45	84,7 ± 6,61
TOTAL AA	339 ± 28,9	2479 ± 204	1015 ± 35,5	2928 ± 114	163 ± 11,6	915 ± 57,6	104 ± 4,19	1087 ± 53,4

Les acides aminés Pro, Lys, Arg, Cys et Ala sont présents dans la plupart de ces cépages. Empiriquement, certains acides aminés sont prédominants dans le vin, en particulier l' α -Ala, la Ser, l'Arg et la Pro, ainsi que le Glu. La Pro constitue la plus grande proportion des acides aminés totaux dans tous les cépages étudiés (Partie 1,III.2).

Par ailleurs, ces résultats sont cohérents avec le contenu en acides aminés d'autres cépages blancs. Par exemple, Kelly et al (2017) ont travaillé avec le cépage blanc Petit Manseng, un proche parent du GM (J. Robinson et al., 2012). Ils ont montré que l'Arg, l'Ala et l'His sont les acides aminés prédominants dans les vins de Petit Manseng. De plus, les vins de Chardonnay contiennent également la plupart de ces acides aminés (Chen et al., 2019). La Gly, le Glu, la Met, l'Iso et la Lys retrouvés dans les vins de l'étude ont également été retrouvés dans des vins issus de cépages blancs européens. Par exemple, Mirás-Avalos et al (2020) ont montré que les vins blancs de Galice étaient riches en Lys, Arg, Glu, Ala

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest et His. En outre, Soufleros et al (2003) ont étudié le profil en acides aminés de différents cépages blancs et ont montré que les acides aminés les plus abondants dans les vins de Roditis étaient l'Arg et la Lys. Plus spécifiquement, les acides aminés les plus abondants étaient l'Arg, la Lys et Glu pour le Muscat d'Alexandrie, l'Ala et la Thr pour le Muscat blanc, et l'Arg, l'Ala, le Glu et le Gaba pour le Chardonnay. En moyenne, pour les trois vendanges considérées, la concentration en acides aminés est de $1203 \pm 41,1$ mg.L⁻¹ pour les vins COL, $2100 \pm 45,5$ mg.L⁻¹ pour les vins GM, $465 \pm 38,6$ mg.L⁻¹ pour les vins LL et $458 \pm 39,5$ mg.L⁻¹ pour les vins MZ (**Tableau 13**). Ces vins présentent ainsi des concentrations en acides aminés plus élevées que les vins issus de cépages blancs rapportés dans la littérature. De plus, des écarts importants de concentration sont observés pour la majorité des acides aminés. Ces différences peuvent provenir du millésime, du cépage, et des différentes pratiques viticoles et œnologiques adoptées lors de la vinification. Ces facteurs ont été examinés plus en détail, en se basant sur les données issues de la composition en acides aminés des vins analysés dans la présente étude.

Tableau 13: Les données représentent la moyenne des différents échantillons provenant d'une variété de vigne \pm écart-type.

Les p-values pour les facteurs suivants sont indiquées : cépage, étape de prélèvement (fin de FA ou vin fini embouteillé), millésime et leurs interactions. Les différences significatives entre les variétés, selon le test HSD de Tukey pour un paramètre donné, sont indiquées par des lettres différentes.

Acides aminés	COL n= 25	GM n=9	LL n=20	MZ n=15	Cépages	Etape de prélèvement	Millésime	Cépage * Etape de prélèvement
	mg.L ⁻¹							
Asp	39,7 \pm 1,21 a	42,6 \pm 1,24 a	21,8 \pm 1,18 b	20,6 \pm 1,18 b	0,0022	0,23	0,15	0,04
Glu	28,2 \pm 1,20 a	29,6 \pm 1,22 a	12,7 \pm 1,17 b	9,16 \pm 1,17 b	<0,0001	0,09	0,08	0,34
Pro	521 \pm 1,29 b	1371 \pm 1,31 a	125 \pm 1,26 c	118 \pm 1,27 c	<0,0001	0,07	0,01	0,14
Asn	19,2 \pm 1,11 a	21,5 \pm 1,16 a	9,37 \pm 1,10 b	7,99 \pm 1,12 b	<0,0001	0,06	0,03	0,56
Ser	21,4 \pm 1,14 a	28,3 \pm 1,16 a	12,0 \pm 1,12 b	12,5 \pm 1,12 b	<0,0001	0,04	0,03	0,50
Gln	9,00 \pm 1,24 a	11,3 \pm 1,29 a	4,99 \pm 1,21 b	4,29 \pm 1,22 b	0,0015	0,04	0,26	0,05
His	43,4 \pm 3,48 a	54,7 \pm 4,84 a	24,9 \pm 3,20 b	28,6 \pm 3,78 b	<0,0001	0,07	0,07	0,88
Gly	23,8 \pm 1,22 a	32,2 \pm 1,18 a	12,0 \pm 1,19 b	11,9 \pm 1,15 b	<0,0001	0,25	0,04	0,30
Thr	16,6 \pm 1,14 b	22,4 \pm 1,16 a	11,3 \pm 1,12 c	11,5 \pm 1,12 c	0,0003	0,63	0,01	0,18
Arg	87,1 \pm 1,33 a	84,7 \pm 1,33 a	25,1 \pm 1,29 b	27,5 \pm 1,26 b	<0,0001	0,14	0,18	0,03
Ala	59,4 \pm 1,24 a	57,6 \pm 1,28 a	23,3 \pm 1,21 b	26,4 \pm 1,21 b	0,0002	0,08	0,05	0,09
GABA	4,84 \pm 1,13 a	4,62 \pm 1,15 a	3,06 \pm 1,12 b	2,62 \pm 1,12 b	<0,0001	0,13	0,06	0,03
Tyr	22,4 \pm 1,19 a	29,5 \pm 1,21 a	13,7 \pm 1,16 b	12,1 \pm 1,16 b	0,0012	0,16	0,02	0,04
Val	16,3 \pm 1,19 a	18,0 \pm 1,22 a	9,18 \pm 1,16 b	7,89 \pm 1,16 b	0,0007	0,09	0,03	0,52
Met	4,76 \pm 1,15 a	6,82 \pm 1,17 a	2,28 \pm 1,13 b	2,20 \pm 1,14 b	<0,0001	0,52	0,05	0,27

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

Acides aminés	COL n= 25	GM n=9	LL n=20	MZ n=15	Cépages	Etape de prélèvement	Millésime	Cépage * Etape de prélèvement
	mg.L ⁻¹							
Cys	70,5 ± 7,62 a	65,7± 8,79 a	40,1± 6,89 b	43,9± 7,00 b	0,0004	0,01	0,02	0,03
Ile	16,7 ± 1,75 a	20,0 ± 1,97 a	11,2 ± 1,58 b	11,8 ± 1,58 b	0,0003	0,02	0,01	0,22
Try	5,83 ± 1,22 a	7,22± 1,25 a	3,21± 1,18 b	2,80± 1,19 b	0,0008	0,02	0,03	0,16
Leu	42,6 ± 4,85 a	46,3± 5,69 a	30,0± 4,33 b	28,6± 4,48 b	0,0096	0,03	0,02	0,20
Phe	26,9 ± 2,79 a	26,6± 3,22 a	16,1± 2,51 b	16,3± 2,55 b	0,0004	0,04	0,06	0,05
Orn	27,3 ± 1,35 a	34,3 ± 1,40 a	6,64 ± 1,29 b	9,49 ± 1,30 b	0,0001	0,05	0,01	0,20
Lys	97,4 ± 1,24 a	85,6 ± 1,28 a	47,0 ± 1,21 b	41,0 ± 1,22 b	0,0016	0,19	0,02	0,15
Concentration moyenne TOTALE	1203 ± 41,1	2100 ± 45,5	465 ± 38,6	458± 39,5	0,001	0,13	0,06	0,230
Concentration moyenne TOTALE (sans Pro)	683 ± 39,8	729 ± 44,2	340 ± 37,4	339 ± 38,2	0,001	0,14	0,04	0,230

1.1. Effet du millésime

Treize acides aminés sont corrélés (p -value < 0,05) avec le millésime (**Tableau 13**) : Pro, Ser, Asn, Gly, Thr, Tyr, Val, Cys, Ile, Try, Leu, Orn, Lys. Pour la plupart des acides aminés, le millésime 2020 se distingue par des concentrations généralement plus élevées par rapport à 2016 et 2021 (**Tableau 14**).

Tableau 14: Concentration (mg.L⁻¹) en acides aminés libres dans les 69 vins étudiés en fonction du millésime

Millésimes	2016 n= 7	2020 n=8	2021 n=54	Année p-values
	mg.L ⁻¹			
Pro	209 ± 1,34 b	663 ± 1,36 a	237 ± 1,27 b	0,01
Asn	12,8 ± 1,16 a	18,1 ± 1,17 a	10,1 ± 1,06 b	0,03
Ser	16,0 ± 1,18 a	23,7 ± 1,17 a	13,8 ± 1,10 b	0,03
Gly	18,1 ± 1,33 ab	16,8 ± 1,17 a	11,0 ± 1,10 b	0,04
Thr	17,6 ± 1,18 a	22,4 ± 1,16 a	11,3 ± 1,12 b	0,01
Tyr	19,2 ± 1,25 ab	24,0 ± 1,23 a	13,0 ± 1,12 b	0,02
Val	11,4 ± 1,24 a	17,1 ± 1,24 a	9,62 ± 1,13 b	0,04
Cys	53,7 ± 10,9 a	70,7 ± 9,55 a	40,8 ± 3,87 b	0,02
Ile	14,7 ± 2,52 ab	19,0 ± 2,15 a	11,1 ± 0,86 b	0,01
Try	3,75 ± 1,29 ab	7,11 ± 1,27 a	3,22 ± 1,14 b	0,03
Leu	33,1 ± 6,62 a	48,8 ± 6,17 a	28,7 ± 2,87 b	0,02
Orn	8,25 ± 1,45 b	39,9 ± 1,44 a	11,5 ± 1,22 b	0,01
Lys	56,4 ± 1,32 ab	105 ± 1,31 a	42,8 ± 1,15 b	0,02
TOTAL concentration moyenne	67 ± 2,5	149 ± 2,6	26 ± 1,5	/

Cette année-là a été plus chaude avec des températures élevées et un stress hydrique significatif, entraînant une maturité précoce (Météofrance, 2020). Cela pourrait expliquer la richesse en acides aminés de ce millésime notamment avec les concentrations élevées en Pro et Orn (un intermédiaire dans la synthèse de l'arginine à partir de Glu). Il est également bien établi que le stress hydrique impacte le volume des baies affectant ainsi le rendement. Les raisins récoltés deviennent alors plus concentrés en sucre, pouvant entraîner des niveaux d'alcool potentiellement plus élevés dans les vins. En effet, les vins de la récolte 2020 ($12,9 \pm 0,3$ %, $n=8$) affichent des degrés alcooliques supérieurs à ceux des millésimes 2016 ($12,1 \pm 0,3$ %, $n=7$) et 2021 ($12 \pm 0,2$ %, $n=54$) (Chapitre 1, III). Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,008 > 0,05$). L'impact d'un éventuel stress hydrique n'est donc pas confirmé. Bien que la saison 2020 ait été plus sèche, les conditions spécifiques à l'échelle de la parcelle restent inconnues.

L'année 2021 ($26 \pm 1,5$ mg.L⁻¹, $n=54$) montre des quantités d'acides aminés plus faibles par rapport à 2020 ($67 \pm 2,5$ mg.L⁻¹, $n=7$). L'année 2021 a été particulièrement difficile pour les viticulteurs avec une série de perturbations environnementales, telles que des gelées printanières et des maladies, qui ont affecté de manière significative les composants des raisins (Météo France, 2021)

Un climat favorable influence grandement les concentrations d'acides aminés, notamment les niveaux de Pro. Cependant, les vins produits à partir de COL, théoriquement récoltés plus tôt et avec une maturité moindre, ont montré des niveaux importants de Pro, une caractéristique probable du cépage ou bien une conséquence des choix techniques des viticulteurs. Il serait également intéressant d'explorer davantage si chaque cépage peut être caractérisé par la présence d'un ou plusieurs acides aminés spécifiques. De plus, pour obtenir des données plus précises, les données relatives au raisin et à sa transformation devraient être suivies, notamment en ce qui concerne la gestion du vignoble et les opérations de vinification.

1.2. Effet du cépage

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

Pour tous les acides aminés identifiés, les vins issus des côtes de Gascogne (COL et GM) se distinguent plus nettement des autres cépages en raison de leur prédominance marquée de la plupart des acides aminés, tandis que les vins issus du Tarn (MZ et LL) contiennent des niveaux plus faibles d'acides aminés libres. Les concentrations moyennes de tous les acides aminés pour chaque cépage sont détaillées dans le **Tableau 13**. Parmi ces vins, la Pro est l'acide aminé prédominant, car les levures ne l'utilisent pas pendant la FA. Les concentrations en Pro varient selon les cépages : dans les vins de GM, la Pro représente près de 70 % du contenu total en acides aminés (**Figure 24**) tandis que dans les vins de COL, elle constitue environ 40 %, et dans les vins de LL et MZ, elle atteint 25 %.

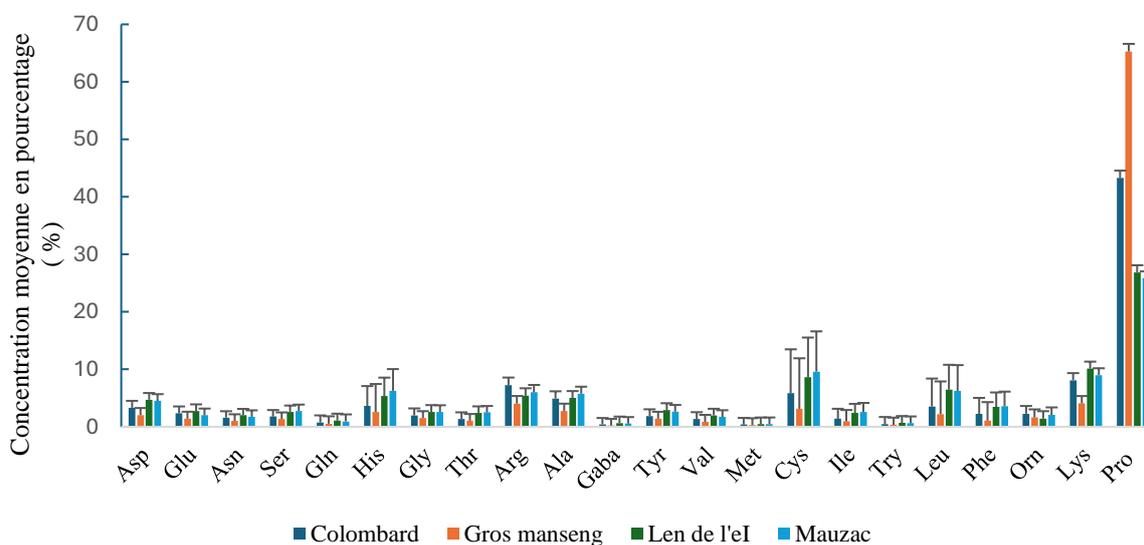


Figure 24: Pourcentage moyen de chaque acide aminé par rapport au total des acides aminés libres dans les vins COL, GM, MZ et LL.

Les barres indiquent les erreurs types. Abréviations : Asp (acide aspartique), Glu (acide glutamique), Lys (lysine), Arg (arginine), Asn (asparagine), Ala (alanine), His (histidine), GABA (acide aminobutyrique), Leu (leucine), Gly (glycine), Val (valine), Phe (phénylalanine), Thr (thréonine), Ser (sérine), Ile (isoleucine), Tyr (tyrosine), Met (méthionine), Try (tryptophane), Orn (ornithine), Gln (glutamine), Cys (cystéine), Pro (proline).

Cet acide aminé est très caractéristique de la maturité des raisins : la concentration en Pro peut augmenter d'un facteur de 25 à 30 au cours de la maturation en raison de la transformation de l'Arg (Stines et al., 2000). De plus, la Pro est très caractéristique de certains cépages en raison de facteurs génétiques qui sont plus déterminants que les facteurs environnementaux (Stines et al., 2000). En effet, les concentrations en Arg et en Pro varient d'un facteur de 10 à 15 selon le cépage (de 300 à 4600 mg.L⁻¹ pour la Pro). Le ratio Pro/Arg reste relativement constant d'un millésime à l'autre au sein d'un même

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest cépage. Ce qui pourrait traduire un effet plus marqué du cépage et/ou des itinéraires techniques que du millésime. Au-delà d'une proportion plus élevée, les vins de COL et de MZ se distinguent par des concentrations élevées en Pro. Comme évoqué précédemment, ces vins sont très recherchés pour leurs arômes thiolés. Pour optimiser les concentrations en thiols, en plus des opérations de pulvérisation d'azote foliaire décrite précédemment, les vinificateurs ajoutent de l'azote aux moûts (sous forme organique ou minérale) impactant significativement les concentrations en acides aminés, en particulier la Pro (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017). La Pro peut ainsi être considérée comme une caractéristique spécifique à ces cépages, dans les bassins de production de cette étude. Au contraire, les vins du Tarn ne se distinguent pas par des concentrations significatives en Pro.

De plus, d'autres acides aminés sont présents de manière prédominante dans les quatre cépages de vin : Lys, Arg, Cys, Ala, et His. L'acide aminé présent après la Pro est la Lys. Cet acide aminé est généralement retrouvé dans les vins. La plupart de la teneur en Lys peut résulter du métabolisme des levures (McKinnon, 2013), mais elle n'est pas préférée comme source d'azote par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Mandl et al., 2017). L'Arg est un autre acide aminé principal, avec des concentrations plus élevées dans les vins COL et GM par rapport aux vins LL et MZ. Les différences dans le contenu en Arg entre les vins sont probablement dues aux niveaux d'Arg présents dans les baies de raisin et les moûts résultants, influencés par la fertilisation azotée (Soufleros et al., 2003) ainsi que par la maturité des raisins (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Pendant la maturation des raisins, cette Arg est plus souvent stockée dans la pellicule du raisin (Stines et al., 2000). Ainsi, il est probable que les raisins de COL présentent ces concentrations plus élevées en Arg car ils subissent souvent une phase de macération pré fermentaire à froid à l'issue du pressurage, dans le but d'augmenter les précurseurs de thiols dans les moûts.

La concentration en Cys, quant à elle, donne un aperçu de la synthèse des composés volatils. Les vins des Côtes de Gascogne sont particulièrement recherchés pour leurs arômes de thiols, ce qui explique les niveaux plus faibles de cet acide aminé dans ces vins. L'Ala est également très présente dans les vins du Sud-Ouest. C'est l'une des principales sources d'azote pour les levures. Elle résulte généralement de

l'acide pyruvique, soit après la décarboxylation de l'acide aspartique, soit par des réactions de transamination.

Les quatre cépages de vins issus de raisins autochtones du Sud-Ouest peuvent être distingués en fonction de leurs teneurs en acides aminés (**Figure 25**). La variable Pro permet de classer les quatre variétés en trois groupes distincts. Les vins GM présentent des niveaux de Pro plus élevés par rapport aux vins COL et aux variétés typiques du Tarn, LL et MZ. Cela peut être attribué soit aux caractéristiques inhérentes de la variété de raisin elle-même, soit aux effets des traitements foliaires et plus généralement de l'itinéraire technique. Les vins du Tarn, avec des concentrations plus faibles de Pro, sont différenciés en fonction de leur teneur en Glu. Les vins de LL semblent être plus riches en Glu par rapport aux vins de MZ. Selon le cépage, les concentrations en acide glutamique peuvent augmenter pendant la maturation des raisins (Kliwer, 1969) : ainsi, une maturité plus poussée des LL lors de la vendange, potentiellement liée aux objectifs de production des vinificateurs, pourrait expliquer la teneur plus élevée en acide glutamique retrouvée dans les vins par rapport à ceux de COL. Les vins produits à partir de quatre variétés typiques du sud-ouest semblent se distinguer selon leurs profils d'acides aminés, en particulier pour la proline et l'acide glutamique.

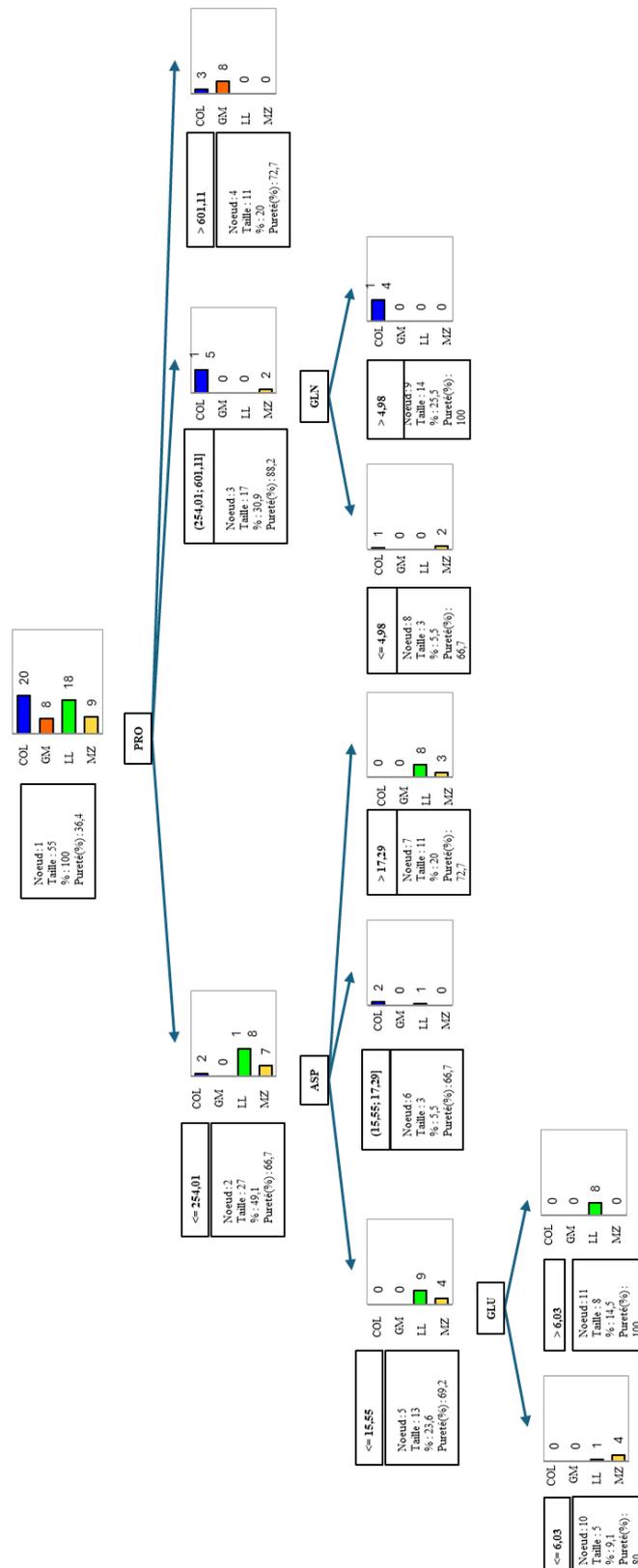


Figure 25: Arbre de classification et de régression réalisé avec tous les acides aminés mesurés dans les vins

COL : Colombar, GM : Gros Manseng, MZ : Mauzac, LL : Len de l'EI, Pro : proline, Gln : glutamine, Asp : acide aspartique, Glu : acide glutamique

III. Conclusion

Les acides aminés présents dans les vins de différentes régions viticoles présentent des distinctions principalement basées sur deux acides aminés : la Pro et le Glu. Ces acides aminés sont connus pour leurs rôles dans la perception du goût des vins (Delompré et al., 2019). La Pro (L-pro) a été identifiée comme apportant une saveur sucrée et influençant les propriétés sensorielles des vins rouges en réduisant l'astringence et l'amertume tout en augmentant la sucrosité et la viscosité (Espinase Nandorfy et al., 2022). De plus, la présence de L-Glu affecte la perception de l'umami dans les vins rouges (Espinase Nandorfy et al., 2022). Cependant, d'autres études (Franceschi et al., 2023) ont démontré que le Glu influence le profil sensoriel des vins italiens mais n'affecte pas le goût umami. Néanmoins, le Glu est essentiel pour améliorer d'autres perceptions gustatives, telles que la salinité et l'intensité des saveurs, ainsi que les perceptions olfactives, en augmentant l'intensité et la persistance des arômes.

La Pro est présente en forte concentration dans les vins du Sud-Ouest. De plus, il n'y a pas de consensus quant au rôle du Glu dans les vins blancs. Ainsi, ces deux acides aminés ont fait l'objet d'une étude sensorielle préliminaire pour évaluer leur impact sur les perceptions gustatives des vins blancs de l'étude.

CHAPITRE 3 : IMPACT DE LA PROLINE ET DE L'ACIDE GLUTAMIQUE SUR LES PERCEPTIONS GUSTATIVES DES VINS BLANCS DU SUD-OUEST

Dans ce chapitre, le rôle de deux acides aminés sur les perceptions gustatives des vins blancs a été étudiés : la Pro et le Glu. Pour cela, un test sensoriel (test triangulaire) a été réalisé à l'aide d'un panel amateur formé à l'école d'ingénieur de PURPAN.

I. État des connaissances de l'impact de la proline et l'acide glutamique sur les perceptions gustatives des vins

Les acides aminés présents dans les vins sont principalement associés au métabolisme des levures, notamment en tant que précurseurs de composés aromatiques volatils produits par celles-ci. Toutefois, leurs propriétés gustatives dans les vins ont été peu explorées à ce jour. Dans le domaine de la nutrition, plusieurs acides aminés ont été identifiés comme ayant une influence sur la saveur (Partie 1, III.1.4), tels que la L-Pro, qui confère une saveur sucrée, et le Glu, qui contribue à la saveur umami (Delompré et al., 2019).

De nombreuses études (Espinase Nandorfy et al., 2022; Skogerson et al., 2009) ont exploré l'impact de la Pro sur les perceptions gustatives des vins. Comme elle n'est pas consommée par les levures, elle est présente en grande quantité dans les vins, avec des concentrations qui diffèrent selon les cépages. En effet, sa concentration est très fortement influencée par les traitements azotés à la vigne. Sa saveur sucrée et sa variation d'un cépage à l'autre ont conduit plusieurs chercheurs à s'interroger sur son rôle dans la perception sensorielle des vins blancs. Par exemple, Skogerson et al (2009) ont rapporté que la Pro, était positivement associée à une augmentation du 'corps' et de la 'viscosité' des vins blancs. De plus, Espinase Nandorfy et al (2022) ont montré qu'elle avait un impact positif sur la douceur et la viscosité des vins.

Concernant Glu, présent essentiellement dans la pellicule du raisin et dans le vin, est souvent attribué à la saveur umami. On peut également le retrouver dans le fromage tels que le parmesan, dans le thé vert, dans certains poissons et crustacés tels que les sardines et les huîtres et bien d'autres encore (Teranishi

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest et al., 1989). Il peut également être utilisé comme exhausteur de goût (Roudot-Algaron, 1996). Sa concentration dans le vin peut varier selon les techniques de vinification employées, le type de vin produit et les micro-organismes participant aux fermentations alcoolique et malolactique (Klosse, 2013). Dans les vins, cette concentration dépasse souvent les seuils de détection établis dans l'eau (Delompré et al., 2019). C'est pourquoi certains chercheurs se sont intéressés à la contribution de cet acide aminé dans les vins. Par exemple, Franceschi et al (2023) ont étudié l'impact de Glu sur le profil sensoriels des vins italiens. Les résultats montrent qu'il n'existe pas de relation claire entre le goût umami et la concentration en Glu dans les vins. Cependant, leur présence joue un rôle fondamental en renforçant d'autres perceptions gustatives et olfactives, les rendant encore plus persistantes.

Étant donné le rôle de ces deux acides aminés sur les perceptions gustatives et olfactives des vins, et considérant que nos vins du Sud-Ouest se distinguent par leur contenu en ces deux acides aminés, une étude a été réalisée pour évaluer leur impact sur les vins de cette région.

II. Etude de l'impact de la proline et de l'acide glutamique sur les perceptions gustatives des vins de l'étude

Pour évaluer l'effet de la Pro et de Glu sur le goût du vin, il est demandé au panel de dégustateurs de réaliser un test triangulaire avec les modalités de chaque série. Les échantillons leur sont présentés selon les normes ISO (ISO,2021). Les résultats sont synthétisés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15: Résultats des tests triangulaires en fonction des deux modalités Glu et Pro (n=30).

Modalité	Effet de l'acide Glu	Effet de la Pro
Série	1	2
Nombre de bonne réponse/30 juges	14	15
Significativité alpha	5%	5%
p-value	0,09	0,043

Pour la série 1, les données sensorielles des 30 juges (p-value =0,09) indiquent que les résultats ne sont pas significatifs, ce qui signifie que les juges n'ont pas perçu de différence de goût entre le vin COL et le vin COL+Glu. Cependant, le panel utilisé dans le cadre de cette étude était dans sa majorité non entraîné. Il serait intéressant de refaire ce test avec un panel entraîné.

Troisième partie : Contribution des acides aminés aux profils sensoriels des vins blancs du Sud-Ouest

Par ailleurs, afin de mettre en évidence la nature de la différence perçue, il a été demandé au panel de noter un descripteur propre à chacun : en analysant les descripteurs fournis par les panélistes ayant différencié les échantillons (n=14), on constate que, dans la plupart des cas, ils ont convergé vers un même descripteur (**Tableau 16**).

Tableau 16: Tableau synthétique du test sensoriel (test triangulaire) étudiant l'impact de Glu sur les perceptions gustatives d'un vin blanc issu du cépage COL

Seuls les descripteurs énumérés par les 14 juges ayant discriminé les échantillons ont été résumés dans ce tableau

Vin COL		Vin COL + Glu	
Descripteurs énumérés	Occurrence	Descripteurs énumérés	Occurrence
Pétillant	3	Amertume	1
Acide	9	Faible acidité	2
Faible amertume	1	Moins pétillant	1

Dans la plupart des cas, les juges ont majoritairement distingué les échantillons en fonction de leur acidité. Le vin de base a été perçu comme acide, et ce descripteur n'est pas retrouvé dans le vin complétement en acide glutamique, caractérisé par une moindre perception de l'acidité. De plus, la présence d'acide glutamique a tendance à renforcer l'amertume pour deux panélistes. Bien que la différence perçue entre ces deux aspects ne soit pas significative, les descripteurs observés suggèrent que l'acide glutamique joue un rôle dans l'équilibre des vins en atténuant l'acidité.

En ce qui concerne la série 2 (Pro), les données sensorielles des 30 juges ($p = 0,043$) montrent que les résultats sont significatifs, ce qui montre que les juges ont perçu une différence de goût entre les deux modalités : MZ et MZ+Pro. De plus, les descripteurs énumérés par chacun des juges afin de discriminer les échantillons ont été répertoriés dans le **Tableau 17**.

Tableau 17: Tableau synthétique du test sensoriel (test triangulaire) étudiant l'impact de la Pro sur les perceptions gustatives d'un vin de MZ.

Seuls les descripteurs énumérés par les 15 juges ayant discriminé les échantillons ont été résumés dans ce tableau

Vin MZ		Vin MZ + Pro	
Descripteurs énumérés	Occurrence	Descripteurs énumérés	Occurrence
Plus astringent	2	Plus sucré	7
Moins sucré	1	Moins astringent	3
Forte amertume	2		

Parmi les 30 juges ayant participé au test sensoriel, la majorité a différencié les échantillons lorsque celui qui se distinguait était le vin initial enrichi en Pro. Les juges ayant perçu une différence gustative (n=15) ont principalement décrit l'échantillon enrichi en proline comme étant plus sucré, tandis que le vin initial était perçu comme plus astringent, moins sucré, et avec une amertume marquée. Ces résultats concordent avec les études existantes sur l'impact de la proline sur les perceptions gustatives du vin. En effet, Espinase Nandorfy et al. (2022) ont montré que la présence de proline augmentait la douceur et la viscosité. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que la Pro a été identifiée comme ayant une saveur sucrée. Ils constituent une première observation sur l'impact de la proline sur les perceptions sensorielles du vin.

CONCLUSION

Cette partie de l'étude avait pour vocation d'étudier les spécificités de vins monovariétaux au regard de leur composition en acides aminés, d'où le grand nombre d'échantillons étudiés. Ainsi, des hypothèses ont été avancées pour expliquer les résultats obtenus. Le cépage semble se distinguer comme étant le principal facteur permettant de distinguer les quatre cépages. Cependant, le suivi des opérations au vignoble et de l'itinéraire de vinification sera nécessaire pour aller plus loin dans l'analyse.

L'analyse HPLC a permis de distinguer les cépages COL, GM, MZ et LL grâce à deux acides aminés clés : la Pro et le Glu, reconnus pour leurs effets sur la perception gustative des vins (Delompré et al., 2019a). Une analyse triangulaire a montré que la Pro augmentait la sucrosité des vins, ce qui concorde avec les résultats de la littérature (Espinase Nandorfy et al., 2022). En revanche, l'effet du Glu sur la perception gustative n'a pas été significatif.

Le rôle de la Pro sur les saveurs des vins de MZ a été clairement établi. Cet acide aminé, qui n'est pas consommé par les levures, est abondant dans les vins et ses concentrations sont fortement influencées par le cépage ainsi que par les pratiques viticoles, telles que la fertilisation azotée. Cette saveur sucrée pourrait donc être recherchée par les vignerons et ajustée en modifiant certains paramètres, notamment les choix réalisés au vignoble et la nature de l'azote apporté sur le moût avant FA.

Quatrième partie

Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Contrairement aux acides aminés, les macromolécules telles que les polyphénols et les polysaccharides ont déjà fait l'objet d'études pour leurs contributions aux caractéristiques gustatives des vins notamment dans les vins rouges, ainsi que dans les bières. Afin de pouvoir identifier et étudier ces macromolécules, une nouvelle approche analytique a été utilisée dans les vins : l'AF4. Cependant, peu d'études reposant sur cette technique se sont concentrées sur les vins blancs notamment sur ceux du Sud-Ouest. De plus, la majorité des méthodes sensorielles étudiant l'impact des macromolécules ne se basent pas uniquement sur le goût.

Les cépages du Sud-Ouest possèdent chacun une identité gustative unique. L'influence des macromolécules présentes dans les vins sur les perceptions gustatives et tactiles des vins blancs sera donc examinée.

Pour répondre à cette question de recherche, plusieurs objectifs sont établis.

- Dans un premier temps, il s'agit de discriminer les vins issus des quatre cépages en fonction de leur profil gustatif à l'aide d'un test sensoriel descriptif : le Profil Flash (PF)
- Puis, l'AF4 est mise en œuvre pour discriminer selon leur profil macromoléculaire, les vins sélectionnés pour leurs propriétés gustatives suite à l'analyse sensorielle. Les fractions d'intérêt sont collectées puis analysées à l'aide d'un test de SDS-page.
- Enfin, une méthode d'ultrafiltration est mise en place pour pouvoir déguster les fractions obtenues en conditions 'food grade'.

I. État des connaissances de l'utilisation de l'AF4 sur le profil macromoléculaire des vins blancs

De nombreux vignobles de renommée mondiale en France utilisent des cépages typiques et des méthodes de vinification propres à leur région, ce qui permet de développer une sensation gustative en bouche et un profil aromatique caractéristiques, garants de la qualité du vin. Dans des régions moins connues, comme le Sud-Ouest de la France, une grande diversité de cépages indigènes est également utilisée tels que COL, GM, LL et MZ, contribuant à la singularité des vins locaux. Au-delà de leurs caractéristiques aromatiques, ces cépages présentent de nombreuses qualités gustatives : les vins COL et GM sont réputés pour leur forte acidité, tandis que les vins LL et MZ sont moins acides (Frankel, 2013; J. Robinson et al., 2012). Cependant, les caractéristiques gustatives de ces vins n'ont pas encore été étudiées en détail.

Plusieurs méthodes permettent d'analyser les propriétés sensorielles des vins : les méthodes descriptives (PF, test QDA), les tests discriminants (test triangulaire), et bien d'autres. Dans notre étude, la méthode du PF est la plus appropriée pour caractériser le vin en fonction de ses différentes dimensions sensorielles.

Comme vu dans la section précédente (Partie1,IV.2), il a été empiriquement démontré que la présence de diverses macromolécules tels que les polyphénols et les polysaccharides affecte la saveur du vin. La composition macromoléculaire des vins a été principalement étudiée et caractérisée par des techniques analytiques conventionnelles. Récemment, plusieurs projets ont promu une méthode non conventionnelle, l'AF4 pour séparer et caractériser les macromolécules dans la bière (Choi et al., 2017; Tügel et al., 2015) et les vins rouges (Marassi et al., 2021; Osorio-Macías et al., 2020; Pascotto et al., 2020, 2021; Vernhet et al., 2011). Le principal avantage de cette méthode est l'absence de phase stationnaire et la possibilité d'effectuer la séparation sous des conditions de basse pression qui permettent de séparer sans dégrader les complexes ou les co-agrégats (Runyon et al., 2014). L'AF4 peut être intégrée en ligne avec divers détecteurs (UV/Vis, FLD, MALS et dRI) pour fournir simultanément une analyse macromoléculaire et une caractérisation de la taille des macromolécules.

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

Cette approche offre des informations précieuses sur la composition des échantillons, leur stabilité et les phénomènes liés à l'agrégation et à la désagrégation (Marassi et al., 2015; Reschiglian et al., 2014).

À ce jour, peu d'études (Coelho et al., 2017; Tügel et al., 2015) ont utilisé l'AF4 pour étudier les macromolécules dans les vins blancs. Coelho et al. (2017) comparent la SEC et l'AF4 pour examiner la composition colloïdale du vin blanc Chardonnay et déterminer comment l'étape de pressurage et la fermentation affectent sa structure macromoléculaire. Les résultats indiquent que l'AF4 est plus fiable et moins perturbante pour l'environnement chimique natif des macromolécules chromophoriques du vin. Par conséquent, l'AF4 est recommandée pour séparer les substances colloïdales chromophoriques dans les vins blancs. Dans d'autres travaux, l'AF4 couplée à la détection UV, MALS et dRI est utilisée pour déterminer l'efficacité de la clarification des vins après traitement par sept agents de collage courants (Osorio-Macías et al., 2022). L'AF4 a permis de fournir de nouvelles informations sur le rôle du processus de clarification du vin, en particulier concernant les changements dans la concentration des fractions colloïdales et macromoléculaires. Ces résultats ont ensuite été comparés aux évaluations de qualité industrielle standard, telles que la turbidité, la stabilité, la couleur, la concentration en protéines, la teneur en métaux, l'absorptivité et la teneur en composés phénoliques. Il a été montré que le traitement à la bentonite élimine efficacement les colloïdes et macromolécules, mais peuvent altérer le vin, tandis que les clarificateurs végétaux préservent mieux ses caractéristiques. Les polymères synthétiques, bien que moins efficaces, agissent principalement sur un type particulier de macromolécules, les phénols colloïdaux. Les résultats obtenus dans ces études démontrent que l'AF4 est une technique analytique puissante avec un potentiel significatif pour l'industrie du vin.

Dans ce chapitre, la méthode AF4 est utilisée sur des vins blancs monovariétaux élaborés à partir de cépages autochtones du Sud-Ouest. Les propriétés gustatives de ces vins ont d'abord été analysées par un panel entraîné par la méthode du PF. L'utilisation de l'AF4 a pour objectif de comprendre les différences de sensations en bouche perçues par les dégustateurs. Pour ce faire, l'instrumentation AF4 a été équipée d'un système de multi détection pour identifier le profil macromoléculaire des différentes espèces. Les fractions AF4 collectées ont ensuite été analysées plus en détail afin d'en élucider la composition. Pour évaluer l'influence des composés présents dans les différentes fractions, une UF a été

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

effectuée avec plusieurs seuils de coupure correspondant aux masses molaires des principales macromolécules présentes dans les vins : protéines (30 kDa), polyphénols (50 kDa) et polysaccharides (>100 kDa). En effet, cette technique a été utilisée au préalable dans le domaine du vin mais pour des finalités différentes. Par exemple, Hsu et al (1987) ont utilisé ce système afin d'isoler et caractériser les protéines instables de vins issus de cépage Riesling et Gewürztraminer. L'étude montre que l'ultrafiltration avec des seuils de coupures de 10 et 30 kDa est efficace pour retenir la majorité des protéines dans le vin, réduisant ainsi la nécessité d'utiliser de la bentonite pour la stabilisation. Cependant, les jus de raisin semblent plus difficiles à stabiliser que les vins. Également, Flores et al (1990) ont utilisé ce système pour étudier la composition et la stabilité des vins. Dans notre étude, cette technique a été employée pour compenser l'impossibilité de réaliser des dégustations après séparation par AF4 (AF4 pas en condition « food-grade »).

II. Sélection d'échantillons basée sur le goût : Analyse sensorielle par Profil Flash

Lors de la première session de PF, les évaluateurs ont généré cinq descripteurs pour caractériser les 12 échantillons de vin. Tous les juges ont proposé des descripteurs similaires, qu'ils ont synthétisés comme étant l'acidité, la sucrosité, l'amertume, la viscosité et la salinité.

Les résultats de la deuxième session de PF ont été soumis à une GPA pour évaluer les différents vins en utilisant les cinq descripteurs choisis lors de la première session sensorielle. Une analyse en composantes principales (**Figure 26.a**) explique 78,72 % de la variation des échantillons. L'axe PC1 décrit 55,8 % de la variation et est caractérisé par trois descripteurs : viscosité, salinité et sucrosité. Les descripteurs amertume et acidité sont mieux décrits sur l'axe PC2, avec une corrélation de 23,54 %. Un vin produit à partir du cépage GM s'est distingué des autres vins par sa sucrosité prononcée, attribuée à sa teneur élevée en sucre résiduel (sucre résiduel = 27 g.L⁻¹). Cette teneur élevée en sucre résulte d'une FA incomplète, ce qui va dans le sens de son TAV relativement faible (TAV = 10%) (Ribéreau-Gayon, Dubourdiou, et al., 2020). En excluant cet échantillon de l'analyse, les divers vins produits à partir de cépages d'une même région étaient relativement similaires en termes de PCA, mais clairement différenciés sur la base de leurs caractéristiques gustatives. Les cépages COL et GM (de la région du

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

Gers) sont à l'origine de vins décrits davantage en termes d'acidité, tandis que l'amertume décrit davantage les vins issus des cépages LL et MZ (de la région du Tarn). Ces caractéristiques gustatives, fournies par le panel entraîné, sont cohérentes avec les données de la littérature. Par exemple, les cépages COL et GM sont connus pour produire des vins acides (J. Robinson et al., 2012). A l'inverse, les vins de MZ sont décrits comme étant moins acides et plus sucrants (Casamayor, 2006). Des recherches supplémentaires sont nécessaires sur ces cépages, et plus particulièrement le LL. Par ailleurs, aucune donnée sensorielle précise n'a reporté l'amertume des vins de MZ et LL.

Pour éliminer le biais dû à l'échantillon sucré de GM, celui-ci a été exclu de la GPA (**Figure 26.b**). Les vins restent classés par leur région de production et caractérisés par les mêmes descripteurs.

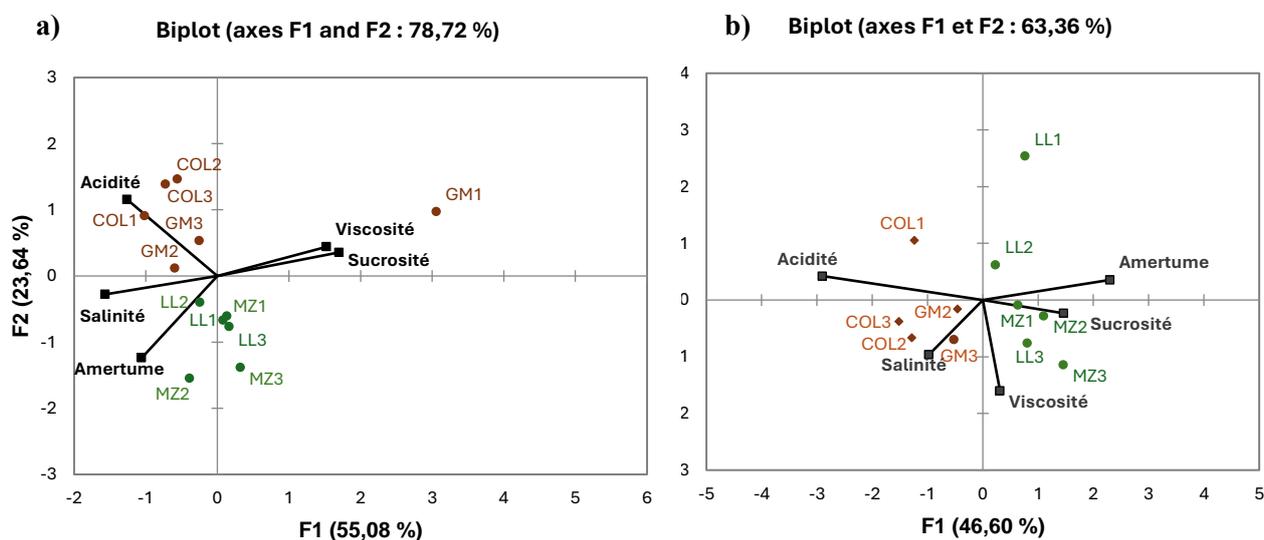


Figure 26: Analyse Procrustéenne Généralisée (GPA) pour évaluer a) 12 vins de COL, GM, LL et MZ selon cinq descripteurs (acidité, salinité, amertume, sucrosité et viscosité) sélectionnés lors de la première session de la FP ; b) 11 vins après l'exclusion de l'échantillon GM

Ainsi les caractéristiques gustatives de vins blancs du Gers et du Tarn ont pu être distingués par la méthode du PF. Dans une étude portant sur les vins rouges, les différences gustatives ont été attribués à la composition macromoléculaire des vins (Pascotto et al., 2021). Afin de confirmer cet impact des macromolécules sur le profil gustatif des vins blancs, les profils macromoléculaires de deux vins (COL et MZ) distinctement appréciés par le panel sensoriel entraîné, ont été analysés à l'aide de l'AF4.

III. Étude macromoléculaire des vins par AF4 : COL et MZ

Les deux vins COL 1 et MZ 2 ont été sélectionnés pour leurs caractéristiques gustatives (résultats PF, chapitre 7, II) et analysés à l'aide de l'AF4, UV, MALS et dRI. Les profils macromoléculaires des deux vins étudiés sont illustrés dans les fractogrammes (Figure 27). Quatre fractions macromoléculaires ont été identifiées dans ces deux vins.

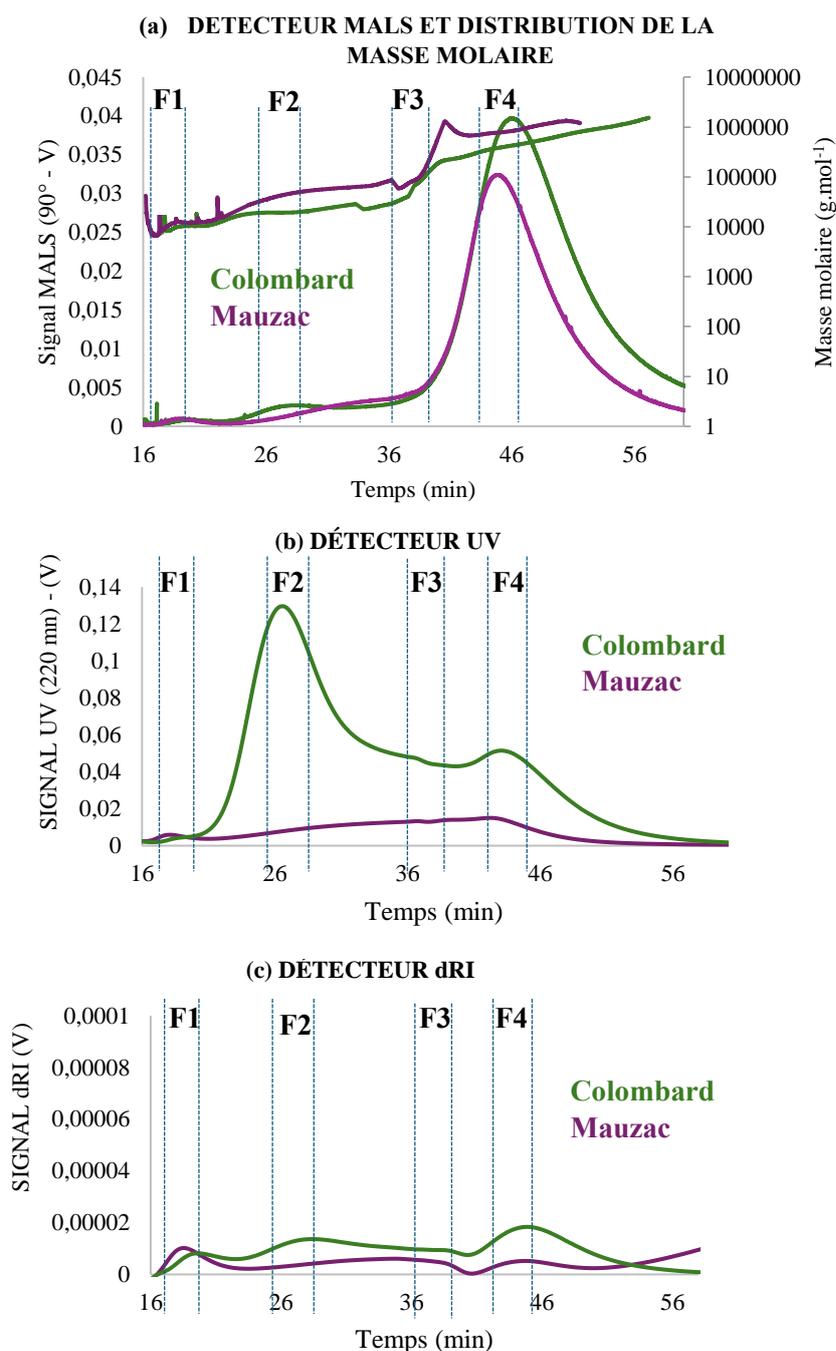


Figure 27: Fractogrammes AF4 : (a) distribution des masses molaires avec détecteur MALS, (b) détecteur UV et (c) détecteur dRI, pour les vins COL et MZ (F1, F2, F3 et F4 correspondant aux différentes fractions collectées dans l'AF4).

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

La première fraction (F1), observée à un temps de rétention compris entre 17 et 20 minutes pour les cépages COL et MZ, se distingue par une faible absorption en UV et un signal MALS très faible (**Figure 27**), suggérant la présence de petites particules, probablement des protéines. Par ailleurs, la masse molaire calculée à partir du réfractomètre de ces composés ($dn/dc_{(protéines)} = 0,185 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), comprise entre 9 et 15 kDa (**Figure 27.a**) vient renforcer cette hypothèse. En effet, de nombreuses protéines avec des masses molaires variant de 9 à 65 kDa ont déjà été identifiées dans les vins (Curioni et al., 2008; Ferreira et al., 2001). Bien que les protéines absorbent dans l'UV, le signal UV observé est plus faible que celui obtenu à une même longueur d'onde dans d'autres études (Reinmuth-Selzle et al., 2022). Cette différence pourrait s'expliquer par la faible concentration de molécules dans les cépages COL et MZ (détecteur dRI)(**Figure 27.c**). En effet, le signal dRI, qui fournit des informations sur la concentration des analytes, est très faible. Cela suggère une faible quantité de ces macromolécules dans la fraction F1.

La deuxième fraction (F2), avec un temps de rétention compris entre 25 et 32 minutes, présente des différences notables entre les deux cépages. Le COL montre une absorption significative dans l'UV, contrairement au MZ, qui n'en présente aucune (**Figure 27.b**). Les différences de signaux UV observées entre les deux cépages pourraient être dues à des variations dans leurs compositions macromoléculaires. En effet, les signaux MALS varient également, comme le montrent les distributions massiques : la masse molaire moyenne (M_w) calculée à partir du réfractomètre de F2 ($dn/dc_{(protéines)} = 0,185 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) du MZ était d'environ $36,9 \pm 5,2 \text{ kDa}$, tandis que celle du COL était de $17,8 \pm 2,4 \text{ kDa}$ (**Figure 27.a**). Cela suggère que la deuxième fraction du COL, tout comme la première, pourrait être principalement constituée de protéines de types chitinases et TLP, dont les masses moléculaires se situent entre 20 et 30 kDa (Curioni et al., 2008; Ferreira et al., 2001).

Concernant la deuxième fraction du MZ, elle ne présente pas d'absorption dans l'UV, et sa masse molaire moyenne calculée à partir du réfractomètre est supérieure à celle des protéines habituellement présentes dans les vins. Cependant, certains vins contiennent des polysaccharides fortement mannosylés (Curioni et al., 2008), composés de 10 à 20% de protéines, le reste étant constitué de D-mannose, avec des résidus de D-glucose et de N-acétylglucosamine (Rodrigues et al., 2012). La masse molaire de ces

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

polysaccharides varie entre 5 et 500 kDa (Cosme et al., 2020; Vidal, Williams, et al., 2003). Ainsi, la deuxième fraction du MZ pourrait être composée de mannoprotéines, dont la forte teneur en sucres expliquerait la faible absorption dans l'UV.

La troisième fraction (F3), observée à un temps de rétention compris entre 37 et 39 minutes pour les vins COL et MZ, montre une absorption UV plus forte pour le vin COL que pour le vin MZ (**Figure 27.b**), bien que ce dernier présente un signal MALS plus intense (**Figure 27.a**). Cette forte absorption UV pour le COL suggérerait encore la présence de protéines. En effet, la masse molaire calculée à partir du réfractomètre de F3 du vin COL ($dn/dc_{(protéines)} = 0,185 \text{ mL.g}^{-1}$) est de $26,4 \pm 2,2 \text{ kDa}$ (**Figure 27.a**), masse molaire des protéines majoritairement retrouvée dans les vins. De plus, la diminution de l'intensité UV pour la fraction F2 pourrait indiquer la présence de macromolécules, telles que les polyphénols, qui absorbent moins en UV. En ce qui concerne le MZ, la même hypothèse que pour la fraction F2 peut être émise, la fraction F3 étant quant-à-elle supposée être majoritairement composée de mannoprotéines. De plus, la masse molaire calculée à partir du réfractomètre de F3 du vin MZ ($dn/dc_{(mannoprotéines)} = 0,146 \text{ mL.g}^{-1}$) est de $52,9 \pm 2,5 \text{ kDa}$. Également, cette dernière pourrait être composée de polyphénols dans une moindre mesure. Ainsi, la troisième fraction du vin COL serait principalement constituée de protéines, et potentiellement de polyphénols, tandis que celle du vin MZ pourrait être majoritairement composée de mannoprotéines et également d'une part de polyphénols, même si dans les vins blancs ces derniers sont minoritaires.

La dernière fraction (F4) a généré un signal MALS intense, indiquant la présence de molécules de haute masse molaire avec une faible absorption dans l'UV (**Figure 27**). Le signal MALS du vin COL est plus élevé que le signal MALS du vin MZ, avec des masses molaires moyennes respectives calculées à partir du réfractomètre ($dn/dc_{(polysaccharides)} = 0,165 \text{ mL.g}^{-1}$) de $266,8 \pm 1,7 \text{ kDa}$ et $707,8 \pm 2,0 \text{ kDa}$ (**Figure 27.a**). Ces valeurs correspondent à la gamme de masses molaires des polysaccharides (RG-I et II), ainsi que des AGP (Jones-Moore et al., 2021) présents dans les vins, qui s'étendent de 5 à 800 kDa (Jones-Moore et al., 2022). Cela suggère que les vins COL et MZ pourraient en partie contenir des polysaccharides. Cependant, les macromolécules des vins COL absorbent dans l'UV. Étant donné leur

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

grande taille, les polysaccharides n'absorbent généralement pas dans l'UV. Toutefois, dans les vins, ces polysaccharides peuvent interagir avec les protéines et les tanins endogènes pour former des espèces colloïdales (Marassi et al., 2021), qui pourraient expliquer cette absorption dans l'UV. De plus, en raison de leur grande taille, les macromolécules présentes dans la F4 peuvent induire un phénomène de diffusion dans l'UV. Du fait de la complexité des interactions dans le vin, il est difficile d'aller plus loin dans la caractérisation de cette fraction (Pascotto et al., 2020).

Les études AF4 mettent en évidence des profils macromoléculaires distincts pour les cépages COL et MZ, ce qui est particulièrement intéressant, car au sein d'un même cépage, les profils AF4 sont identiques (Annexe 1A et B).

Pour étayer nos hypothèses concernant la composition précise de ces fractions distinctes, nous avons appliqué une analyse SDS-PAGE.

IV. Caractérisation chimique des vins COL et MZ par SDS-PAGE

La composition protéique des quatre fractions AF4 pour les vins COL et MZ a été analysée par SDS-PAGE colorée à l'argent (**Figure 28**).

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

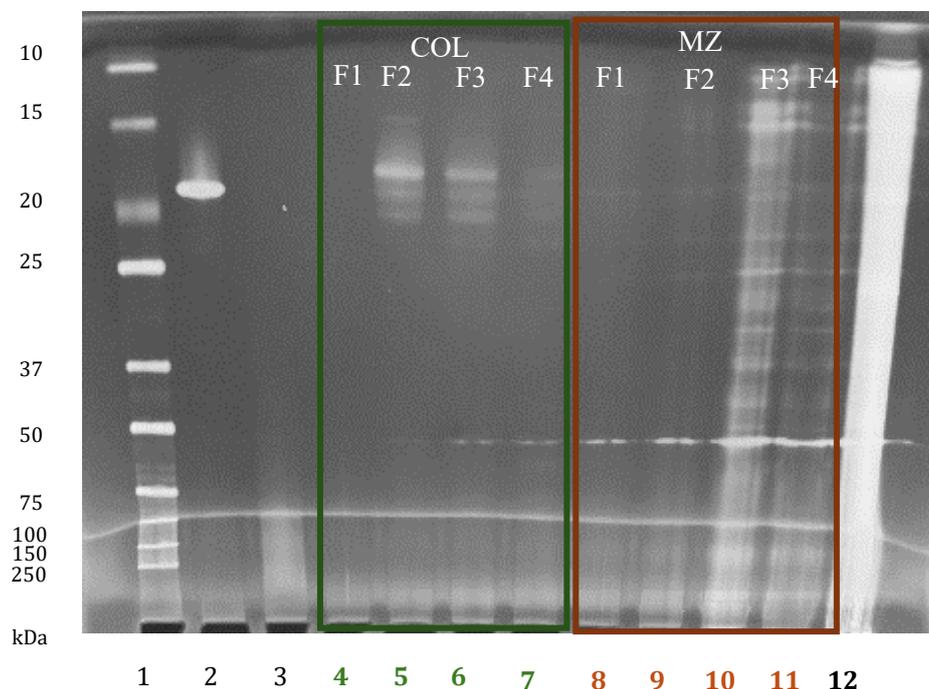


Figure 28: SDS-PAGE des différentes fractions obtenus en AF4

[1 : Standard de taille ; 2 : Standard de thumatine ; 3 : Standard de mannoprotéines ; 4 : F1 COL ; 5 : F2 COL ; 6 : F3 COL ; 7 : F4 COL ; 8 : F1 MZ ; 9 : F2 MZ ; 10 : F3 MZ ; 11 : F4 MZ ; 12 : Standard de polysaccharides]

Une bande de protéines de type thumatine (Le Bourse et al., 2011) est clairement visible dans les fractions F2 à F4 des vins COL, alors qu'aucune protéine n'a été détectée dans la fraction F1. L'analyse AF4 indique que cette fraction contient une faible concentration en macromolécules. Par conséquent, l'échantillon injecté dans le SDS-PAGE était probablement trop dilué, rendant la détection des macromolécules impossible dans cette analyse. Les mannoprotéines étaient présentes dans les fractions F3 et F4 des vins COL.

En revanche, la bande correspondant à la protéine thumatine n'est visible pour aucune des fractions de MZ. Les fractions MZ sont principalement composées de mannoprotéines à des concentrations plus élevées que celles observées dans les fractions du COL. De plus, les fractions finales (F3 et F4) étaient majoritairement composées de polysaccharides.

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-FLUO-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

Les cépages COL et MZ présentent des profils macromoléculaires bien distincts. Les vins de COL sont principalement riches en protéines, tandis que les vins de MZ sont caractérisés par des concentrations plus importantes en mannoprotéines et en polysaccharides. Ainsi, les vins élaborés à partir des deux cépages étudiés se distinguent non seulement par leurs propriétés gustatives, révélées par le test PF, mais aussi par leurs profils macromoléculaires, mis en évidence par les analyses. Pour approfondir la compréhension du lien entre macromolécules et sensations en bouche, nous nous concentrons désormais sur l'impact de chaque fraction macromoléculaire sur le goût des vins COL et MZ. Cependant, pour des raisons de sécurité, il est impossible de les déguster directement après l'AF4, car le solvant utilisé n'est pas de qualité alimentaire. C'est pourquoi les vins initiaux ont été ultrafiltrés avec différents seuils de coupure, dans le but de reproduire la collecte de fractions et de permettre leur dégustation par un panel expert.

V. Spécificités gustatives des fractions de vin blanc ultrafiltrées

1. Étude macromoléculaire des échantillons ultrafiltrés (COL et MZ) par AF4-UV-FLUO-MALS

Les échantillons ultrafiltrés ont été analysés par AF4 afin de vérifier l'élimination des fractions aux trois seuils de coupure (30,50 et 100 kDa). En complément, afin de caractériser le contenu colloïdal chromophore de chaque filtration, des matrices d'émission ont été enregistrées à l'aide d'un détecteur de fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 280 nm.

1.1. Cas du cépage COL

La **Figure 29.a** illustre l'évolution de l'absorbance des fractions ultrafiltrées du COL. L'absorbance UV de la quatrième fraction diminue significativement entre le vin initial et la fraction <100 kDa, ce qui est corroboré par le détecteur MALS (**Figure 29.b**). La filtration à l'aide d'une membrane de 100 kDa a permis d'éliminer les molécules les plus grosses. Par ailleurs, les signaux UV sont restés constants au cours des filtrations suivantes confirmant que la majorité des macromolécules ayant des masses molaires supérieures à 100 kDa ont été éliminées. Cependant, les signaux MALS montrent une légère diminution

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

du signal aux fil des ultrafiltrations (50 kDa et 30 kDa), confirmant l'élimination potentielle de macromolécules n'absorbant pas en UV telles que des polyphénols.

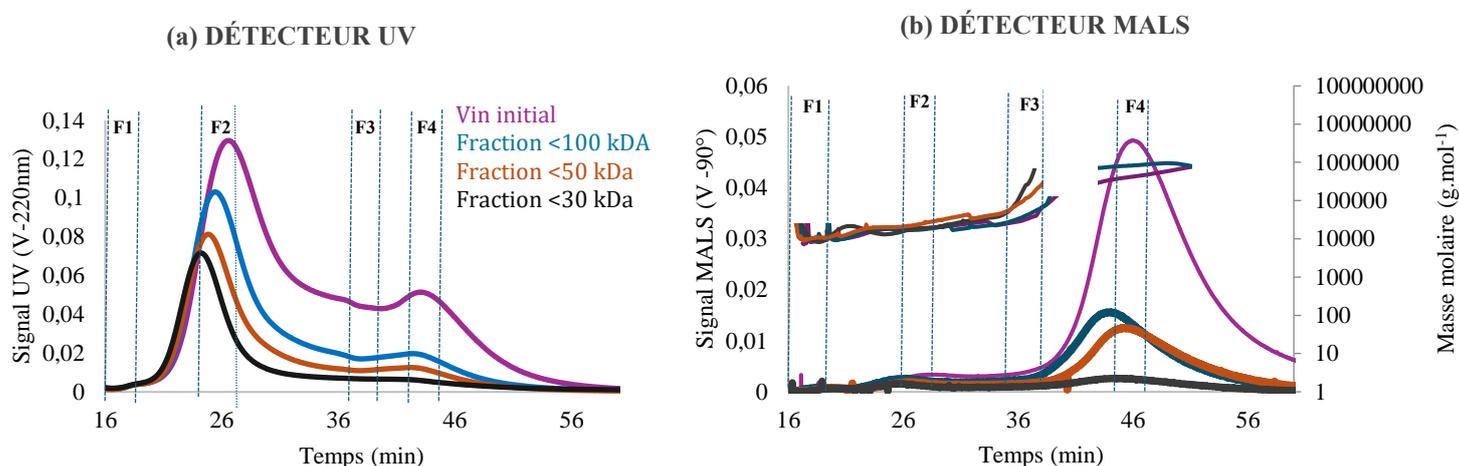


Figure 29: Fractogrammes AF4 du vin initial et des 3 fractions ultrafiltrées du vin COL, obtenus à l'aide des détecteurs UV (a) et MALS (b)

Ce résultat est confirmé par l'analyse de fluorescence (Figure 30).

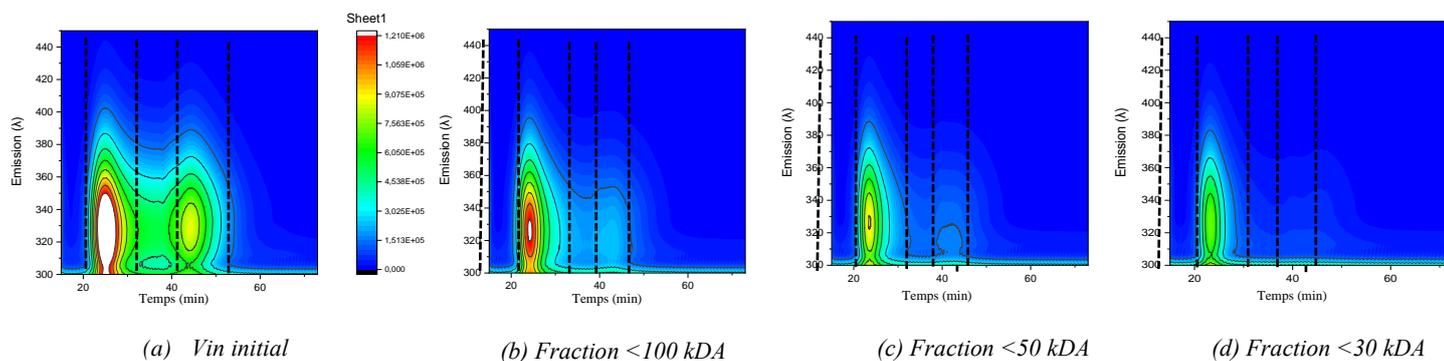


Figure 30: Spectres de fluorescence du vin Colombar initial et de ses fractions ultrafiltrées

Dans le vin initial (Figure 30.a) deux larges bandes entre 20–30 et 40–45 minutes présentent une émission maximale proche de 320 nm. Ces bandes spectrales ($\lambda_{ex}=280$ nm et $\lambda_{em}=320-340$ nm) sont très spécifiques des composés phénoliques (Coelho et al., 2017; Sádecká et al., 2018; Sádecká & Jakubíková, 2020; Suciú et al., 2019; Xagoraris et al., 2021). De plus, la bande spectrale observée à des temps de

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

rétenion compris entre 20 et 30 min, correspondant à la deuxième fraction collectée en AF4 (F2), composée principalement de protéines, émet à 320 nm. Cela correspond à des résidus de type tyrosine (structures protéiques) (Coelho et al., 2017).

Le spectre d'émission de la première filtration <100 kDa (**Figure 30.b**) révèle l'absence de macromolécules à $t_{(émission)} = 40-45$ min correspondant à la fraction finale (F4) en AF4 (**Figure 29**), indiquant l'élimination potentielle des complexes polyphénols-protéines-polysaccharides à haut poids moléculaire. Par ailleurs, les signaux UV sont restés constants au cours des ultrafiltrations suivantes (Fractions < 50 et <30 kDa), confirmant que la majorité des macromolécules absorbant à 220 nm et ayant des masses molaires supérieures à 100 kDa ont pu être éliminées.

Cependant, le signal MALS pour la fraction F4 diminue légèrement au fil des 3 ultrafiltrations (Fractions <100 kDa, <50 kDa et 30 kDa). Cela peut suggérer la présence dans la fraction F4 de macromolécules ayant des masses molaires <100 kDa présentes en trop faibles quantités pour être détectées en UV (polyphénols). En effet dans les vins blancs, certains polyphénols de faibles masses molaires tels que les acides phénoliques peuvent être présents. L'hypothèse de macromolécules n'absorbant pas dans l'UV telles que les polysaccharides peut également être émise. Ces hypothèses peuvent être confirmées grâce au spectre d'émission de la seconde ultrafiltration (<50 kDa) (**Figure 30.c**) qui révèle un faible signal à un temps d'émission de 40-45 min, suggérant la probable présence dans la fraction finale (F4) de polyphénols ou de complexes polysaccharidiques-polyphénols de taille comprise entre 50 et 100 kDa à faible concentration.

En ce qui concerne la bande d'émission associée à la tyrosine (t_r : 20–30 min, **Figure 30**), elle montre une absorption réduite, ce qui suggère que certaines protéines se sont agglomérées sur la membrane. Cette hypothèse a été confirmée par l'absorbance UV de la fraction F2 (**Figure 29**). En effet, cette dernière indique une diminution constante au fil des différentes filtrations, suggérant un éventuel colmatage de la membrane par certaines macromolécules.

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

Pour vérifier que la membrane n'a pas retenu toutes les macromolécules, la distribution massique des différents échantillons a été examinée (**Figure 29.b**). La distribution massique de la fraction F2 est constante dans le vin initial ainsi que suite aux 3 ultrafiltrations (100, 50 et 30 kDa), confirmant que la plupart des macromolécules ont traversé les membranes malgré leur colmatage partiel. De plus, les spectres de fluorescence (**Figure 30**) montrent que la composante protéique ($t_r=20-30$ min) continue à émettre, bien que dans une moindre mesure, dans la fraction finale. Cela indique que, tandis que certaines molécules restent piégées sur la membrane, d'autres parviennent à la traverser.

1.2. Cas du cépage Mauzac

Pour le cépage MZ (**Figure 31**), la plupart des polysaccharides présents dans la fraction F4 ont été éliminés par ultrafiltration à l'aide d'une membrane de 100 kDa.

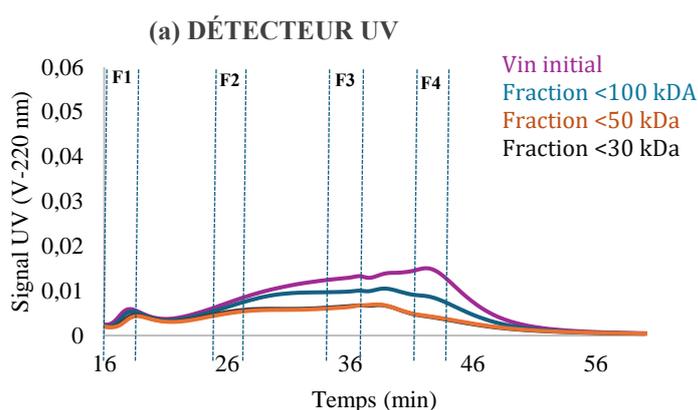


Figure 31: Fractogrammes AF4 du vin MZ initial et de ses trois fractions ultrafiltrées (<100 kDa, <50 kDa et <30 kDa) à l'aide du détecteur UV

Les fractogrammes obtenus suite à UF vont à nouveau dans le sens d'une absence de protéines dans les vins de MZ étudiés (signal UV très faible, **Figure 31**). Ce résultat pourrait être dû au processus de vinification (traitement à la bentonite) ou aux caractéristiques du cépage. Cependant, ces vins peuvent encore contenir des composés phénoliques qui fluorescent à d'autres longueurs d'onde (Gawel et al., 2018; Xagoraris et al., 2021). De plus, les molécules avec une masse molaire supérieure à 50 kDa, telles

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

que les polysaccharides ou des polyphénols, ont été éliminés lors de la deuxième ultrafiltration par une membrane avec un seuil de coupure supérieur à 50 kDa (**Figure 31**). En effet, la **Figure 32.b** révèle un signal émis par des polyphénols, probablement en faibles concentrations, comme l'indique la faiblesse du signal. Le signal MALS n'est pas présenté ici en raison de son intensité insuffisante, ce qui suggère que le contenu macromoléculaire a été presque entièrement éliminé après filtration (en accord avec les spectres de fluorescence, **Figure 32**).

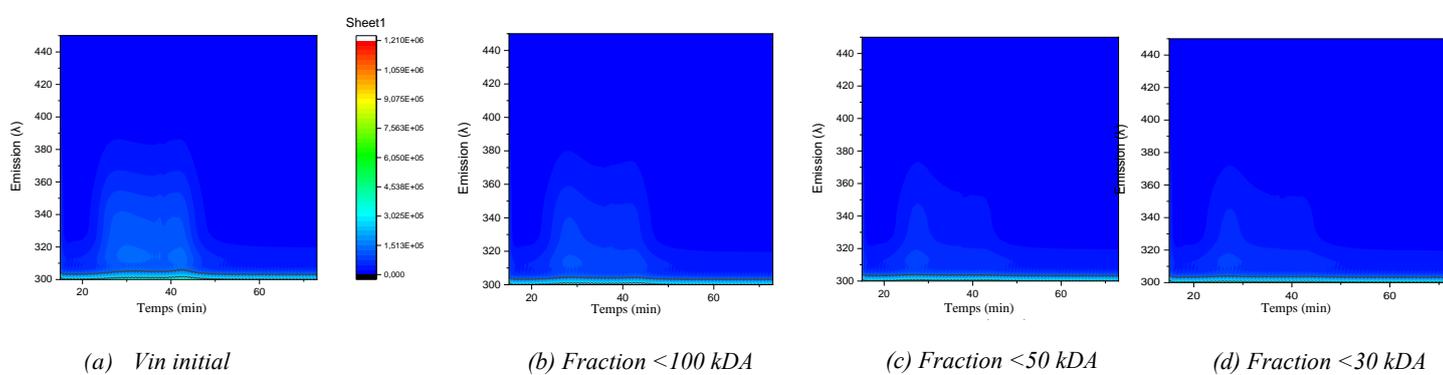


Figure 32: Spectres de fluorescence du vin initial Mauzac (a) et de ses fractions ultrafiltrées (b, c et d)

Aucune évolution n'est observée suite à la dernière UF au seuil de coupure de 30 kDa (**Figure 31**). En effet, en fonction de la nature des mannoprotéines ayant des masses molaires comprises entre 30 et 500 kDa, ces dernières peuvent être partiellement éliminées par ultrafiltration à un seuil de coupure de 30 kDa.

Les échantillons ultrafiltrés ont finalement été dégustés par le panel entraîné du DNO afin d'évaluer l'impact des macromolécules sur la perception du goût des vins blancs de COL et de MZ étudiés.

2. Dégustation des échantillons ultrafiltrés

Les échantillons ultrafiltrés ont été discriminés en utilisant un PF avec le même panel entraîné et les mêmes descripteurs (Quatrième partie, II). Les dégustateurs étaient munis d'un pince-nez pour se

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

concentrer sur la perception en bouche. Pour chaque cépage, la représentation graphique générée par PCA a permis de distinguer le vin initial et les 3 fractions les uns par rapport aux autres (**Figure 33**).

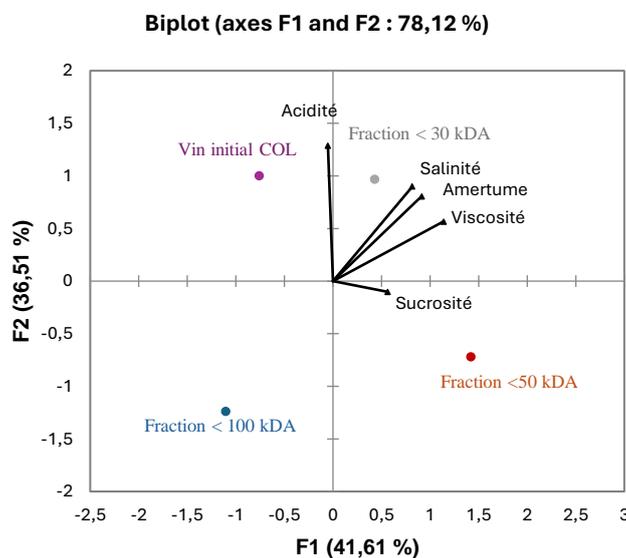


Figure 33: Analyse de Procruste généralisée (GPA) pour évaluer le vin COL initial et ses trois fractions ultrafiltrées (<100 kDa, < 50 kDa et < 30 kDa) en fonction des cinq descripteurs choisis lors de la première session de PF.

Les deux premiers axes (F1 et F2) expliquent 78,12 % de la variance totale. L'axe F1 (41,61 %) discrimine les vins selon leur sucrosité et leur viscosité (corrélation positive). L'axe F2 (36,51 %) différencie principalement les vins selon leur acidité (corrélation positive). L'acidité est le descripteur le plus efficace pour distinguer les échantillons : le vecteur d'acidité sur le graphique PCA est plus long que les autres vecteurs. D'autres descripteurs tels que l'amertume et la salinité sont plus corrélés avec F2 qu'avec F1. Les échantillons sont positionnés à travers les quatre quadrants du graphique PCA. L'échantillon de vin original est plus fortement corrélé avec l'axe F2, indiquant une perception d'acidité plus élevée, potentiellement plus d'amertume et de salinité, et une sucrosité et une viscosité moindre, par rapport aux autres échantillons. Le cépage COL de la région du Gers est généralement récolté tôt dans la saison pour obtenir des rendements élevés et des vins frais et aromatiques avec un faible TAV. Ces raisins sont également caractérisés par une haute acidité (J. Robinson et al., 2012).

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

En revanche, la fraction <100 kDa dans le vin COL est corrélée négativement avec l'axe F2, indiquant une acidité plus faible. Cette fraction résulte de l'utilisation d'une membrane de 100 kDa, qui élimine la plupart de la fraction polysaccharidique-protéines (8–800 kDa). Ces macromolécules affectent le goût de plusieurs manières. Vidal et al. (2004) ont étudié la sensation en bouche liée à la présence de polysaccharides dans un milieu similaire au vin et ont démontré qu'ils augmentent la perception de la rondeur et diminuent celle de l'astringence. Cependant, Okuda et al (2006) ont montré que l'ajout de polysaccharides au vin blanc affectait légèrement la viscosité mais n'avait pas d'effet statistiquement significatif. De plus, Gawel et al (2018) ont prouvé que le pH du vin affecte la perception de la viscosité : Le lien entre viscosité et polysaccharides dépend essentiellement du pH du vin : un pH élevé ($\text{pH} > 3,6$) modifie la charge des polysaccharides acides, ce qui augmente la perception de la viscosité. Dans notre étude, la perception de la viscosité ne devrait pas être liée à la présence de polysaccharides, étant donné le pH bas du vin ($\text{pH} = 3,2$) constant pour chaque échantillon. Toutefois, lors de la dégustation, le vin ultrafiltré (<100 kDa) a été perçu comme moins acide par le panel formé. Néanmoins, il est difficile de tirer des conclusions sur l'impact des polysaccharides sur l'acidité des vins, car la littérature à ce sujet est limitée.

La fraction <50 kDa est corrélée avec l'axe F1, indiquant une tendance vers la sucrosité. Comme discuté précédemment, les polyphénols, présents en faible concentration dans les vins blancs, ont été presque tous éliminés par cette filtration et leur concentration est minime. En effet, une perte de matériel dans cette fraction a été mise en avant par les fractogrammes obtenus par AF4 et les spectres de fluorescence. Par conséquent, les macromolécules restant dans cette fraction sont principalement des mannoprotéines et des protéines. Les mannoprotéines affectent la sucrosité, suggérant que ces macromolécules pourraient être impliquées dans la perception de sucrosité de cette fraction (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2020).

La fraction finale (<30 kDa) est corrélée positivement avec les axes F2 et F1, indiquant qu'elle est plus souvent décrite en termes d'acidité et d'amertume plutôt que de sucrosité et de viscosité. Les

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

mannoprotéines sont largement éliminées dans cette fraction, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la perception de l'amertume par le panel.

Une analyse similaire a été réalisée avec le cépage MZ (**Figure 34**).

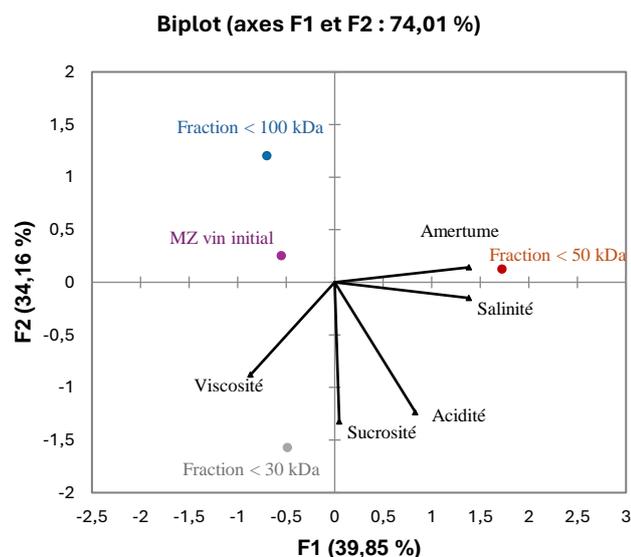


Figure 34: Analyse de Procruste généralisée (GPA) pour évaluer les différentes fractions ultrafiltrées des vins MZ en fonction des différents descripteurs choisis lors du PF.

Les deux premiers axes (F1 et F2) représentent 74,01 % de la variance totale. Les descripteurs salinité et amertume sont corrélés positivement avec l'axe F1, tandis que la sucrosité, acidité et viscosité sont corrélés négativement avec l'axe F2. Deux vins étaient relativement proches sur le PCA : le vin de MZ initial et la fraction <100 kDa. Cependant, le vin de MZ initial est plus fortement corrélé négativement avec F1, tandis que la fraction <100 kDa est plus positivement corrélée avec F2. En termes de perception du goût, le vin de MZ initial a des notes d'amertume et de salinité basses, tandis que la fraction <100 kDa est caractérisée par une faible perception de l'acidité et de la sucrosité. Dans l'échantillon ultrafiltré, la plupart des polysaccharides ont été éliminés, ce qui peut être à l'origine de la diminution de viscosité perçue par les dégustateurs. Comme discuté pour le COL, le pH des échantillons est de l'ordre de 3,6, un pH considéré comme élevé, potentiellement à l'origine d'une augmentation de la viscosité du vin (Gawel et al., 2018).

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

La fraction <50 kDa est fortement corrélée avec l'amertume et la salinité. L'hypothèse du rôle de certains composés phénoliques tels que l'épicatéchine (faible masse molaire) dans cette perception peut être émise. En effet, certaines méthodes de vinification comme la macération pelliculaire (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020), favorisent la contribution relative des composés phénoliques amers (par exemple, épicatechine et naringine) par rapport aux composés phénoliques non amers (par exemple, acide caftarique) dans le pool de composés phénoliques présents dans les vins (Gawel et al., 2018; Xagoraris et al., 2021)

La fraction finale est corrélée négativement avec F2 et est caractérisée par sa sucrosité et son acidité. La plupart des grandes molécules ont été éliminées, ne laissant que de petites macromolécules tels que des mannoprotéines (<30 kDa) existant sous différentes formes à différentes masses molaires dans les vins blancs (Cosme et al., 2020), ce qui pourrait expliquer le goût sucré.

VI. CONCLUSION

Les deux cépages du Sud-Ouest, COL et MZ, ont été différenciés par un jury expert en fonction de leurs caractéristiques gustatives. Le COL a été jugé plus acide, tandis que le MZ a été décrit comme plus amer. L'analyse macromoléculaire par AF4 a révélé des différences significatives entre leurs profils. Les vins de COL sont principalement riches en protéines, tandis que les vins de MZ sont caractérisés par des concentrations plus importantes en mannoprotéines et en polysaccharides.

Ainsi, les vins élaborés à partir de deux des cépages étudiés se distinguent non seulement par leurs propriétés gustatives, révélées par le test PF, mais aussi par leurs profils macromoléculaires, mis en évidence par les analyses.

Pour approfondir la compréhension du lien entre macromolécules et sensations en bouche, une ultrafiltration des vins a été réalisée. L'ultrafiltration s'est révélée être une méthode efficace malgré la perte de matériel inhérente à ce processus : les macromolécules des vins testés semblent influencer leur goût. Cependant, aucune conclusion définitive ne peut être tirée concernant leur rôle précis. La méthode

Quatrième partie : Spécificités gustatives (profil flash) et profilage macromoléculaire (AF4 – UV-MALS-dRI) des vins blancs monovariétaux issus de quatre cépages autochtones du Sud-Ouest de la France

d'UF retenue (altération des vins lors des filtrations avec notamment des réactions d'oxydation, perte de matériel) ainsi que le manque d'une formation du panel sensoriel peuvent expliquer ces limites. Le panel pourrait être formé spécifiquement sur les descripteurs retenus, et familiarisé en amont avec l'utilisation du pince-nez. Le recours à d'autres tests sensoriels (méthode CATA, profil conventionnel, ou profil pivot par rapport au vin initial par exemple) pourrait permettre de compléter et d'affiner les résultats obtenus.

CINQUIEME PARTIE

AF4-UHPLC :

Séparation bidimensionnelle des macromolécules dans quatre vins blancs du Sud-Ouest de la France

Cinquième partie : Développement d'un couplage AF4-UHPLC : Analyse bidimensionnelle des macromolécules dans quatre vins blancs du Sud-Ouest de la France

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les polyphénols et les polysaccharides dans les vins blancs jouent un rôle important. Les études sensorielles et analytiques ont pu nous le montrer. Cependant, le rôle des protéines reste encore inconnu. Néanmoins, ces dernières sont impliquées dans la casse protéique des vins blancs. Leur stabilisation nécessite actuellement des méthodes coûteuses, et le développement de techniques de collage plus économiques, avec un moindre impact sur la qualité du vin, est essentiel pour l'économie viticole du Sud-Ouest de la France.

L'analyse macromoléculaire par AF4 offre une approche prometteuse pour étudier les protéines dans les vins, mais présente des défis techniques liés à la séparation des macromolécules de taille similaire tels que les protéines. À ce jour, une seule étude (Yohannes et al., 2007) a examiné l'intégration de l'AF4 dans les analyses HPLC, un système prometteur pour séparer les protéines selon leur taille et leur hydrophobicité. Cependant, cette technique présente plusieurs inconvénients tels que la perte d'échantillon et le temps d'analyse.

L'objectif de cette partie est de présenter le développement d'un système bidimensionnel combinant l'AF4 et l'UHPLC pour optimiser la séparation des protéines tout en réduisant les pertes. Ce système est ensuite appliqué aux vins pour les différencier en fonction de leurs profils macromoléculaires et protéiques.

I. Introduction

Comme évoqué précédemment, le vin blanc est une matrice complexe composée principalement d'eau, d'alcool et d'acides organiques, ainsi que de divers autres composés, dont des macromolécules telles que les protéines, les composés phénoliques de type non-flavonoïdes (hydroxycinnamates) et flavonoïdes comme les flavanols et les anthocyanes (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020; Vilela, 2016) et les polysaccharides (AGP, RGII et mannoprotéines) (F. Gonçalves et al., 2002; Vidal, Francis, et al., 2004). Bien que présents en petites quantités, ces composés ont été identifiés comme ayant une influence sur la perception du goût (Gawel et al., 2018).

Les protéines, quant à elle, sont présentes en faibles concentrations dans les vins blancs (Cheynier & Sarni-Manchado, 2010) et leur concentrations sont influencées par plusieurs facteurs tels que la variété ainsi que la maturité du raisin et le processus de vinification (Sauvage et al., 2010). Comme énoncé dans la partie 1 (IV.1.3), les protéines du vin sont principalement connues pour jouer un rôle important dans l'instabilité du vin, notamment dans un phénomène appelé "trouble protéique" (Ferreira et al., 2001; Lamikanra & Inyang, 1988; Waters et al., 2005). Les protéines impliquées dans ce rôle comprennent des TLP et des chitinases (Ferreira et al., 2001). La présence de turbidité ou de dépôts dans les bouteilles de vin peut diminuer leur attrait commercial, les rendant visuellement peu attrayantes pour les consommateurs (Z. Liu et al., 2023). Pour résoudre ce problème, les vignerons utilisent principalement la bentonite comme agent de collage (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020). Cependant, ce processus est coûteux et présente plusieurs inconvénients pour la qualité, ce qui incite à la recherche d'alternatives (Mierczynska-Vasilev et al., 2022).

Le défi de découvrir de nouvelles méthodes de collage plus économiques et ayant moins d'effets négatifs sur le vin est d'une grande importance pour l'économie locale de la région du Sud-Ouest de la France. Cette région figure parmi les principaux producteurs et exportateurs de vins blancs secs en France, utilisant de nombreuses variétés de raisin caractéristiques pour la production de vin.

Les protéines du vin ont fait l'objet de nombreuses recherches. Plusieurs études ont utilisé diverses méthodes chimiques pour les étudier, telles que l'échange d'ions (Monteiro et al., 2001; Sarmento, Oliveira, et al., 2001; Sarmento, Oliveiraz, et al., 2001), la chromatographie d'exclusion par taille (López-Barajas et al., 1998), le blotting des protéines (Manteau et al., 2003), et l'électrophorèse en deux dimensions (Okuda et al., 2006) Actuellement, la plupart des études (Marangon et al., 2009) utilisent principalement la chromatographie liquide en phase inverse. Ces techniques ne sont pas les plus appropriées pour étudier les protéines dans un état non dénaturé. En raison de leur structure tridimensionnelle, les protéines peuvent interagir avec d'autres molécules biologiques (Podzimek, 2011). Par conséquent, les techniques d'analyse doivent préserver les interactions supramoléculaires et non covalentes tout en étant capables de caractériser les protéines dans leur état natif, non altéré. C'est pourquoi une nouvelle technique appelée AF4 a été récemment employée pour examiner la composition macromoléculaire des vins (Coelho et al., 2017; Marassi et al., 2021; Osorio-Macías et al., 2020, 2022), notamment des protéines (Rambaldi et al., 2011). Cette technique offre des informations précieuses sur la composition des échantillons, cependant la séparation des macromolécules en fonction de leur taille pose un défi pour l'étude des protéines dans les vins, notamment parce que la majorité des protéines dans les vins blancs présentent des tailles similaires. De plus, l'isolement, la séparation et la caractérisation des protéines dans les moûts et les vins sont des tâches difficiles en raison de leur faible concentration et des interactions prononcées avec les polyphénols endogènes et d'autres composés non protéiques. À ce jour, une seule étude (Yohannes et al., 2007) a exploré l'intégration de l'AF4 dans les analyses HPLC. Yohannes et al (2007) a étudié les protéines dans le blanc d'œuf en développant un nouveau système combinant l'AF4 avec la chromatographie liquide. Ce système présente un grand potentiel pour séparer les protéines en fonction de leur taille et de leur hydrophobicité. Les fractions recueillies à la sortie de l'AF4 sont généralement diluées d'un facteur 10, et une partie de l'échantillon est également perdue. En outre, les analyses en deux dimensions utilisant la chromatographie liquide sont longues. Pour répondre à ces problèmes, un nouveau système bidimensionnel intégrant l'AF4 et l'UHPLC a été développé dans cette étude. Ce système permet de séparer les échantillons en fonction de leur taille à l'aide de l'AF4. Les fractions sortant de l'AF4 sont ensuite concentrées à l'aide de cartouches contenant une phase

chromatographique, puis éluées sur une colonne UHPLC, facilitant ainsi une analyse rapide. Dans cette étude, le système a d'abord été validé, puis appliqué à une matrice complexe, le vin, dans le but de différencier des vins monovariétaux selon leurs profils macromoléculaires.

II. Validation du système 2D

Dans le cadre de la validation de notre système AF4-UHPLC, un mélange contenant deux standards a été injecté : des mannoprotéines et la protéine thaumatine. Les mannoprotéines, polysaccharides produits par les levures lors de la FA, sont présentes dans les vins blancs. Ces polysaccharides sont principalement composés de groupes mannose associés à environ 10-20 % de protéines avec une masse molaire pouvant atteindre 450 kDa (Gawel et al., 2018). Leur concentration varie considérablement en fonction du processus de vinification (Gonçaves et al., 2002). La thaumatine n'a pas été identifiée dans le vin, mais d'autres protéines de la même famille, appelées TLP y sont présentes (Ferreira et al., 2001). Ces protéines proviennent du raisin et constituent l'un des deux principaux groupes de protéines, avec les chitinases. Elles se caractérisent par des masses moléculaires relativement faibles, généralement autour de 20-30 kDa (Curioni et al., 2008).

Suite à l'injection de ces standards dans le système AF4-UHPLC, deux pics distincts sont observés sur le fractogramme (**Figure 35**) à des temps de rétention différents selon la première dimension de l'axe : $tr_{1D} = 20$ min et $tr_{2D} = 38$ min.

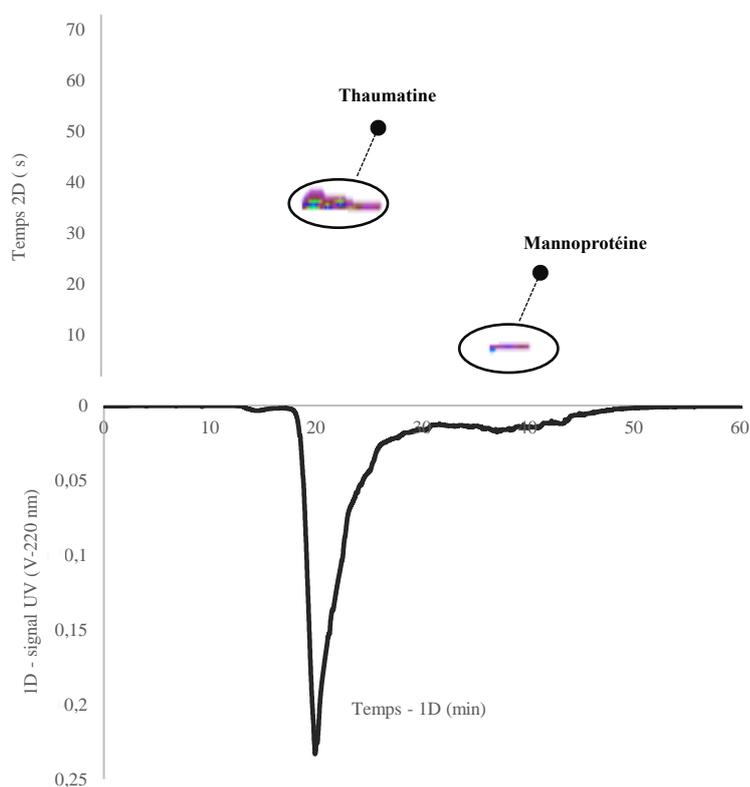


Figure 35: Signaux 1D et 2D de deux échantillons standards

Cette première dimension correspond à la fraction des macromolécules dans un canal AF4, une technique permettant la séparation basée sur la taille des macromolécules (Podzimek, 2011; Schimpf et al., 2000). Cela explique pourquoi notre standard protéique, avec une taille de particule inférieure à celle des mannoprotéines, présente un temps de rétention plus faible. Ainsi, notre système 1D permet de séparer efficacement les deux standards en fonction de leur taille. En ce qui concerne la deuxième dimension, le standard de thaumatine a un temps de rétention de 35 secondes. Ce composé semble être plus retenu par la colonne de type C8, contrairement au standard de mannoprotéine, avec un temps de rétention de 10 secondes. Les mannoprotéines sont des polymères de mannose hydrophiles liés de

manière covalente à la chaîne principale de la protéine (Braun, 1999; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2020; Wan et al., 2021). Lorsque la phase mobile est principalement composée d'eau, le standard de mannoprotéine est élué. En effet, il s'associe à l'eau en formant des liaisons hydrogène, ce qui lui confère une grande affinité pour la phase mobile et permet son déplacement le long de la phase stationnaire (C8). Cependant, le composé est encore retenu par la colonne en raison de sa composante protéique, qui peut contenir des acides aminés non polaires. Ainsi, une partie des mannoprotéines peut également être hydrophobe. Les protéines thaumatine, en raison de leur structure complexe (Marangon et al., 2014), sont intrinsèquement plus hydrophobes que les mannoprotéines, qui se composent principalement d'une composante sucre hautement polaire. Elles sont éluées après les mannoprotéines à l'aide d'une phase mobile composée principalement d'acétonitrile. En effet, ce solvant présente une affinité spécifique pour les protéines dans les méthodes chromatographiques (Gekko et al., 1998), en raison de sa capacité à interagir efficacement avec les protéines, à solvater les molécules et à contrôler les interactions hydrophobes. Ces propriétés en font un solvant efficace pour la séparation et l'analyse des protéines dans les techniques chromatographiques.

La faisabilité du système AF4-UHPLC a été démontré avec succès. Les différents standards sont séparés efficacement en fonction de leur taille moléculaire grâce à l'AF4. De plus, ils sont distinctement séparés en fonction de leur hydrophobicité dans la deuxième dimension. Cette technique pourrait s'avérer extrêmement utile pour la séparation de mélanges complexes tels que les vins. En effet, la séparation des composés par taille à l'aide de l'AF4 permet de distinguer des composés ayant la même hydrophobicité, créant ainsi un profil d'identité unique pour chaque échantillon. C'est pourquoi cette méthode a ensuite été appliquée aux vins blancs pour étudier la composition macromoléculaire de différentes variétés indigènes de raisin au sein d'une même population.

III. Application du système 2D à quatre variétés autochtones

Chaque cépage possède sa propre identité. La variété COL (**Figure 36**) se compose de deux populations distinctes observées dans la première dimension : l'une à un temps de rétention de $t_{r1D} = 26$ min et l'autre à $t_{r1D} = 40$ min.

Cinquième partie : Développement d'un couplage AF4-UHPLC : Analyse bidimensionnelle des macromolécules dans quatre vins blancs du Sud-Ouest de la France

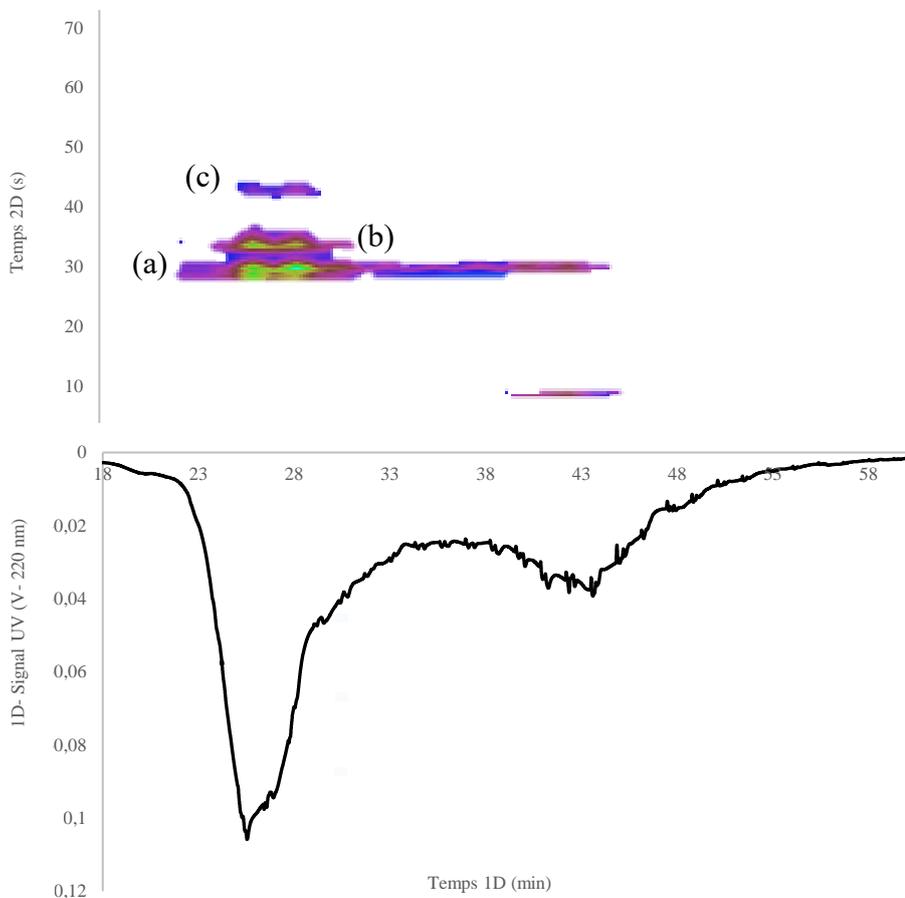


Figure 36: Signaux 1D et 2D du cépage Colombard

Ces deux populations montrent une absorption UV ($\lambda=220$ nm), avec une absorption plus élevée pour la première population. Grâce à l'injection de divers standards naturellement présents dans le vin, des hypothèses ont pu être émises quant à l'identification de ces composés : la première population serait être hypothétiquement composée de protéines, tandis que la seconde serait hypothétiquement composée de mannoprotéines. L'analyse en deuxième dimension révèle des différences de composition au sein de la même population. Pour la première population fractionnée à $t_{r1D} = 26$ min et hypothétiquement composée de protéines, la variété COL exhibe trois types de macromolécules (potentiellement 3 protéines). Ces trois groupes de macromolécules ont des affinités différentes avec les phases stationnaire et mobile, car ils sont élués à différents temps de rétention : le premier est élué (a) à $t_{r2D} = 29$ s, le second

Cinquième partie : Développement d'un couplage AF4-UHPLC : Analyse bidimensionnelle des macromolécules dans quatre vins blancs du Sud-Ouest de la France

(b) à $tr_{2D} = 34s$ et le troisième (c) à $tr_{2D} = 43s$. De plus, ces composants n'absorbent pas avec la même intensité (**Tableau 18**).

Tableau 18: Aire (en pixels) des différentes macromolécules présentes dans les différents cépages.

Aire (pixel)		Cépages			
		COL	GM	LL	MZ
1 ^{ère} population	1 ^{ère} protéine	972	330	810	/
	2 ^{ème} protéine	650	615	174	/
	3 ^{ème} protéine	291	traces	/	/
2 ^{ème} population	Mannoprotéines	160	385	287	442
	Complexe protéique	295	130	/	/

En effet, le composant (a) a une aire de pixels de 972, le composant (b) une aire de pixels de 650, et le composant final (c) une aire de pixels de 291. Une première hypothèse peut être proposée : le premier composé (a) et le second composé (b) pourraient être plus concentrés dans l'échantillon que le troisième (c), mais ces composés pourraient également présenter des coefficients d'absorption différents. L'identification potentielle de ces protéines pourrait indiquer des protéines de type thaumatine (22 kDa) ou de la chitinase (30 kDa), principalement présentes dans les vins blancs. Certaines études ont examiné l'impact de ces protéines sur les vins, révélant une diversité significative d'isoformes tant pour la chitinase que pour les TLP (Manteau et al., 2003; Marangon et al., 2009). Les trois macromolécules distinctes pourraient potentiellement représenter des isoformes de protéines de type thaumatine. En ce qui concerne la deuxième population à $tr_{1D} = 40$ min, la variété COL est composée de deux composés. Le premier, avec $tr_{2D} = 10s$, correspond certainement aux mannoprotéines. En effet, après injection d'un standard de mannoprotéine, la macromolécule est éluée au même temps de rétention en première et deuxième dimension, comme observé dans nos vins. Le second, avec $tr_{2D} = 31s$, semble avoir les mêmes propriétés d'hydrophobicité que les protéines. Cependant, cette macromolécule a une masse molaire plus élevée que la première protéine. Cette observation pourrait s'expliquer par la formation de complexes avec d'autres composants protéiques ou avec des polyphénols comme les acides hydroxycinnamiques.

La variété GM présente un fractogramme similaire à celui de COL (**Figure 37**), avec deux populations macromoléculaires distinctes éluées aux mêmes temps de rétention.

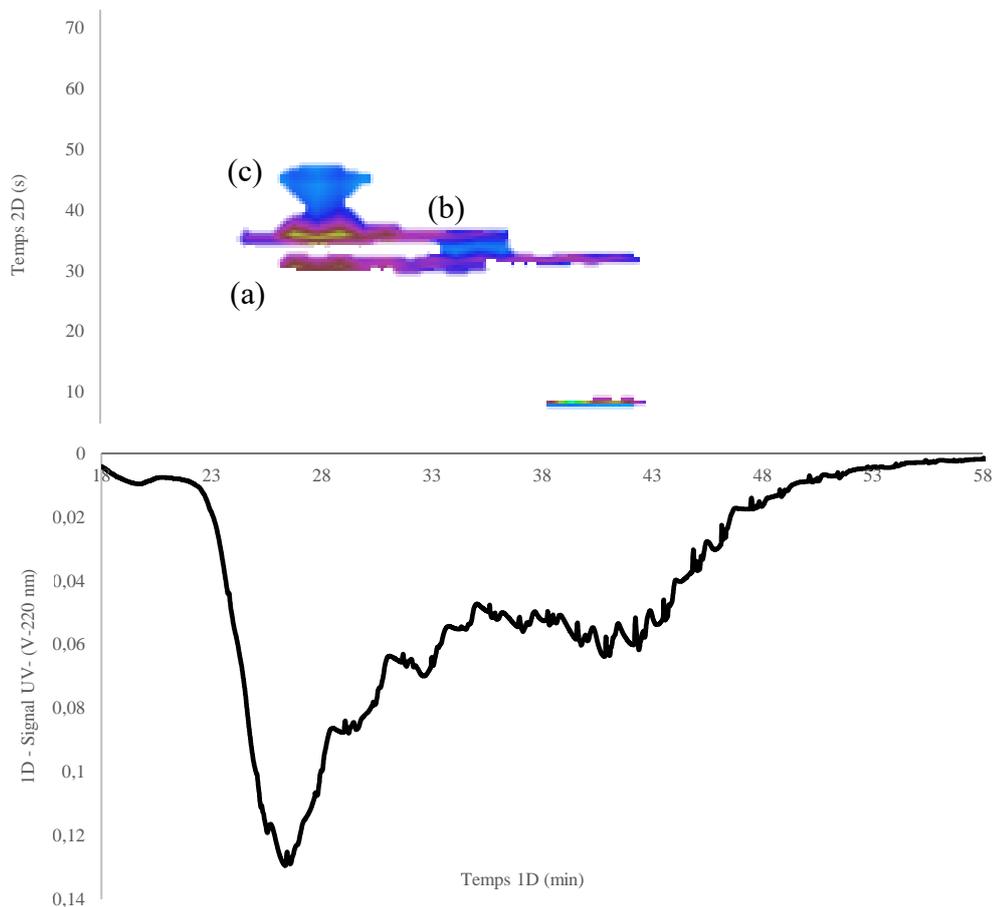


Figure 37: Signaux 1D et 2D du cépage Gros manseng

De plus, les profils en deux dimensions sont identiques pour les deux populations. Elles semblent se composer du même type de macromolécules. Cependant, l'aire en pixels des trois composants est différente (**Tableau 18**). Le volume sous le pic est plus faible comparé à COL, ce qui suggère que la teneur en protéines potentielle dans la première population de GM (a) pourrait être moins concentrée ou avoir un coefficient d'absorption inférieur à celui de COL. De plus, le deuxième ensemble de protéines potentielles dans la variété GM (b) est présent en concentrations plus élevées ou avait un coefficient d'absorption plus important que le premier ensemble. La deuxième population, composée

hypothétiquement de mannoprotéines, est identique à celle de COL mais plus concentrée dans la variété GM (**Tableau 18**). Les mannoprotéines sont synthétisées par les levures lors du processus de FA. Ces polymères se retrouvent en quantités notables dans les vins, et leurs niveaux varient selon les méthodes spécifiques utilisées dans la vinification (Euillat, 1989). De plus, la deuxième macromolécule, qui a le même temps de rétention dans la première dimension que les mannoprotéines ($tr_{1D} = 40$ min), semble être identique à celle observée dans COL. Ces molécules partagent également le même temps de rétention dans la deuxième dimension ($tr_{2D} = 31$ s), indiquant des propriétés hydrophobes similaires. Cependant, l'aire en pixels correspondant aux macromolécules présentes dans les vins est plus petite que celle observée dans COL.

Le fractogramme de la variété LL est différent de celui de COL et GM (**Figure 38**) ; il montre une absorption UV plus élevée pour la première population comparée aux deux autres.

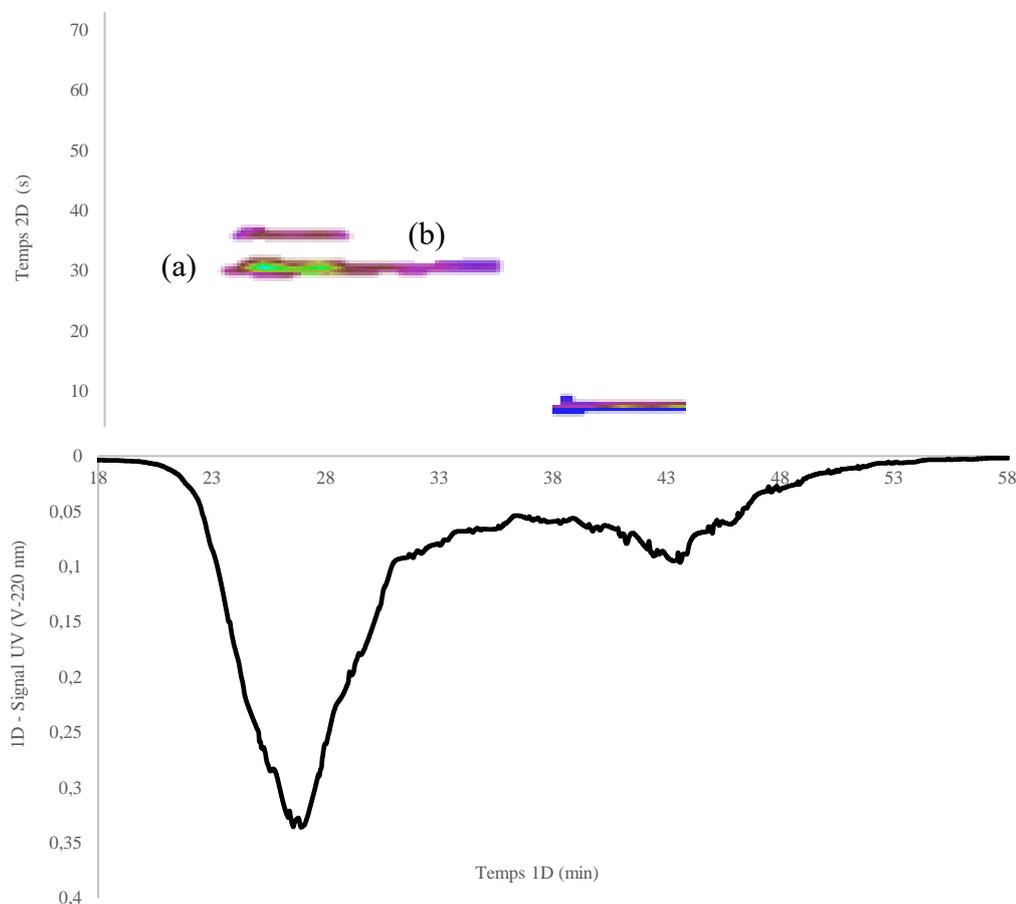


Figure 38: Signaux 1D et 2D du cépage Len de l'el

De plus, la composition des macromolécules (hypothétiquement des protéines) dans la première population est différente. Elle comprend deux types de macromolécules (peut être protéines), correspondant spécifiquement à celles trouvées en première et deuxième position dans GM et COL. La concentration du premier groupe de macromolécules (hypothétiquement protéines) semble avoir une aire de pixels très proche de celle de la variété COL. Cependant, le second groupe de macromolécules (hypothétiquement protéines) présente une intensité bien plus faible comparée au second groupe dans COL et GM. De plus, le troisième groupe de macromolécules (hypothétiquement protéines) est absent dans cette variété de raisin. La seconde population macromoléculaire, composée hypothétiquement de mannoprotéines, est moins concentrée dans LL que dans GM, mais plus élevée que dans COL.

Contrairement à d'autres cépages, MZ se distingue de par son très faible signal UV entre 26 et 38 minutes en AF4 (**Figure 39**), ce qui pourrait correspondre à l'hypothèse de la présence de protéines à de très faibles concentrations. En effet, dans ce cépage, les protéines sont rares, principalement en raison du processus de vinification. De plus, cette légère absorbance pourrait être due à la présence de composés qui absorbent légèrement dans la gamme UV à une longueur d'onde de 220 nm mais qui n'ont aucune affinité avec le solvant en 2D. Cependant, il contient également des mannoprotéines en concentrations plus élevées que les autres cépages.

Cinquième partie : Développement d'un couplage AF4-UHPLC : Analyse bidimensionnelle des macromolécules dans quatre vins blancs du Sud-Ouest de la France

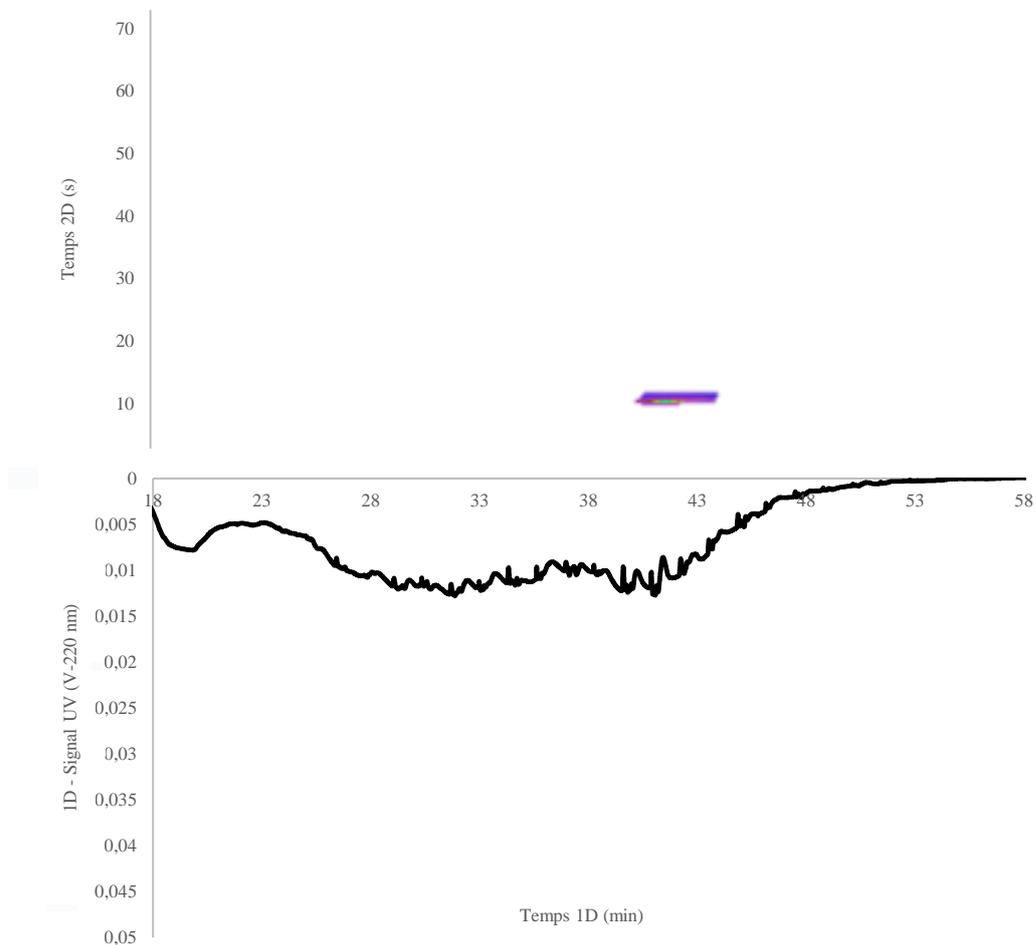


Figure 39: Signaux 1D et 2D du cépage Mauzac

Cette méthode nous permet de caractériser la composition des macromolécules au sein d'une population spécifique. Toutefois, les vins blancs contiennent des macromolécules au-delà des protéines et des mannoprotéines ; ils incluent également des polysaccharides. Ces composés manquent de groupes chromophores et ne sont donc pas détectables sous lumière UV.

IV. Conclusion

En conclusion, la faisabilité de ce système bidimensionnel intégrant une analyse AF4-UHPLC hors ligne a été démontré avec succès grâce à l'injection de deux standards. Cette technique se révèle très prometteuse pour l'étude de mélanges complexes tels que les vins. En effet, ce dispositif permet de différencier diverses variétés de raisin en fonction de leur composition macromoléculaire. De plus, il présente des avantages considérables par rapport à l'UHPLC classique, car les échantillons sont initialement concentrés sur une cartouche, ce qui empêche la perte de matière et évite la dénaturation des échantillons. Le fractionnement des échantillons par AF4 permet en outre la séparation des analytes en fonction de leur taille, facilitant ainsi l'identification de composés ayant une hydrophobicité similaire, ce qui serait difficile à observer avec une simple analyse UHPLC. Ainsi, cet outil pourrait s'avérer un atout majeur pour l'industrie vinicole en offrant une meilleure compréhension des protéines responsables de la formation du trouble protéique et, idéalement, en réduisant les coûts associés à ce phénomène. Il pourrait également être appliqué à d'autres matrices complexes telles que le moût de raisin, la bière ou le lait.

Conclusion Générale et Perspectives

Le vignoble du Sud-Ouest, riche de la diversité de ses terroirs et du savoir-faire de ses vinificateurs, offre une vaste gamme de cépages produisant des vins au caractère unique. Les cépages COL et GM sont particulièrement reconnus pour leur acidité marquée, tandis que les vins issus des cépages LL et MZ se distinguent par leur douceur. Ces variations gustatives s'expliquent en partie par la composition des vins, où le rôle de composés tels que les polyphénols et les polysaccharides est avéré. Bien que de nombreuses études aient été menées sur le rôle de ces molécules sur le goût des vins, très peu se sont penchées sur ces cépages. De plus, le rôle des acides aminés dans les perceptions sensorielles est bien établi mais leur influence sur les perceptions gustatives demeure encore peu étudiée, bien qu'ils jouent un rôle crucial dans le goût des aliments. L'objectif de cette étude était donc de mettre en lumière le rôle des acides aminés et macromolécules sur les perceptions gustatives des vins blancs du Sud-Ouest.

Le premier axe de cette thèse a été d'étudier la contribution des acides aminés au goût des vins blancs du Sud-Ouest. Pour cela, une étude préliminaire des paramètres physico-chimiques des vins a permis de discriminer les vins par cépage en fonction de leur teneur en azote organique (acides aminés majoritaires). Une analyse par HPLC a donc été réalisée dans le but de différencier ces mêmes vins en fonction de leur profil aminé. La majorité des acides aminés retrouvés dans les vins étaient cohérents avec ceux retrouvés dans la littérature mais à des concentrations plus importantes. Ces variations de concentrations sont souvent dues à différents facteurs tels que le cépage, le millésime et les pratiques viticoles. Grâce à une analyse discriminante, les vins issus de 4 variétés différentes du Sud-Ouest ont pu être différenciés en fonction de leur concentration en deux acides aminés : la Pro et le Glu. Les vins GM et COL étant plus riches en Pro et les vins LL et MZ plus riches en Glu. Les fortes concentrations en Pro dans les cépages COL et GM sont probablement la conséquence de la pulvérisation d'azote foliaire au vignoble ainsi que l'ajout d'azote organique dans les moûts afin d'optimiser les concentrations en thiols qui font toute la typicité des vins blancs de l'IGP Côte de Gascogne. Les concentrations en Glu plus importantes dans les variétés LL et MZ peuvent quant-à-elles être liées à une maturité des raisins plus importante pour ces cépages, en lien avec les objectifs de production recherchés pour l'AOP Gaillac. Ces deux acides aminés sont reconnus dans la littérature pour leurs effets sur la perception

gustative des vins. C'est pourquoi, leur influence a été évaluée sur nos vins. Il a été démontré que la Pro avait un impact significatif et augmentait la sucrosité des vins de MZ. Connaissant l'impact de cet acide aminé sur les perceptions gustatives des vins, il serait intéressant par la suite de pouvoir différencier gustativement ces 4 cépages selon leurs concentrations en Pro. Cependant, les vins analysés présentent une grande variabilité en termes de paramètres physico-chimiques, en raison des différentes pratiques viticoles et œnologiques auxquelles ils ont été soumis sur plusieurs millésimes. Il serait donc pertinent de réaliser des micro-vinifications à partir de ces quatre cépages, en contrôlant rigoureusement tous les paramètres afin que seul le cépage influence la composition finale. De surcroît, l'étude de l'effet de l'ajout d'azote dans les moûts, modifiant la concentration en proline, pourrait s'avérer pertinent. En effet, il serait intéressant de soumettre à la dégustation comparative un vin sans ajout d'azote et un vin enrichi en azote, minéral d'une part et organique d'autre part, afin d'évaluer les différences de sucrosité.

Contrairement à la Pro, l'effet de Glu sur nos vins n'a pas donné de résultats significatifs pour une concentration de 70 mg.L^{-1} , notamment en raison du manque de formation du panel recruté pour l'analyse. En effet, une étude récente (Franceschi et al., 2023) a calculé à l'aide d'un panel expert le seuil de perception de Glu dans les vins. Ces résultats ont révélé que 50 % des membres du panel entraîné ont identifié cette saveur dans un vin neutre, où la concentration de Glu mesurée était de 48 mg.L^{-1} , seuil inférieur à la concentration ajoutée dans nos vins. Cette étude souligne le déficit d'entraînement de notre panel. Cependant, Lugaz (2002) a pu démontrer à travers ces travaux que certains êtres humains présentaient une anosmie à l'acide glutamique dû à des variations génétiques interindividuelles. Bien que le panel de l'étude de Franceschi et al (2023) ait montré une différence, elle semble être minime (50 % des participants l'ont perçue). Il serait donc pertinent de vérifier, avec le panel utilisé pendant l'étude, si l'augmentation de la concentration en acide glutamique dans les vins permettrait à un plus grand nombre de personnes de percevoir la différence. Cela permettrait de déterminer si la limite observée est liée aux compétences du panel ou à des facteurs génétiques propres à chaque individu.

L'étude de Glu dans le goût des vins est particulièrement intéressante pour mieux comprendre un effet sur les perceptions gustatives encore méconnue qui pourrait être qualifiée de 6^{ème} saveur : le Kokumi. L'effet Kokumi est souvent qualifié par les termes de « richesse de goût » ou de « plénitude ». Cette

saveur est associée à un tripeptide appelé γ -Glutamyl-Valyl-Glycine, qui n'a pas été retrouvé dans les vins mais seulement dans la bière (Miyamura et al., 2015). En revanche, un autre tripeptide peut être responsable de cette saveur : le glutathion (γ -Glu-Val-Gly). Il est naturellement présent sous forme réduite dans les raisins. Il s'accumule à partir de la véraison pour atteindre une concentration de quelques milligrammes par litre jusqu'à 100 mg.L^{-1} dans les moûts (Kritzinger et al., 2013). Les vins blancs peuvent en contenir jusqu'à 70 mg.L^{-1} (Fracassetti et al., 2011). De nombreux facteurs jouent sur cette dernière concentration : le cépage, le statut azoté des vignes, la souche de levures employées, les itinéraires de vinification plus ou moins réducteurs, les niveaux de SO_2 . Son rôle sur la saveur des vins n'a jamais été étudié pourtant il contient dans sa séquence le Glu, connu pour être un exhausteur de goût. Étant donné que les molécules Kokumi n'ont pas de saveur propre mais peuvent rehausser le goût de certains aliments, une question se pose : connaissant le rôle de Glu en tant qu'exhausteur de goût, est-il également impliqué dans un effet Kokumi potentiel dans les vins blancs ?

Si la contribution des acides aminés aux perceptions gustatives sur les vins du Sud-Ouest a été étudiée, qu'en est-il du rôle des macromolécules ? Le deuxième axe de cette thèse s'est ainsi concentré sur l'influence de macromolécules sur les différences gustatives des vins blancs. La majorité des macromolécules présentes dans le vin ont fait l'objet de nombreuses études visant à mieux comprendre leur rôle dans la perception en bouche. Cependant, leur analyse reste particulièrement complexe en raison de leur grande taille et de leur diversité structurale. De plus, les interactions délicates, impliquant la formation de complexes supramoléculaires associés à certaines sensations en bouche, telles que l'astringence, rendent cette analyse encore plus difficile.

Dans cette étude, l'AF4 couplée à un système de multidétection (UV-MALS-dRI) a été proposée comme une approche originale permettant de répondre à ces objectifs. De plus, afin de procéder à une discrimination de nos vins par le goût, une évaluation sensorielle a d'abord été mise en œuvre. Cette méthode se différencie des autres approches sensorielles décrites dans la littérature, car elle requiert l'utilisation de pince-nez par les panélistes, leur permettant ainsi de se concentrer exclusivement sur le goût. Cette approche a permis de différencier deux cépages selon leurs caractéristiques gustatives : le COL, qui présente des notes plus acides, et le MZ, qui se distingue par son amertume. Pour mieux

comprendre comment ces différences gustatives se manifestent, le profil macromoléculaire de ces vins a été analysé par AF4. Nos résultats montrent que l'AF4 est un outil performant pour fractionner les macromolécules du vin blanc. Elle nous a permis d'obtenir des profils macromoléculaires très distincts pour les deux cépages. Le fractogramme des vins a été divisé en quatre fractions (F1 – F4). L'utilisation d'un test SDS-page nous a permis d'identifier la majorité des macromolécules présentes dans chaque fraction pour chaque vin. Il a été montré que les cépages COL et MZ présentent des profils macromoléculaires bien distincts. Les vins de COL sont principalement riches en protéines, tandis que les vins de MZ sont caractérisés par des concentrations plus importantes en mannoprotéines et en polysaccharides. Ainsi, les vins élaborés à partir des deux cépages étudiés se distinguent non seulement par leurs propriétés gustatives, révélées par le test PF, mais aussi par leurs profils macromoléculaires, mis en évidence par les analyses. Pour étudier l'impact sur le goût de chacune de ces macromolécules, une ultrafiltration permettant d'éliminer sélectivement les macromolécules identifiées grâce à l'AF4, a été réalisée. La méthode s'est avérée efficace en tant que consensus pour remédier au problème de dégustation en sortie d'AF4. Malgré la perte de matériel inhérente à ce processus, les macromolécules des vins testés semblent influencer leur goût. Cependant, aucune conclusion définitive ne peut être tirée concernant leur rôle précis. La méthode d'UF retenue (altération des vins lors des filtrations (notamment réactions d'oxydation), perte de matériel) ainsi que le manque d'une formation du panel sensoriel peuvent expliquer ces limites. L'utilisation d'un autre matériel d'UF, plus spécifique à l'UF industrielle, ainsi qu'un volume plus important de vin, pourraient pallier l'agrégation des composés sur la membrane. Également, la complexité des interactions entre les macromolécules rend leur isolation particulièrement délicate. L'utilisation d'autres membranes, avec d'autres seuils de coupure plus important que 100 kDa, pourrait être une alternative afin d'isoler certains complexes et d'en étudier le rôle sur les perceptions gustatives.

De plus, le panel pourrait être formé spécifiquement sur les descripteurs retenus, et familiarisé en amont avec l'utilisation du pince-nez. Le recours à d'autres tests sensoriels (méthode CATA, profil conventionnel, ou profil pivot par rapport au vin initial par exemple) pourrait permettre de compléter et d'affiner les résultats obtenus.

Les deux cépages se distinguent par leurs différences de teneur en protéines. L'une des limites de l'AF4 réside dans le fait qu'elle sépare en fonction de la taille, ce qui peut donner lieu à des types variés de protéines ayant des tailles identiques impliquant les mêmes temps de rétention. C'est pourquoi le système AF4-UHPLC a été développé pour séparer les macromolécules par leur taille selon une première dimension et en fonction de leur hydrophobicité selon une deuxième dimension. L'originalité de ce système réside dans l'utilisation de cartouches pour concentrer l'échantillon, évitant ainsi toute perte de ce dernier. La faisabilité de ce dispositif a été démontrée par l'injection de deux standards. De plus, l'injection de nos vins a permis de générer une carte d'identité spécifique à chacun d'eux. Ce système présente un intérêt considérable pour l'identification de mélanges complexes. Cependant, ces analyses ne fournissent qu'une information qualitative. Pour quantifier chacun de ces composés, différentes concentrations d'un standard tel que la thaumatine pourraient être injectées. La taille des spots obtenus en 2D (pixels) pourrait permettre l'élaboration d'une courbe d'étalonnage. En outre, afin de mieux caractériser ces macromolécules, le système pourrait être amélioré en intégrant un couplage online avec un détecteur de spectrométrie de masse à la sortie du DAD, par exemple.

En résumé, cette étude a fourni de nouvelles informations sur le rôle des acides aminés dans le goût des vins blancs. L'approche sensorielle, centrée exclusivement sur le goût, ainsi que l'utilisation de l'AF4, ont permis de discriminer les cépages du Sud-Ouest en fonction de leur profil macromoléculaire. De plus, l'intégration d'un système innovant couplant l'AF4 à l'UHPLC s'avère prometteuse pour offrir des indications complémentaires à une analyse AF4 traditionnelle.

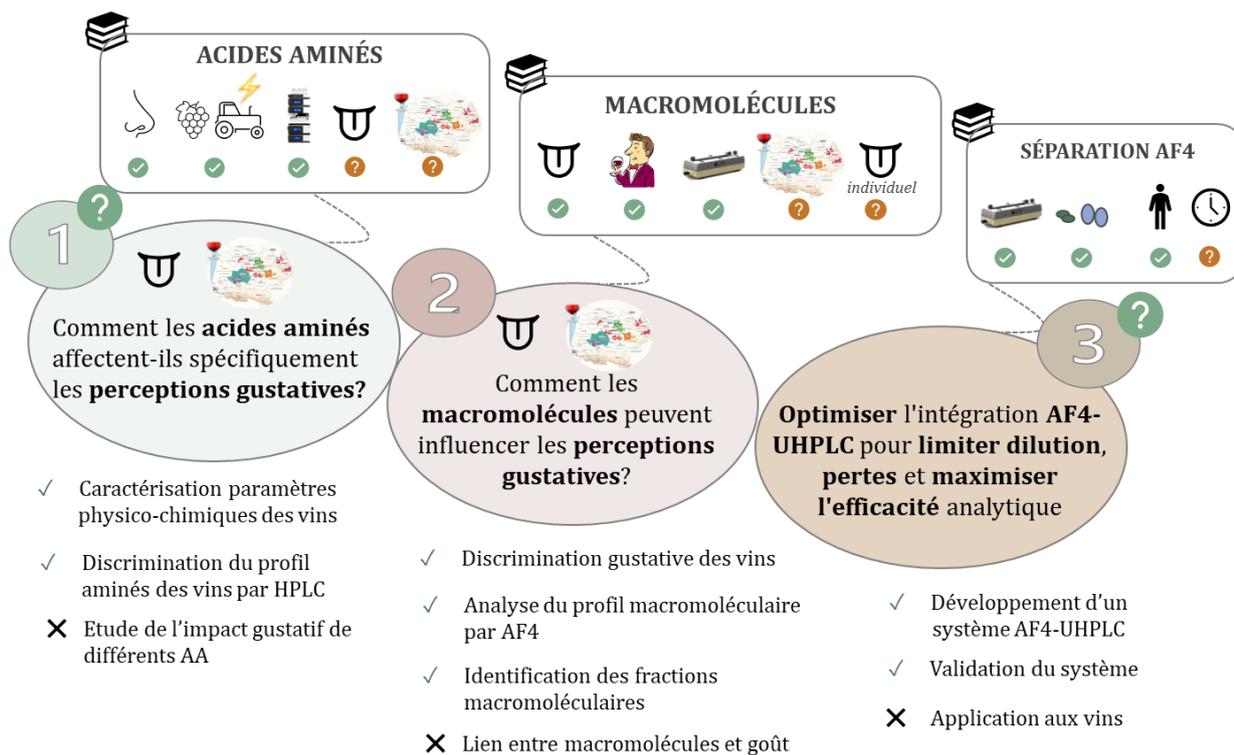


Figure 40: Synthèse des travaux réalisés au cours de la thèse

Source : Figure réalisée par l'auteurice

Littérature citée

- Acree, T. E., Atema, J., Bardach, J. E., Bartoshuk, L. M., Beidler, L. M., Benjamin, R. M., Bradley, R. M., Bujas, Z., Burton, H., Cole, L. P., Farbman, A. I., Guth, L., Kalmus, H., Kare, M., Kurihara, K., McBurney, D. H., Murray, R. G., Nachman, M., Pfaffmann, C., ... Beidler, L. M. (1971). *Taste*. Springer Berlin Heidelberg.
- 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)
- Agreste.(2023).*Saa_2010-2022_definitives_donnees_vigne_vin_occitanie_22385.xlsx*.
draaf.occitanie.agriculture.gouv.fr
- ALQtaishat, N., Saleh, M., Al-Ismaïl, K., & Abu Ghoush, M. (2022). Effects of sodium chloride partial substitution with bitterness-treated potassium and magnesium chloride on some properties of white-brined cheese. *International Journal of Dairy Technology*, *75*(3), 668-678.
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12867>
- Anglade, P., & Puisais, J. (Éds.). (1987). *Vins & vignobles de France*. Savour Club : Larousse.
- Aradhya, M., Koehmstedt, A., Prins, B. H., Dangl, G. S., & Stover, E. (2008). Genetic structure, differentiation, and phylogeny of the genus vitis : implications for genetic conservation. *Acta Horticulturae*, *799*, 43-49.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.799.4>
- Badoud, R., Löliger, J., Etournaud, A., & Bauer, W. J. (2010). *Science et technologie des aliments principes de chimie des constituants et de technologie des procédés*. Presses polytechniques romandes.
- 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>

- Bauer, R., Nieuwoudt, H., Bauer, F. F., Kossmann, J., Koch, K. R., & Esbensen, K. H. (2008). *For Grape and Wine Analysis*.
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry*, 36(18), 5566-5577.
<https://doi.org/10.1021/bi9700328>
- Beckett, Ronald., Jue, Zhang., & Giddings, J. Calvin. (1987). Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation. *Environmental Science & Technology*, 21(3), 289-295.
<https://doi.org/10.1021/es00157a010>
- Bélanger, J. M. R., Jocelyn Paré, J. R., & Sigouin, M. (1997). Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC) : Principles and applications. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* (Vol. 18, p. 37-59). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80011-X](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80011-X)
- Bell, S.-J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Belloir, C., Neiers, F., & Briand, L. (2017). Sweeteners and sweetness enhancers. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 20(4), 279-285.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000377>
- Berg, C. P. (1953). Physiology of the D-Amino Acids. *Physiological Reviews*, 33(2), 145-189.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1953.33.2.145>
- Birlouez-Aragon, I. (2008). La réaction de Maillard dans les aliments : Quels enjeux pour la santé humaine ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 43(6), 289-295.
[https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(08\)75570-6](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(08)75570-6)
- Boulet, J.-C., Trarieux, C., Souquet, J.-M., Ducasse, M.-A., Caillé, S., Samson, A., Williams, P., Doco, T., & Cheynier, V. (2016). Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols,

- oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency. *Food Chemistry*, *190*, 357-363.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.062>
- Bouzas-Cid, Y., Díaz-Losada, E., Trigo-Córdoba, E., Falqué, E., Orriols, I., Garde-Cerdán, T., & Mirás-Avalos, J. M. (2018). Effects of irrigation over three years on the amino acid composition of Albariño (*Vitis vinifera* L) musts and wines in two different terroirs. *Scientia Horticulturae*, *227*, 313-325.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.005>
- Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., Doco, T., De Freitas, V., & Soares, S. (2017). The role of wine polysaccharides on salivary protein-tannin interaction : A molecular approach. *Carbohydrate Polymers*, *177*, 77-85.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.075>
- Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., Doco, T., De Freitas, V., & Soares, S. (2020). Inhibition Mechanisms of Wine Polysaccharides on Salivary Protein Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(10), 2955-2963.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06184>
- Brandão, E., Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2014). In Vivo Interactions between Procyanidins and Human Saliva Proteins : Effect of Repeated Exposures to Procyanidins Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(39), 9562-9568.
<https://doi.org/10.1021/jf502721c>
- Braun, P. C. (1999). *Nutrient uptake by Candida albicans : The influence of cell surface mannoproteins*. 45.
- Bredie, W. L. P., Liu, J., Dehlholm, C., & Heymann, H. (2018). Flash Profile Method. In S. E. Kemp, J. Hort, & T. Hollowood (Éds.), *Descriptive Analysis in Sensory Evaluation* (1^{re} éd., p. 513-533). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781118991657.ch14>
- Brockhoff, A., Behrens, M., Massarotti, A., Appendino, G., & Meyerhof, W. (2007). Broad Tuning of the Human Bitter Taste Receptor hTAS2R46 to Various Sesquiterpene Lactones, Clerodane and

- Labdane Diterpenoids, Strychnine, and Denatonium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6236-6243.
<https://doi.org/10.1021/jf070503p>
- Brondel, L., Jacquin, A., Meillon, S., & Pénicaud, L. (2013). Le goût : Physiologie, rôles et dysfonctionnements. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 27(3), 123-133.
<https://doi.org/10.1016/j.nupar.2013.06.002>
- Bruwer, F. A., Du Toit, W., & Buica, A. (2019). Nitrogen and Sulphur Foliar Fertilisation. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 40(2).
<https://doi.org/10.21548/40-2-3281>
- Burin, V. M., Caliarì, V., & Bordignon-Luiz, M. T. (2016). Nitrogen compounds in must and volatile profile of white wine : Influence of clarification process before alcoholic fermentation. *Food Chemistry*, 202, 417-425.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.096>
- Callejón, R. M., Troncoso, A. M., & Morales, M. L. (2010). Determination of amino acids in grape-derived products : A review. *Talanta*, 81(4-5), 1143-1152.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.040>
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006). Influence of Wine Pectic Polysaccharides on the Interactions between Condensed Tannins and Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8936-8944.
<https://doi.org/10.1021/jf061835h>
- Casamayor, P. (2006). *La dégustation*. Hachette Pratique.
<https://books.google.fr/books?id=ULcWWdRxMT0C>
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 992-1002.
<https://doi.org/10.1021/jf062800k>
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2000). T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell*, 100(6), 703-711.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80706-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80706-0)

Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M.

P. (2002). Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1593-1601.

<https://doi.org/10.1021/jf010897z>

Chen, L., Capone, D. L., Nicholson, E. L., & Jeffery, D. W. (2019). Investigation of intraregional variation, grape amino acids, and pre-fermentation freezing on varietal thiols and their precursors for *Vitis vinifera* Sauvignon blanc. *Food Chemistry*, 295, 637-645.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.126>

Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>

Cheyrier, V., & Sarni-Manchado, P. (2010). Wine taste and mouthfeel. In *Managing Wine Quality* (p. 29-72). Elsevier.

<https://doi.org/10.1533/9781845699284.1.30>

Choi, J., Zielke, C., Nilsson, L., & Lee, S. (2017). Characterization of the molar mass distribution of macromolecules in beer for different mashing processes using asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) coupled with multiple detectors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(19), 4551-4558.

<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0393-8>

Choné, X., Lavigne-Cruège, V., Tominaga, T., Van Leeuwen, C., Castagnède, C., Saucier, C., & Dubourdiou, D. (2006). Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: Flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis vinifera* L. Cv Sauvignon blanc grape juice. *OENO One*, 40(1), 1.

<https://doi.org/10.20870/oenone.2006.40.1.880>

Coelho, C., Parot, J., Gonsior, M., Nikolantonaki, M., Schmitt-Kopplin, P., Parlanti, E., & Gougeon, R. D. (2017). Asymmetrical flow field-flow fractionation of white wine chromophoric colloidal matter. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(10), 2757-2766.

- <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0221-1>
- Cosme, F., Fernandes, C., Ribeiro, T., Filipe-Ribeiro, L., & Nunes, F. M. (2020). White Wine Protein Instability : Mechanism, Quality Control and Technological Alternatives for Wine Stabilisation—An Overview. *Beverages*, *6*(1), 19.
<https://doi.org/10.3390/beverages6010019>
- Coupland, J. N., & Hayes, J. E. (2014). Physical Approaches to Masking Bitter Taste : Lessons from Food and Pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research*, *31*(11), 2921-2939.
<https://doi.org/10.1007/s11095-014-1480-6>
- Cretin, B. N., Dubourdieu, D., & Marchal, A. (2018). Influence of ethanol content on sweetness and bitterness perception in dry wines. *LWT*, *87*, 61-66.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.075>
- Curioni, A., Vincenzi, S., & Flamini, R. (2008). Proteins and Peptides in Grape and Wine. In R. Flamini (Éd.), *Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry* (1^{re} éd., p. 249-287). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9780470754320.ch7>
- Dawid, C., & Hofmann, T. (2012). Identification of Sensory-Active Phytochemicals in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(48), 11877-11888.
<https://doi.org/10.1021/jf3040868>
- De La Presa-Owens, C., Lamuela-Raventos, R. M., Buxaderas, S., & De La Torre-Boronat, M. C. (1995). Differentiation and Grouping Characteristics of Varietal Grape Musts from Penedès Region (I). *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*(3), 283-291
<https://doi.org/10.5344/ajev.1995.46.3.283>
- Delompré, T., Guichard, E., Briand, L., & Salles, C. (2019). Taste Perception of Nutrients Found in Nutritional Supplements : A Review. *Nutrients*, *11*(9), 2050.
<https://doi.org/10.3390/nu11092050>
- Deng, S., Zhang, G., Olayemi Aluko, O., Mo, Z., Mao, J., Zhang, H., Liu, X., Ma, M., Wang, Q., & Liu, H. (2022). Bitter and astringent substances in green tea : Composition, human perception mechanisms, evaluation methods and factors influencing their formation. *Food Research International*, *157*, 111262.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111262>

Di Lecce, G., Arranz, S., Jáuregui, O., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P., & Lamuela-Raventós, R.

M. (2014). Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, *145*, 874-882.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.115>

Dietzen, D. J. (2018). Amino Acids, Peptides, and Proteins. In *Principles and Applications of Molecular Diagnostics* (p. 345-380). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816061-9.00013-8>

Doco, T., & Brillouet, J.-M. (1993). Isolation and characterisation of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, *243*(2), 333-343.

[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)87037-S](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)87037-S)

Dournes, G., Verbaere, A., Lopez, F., Dufourcq, T., Mouret, J. -R., & Roland, A. (2022). First characterisation of thiol precursors in Colombard and Gros Manseng : Comparison of two cultivation practices. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *28*(3), 492-499.

<https://doi.org/10.1111/ajgw.12547>

Drewnowski, A. (2009). The Science and Complexity of Bitter Taste. *Nutrition Reviews*, *59*(6), 163-169.

<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb07007.x>

Dufourcq, T., Davaux, F., Charrier, F., Pou, P., & Schneider, R. (2010). *La fertilisation foliaire en azote de la vigne et ses conséquences sur la composition des mouts et des vins*.

Espinase Nandorfy, D., Watson, F., Likos, D., Siebert, T., Bindon, K., Kassara, S., Shellie, R., Keast, R., & Francis, I. L. (2022). Influence of amino acids, and their interaction with volatiles and polyphenols, on the sensory properties of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *28*(4), 621-637.

<https://doi.org/10.1111/ajgw.12564>

Esteves, M. A., & Manso Orgaz, M. D. (2001). The influence of climatic variability on the quality of wine. *International Journal of Biometeorology*, *45*(1), 13-21.

<https://doi.org/10.1007/s004840000075>

- Etiévant, P., Schlich, P., Bouvier, J., Symonds, P., & Bertrand, A. (1988). Varietal and geographic classification of French red wines in terms of elements, amino acids and aromatic alcohols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45(1), 25-41.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740450105>
- Euillat, M. F. (s. d.). *L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne II. Evolution des macromolécules : Polysaccharides et protéines.*
- Fang, F., Li, J.-M., Zhang, P., Tang, K., Wang, W., Pan, Q.-H., & Huang, W.-D. (2008). Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. *Food Research International*, 41(1), 53-60.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.09.004>
- Faus, I., & Sisniega, H. (2003). Sweet-tasting Proteins. In A. Steinbüchel (Éd.), *Biopolymers Online* (1^{re} éd.). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol8008>
- Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2001). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 12(7), 230-239.
[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00080-2)
- Filippo D'Antuono, L., Ferioli, F., & Manco, M. A. (2016). The impact of sesquiterpene lactones and phenolics on sensory attributes : An investigation of a curly endive and escarole germplasm collection. *Food Chemistry*, 199, 238-245.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.002>
- Fincher, G. B., Stone, B. A., & Clarke, A. E. (1983). Arabinogalactan-Proteins : Structure, Biosynthesis, and Function. *Annual Review of Plant Physiology*, 34(1), 47-70.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.000403>
- Flores, J. H., Heatherbell, D. A., & McDaniel, M. R. (1990). Ultrafiltration of Wine : Effect of Ultrafiltration on White Riesling and Gewürztraminer Wine Composition and Stability. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(3), 207-214.
<https://doi.org/10.5344/ajev.1990.41.3.207>

- 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>
- Fracassetti, D., Lawrence, N., Tredoux, A. G. J., Tirelli, A., Nieuwoudt, H. H., & Du Toit, W. J. (2011). Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food Chemistry*, *128*(4), 1136-1142.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.001>
- Franceschi, D., Lomolino, G., Sato, R., Vincenzi, S., & De Iseppi, A. (2023). Umami in Wine : Impact of Glutamate Concentration and Contact with Lees on the Sensory Profile of Italian White Wines. *Beverages*, *9*(2), 52.
<https://doi.org/10.3390/beverages9020052>
- Frankel, C. (2013). *Guide des cépages et des terroirs*. Delachaux et Niestlé.
- Garde-Cerdán, T., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., & Santamaría, P. (2014). Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers. *Food Chemistry*, *163*, 136-141.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.101>
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Research International*, *54*(2), 1844-1858.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
- 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>
- Gawel, R., Smith, P. A., Cicerale, S., & Keast, R. (2018). The mouthfeel of white wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(17), 2939-2956.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1346584>

- Gawel, R., Smith, P. A., & Waters, E. J. (2016). Influence of polysaccharides on the taste and mouthfeel of white wine : Effect of polysaccharides on white wine mouthfeel. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(3), 350-357.
<https://doi.org/10.1111/ajgw.12222>
- Gawel, R., Van Sluyter, S. C., Smith, P. A., & Waters, E. J. (2013). Effect of pH and Alcohol on Perception of Phenolic Character in White Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(4), 425-429.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13016>
- Gekko, K., Ohmae, E., Kameyama, K., & Takagi, T. (1998). Acetonitrile-protein interactions : Amino acid solubility and preferential solvation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1387(1-2), 195-205.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00121-6)
- Gerwig, G. J., Te Poele, E. M., Dijkhuizen, L., & Kamerling, J. P. (2016). Stevia Glycosides. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 73, p. 1-72). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/bs.accb.2016.05.001>
- Gibbs, B. F., Alli, I., & Mulligan, C. (1996). Sweet and taste-modifying proteins : A review. *Nutrition Research*, 16(9), 1619-1630.
[https://doi.org/10.1016/0271-5317\(96\)00175-3](https://doi.org/10.1016/0271-5317(96)00175-3)
- Gladstones, J. S. (2016). *Viticulture and environment : A study of the effects of environment on grapegrowing and wine qualities, with emphasis on present and future areas for growing winegrape in Australia* (Revised edition). Trivinum Press.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & García-Romero, E. (2007). Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 608-613.
<https://doi.org/10.1021/jf062820m>
- Gonçalves, F., Heyraud, A., De Pinho, M. N., & Rinaudo, M. (2002). Characterization of White Wine Mannoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6097-6101.
<https://doi.org/10.1021/jf0202741>

- Gonçalves, L. M., Grosso Pacheco, J., Jorge Magalhães, P., António Rodrigues, J., & Araújo Barros, A. (2010). Determination of free and total sulfites in wine using an automatic flow injection analysis system with voltammetric detection. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(2), 175-180.
<https://doi.org/10.1080/19440040903261547>
- Grainger, K., & Tattersall, H. (2005). *Wine production : Vine to bottle*. Blackwell Pub.
- Grosch, W. (2001). Evaluation of the Key Odorants of Foods by Dilution Experiments, Aroma Models and Omission. *Chemical Senses*, 26(5), 533-545.
<https://doi.org/10.1093/chemse/26.5.533>
- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2007). Polysaccharide Profile and Content during the Vinification and Aging of Tempranillo Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10720-10728.
<https://doi.org/10.1021/jf0716782>
- Guadalupe, Z., Martínez-Pinilla, O., Garrido, Á., Carrillo, J. D., & Ayestarán, B. (2012). Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chemistry*, 131(1), 367-374.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.049>
- Gutiérrez-Gamboa, G., Carrasco-Quiroz, M., Martínez-Gil, A. M., Pérez-Álvarez, E. P., Garde-Cerdán, T., & Moreno-Simunovic, Y. (2018). Grape and wine amino acid composition from Carignan noir grapevines growing under rainfed conditions in the Maule Valley, Chile: Effects of location and rootstock. *Food Research International*, 105, 344-352.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.021>
- Gutiérrez-Gamboa, G., Diez-Zamudio, F., Stefanello, L. O., Tassinari, A., & Brunetto, G. (2022). Application of foliar urea to grapevines: Productivity and flavour components of grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 28(1), 27-40.
<https://doi.org/10.1111/ajgw.12515>

- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Portu, J., Moreno-Simunovic, Y., & Martínez-Gil, A. M. (2017). Foliar nitrogen application in Cabernet Sauvignon vines : Effects on wine flavonoid and amino acid content. *Food Research International*, *96*, 46-53.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.025>
- Habschied, K., Košir, I. J., Krstanović, V., Kumrić, G., & Mastanjević, K. (2021). Beer Polyphenols—Bitterness, Astringency, and Off-Flavors. *Beverages*, *7*(2), 38.
<https://doi.org/10.3390/beverages7020038>
- Herbert, P., Barros, P., Ratola, N., & Alves, A. (2000). HPLC Determination of Amino Acids in Musts and Port Wine Using OPA/FMOC Derivatives. *Journal of Food Science*, *65*(7), 1130-1133.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10251.x>
- Hinnewinkel, J.-C., & Lavaud, S. (Éds.). (2009). *Vignobles et vins en Aquitaine : Images et identités d'hier et d'aujourd'hui*. Maison des sciences de l'homme d'Aquitaine.
- Hsu, J. C., Heatherbell, D. A., Flores, J. H., & Watson, B. T. (1987). Heat-Unstable Proteins in Grape Juice and Wine. II. Characterization and Removal by Ultrafiltration. *American Journal of Enology and Viticulture*, *38*(1), 17-22. <https://doi.org/10.5344/ajev.1987.38.1.17>
- Ikeda, K. (s. d.). *College of Science, Imperial University of Tokyo, Tokyo, Japan*.
- International Organization for Standardization (ISO)*. (2021). *4120:2021 Sensory Analysis-Methodology-Triangle Test*
- International Organization for Standardization (ISO)*. (2016). *13299 - Sensory Analysis - Flash Profile*
- Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(2), 461-467.
<https://doi.org/10.1128/aem.61.2.461-467.1995>
- 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>

- Jones-Moore, H. R., Jelley, R. E., Marangon, M., & Fedrizzi, B. (2021). The polysaccharides of winemaking: From grape to wine. *Trends in Food Science & Technology*, *111*, 731-740.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.019>
- Jones-Moore, H. R., Jelley, R. E., Marangon, M., & Fedrizzi, B. (2022). The interactions of wine polysaccharides with aroma compounds, tannins, and proteins, and their importance to winemaking. *Food Hydrocolloids*, *123*, 107150.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107150>
- Kelly, M., Gill Giese, W., Velasco-Cruz, C., Lawson, L., Ma, S., Wright, M., & Zoecklein, B. (2017). Effect of foliar nitrogen and sulfur on petit manseng (*Vitis vinifera* L.) grape composition. *Journal of Wine Research*, *28*(3), 165-180.
<https://doi.org/10.1080/09571264.2017.1324774>
- Kim, M.-J., Yoo, S.-H., Kim, Y., & Hong, J.-H. (2016). Relative sweetness and sweetness quality of phyllooludcin [(3R)-8-Hydroxy-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one]. *Food Science and Biotechnology*, *25*(4), 1065-1072.
<https://doi.org/10.1007/s10068-016-0172-x>
- Kliewer, W. M. (1969). Free Amino Acids and Other Nitrogenous Substances of Table Grape Varieties. *Journal of Food Science*, *34*(3), 274-278.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1969.tb10341.x>
- Kliewer, W. M. (1970). Free Amino Acids and Other Nitrogenous Fractions in Wine Grapes. *Journal of Food Science*, *35*(1), 17-21.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1970.tb12358.x>
- Klosse, P. (2013). *Umami* in wine. *Research in Hospitality Management*, *2*(1-2), 25-28.
<https://doi.org/10.1080/22243534.2013.11828287>
- Koch, Thomas., & Giddings, J. Calvin. (1986). High-speed separation of large (>1 .mu.m) particles by steric field-flow fractionation. *Analytical Chemistry*, *58*(6), 994-997.
<https://doi.org/10.1021/ac00297a003>
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., & Du Toit, W. J. (2013). Role of Glutathione in Winemaking : A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(2), 269-277.

- <https://doi.org/10.1021/jf303665z>
- Kurihara, K. (2009). Glutamate : From discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 719S-722S
<https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462D>
- Laaksonen, O., Sandell, M., & Kallio, H. (2010). Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. *European Food Research and Technology*, 231(2), 271-285.
<https://doi.org/10.1007/s00217-010-1278-7>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laffitte, A., Neiers, F., & Briand, L. (2016). Characterization of taste compounds : Chemical structures and sensory properties. In E. Guichard, C. Salles, M. Morzel, & A. Le Bon (Éds.), *Flavour* (1^{re} éd., p. 154-191). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781118929384.ch7>
- Lamikanra, O., & Inyang, I. D. (1988). Temperature Influence on Muscadine Wine Protein Characteristics. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), 113-116.
<https://doi.org/10.5344/ajev.1988.39.2.113>
- Larousse (Éd.). (2021). *Dictionnaire Larousse poche 2022* (Nouvelle éd). Larousse dictionnaires.
- Le Bourse, D., Conreux, A., Villaume, S., Lameiras, P., Nuzillard, J.-M., & Jeandet, P. (2011). Quantification of chitinase and thaumatin-like proteins in grape juices and wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1541-1549.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-4912-8>
- Li, S., Wang, Z., Ding, F., Sun, D., Ma, Z., Cheng, Y., & Xu, J. (2014). Content changes of bitter compounds in ‘Guoqing No.1’ Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) during fruit development of consecutive 3 seasons. *Food Chemistry*, 145, 963-969.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.040>

- Lindemann, B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413(6852), 219-225.
<https://doi.org/10.1038/35093032>
- Liu, J., Grønbeck, M. S., Di Monaco, R., Giacalone, D., & Bredie, W. L. P. (2016). Performance of Flash Profile and Napping with and without training for describing small sensory differences in a model wine. *Food Quality and Preference*, 48, 41-49.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.08.008>
- Liu, Z., Xu, L., Wang, J., Duan, C., Sun, Y., Kong, Q., & He, F. (2023). Research progress of protein haze in white wines. *Food Science and Human Wellness*, 12(5), 1427-1438.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.02.004>
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines : Role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1), 9-13.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x>
- López-Barajas, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (1998). Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the simple analysis of grape juice and wine polysaccharides. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 339-347.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00640-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00640-2)
- Loughin, T. M. (2006). SAS[®] for Mixed Models, 2nd edition Edited by Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., Wolfinger, R. D., and Schabenberger, O. *Biometrics*, 62(4), 1273-1274.
https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2006.00596_6.x
- Lugaz, O. (2002). A New Specific Ageusia : Some Humans Cannot Taste L-Glutamate. *Chemical Senses*, 27(2), 105-115.
<https://doi.org/10.1093/chemse/27.2.105>
- Mackenzie, D. E., & Christy, A. G. (2005). The role of soil chemistry in wine grape quality and sustainable soil management in vineyards. *Water Science and Technology*, 51(1), 27-37.
<https://doi.org/10.2166/wst.2005.0004>
- Mandl, K., Silhavy-Richter, K., Korntheuer, K., Prinz, M., Patzl-Fischerleitner, E., & Eder, R. (2017). Influence of different yeasts on the amino acid pattern of rosé wine. *BIO Web of Conferences*, 9, 02014.

<https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902014>

Manteau, S., Lambert, B., Jeandet, P., & Legendre, L. (2003). Changes in Chitinase and Thaumatin-like Pathogenesis-Related Proteins of Grape Berries during the Champagne Winemaking Process. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(4), 267-272.

<https://doi.org/10.5344/ajev.2003.54.4.267>

Marangon, M., Sauvage, F.-X., Waters, E. J., & Vernhet, A. (2011). Effects of Ionic Strength and Sulfate upon Thermal Aggregation of Grape Chitinases and Thaumatin-like Proteins in a Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2652-2662.

<https://doi.org/10.1021/jf104334v>

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Haynes, P. A., & Waters, E. J. (2009). Grape and Wine Proteins : Their Fractionation by Hydrophobic Interaction Chromatography and Identification by Chromatographic and Proteomic Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4415-4425.

<https://doi.org/10.1021/jf9000742>

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Waters, E. J., & Menz, R. I. (2014). Structure of Haze Forming Proteins in White Wines : *Vitis vinifera* Thaumatin-Like Proteins. *PLoS ONE*, 9(12), e113757.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113757>

Marassi, V., Casolari, S., Roda, B., Zattoni, A., Reschiglian, P., Panzavolta, S., Tofail, S. A. M., Ortelli, S., Delpivo, C., Blosi, M., & Costa, A. L. (2015). Hollow-fiber flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering investigation of the size, shape and metal-release of silver nanoparticles in aqueous medium for nano-risk assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 92-99.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.031>

Marassi, V., Marangon, M., Zattoni, A., Vincenzi, S., Versari, A., Reschiglian, P., Roda, B., & Curioni, A. (2021). Characterization of red wine native colloids by asymmetrical flow field-flow fractionation with online multidetection. *Food Hydrocolloids*, 110, 106204.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106204>

- Martin, D., Grose, C., Fedrizzi, B., Stuart, L., Albright, A., & McLachlan, A. (2016). Grape cluster microclimate influences the aroma composition of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, 210, 640-647.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.010>
- Martínez-Pinilla, O., Guadalupe, Z., Hernández, Z., & Ayestarán, B. (2013). Amino acids and biogenic amines in red varietal wines : The role of grape variety, malolactic fermentation and vintage. *European Food Research and Technology*, 237(6), 887-895.
<https://doi.org/10.1007/s00217-013-2059-x>
- Masa, A., Vilanova, M., & Pomar, F. (2007). Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1164(1-2), 291-297.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.058>
- Maul, E., & Töpfer, R. (2015). *Vitis* International Variety Catalogue (V IVC) : A cultivar database referenced by genetic profiles and morphology. *BIO Web of Conferences*, 5, 01009.
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20150501009>
- Mazur, R. H. (1976). Aspartame-a sweet surprise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2(1), 243-249.
<https://doi.org/10.1080/15287397609529429>
- McKinnon, A. (s. d.). *The Impact of Amino Acids on Growth Performance and Major Volatile Compound Formation by Industrial Wine Yeast*.
- Meister, A. (1965). *Biochemistry of the amino acids : Volume II*. Academic Press.
- Météofrance.(2020). *Bilan climatique de l'automne 2020*.
https://meteofrance.fr/sites/meteofrance.fr/files/files/editorial/bilan_definitif_automne_2020_141220.pdf
- Météofrance.(2021).Année2021-2epartie.
https://meteofrance.fr/sites/meteofrance.fr/files/files/editorial/2_Bilan_annuel_2021_200122.pdf

- Miele, A., Carbonneau, A., & Bouard, J. (2000). Free amino acids of leaves and berries of Cabernet Sauvignon grapevines. *OENO One*, *34*(1), 19.
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2000.34.1.1014>
- Mierczynska-Vasilev, A., Vasilev, A., Reilly, T., Bindon, K., & Vasilev, K. (2022). Fluorescence sensing technology for the rapid detection of haze-forming proteins in white wine. *Food Chemistry*, *374*, 131770.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131770>
- Mirás-Avalos, J. M., Bouzas-Cid, Y., Trigo-Córdoba, E., Orriols, I., & Falqué, E. (2020). Amino Acid Profiles to Differentiate White Wines from Three Autochthonous Galician Varieties. *Foods*, *9*(2), 114.
<https://doi.org/10.3390/foods9020114>
- Miyamura, N., Iida, Y., Kuroda, M., Kato, Y., Yamazaki, J., Mizukoshi, T., & Miyano, H. (2015). Determination and quantification of kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, in brewed alcoholic beverages. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(3), 311-314.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.018>
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*(2), 85-118.
<https://doi.org/10.1080/10408690490911710>
- Monteiro, S., Piçarra-Pereira, M. A., Mesquita, P. R., Loureiro, V. B., Teixeira, A., & Ferreira, R. B. (2001). The Wide Diversity of Structurally Similar Wine Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(8), 3999-4010.
<https://doi.org/10.1021/jf0013914>
- Moreira, J. L., & Santos, L. (2004). Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, *513*(1), 263-268.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.029>
- Noble, A. C. (1994). Bitterness in wine. *Physiology & Behavior*, *56*(6), 1251-1255.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90373-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90373-5)

- Nollet, L. M. L., & Toldrá, F. (2013). *Food analysis by HPLC* (3rd ed). CRC press.
- Nurgel, C., & Pickering, G. (2005). Contribution of glycerol, ethanol and sugar to the perception of viscosity and density elicited by model white wines. *Journal of Texture Studies*, 36(3), 303-323.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2005.00018.x>
- Oberholster, A., Francis, I. L., Iland, P. G., & Waters, E. J. (2009). Mouthfeel of white wines made with and without pomace contact and added anthocyanins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(1), 59-69.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00038.x>
- Okuda, T., Fukui, M., Takayanagi, T., & Yokotsuka, K. (2006). Characterization of Major Stable Proteins in Chardonnay Wine. *Food Science and Technology Research*, 12(2), 131-136.
<https://doi.org/10.3136/fstr.12.131>
- Olneo, S. H. A., & Kardono, B. S. (1993). Selligueain a, a novel highly sweet proanthocyanidin from the rhizomes of *Selligoua feez*”. *Journal of Natural Products*, 9.
- Organisation internationale de la Vigne et du Vin. (2022)
- Osorio-Macías, D. E., Bolinsson, H., Linares-Pastén, J. A., Ferrer-Gallego, R., Choi, J., Peñarrieta, J. M., & Bergenståhl, B. (2022). Characterization on the impact of different clarifiers on the white wine colloids using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *Food Chemistry*, 381, 132123.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132123>
- Osorio-Macías, D. E., Song, D., Thuvander, J., Ferrer-Gallego, R., Choi, J., Peñarrieta, J. M., Nilsson, L., Lee, S., & Bergenståhl, B. (2020). Fractionation of Nanoparticle Matter in Red Wines Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(49), 14564-14576.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07251>
- Padiglia, A., Orrù, R., Boroumand, M., Olianias, A., Manconi, B., Sanna, M. T., Desiderio, C., Iavarone, F., Liori, B., Messina, I., Castagnola, M., & Cabras, T. (2018). Extensive Characterization of the Human Salivary Basic Proline-Rich Protein Family by Top-Down Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 17(9), 3292-3307.

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00444>

Pascotto, K., Cheynier, V., Williams, P., Geffroy, O., & Violleau, F. (2020). Fractionation and characterization of polyphenolic compounds and macromolecules in red wine by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A*, *1629*, 461464.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461464>

Pascotto, K., Leriche, C., Caillé, S., Violleau, F., Boulet, J.-C., Geffroy, O., Levasseur-Garcia, C., & Cheynier, V. (2021). Study of the relationship between red wine colloidal fraction and astringency by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multi-detection. *Food Chemistry*, *361*, 130104.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130104>

Paup, V. D., Cook-Barton, T., Diako, C., Edwards, C. G., & Ross, C. F. (2021). Detection of Red Wine Faults over Time with Flash Profiling and the Electronic Tongue. *Beverages*, *7*(3), 52.

<https://doi.org/10.3390/beverages7030052>

Pellerin, P., Doco, T., Vida, S., Williams, P., Brillouet, J.-M., & O'Neill, M. A. (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, *290*(2), 183-197.

[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00139-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00139-5)

Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J.-M. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, *277*(1), 135-143.

[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00206-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00206-9)

Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2012). S-Cysteinylylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. *Food Chemistry*, *131*(1), 1-13.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.079>

Peng, Z., Pocock, K. F., Waters, E. J., Francis, I. L., & Williams, P. J. (1997). Taste Properties of Grape (*Vitis vinifera*) Pathogenesis-Related Proteins Isolated from Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(12), 4639-4643.

<https://doi.org/10.1021/jf970194a>

- Pereira, G. E., Gaudillere, J.-P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. (2006). Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of Grape Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6765-6775.
<https://doi.org/10.1021/jf061013k>
- Pérez-Álvarez, E. P., Martínez-Vidaurre, J. M., García-Escudero, E., & Garde-Cerdán, T. (2019). *Amino acids content in « Tempranillo » must from three soil types over four vintages*.
- Pianet, I., André, Y., Ducasse, M.-A., Tarascou, I., Lartigue, J.-C., Pinaud, N., Fouquet, E., Dufourc, E. J., & Laguerre, M. (2008). Modeling Procyanidin Self-Association Processes and Understanding Their Micellar Organization: A Study by Diffusion NMR and Molecular Mechanics. *Langmuir*, 24(19), 11027-11035.
<https://doi.org/10.1021/la8015904>
- Pickering, G. J., & Demiglio, P. (2008). The White Wine Mouthfeel Wheel: A Lexicon for Describing the Oral Sensations Elicited by White Wine. *Journal of Wine Research*, 19(1), 51-67.
<https://doi.org/10.1080/09571260802164038>
- Podzimek, S. (2011). *Light scattering, size exclusion chromatography, and asymmetric flow field flow fractionation: Powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles*. Wiley.
- Poncet-Legrand, C., Cartalade, D., Putaux, J.-L., Cheynier, V., & Vernhet, A. (2003). Flavan-3-ol Aggregation in Model Ethanol Solutions: Incidence of Polyphenol Structure, Concentration, Ethanol Content, and Ionic Strength. *Langmuir*, 19(25), 10563-10572.
<https://doi.org/10.1021/la034927z>
- Portu, J., López, R., López-Alfaro, I., González-Arenzana, L., Santamaría, P., & Garde-Cerdán, T. (2014). Amino acid content in red wines obtained from grapevine nitrogen foliar treatments: Consumption during the alcoholic fermentation. *Wine Studies*, 3(1).
<https://doi.org/10.4081/ws.2014.4475>
- Pozo-Bayón, M. Á., Hernández, M. T., Martín-Álvarez, P. J., & Polo, M. C. (2003). Study of Low Molecular Weight Phenolic Compounds during the Aging of Sparkling Wines Manufactured

- with Red and White Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2089-2095.
<https://doi.org/10.1021/jf021017z>
- Rambaldi, D. C., Reschiglian, P., & Zattoni, A. (2011). Flow field-flow fractionation : Recent trends in protein analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(4), 1439-1447.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-4312-5>
- Rao, A. B., Reddy, G. R., Ernala, P., Sridhar, S., & Ravikumar, Y. V. L. (2012). An improvised process of isolation, purification of steviosides from *S tevia rebaudiana* B ertoni leaves and its biological activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(12), 2554-2560.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03134.x>
- Rapp, A., & Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In *Developments in Food Science* (Vol. 37, p. 1659-1694). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80257-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80257-8)
- Redgwell, R. J., Schmitt, C., Beaulieu, M., & Curti, D. (2005). Hydrocolloids from coffee : Physicochemical and functional properties of an arabinogalactan–protein fraction from green beans. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 1005-1015. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.010>
- Reed, D. R., Tanaka, T., & McDaniel, A. H. (2006). Diverse tastes : Genetics of sweet and bitter perception. *Physiology & Behavior*, 88(3), 215-226.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.033>
- Reinmuth-Selzle, K., Tchipilov, T., Backes, A. T., Tscheuschner, G., Tang, K., Ziegler, K., Lucas, K., Pöschl, U., Fröhlich-Nowoisky, J., & Weller, M. G. (2022). Determination of the protein content of complex samples by aromatic amino acid analysis, liquid chromatography-UV absorbance, and colorimetry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(15), 4457-4470.
<https://doi.org/10.1007/s00216-022-03910-1>
- Reschiglian, P., Roda, B., Zattoni, A., Tanase, M., Marassi, V., & Serani, S. (2014). Hollow-fiber flow field-flow fractionation with multi-angle laser scattering detection for aggregation studies of therapeutic proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(6), 1619-1627.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7462-4>

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2020). *Handbook of Enology : The Microbiology of Wine and Vinifications* (1^{re} éd.). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/0470010363>
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2020). *Handbook of Enology—Vol 2—The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. Wiley. DOI:10.1002/0470010398
- Rinaldi, A., Gambuti, A., & Moio, L. (2012). Precipitation of Salivary Proteins After the Interaction with Wine : The Effect of Ethanol, pH, Fructose, and Mannoproteins. *Journal of Food Science*, 77(4).
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02639.x>
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine—Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*.
- Robinson, A. L., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2014). Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(1), 1-24.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12070>
- Robinson, J., Harding, J., & Vouillamoz, J. F. (2012). *Wine grapes : A complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours*. Allen Lane.
- Rodrigues, A., Ricardo-Da-Silva, J. M., Lucas, C., & Laureano, O. (2012). Effect of commercial mannoproteins on wine colour and tannins stability. *Food Chemistry*, 131(3), 907-914.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.075>
- Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J. L., Martínez Gascueña, J., & García Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 687-693.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.003>
- Rodriguez-Lovelle, B., & Gaudillère, J.-P. (2002). Carbon and nitrogen partitioning in either fruiting or non-fruiting grapevines : Effects of nitrogen limitation before and after veraison. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8(2), 86-94.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2002.tb00216.x>

Roudot-Algaron, F. (1996). Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines : Exemple de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines. *Le Lait*, 76(4), 313-348.

<https://doi.org/10.1051/lait:1996425>

Runyon, J. R., Ulmius, M., & Nilsson, L. (2014). A perspective on the characterization of colloids and macromolecules using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 25-33.

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

Agreste.(2023).*Saa_2010-2022_definitives_donnees_vigne_vin_occitanie_22385.xlsx*.

draaf.occitanie.agriculture.gouv.fr

Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., & Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(4), 377-381.

[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)

Sádecká, J., & Jakubíková, M. (2020). Varietal classification of white wines by fluorescence spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*, 57(7), 2545-2553.

<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04291-y>

Sádecká, J., Jakubíková, M., & Májek, P. (2018). Fluorescence spectroscopy for discrimination of botrytized wines. *Food Control*, 88, 75-84.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.033>

Sarmiento, M. R., Oliveira, J. C., Slatner, M., & Boulton, R. B. (2001). Comparative quantitative analysis of the effect of cultivar, wine growing region and vinification method on the protein profiles of some white wines. *International Journal of Food Science and Technology*.

Sarmiento, M. R., Oliveiraz, J. C., Slatner, M., & Boulton, R. B. (2001). Effect of Ion-Exchange Adsorption on the Protein Profiles of White Wines. *Food Science and Technology International*, 7(3), 217-224.

<https://doi.org/10.1106/7FA5-Q9QF-VN8Y-AQ5D>

- Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2002). Study of non-covalent complexation between catechin derivatives and peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 37(6), 609-616.
<https://doi.org/10.1002/jms.321>
- Sartor, S., Burin, V. M., Caliarì, V., & Bordignon-Luiz, M. T. (2021). Profiling of free amino acids in sparkling wines during over-lees aging and evaluation of sensory properties. *LWT*, 140, 110847.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110847>
- Sauvage, F.-X., Bach, B., Moutounet, M., & Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines : Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118(1), 26-34.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.080>
- Schaan, K., & Hughes, P. (2024). A comparison of free amino nitrogen and yeast-assimilable nitrogen measurement methods for use in alcoholic fermentation of whey. *Journal of Dairy Science*, 107(9), 6592-6601.
<https://doi.org/10.3168/jds.2023-24324>
- Schiffman, S. S., & Dackis, C. (1975). Taste of nutrients : Amino acids, vitamins, and fatty acids. *Perception & Psychophysics*, 17(2), 140-146.
<https://doi.org/10.3758/BF03203878>
- Schiffman, S. S., & Sennewald, K. (s. d.). *Comparison of Taste Qualities and Thresholds of D- and L-Amino Acids I*.
- Schimpf, M. E., Caldwell, K., & Giddings, J. C. (Éds.). (2000). *Field-flow fractionation handbook*. Wiley-Interscience.
- Schlienger, J.-L., & Monnier, L. (2014). Histoire du goût sucré : Entre morale et plaisir. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 8(3), 346-351.
[https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(14\)70820-X](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(14)70820-X)
- Scollary, G. R., Pásti, G., Kállay, M., Blackman, J., & Clark, A. C. (2012). Astringency response of red wines : Potential role of molecular assembly. *Trends in Food Science & Technology*, 27(1), 25-36.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.05.002>

- Seeber, R., Sferlazzo, G., Leardi, R., Dalla Serra, A., & Versini, G. (1991). Multivariate data analysis in classification of musts and wines of the same variety according to vintage year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(10), 1764-1769.
<https://doi.org/10.1021/jf00010a014>
- Serra Bonvehí, J., & Ventura Coll, F. (2000). Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 210(3), 189-195.
<https://doi.org/10.1007/PL00005510>
- Shallenberger, R. S., & Acree, T. E. (1971). Chemical Structure of Compounds and Their Sweet and Bitter Taste. In L. M. Beidler (Éd.), *Taste: Vol. 4 / 2* (p. 221-277). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-65245-5_12
- Skogerson, K., Runnebaum, R., Wohlgemuth, G., De Ropp, J., Heymann, H., & Fiehn, O. (2009). Comparison of Gas Chromatography-Coupled Time-of-Flight Mass Spectrometry and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Metabolite Identification in White Wines from a Sensory Study Investigating Wine Body. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6899-6907.
<https://doi.org/10.1021/jf9019322>
- Smith, A. M., & McSweeney, M. B. (2019). Partial projective mapping and ultra-flash profile with and without red light : A case study with white wine. *Journal of Sensory Studies*, 34(5), e12528.
<https://doi.org/10.1111/joss.12528>
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2020). Tannins in Food : Insights into the Molecular Perception of Astringency and Bitter Taste. *Molecules*, 25(11), 2590.
<https://doi.org/10.3390/molecules25112590>
- Soares, S., Ferrer-Gallego, R., Brandão, E., Silva, M., Mateus, N., & Freitas, V. D. (s. d.). Contribution of human oral cells to astringency by binding salivary proteins/tannins complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Solms, J., Vuataz, L., & Egli, R. H. (1965). The taste of α-amino acids. *Experientia*, 21(12), 692-694.

<https://doi.org/10.1007/BF02138474>

- Soriano, A., Pérez-Juan, P. M., Vicario, A., González, J. M., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, *104*(3), 1295-1303.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.011>
- Soufleros, Barrios, M.-L., & Bertrand, A. (1998). Correlation Between the Content of Biogenic Amines and Other Wine Compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, *49*(3), 266-278.
<https://doi.org/10.5344/ajev.1998.49.3.266>
- Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C., & Biliaderis, C. G. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry*, *80*(2), 261-273.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00271-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00271-6)
- Stephan, A., & Steinhart, H. (2000). Bitter taste of unsaturated free fatty acids in emulsions : Contribution to the off-flavour of soybean lecithins. *European Food Research and Technology*, *212*(1), 17-25.
<https://doi.org/10.1007/s002170000216>
- Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Høj, P. B., & Heeswijck, R. (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards : Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *6*(2), 150-158.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00174.x>
- Strous, G. J., & Dekker, J. (1992). Mucin-Type Glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *27*(1-2), 57-92.
<https://doi.org/10.3109/10409239209082559>
- Suciu, R.-C., Zarbo, L., Guyon, F., & Magdas, D. A. (2019). Application of fluorescence spectroscopy using classical right angle technique in white wines classification. *Scientific Reports*, *9*(1), 18250.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54697-8>

- Swartz, M. (2010). HPLC DETECTORS : A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130-1150.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Teranishi, R., Buttery, R. G., & Shahidi, F. (Éds.). (1989). *Flavor Chemistry : Trends and Developments* (Vol. 388). American Chemical Society.
<https://doi.org/10.1021/bk-1989-0388>
- Tügel, I., Runyon, J. R., Gómez Galindo, F., & Nilsson, L. (2015). Analysis of polysaccharide and proteinaceous macromolecules in beer using asymmetrical flow field-flow fractionation : Analysis of macromolecules in beer using AF4. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(1), 44-48.
<https://doi.org/10.1002/jib.195>
- Vahl, J. M., Converse, J. E., Collaborators:, Andreasen, A. A., Barnett, J. H., Bence, J. G., Caputi, A., Cherolis, J. A., Cofran, D., Dowrie, R., Dyer, R. H., Fike, S. A., Finley, R. G., Grorud, R. B., Hanson, R., Jacobs, D., Johnson, A., Jones, J. C., Kipp, W. H., ... Rice, A. C. (1980). Ripper Procedure for Determining Sulfur Dioxide in Wine : Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 63(2), 194-199.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/63.2.194>
- Van Leeuwen, C. (2010). Soils and Terroir Expression in Wines. In E. R. Landa & C. Feller (Éds.), *Soil and Culture* (p. 453-465). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-2960-7_28
- Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., & Marangon, M. (2015). Wine Protein Haze : Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4020-4030.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00047>
- Vasconcelos, A. M. P., & Das Neves, H. J. C. (1990). HRGC of wine free amino acids as a tool for elementary wine characterization. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13(7), 494-498.
<https://doi.org/10.1002/jhrc.1240130710>

- Vernhet, A., Dubascoux, S., Cabane, B., Fulcrand, H., Dubreucq, E., & Poncet-Legrand, C. (2011). Characterization of oxidized tannins : Comparison of depolymerization methods, asymmetric flow field-flow fractionation and small-angle X-ray scattering. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1559-1569.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5076-2>
- Vernhet, A., Meistermann, E., Cottureau, P., Charrier, F., Chemardin, P., & Poncet-Legrand, C. (2020). Wine Thermosensitive Proteins Adsorb First and Better on Bentonite during Fining : Practical Implications and Proposition of Alternative Heat Tests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13450-13458.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00094>
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15(3), 209-217.
[https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00059-4)
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564-573.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.1394>
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, 85(4), 519-525.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00084-0)
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine : Total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439-447.
[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00152-8)
- Vilanova, M., Siebert, T. E., Varela, C., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2012). Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the

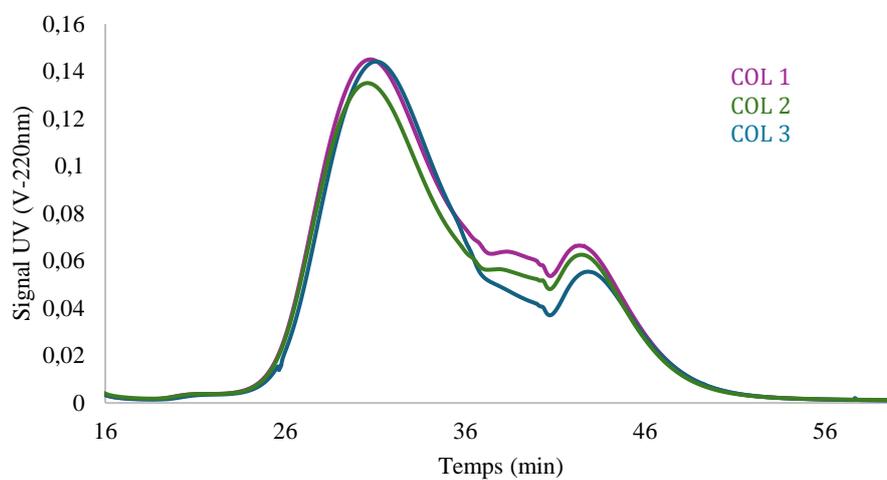
- aromatic grape variety Albariño. *Food Chemistry*, 133(1), 124-131.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.082>
- Vilela, A. (2016). Wine phenolics : Looking for a smooth mouthfeel. *Journal of Food Science and Technology*, 1(1).
- Vitrac, X., Monti, J.-P., Vercauteren, J., Deffieux, G., & Mérillon, J.-M. (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 103-110.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01498-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01498-2)
- Wan, M., Wang, M., Zhao, Y., Deng, H., Tan, C., Lin, S., Kong, Y., Tong, Y., & Meng, X. (2021). Extraction of mannoprotein from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of its chemical composition and molecular structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2252-2259.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.057>
- Waters, E. J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K. F., Colby, C., O'Neill, B. K., Høj, P. B., & Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 215-225.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00289.x>
- Waters, E. J., Wallace, William., Tate, M. E., & Williams, P. J. (1993). Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(5), 724-730.
<https://doi.org/10.1021/jf00029a009>
- Xagoraris, M., Revelou, P.-K., Arvanitis, N., Basalekou, M., Pappas, C. S., & Tarantilis, P. A. (2021). The application of right-angle fluorescence spectroscopy as a tool to distinguish five autochthonous commercial Greek white wines. *Current Research in Food Science*, 4, 815-820.
<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.11.003>
- Yohannes, G., Wiedmer, S. K., Hiidenhovi, J., Hietanen, A., & Hyötyläinen, T. (2007). Comprehensive Two-Dimensional Field-Flow Fractionation-Liquid Chromatography in the Analysis of Large Molecules. *Analytical Chemistry*, 79(8), 3091-3098. <https://doi.org/10.1021/ac062169m>

YOSHIDA, M., & SAITO, S. (1969). MULTIDIMENSIONAL SCALING OF THE TASTE OF AMINO ACIDS. *Japanese Psychological Research*, *11*(4), 149-166.
<https://doi.org/10.4992/psycholres1954.11.149>

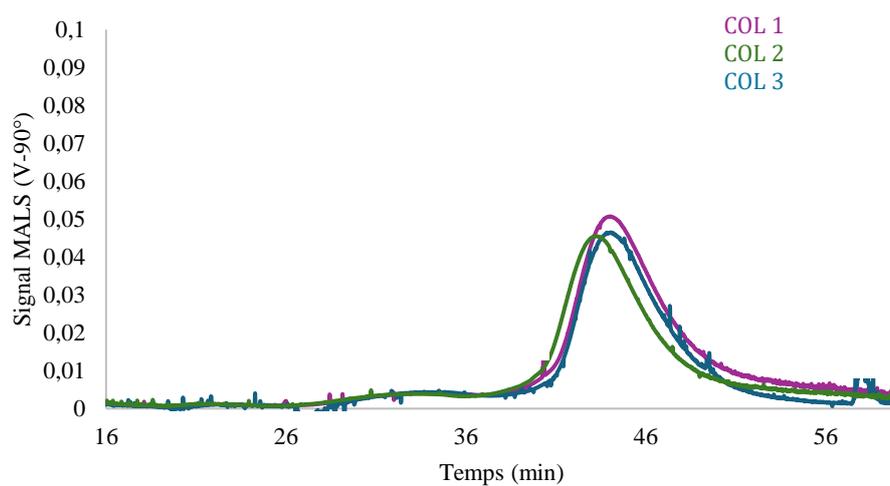
Annexe 1.A

Fractogrammes AF4 : (a) détecteur UV, (b) détecteur MALS et (c) détecteur dRI, pour les vins COL (COL 1,2 et 3)

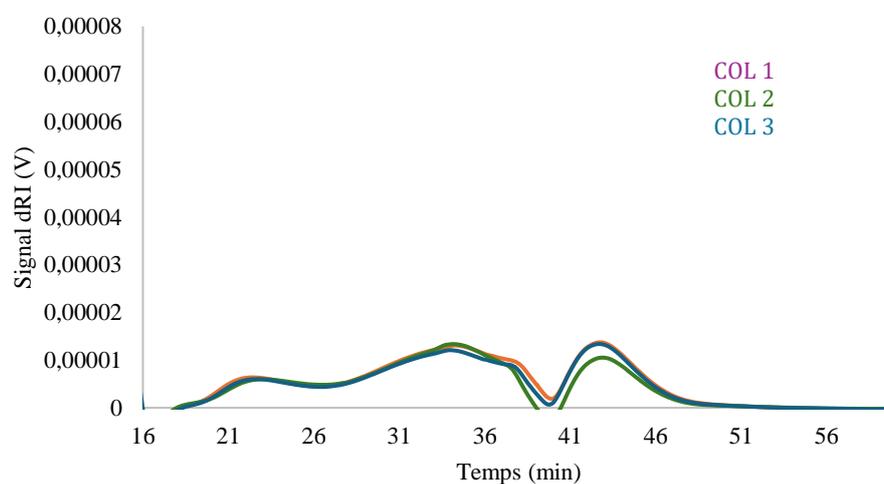
(a) Détecteur UV



(b) Détecteur MALS

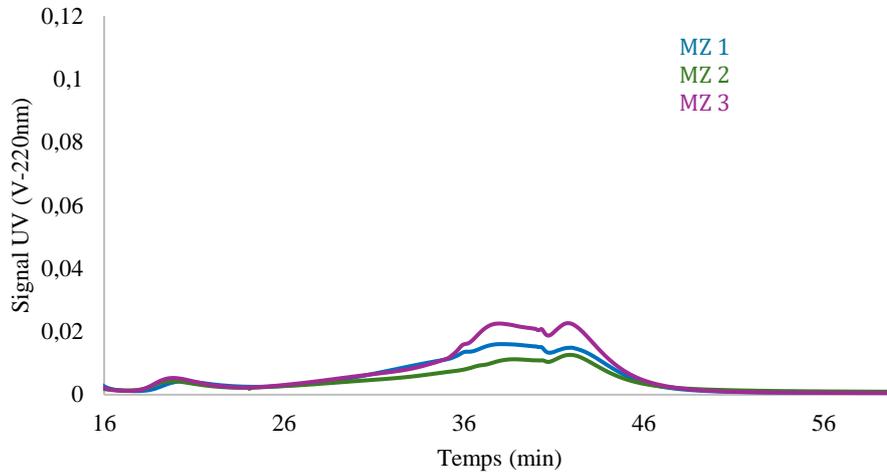
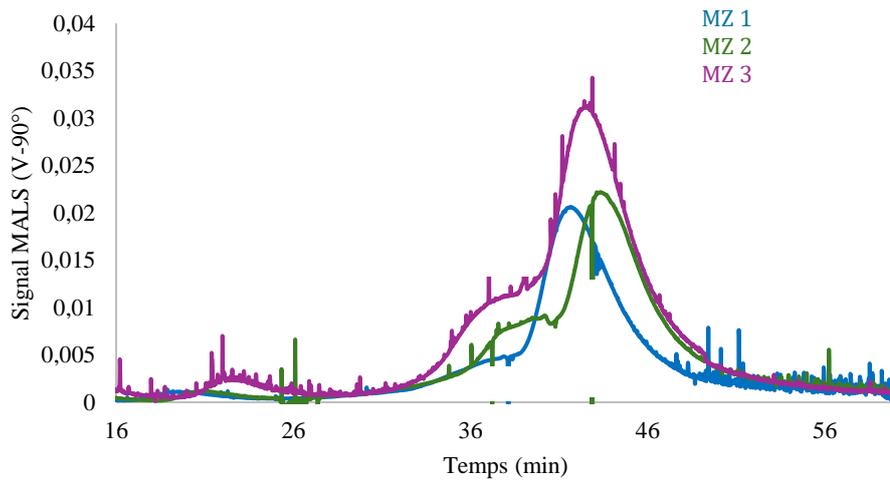
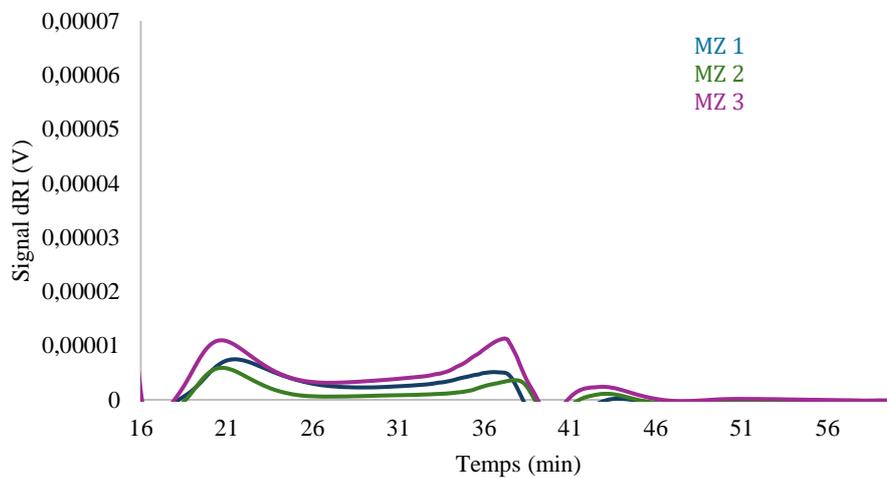


(c) Détecteur dRI



Annexe 1.B

Fractogrammes AF4 : (a) détecteur UV, (b) détecteur MALS et (c) détecteur dRI, pour les vins MZ (MZ 1,2 et 3).

(a) Détecteur UV**(b) Détecteur MALS****(c) Détecteur dRI**

Titre : Rôle des acides aminés et macromolécules dans les perceptions gustatives de vins blancs issus de quatre cépages du Sud-Ouest de la France: analyses chimiques et sensorielles croisées

Mots clés : Acides aminés, Macromolécules, Vins blancs, AF4, Goût

Résumé : La diversité des terroirs et le savoir-faire des vificateurs confèrent aux vins du Sud-Ouest une identité sensorielle unique. Le vin, matrice complexe, est composé de multiples molécules influençant ses perceptions gustatives et olfactives. Si les acides aminés sont connus pour être des précurseurs de molécules volatiles telles que les thiols, contribuant à l'arôme des vins, leur rôle sur les perceptions gustatives reste peu étudié. À l'inverse, les macromolécules telles que les protéines, polyphénols et polysaccharides sont reconnues pour moduler le goût, particulièrement dans les vins rouges. Cependant, leur taille et leur diversité structurale rendent leur analyse complexe.

En raison du nombre limité d'études portant sur les cépages du Sud-Ouest, ce travail de thèse avait pour premier objectif de comprendre comment les acides aminés, reconnus pour leur influence sur les perceptions sensorielles d'autres aliments, impactent le goût des vins blancs du Sud-Ouest en prenant l'exemple de quatre cépages autochtones : le Len de l'el, le Mauzac, le Colombard et le Gros Manseng. Les résultats montrent que les profils aminés des vins obtenus par HPLC varient selon les cépages, avec des concentrations différenciées en proline et en acide glutamique, influençant ainsi les perceptions gustatives. La proline, en particulier, semble accroître la sensation de sucrosité dans les vins blancs, mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer son rôle.

Dans un second temps, le rôle des macromolécules, telles que les protéines, polyphénols et polysaccharides, a été étudié afin de mieux comprendre les différences gustatives des vins blancs du Sud-Ouest. Le défi consistait à sélectionner les vins exclusivement selon leurs propriétés gustatives, grâce à l'utilisation d'un pince-nez. Il s'agissait également d'adopter une approche analytique adaptée à la complexité de cette matrice : l'AF4. Nos résultats ont révélé des différences significatives entre les cépages Colombard et Mauzac, avec des compositions dominées respectivement par des protéines et mannoprotéines pour les vins de Colombard, et des mannoprotéines et polysaccharides pour les vins de Mauzac. Pour évaluer l'impact spécifique de ces macromolécules sur le goût, l'ultrafiltration a été employée. Les fractions obtenues ont ensuite été soumises à la dégustation par un panel entraîné. Toutefois, leur rôle spécifique sur les perceptions gustatives n'a pas été établi de façon exhaustive en raison des nombreuses limites inhérentes aux méthodes d'analyse retenues.

La teneur en protéines de ces deux cépages les distingue l'un par rapport à l'autre, mais l'AF4 présente une limite en ne séparant les macromolécules que par taille, entraînant l'élution simultanée de composés de même taille. Pour surmonter cet écueil, un système AF4-UHPLC permettant une séparation en deux dimensions : la taille (AF4) et l'hydrophobicité (UHPLC), a été développé. Ce dispositif novateur, évitant la perte d'échantillons grâce à l'utilisation de cartouches a été validé puis a permis de générer une carte d'identité spécifique pour chaque vin. Toutefois, ces analyses sont qualitatives, et un étalonnage via des standards serait nécessaire pour une quantification précise. L'amélioration future pourrait inclure un couplage avec un détecteur de spectrométrie de masse.

Title: The Role of Amino Acids and Macromolecules in the Taste Perception of White Wines from Four Grape Varieties of Southwest France: A Cross-Analysis of Chemical and Sensory Data

Key words: Amino acids, Macromolecules, White wines, AF4, Taste

Abstract: The diversity of terroirs and the expertise of winemakers give the wines of Southwest France a unique sensory identity. Wine, a complex matrix, is composed of multiple molecules that influence its gustatory and olfactory perceptions. While amino acids are known to be precursors of volatile molecules, such as thiols, which contribute to the aroma of wines, their role in gustatory perceptions remains little studied. Conversely, macromolecules such as proteins, polyphenols, and polysaccharides are recognized for modulating taste, particularly in red wines. However, their size and structural diversity make their analysis complex.

Due to the limited number of studies focused on grape varieties from Southwest France, the primary objective of this thesis was to understand how amino acids, known for their influence on the sensory perceptions of other foods, affect the taste of white wines from Southwest France, using four indigenous grape varieties as examples: Len de l'el, Mauzac, Colombard, and Gros Manseng. The results show that the amino acid profiles of the wines obtained by HPLC vary according to the grape variety, with differentiated concentrations of proline and glutamic acid, thus influencing gustatory perceptions. Proline, in particular, seems to enhance the sensation of sweetness in white wines, but further studies are needed to confirm its role.

In a second phase, the role of macromolecules, such as proteins, polyphenols, and polysaccharides, was studied to better understand the gustatory differences of white wines from Southwest France. The challenge was to select wines exclusively based on their gustatory properties, using a nose clip. It was also essential to adopt an analytical approach suited to the complexity of this matrix: AF4. Our results revealed significant differences between Colombard and Mauzac wines, with compositions dominated respectively by proteins and mannoproteins for Colombard wines, and mannoproteins and polysaccharides for Mauzac wines. To evaluate the specific impact of these macromolecules on taste, ultrafiltration was used. The fractions obtained were then subjected to tasting by a trained panel. However, their specific role in gustatory perceptions was not exhaustively established due to numerous limitations inherent in the analytical methods used.

The protein content of these two grape varieties distinguishes one from the other, but AF4 has a limitation in only separating macromolecules by size, leading to the simultaneous elution of similarly sized compounds. To overcome this issue, an AF4-UHPLC system allowing two-dimensional separation—size (AF4) and hydrophobicity (UHPLC)—was developed. This innovative device, which avoids sample loss through the use of cartridges, was validated and allowed for the generation of a specific identity map for each wine. However, these analyses remain qualitative, and calibration with standards would be necessary for accurate quantification. A future improvement could include coupling with a mass spectrometry detector.