

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1770

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie et Santé

Option : Œnologie

Présentée et soutenue publiquement le 3 décembre 2010

par

Maria NIKOLANTONAKI

Née le 25 décembre 1981 à Héraklion, Grèce

**Incidence de l'oxydation des composés phénoliques sur
la composante aromatique des vins blancs**

Membres du jury

M. Jorge Ricardo da SILVA, Professeur de l'Université de Lisbonne	Rapporteur
Mme Ana ESCUDERO, Professeur de l'Université de Saragosse	Rapporteur
M. Stéphane QUIDEAU, Professeur de l'Université de Bordeaux 1	Examineur
M. Pierre-Louis TEISSEDRE, Professeur de l'Université V. Segalen Bordeaux 2	Examineur
M. Philippe DARRIET, Professeur de l'Université V. Segalen Bordeaux 2	Directeur de thèse

A la mémoire de mon père,
A ma mère et à ma sœur "unique"

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Œnologie Générale de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux, sous la direction du Professeur Philippe DARRIET. Je le remercie de m'avoir confié ce sujet passionnant, de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenue tout au long de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère et profonde reconnaissance.

Monsieur Stéphane QUIDEAU, Professeur de l'Université Bordeaux 1, m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse et je lui en suis très reconnaissante.

Monsieur Jorge Ricardo da SILVA, Professeur de l'Université de Lisbonne, a bien voulu faire partie de ce jury en tant que rapporteur. Je l'en remercie très vivement.

Madame Ana ESCUDERO, Professeur à l'Université de Zaragoza, m'a fait l'honneur de participer comme rapporteur à ce jury. Je l'en remercie.

Monsieur Pierre-Louis TEISSEDE, Professeur de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, a également accepté d'examiner ce travail et je l'en remercie. Merci aussi pour son implication dans ce travail.

Monsieur Michaël JOURDES, Maître de conférences de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, a contribué de manière décisive à ce travail. Je le remercie très chaleureusement pour son investissement personnel et ses innombrables conseils en chimie.

J'ai une pensée pour Monsieur Takatoshi TOMINAGA qui m'a enseigné son précieux savoir-faire dans la recherche des thiols volatils et qui s'était investi dans mon travail.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier du Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux, auquel j'exprime toute ma reconnaissance.

Je remercie toute l'équipe du Laboratoire d'Œnologie Générale qui m'a aidée et soutenue. J'adresse des remerciements particuliers à Cécile THIBON et Alexandre PONS. Sans leur présence, leurs conseils, leur attention et leurs encouragements, je ne crois pas que j'aurai surmonté certaines épreuves et réussi à terminer ce travail. Qu'ils trouvent ici l'assurance de ma profonde reconnaissance.

De même, merci à Monique PONS pour son aide et son soutien tout au long de ces trois années de recherches et à Christian POUPOT pour ses nombreux conseils techniques et sa disponibilité.

Merci à Kentaro SHINODA, chercheur de la société Suntory, d'être arrivé "à temps", de m'avoir supportée et tant aidée au cours de cette dernière année.

Mes remerciements vont aussi à tous les étudiants, stagiaires, personnels administratifs et scientifiques de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux que j'ai côtoyé au cours de ces trois années de thèse. Je remercie particulièrement les membres du Laboratoire de Chimie Appliquée. Leur aide, leur présence et leur disponibilité m'ont été précieuses et je tiens à les assurer de ma profonde sympathie.

J'adresse toute ma gratitude aux nombreux acteurs de la filière viti-vinicole qui nous ont permis de progresser dans ces travaux de recherches.

Enfin, je remercie mes "familles d'accueil" en France, la famille CROCHET, la famille LACAMPAGNE et la famille PONS, de m'avoir initiée à la magie de la culture française tout au long de mon séjour dans ce magnifique pays. Je leur en suis infiniment reconnaissante.

Sommaire

SOMMAIRE	I
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
INTRODUCTION	1
1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1 Les thiols volatils du vin	5
1.2 La chimie des thiols	10
1.2.1 L'Oxydabilité des Thiols.	11
1.2.2 L'Oxydation Radicalaire des Thiols par l'Intermédiaire de la Réaction de Fenton	13
1.2.3 Evolution des Produits d'Oxydation des Thiols	14
1.2.4 La Complexation des Thiols avec les Métaux	16
1.2.5 Les Propriétés Nucléophiles des Thiols et leur Réactivité avec Différents Electrophiles	16
1.3 Les composés phénoliques du raisin et du vin blanc	20
1.3.1 Les Composés Non-Flavonoïdes	20
1.3.2 Les Composés Flavonoïdes	22
1.3.2.1 Les flavonols	24
1.3.2.2 Les flavan-3-ols monomères	26
1.3.2.3 Les polymères des flavan-3-ols	28
1.4 Voies de formation des quinones dans le moût et le vin	31
1.4.1 Oxydation Enzymatique	32
1.4.1.1 Enzymes catalysant l'oxydation des polyphénols	32
1.4.1.2 Substrats de la polyphénoloxydase du raisin	35
1.4.2 Réactions d'Oxydoréduction Couplées	35
1.4.3 Oxydation Chimique	37
1.4.3.1 Les agents d'oxydation	37
1.4.3.2 Les processus d'oxydation chimique	39

1.4.3.3 Le rôle clé des métaux	39
1.4.3.4 Les principaux antioxydants	41
1.4.3.5 Les produits secondaires de l'oxydation et leur impact sur l'arôme du vin	44
1.5 Mécanismes réactionnels des thiols volatils avec les composés phénoliques	48
1.5.1 Découvertes Empiriques et Observations Scientifiques Acquisées	48
1.5.2 Mécanisme Proposé	53
2 MATERIELS ET METHODES	54
2.1 Analyses des composés volatils	54
2.1.1 Techniques d'Extraction	54
2.1.1.1 Extraction non sélective des composés odorants	54
2.1.1.2 Extraction non-sélective des furanones et des aldéhydes	54
2.1.1.3 Extraction non-sélective des esters éthyliques d'acides gras, acétates d'alcools supérieurs et des alcools en C6	55
2.1.1.4 Extraction sélective des thiols volatils	55
2.1.2 Fractionnement d'Extraits Organiques par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	56
2.1.2.1 Conditions chromatographiques	56
2.1.2.2 Extraction des fractions	57
2.1.3 Analyse du 3,3'-disulfanediyldihexan-1-ol (disulfure du 3SH)	57
2.1.4 Mesure Colorimétrique de la Concentration en Thiols	57
2.1.5 Analyse d'Extraits par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	58
2.1.5.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG-O)	58
2.1.5.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)	58
2.1.5.3 Indices linéaires de rétention	62
2.1.5.4 Dosage des composés volatils par CPG-SM	62
2.2 Analyses des composés non-volatils	63
2.2.1 Protocoles Expérimentaux	63
2.2.1.1 Analyse du précurseur cystéinylé du 3SH	63
2.2.1.2 Analyse du glutathion dans le moût et le vin	64
2.2.1.3 Analyse des quinones	65
2.2.2 Appareillages Utilisés	65
2.2.2.1 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	65
2.2.2.2 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	71
2.2.2.3 Electrophorèse capillaire (EC-LIF)	71

2.2.2.4 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CPG-SM ²)	71
2.2.3 Dosage des Composés Non Volatils	71
2.2.3.1 Par étalonnage externe	71
2.2.3.2 Dosage des adduits par étalonnage interne	72
2.3 Synthèse et caractérisation des différents composés	72
2.3.1 Extraction de la Polyphenoloxydase	72
2.3.2 Synthèse des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et la (+)-Catéchine	72
2.3.3 Synthèse des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et la (-)-Epicatéchine	74
2.3.4 Synthèse de l'Adduit entre le 3-Sulfanylhexanol et l'Acide Caftarique	76
2.3.5 Hémisynthèse des Sulfones de la (+)-Catéchine et de l'Acide Caftarique	78
2.3.6 Hémisynthèse de l'acide 2-S-Glutathionylcaféoyltartrique (GRP)	80
2.4 Analyses œnologiques	80
2.4.1 Analyses Courantes des Moûts et des Vins	80
2.4.2 Dosage de l'Oxygène Dissous dans les Bouteilles Bouchées	81
2.4.3 Dosage du Dioxyde de Soufre Libre	81
2.5 Microvinifications	81
2.6 Tests sensoriels	82
2.6.1 Détermination du Seuil de Perception Olfactive	82
2.7 Analyses statistiques	82
2.8 Produits chimiques employés	84

Première Partie

Etude des mécanismes réactionnels des thiols volatils avec les composés phénoliques

3 REACTIVITE DES THIOLS VOLATILS AVEC LES POLYPHENOLS : IMPACT DE L'OXYGENE, DU FER ET DU DIOXYDE DE SOUFRE	86
3.1 Préparation du milieu réactionnel	86
3.1.1 Préparation des Piluliers	88
3.1.2 Milieu Réactionnel	88
3.1.3 Ajustement du Taux d'Oxygène dans le Milieu Réactionnel	88
3.1.4 Modalités Expérimentales	89

3.2 Réactivité du 3-sulfanylhexanol : Incidence de la présence d'oxygène, de fer et de dioxyde de soufre	91
3.2.1 Influence de la (+)-Catéchine	91
3.2.2 Influence de la (-)-Epicatéchine	97
3.3 Réactivité de la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one : Incidence de la présence d'oxygène, de fer et de dioxyde de soufre	100
3.3.1 Influence de la (+)-Catéchine	100
3.3.2 Influence de la (-)-Epicatéchine	102
3.4 Réactivité du 2-furanméthanethiol : Incidence de la présence d'oxygène, de fer et de dioxyde de soufre	104
3.4.1 Influence de la (+)-Catéchine	104
3.4.2 Influence de la (-)-Épicatéchine	108
3.5 Conclusion	109
4 IDENTIFICATION ET CINÉTIQUE DE FORMATION D'ADDUITS ENTRE THIOL VOLATIL ET COMPOSÉS PHÉNOLIQUES	111
4.1 Synthèse des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (+)-catéchine en milieu modèle	113
4.1.1 Conditions Opératoires de la Synthèse des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et la (+)-Catéchine	113
4.1.2 Analyse et Purification des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et la (-)-Catéchine	113
4.1.3 Analyses Structurales des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et la (+)-Catéchine	115
4.1.3.1 Analyse par CLHP-ESI-SM des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (+)-catéchine	115
4.1.3.2 Analyse par RMN des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (+)-catéchine	117
4.2 Synthèse des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (-)-epicatéchine en milieu modèle	121
4.2.1 Conditions Opératoires de la Synthèse des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et la (-)-Epicatéchine	121
4.2.2 Analyse et Purification des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et la (-)-Epicatéchine	121
4.2.3 Analyses Structurales des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et la (-)-Epicatéchine	123
4.2.3.1 Analyse par CLHP-ESI-SM des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (-)-épicatéchine	123
4.2.3.2 Analyse par RMN des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (-)-épicatéchine	125
4.3 Synthèse des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et l'acide caftarique en milieu modèle	129
4.3.1 Conditions Opératoires de la Synthèse des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et l'Acide Caftarique	129
4.3.2 Analyse et Purification des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et l'Acide Caftarique	131

4.3.3 Analyses Structurales des Adduits entre le 3-Sulfanylhexanol et l'Acide Caftarique	131
4.3.3.1 Analyse par CLHP-ESI-SM de l'adduit entre le 3-sulfanylhexanol et l'acide caftarique	131
4.3.3.2 Analyse par RMN de l'adduit acide 2'-(3''-sulfanylhexanol)-caftarique (Caf2)	131
4.4 Cinétiques de formation des adduits entre les thiols volatils et les composés phénoliques	133
4.4.1 Formation des Adduits de la (+)-Catéchine, de la (-)-Epicatechine, de l'Acide Caftarique avec le 3-Sulfanylhexanol en Conditions d'Oxydation Enzymatique.	135
4.4.1.1 Conditions expérimentales	135
4.4.1.2 Formation des adduits en présence de polyphénoloxydase	135
4.4.1.3 Impact du dioxyde de soufre sur la formation des adduits	138
4.4.2 Formation des Adduits entre la (+)-Catéchine, la (-)-Epicatechine, l'Acide Caftarique et le 3-Sulfanylhexanol en Conditions d'Oxydation Chimique	139
4.4.2.1 Conditions expérimentales	139
4.4.2.2 Formation des adduits en présence d'oxygène	141
4.4.2.3 Impact du dioxyde de soufre sur la formation des adduits	141
4.4.2.4 Impact du fer ferreux sur la formation des adduits	144
4.4.2.5 Impact du fer ferreux et du dioxyde de soufre sur la formation des adduits	145
4.5 Identification des adduits entre les thiols volatils et les composés phénoliques dans le moût	146
4.5.1 Plan Expérimental et Mode Opératoire	146
4.5.2 Identification	149
4.5.3 Cinétique de Formation	153
4.6 Conclusion	153

Seconde Partie

Etude du rôle des flavan-3-ols sur l'évolution aromatique des vins au cours du vieillissement

5 DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES FLAVAN-3-OLS DANS LES MOÛTS ET LES VINS BLANCS	157
5.1 Protocole d'extraction des flavan-3-ols dans le moût blanc	158
5.2 Conditions chromatographiques pour le dosage des flavan-3-ols dans le moût et le vin blanc	160
5.3 Courbes de calibration, répétabilité et sensibilité de la méthode de dosage des flavan-3-ols dans le moût et le vin	162
5.4 Application à l'analyse de moûts et de vins blancs	164

5.5 Conclusion	164
6 IMPACT DES FLAVAN-3-OLS SUR L'EVOLUTION DES TENEURS EN THIOLS VOLATILS ET L'EXPRESSION AROMATIQUE DES VINS BLANCS AU COURS DU VIEILLISSEMENT EN BOUTEILLES	165
6.1 Correlations entre la composition phénolique des vins blancs, leur expression aromatique et leur contenu en thiols volatils. Incidence du vieillissement en bouteilles	167
6.1.1 Discussion	171
6.2 Incidence de l'addition de flavan-3-ols sur l'évolution des teneurs en thiols volatils dans des vins blancs au cours du vieillissement en bouteilles	171
6.2.1 Dispositif Expérimental	171
6.2.1.1 Impact de l'obturateur	177
6.2.2 Discussion	178
6.3 Impact des flavan-3-ols sur la perception sensorielle des vins de Sauvignon	179
6.3.1 Analyse Sensorielle des Vins Supplémentés en Flavan-3-ols au Cours du Vieillissement en Bouteilles	179
6.3.2 Incidence de la Présence de certains Flavan-3-ols sur la Modification de la Perception Sensorielle de Vins de Sauvignon blanc	180
6.3.3 Discussion	182
6.4 Conclusion	183
7 INFLUENCE DE LA PRESENCE DES FLAVAN-3-OLS SUR LA GENESE DES COMPOSES VOLATILS MARQUEURS DU VIEILLISSEMENT OXYDATIF DES VINS BLANCS	185
7.1 Corrélation entre la présence de flavan-3-ols et la teneur en marqueurs du vieillissement oxydatif des vins blancs	188
7.1.1 Etude Descriptive	188
7.1.2 Discussion	192
7.2 Incidence des flavan-3-ols sur la gènese des composés marqueurs du vieillissement défectueux des vins blancs secs	192
7.2.1 Protocole Expérimental	192
7.3 Résultats	194

7.4 Conclusion	195
-----------------------	------------

Troisième Partie

Rôle des flavan-3-ols et de l'oxydation au cours de la vinification sur la composante aromatique des vins

8 INCIDENCE DE LA PRESENCE DES FLAVAN-3-OLS SUR L'EVOLUTION DES THIOLS VOLATILS AU COURS DE LA VINIFICATION	197
--	------------

8.1 Etude des relations entre le contenu des moûts en flavan-3-ols, glutathion et précurseur d'arôme et les teneurs en thiols volatils des vins	198
--	------------

8.1.1 Observations Préliminaires	198
8.1.1.1 Problématique	198
8.1.1.2 Protocole expérimental	200
8.1.1.3 Résultats	200
8.1.2 Etude Exhaustive sur des Mouts et des Vins Blancs, de Diverses Origines et Millésimes	201
8.1.2.1 Origine des moûts et des vins	201
8.1.2.2 Evolution des teneurs en flavan-3-ols, P-S-Cys-3SH et glutathion au cours du pressurage des raisins blancs. Impact sur le contenu en thiols volatils des vins	203
8.1.2.3 Effet du millésime et du cru sur la composition des moûts et des vins	207
8.1.3 Discussion	214

8.2 Impact de la (+)-catéchine des moûts sur la teneur en 3-sulfanylhéxanol des vins	216
---	------------

8.2.1 Etude en Conditions Industrielles	216
8.2.1.1 Protocole expérimental	216
8.2.1.2 Résultats	216
8.2.2 Etude en Conditions Contrôlées	218
8.2.2.1 Protocole Expérimental	218
8.2.2.2 Résultats	221
8.2.3 Discussion	225

8.3 Conclusion	226
-----------------------	------------

9 INFLUENCE DU DEGRE D'OXYDATION DES MOUTS SUR LEUR TENEUR EN FLAVAN-3-OLS ET LA COMPOSITION AROMATIQUE DES VINS	228
---	------------

9.1 Oxydation des moûts. Incidence sur leur composition et les teneurs en thiols volatils des vins	229
---	------------

9.1.1 Principe du Pressurage sous Gaz Neutre	229
9.1.2 Protocole Expérimental	229

9.1.3 Résultats	232
9.2 Effet de l'oxydation sur l'évolution de la teneur en thiols volatils au cours de l'élevage des vins	233
9.3 Oxydation des moûts et profil sensoriel des vins	236
9.3.1 Vins Analysés	237
9.3.2 Protocole Expérimental	237
9.3.3 Etude Descriptive des Fractions Aromatiques	239
9.4 Caractérisation d'un thiol volatil malodorant, l'éthyl-2-sulfanyl acétate, nouveau marqueur associé à l'oxydation des moûts	240
9.4.1 Identification de l'Ethyl-2-sulfanyl acétate	240
9.4.2 Détermination du Seuil de Perception Olfactive de l'Ethyl-2-sulfanyl acétate	242
9.4.3 Validation de la Méthode de Dosage de l'Ethyl-2-sulfanyl acétate dans les Vins	244
9.4.3.1 Conditions analytiques	244
9.4.3.2 Gamme étalon	244
9.4.3.3 Répétabilité, limite de quantification et taux de récupération	244
9.4.4 Contribution de l'Ethyl-2-sulfanyl acétate dans les Vins Blancs et Rosés	246
9.4.5 Incidence du Degré d'Oxydation des Moûts sur le Contenu en Ethyl-2-sulfanyl acétate des Vins	246
9.5 Modifications de la composition de l'arome des vins jeunes selon le degré d'oxydation des moûts	247
9.6 Discussion et Conclusion	249
CONCLUSION GENERALE	251
BIBLIOGRAPHIE	255
VALORISATION DES TRAVAUX DES RECHERCHES	278

Liste des abréviations

Abréviations courantes

2B3MT	2-Butène-3-méthylthiol
2FMT	2-Furanméthanethiol
2M3FT	2-Méthyl-3-furanthiol
2M3SB	2-Méthyl-3-sulfanylbutanol
2M3SP	2-Méthyl-3-sulfanylpropanol
2SE	2-Sulfanyléthanol
2TPT	2-Thiophènethiol
3M3SB	3-Méthyl-3-sulfanylbutanol
3SH	3-Sulfanylhexanol
3SHP	3-Sulfanylheptanol
3SP	3-Sulfanylpropanol
3SPOH	3-Sulfanylpentanol
3SSH	3,3'-disulfanediyldihexan-1-ol
4MSP	4-Méthyl-4-sulfanylpentan-2-one
4MSPOH	4-Méthyl-4-sulfanylpentan-2-ol
A3SH	3-Sulfanylhexyl acétate
A3SP	3-Sulfanylpropyl acétate
ACP	Analyse en composantes principales
AE2S	2-Sulfanyléthyl-acétate
ANOVA	Analyse de la variance
BMT	Benzèneméthanethiol
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CLHP-ESI-SM	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
CLHP-FL	Chromatographie liquide haute performance couplée à la fluorescence
CLHP-UV	Chromatographie liquide haute performance couplée à l'absorption UV visible
COSY	Correlation spectroscopy
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG-MS ²	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem
CPG-O	Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
d	Doublet
d.i.	Diamètre interne
dd	Doublet dédoublé

DPm	Degré de polymérisation moyen
e.f.	Epaisseur de film
E2SA	Ethyl-2-sulfanyl acétate
E2SP	Ethyl-2-sulfanylpropionate
E3SP	Ethyl-3-sulfanylpropionate
EC-LIF	Electrophorèse capillaire fluorescence
ei	Etalon interne
EI	Impact électronique
eq	Equivalent
ES	Erreur standard
et	Ecart type
ET	Ethanethiol
FID	Détection par ionisation de flamme
GRP	2-S-Glutathionylcafeoyltartrique
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
Hs/Hei	Rapport de la hauteur du pic à celui de l'étalon interne
ILR	Indices linéaires de rétention
<i>J</i>	Constante de couplage
<i>m</i>	Massif complexe, multiplet
MT	Methanethiol
PLS	Régression des moindres carrés partielle
PPO	Polyphénoloxydase
P-S-Cys_3SH	Précurseur cystéinylé du 3-sulfanylhexanol
<i>q</i>	Quadruplet
RMN	Résonance magnétique nucléaire
<i>s</i>	Singulet
SIM	Selected ion monitoring
SPE	Extraction en phase solide
<i>t</i>	Triplet
TAV%	Titre alcoométrique volumique à 20°C
TAVP%	Titre alcoométrique volumique probable à 20°C
<i>v</i>	Fréquence
ZO	Zone odorante
δ	Déplacement chimique

Produits chimiques

BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CHES	Acide (cyclohexylamino)-2-éthane-sulfonique
DDT	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1,4-bis-sulfanylbutane-2,3-diol
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
MBB	Monobromobimane
MTBSTFA	N-méthyl-N- (tert-butyl)dimethylsilyl)trifluoroacetamide
<i>p</i> -HMB	<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoate de sodium

Unités internationales

°C	Degré celsius
μA	Microampère
eV	Electron-volt
h, min, s	Heure, minute, seconde
K, g, mg, μg , ng	Kilogramme, gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
kV	Kilovolt
L, mL, μL	Litre, millilitre, microlitre
m, mm, cm, μm , nm	Mètre, millimètre, centimètre, micromètre, nanomètre
M, mM, nM	Mole, millimole, nanomole
m/z	Rapport de la masse sur la charge
mbar	Millibar
NTU	Nephelometric turbidity unit
Pa, kPa	Pascal, kilopascal
ppm	Partie par million
psi	Livre par pouce carré
rpm	Rotation par minute
v/v	Volume pour volume
ε	Coefficient d'extinction moléculaire

Introduction

Le vin est un système dynamique qui évolue à chaque opération de la vinification et de l'élevage. Un des principaux facteurs qui règle l'équilibre de ce système est l'oxygène. En effet, l'oxygène peut influencer la composition et la qualité du moût et du vin. Ainsi, les composés phénoliques, composés majoritaires et essentiels dans les vins, sont très réactifs avec l'oxygène. Cette réactivité, amplifiée par la présence de métaux, peut aussi avoir des conséquences sur les composants de l'arôme des vins, plus ou moins selon leur nature chimique. Par conséquent, l'ensemble des modifications induites sur la matrice du vin par l'oxygène peuvent impacter directement sur la perception de l'arôme. Pour cela, l'oxygène est un facteur clé de la réussite d'un vin. Dans les vins blancs, l'oxygénation doit être réalisée avec soin car elle peut également être à l'origine d'une dégradation irréversible des caractéristiques organoleptiques du vin, en particulier, au cours des opérations préfermentaires de la vinification, pendant l'élevage ou le vieillissement en bouteilles.

Les grands vins blancs secs dits « de garde » présentent cette caractéristique de conserver, malgré d'inévitables étapes d'oxygénation, leurs nuances olfactives de vins jeunes tout en développant des nuances spécifiques propres au cours du vieillissement. Ces nuances aromatiques de vins jeunes dans les vins de Sauvignon blanc rappellent le buis, le genêt, le bourgeon de cassis, le pamplemousse, le fruit de la passion et dans certains cas la fumée ou la viande rôtie. L'arôme caractéristique de ces vins est attribué principalement à la famille chimique des thiols ou mercaptans. Les thiols volatils existent également dans les vins blancs d'autres cépages (Scheurebe, Sémillon, Petit et Gros Manseng, Petite Arvine, Albariño, Parellada, Verdejo, Malvoisie et Koshu) et sont susceptibles de participer à leur arôme (Dubourdieu & Tominaga, 2009). Ces composés peuvent aussi contribuer à certaines nuances de l'arôme des vins rosés, rouges et liquoreux issus de vendanges touchées par la pourriture noble. Les thiols volatils sont des molécules extrêmement odorantes avec un seuil de perception très faible de l'ordre

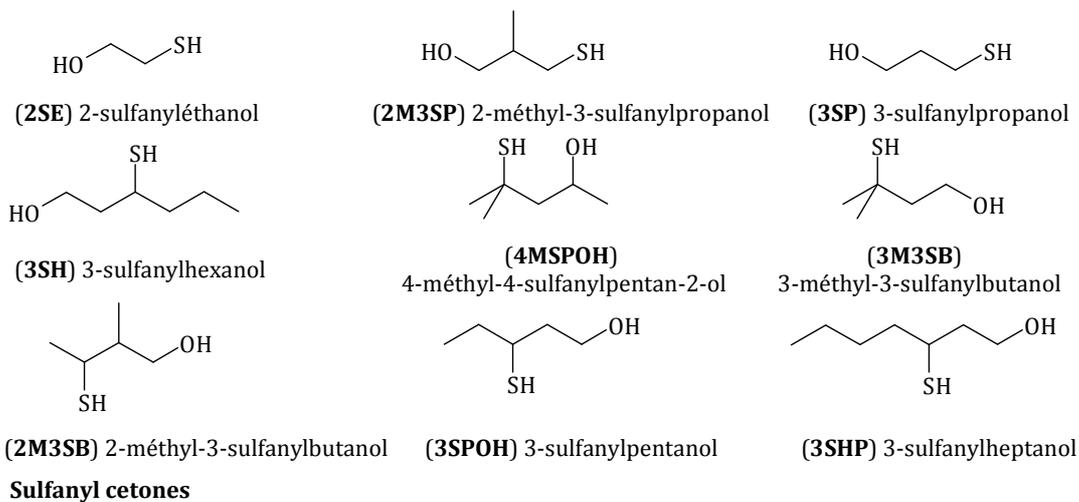
de quelques ng/L. Les thiols volatils peuvent être divisés en deux principaux groupes, en fonction de leur voie de formation. Le premier groupe est composé des thiols volatils libérés à partir de leurs précurseurs inodores au cours de la fermentation alcoolique sous l'action de la levure (Tominaga *et al.*, 1998c; Subileau *et al.*, 2008; Thibon *et al.*, 2008a). Des thiols volatils tels que le 3-sulfanylhéxanol ainsi que son acétate et la 4-méthyl-4-sulfanyl-pentane-2-one contribuent à l'arôme variétal des vins. Le deuxième groupe est composé des thiols volatils formés au cours de la fermentation alcoolique ou du vieillissement, en particulier en fûts de chêne. Des composés tels que le 2-méthyl-3-furanthiol et le 2-furanméthanethiol peuvent contribuer à l'arôme empyreumatique des vins (Bouchilloux *et al.*, 1998a; Blanchard, 2000; Tominaga & Dubourdieu, 2006).

Cependant, les thiols volatils sont des composés chimiquement très réactifs, facilement oxydables en présence de traces des métaux. Ces composés odorants, possèdent une fonction soufre dans leur structure chimique et ont des propriétés nucléophiles. Ainsi, leur instabilité dans le vin peut également être le résultat d'une réaction d'addition avec les produits d'oxydation des composés phénoliques. Aussi, la contribution des thiols volatils à l'arôme distinctif et à la complexité des nuances aromatiques de différents cépages blancs élève le phénomène de leur instabilité dans les vins à un véritable handicap commercial qui suscite l'intérêt de la filière.

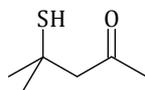
Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont clairement démontré que les teneurs en thiols volatils diminuent, en présence d'oxygène, au cours de l'élevage et surtout de la conservation des vins en bouteille (Blanchard *et al.*, 2004; Brajkovich *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2009). Cependant, la bibliographie ne rapporte pas de travaux approfondis concernant la nature précise des mécanismes réactionnels dans lesquels les composés phénoliques des vins blancs sont susceptibles d'être engagés avec les thiols de l'arôme des vins.

Le sujet de ce mémoire concerne l'approfondissement des mécanismes réactionnels impliquant des familles diverses de thiols volatils des vins avec les principales fractions phénoliques des raisins et des vins, en présence d'oxygène. Il s'agit de préciser le rôle joué par divers cofacteurs ayant des propriétés prooxydantes ou antioxydantes en étudiant les cinétiques d'évolution des thiols volatils et en caractérisant la nature des adduits. Le sujet concerne par ailleurs l'évaluation des

conséquences directes ou indirectes de l'oxydation des polyphénols sur la composition aromatique des vins, leur composition en thiols en particulier, ainsi qu'en d'autres composés associés à leur évolution organoleptique au cours du vieillissement en bouteilles. Afin de progresser dans la connaissance des étapes majeures de l'élaboration d'un vin blanc de qualité respectant sa typicité variétale, la dernière partie de ce mémoire portera sur les modifications induites par l'oxydation des moûts au cours du pressurage sur la composition des vins blancs et ses conséquences potentielles vis à vis de leurs qualités organoleptiques.

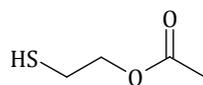


Sulfanyl cétone

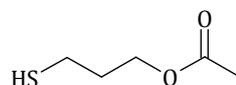


(4MSP) 4-méthyl-4-sulfanyl-2-pentone

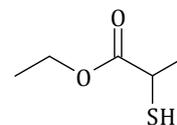
Sulfanyl esters



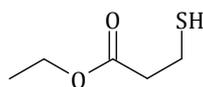
(AE2S) 2-sulfanyléthyl acétate



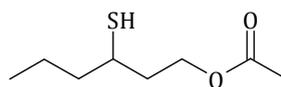
(A3SP) 3-sulfanylpropyl acétate



(E2SP) éthyl-2-sulfanylpropionate

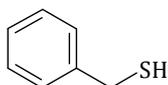


(E3SP) éthyl-3-sulfanylpropionate

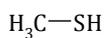


(A3SH) 3-sulfanylhexyl acétate

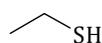
Thiols aliphatiques et aromatiques



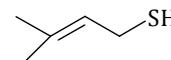
(BMT) benzène-méthane-thiol



(MT) methanethiol

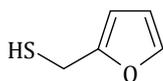


(ET) ethanethiol

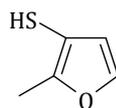


(2B3MT) 2-butène-3-méthylthiol

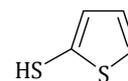
Thiols hétérocycles



(2FMT) 2-furane-méthane-thiol



(2M3FT) 2-méthyl-3-furane-thiol



(2TPT) 2-thiophène-thiol

Figure 1. Les thiols volatils du vin

1

Revue bibliographique

L'arôme du vin est constitué par plusieurs centaines de composés volatils dont les teneurs varient de plusieurs mg/L à quelques ng/L. Les seuils de perception olfactive de ces composés sont aussi divers. En conséquence, l'impact olfactif des constituants volatils du vin est lié à la fois à leur concentration et à leur nature.

1.1 LES THIOLS VOLATILS[‡] DU VIN

Les composés soufrés de type thiols autrement dénommés sulfanyl ou mercaptans sont généralement considérés comme responsables de défauts olfactifs. Dans les vins les défauts organoleptiques provenant de la présence de thiols sont fortement associés, habituellement, au caractère réduit. Il est clairement établi que les thiols impliqués dans ce type de déviations olfactives [**Figure 1**; composé : **2SE** et **2B3MT** (Maga, 1976), **MT** et **ET** (Lavigne *et al.*, 1993; Lavigne & Dubourdieu, 1996; Rauhut *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2002) se développent dans les vins au cours de la fermentation alcoolique (Bamforth & Anness, 1981; Rapp *et al.*, 1985; de Mora *et al.*, 1986; Moreira *et al.*, 2002). Pourtant, l'importance des thiols volatils dans l'arôme de certains fruits est bien établie. Depuis le début des années 1990, plusieurs thiols très odorants ont été identifiés dans nombreux vins. Ces thiols présentent des nuances, herbacées, fruitées et empyreumatiques, évoquant le buis (**4MSPOH**, **4MSP**, **A3SH**), le genêt (**4MSP**), l'eucalyptus, le bourgeon de cassis (**4MSPOH**), la rhubarbe, la feuille de tomate (**3SH**), le pamplemousse (**3SH**), le fruit de la passion (**3SH**), la pêche blanche, la fleur ou le bois d'acacia. Certains vins présentent des odeurs de fumée (**BMT**, **2M3FT**), de grillé (**2FMT**, **E2S**, **A3SP**, **E2SP**, **E3SP**), de viande rôtie (**E2SP**, **BMT**), voire même de truffe, après quelques années de vieillissement.

[‡] Les composés sont cités dans le texte selon les abréviations données en Figure 1

La première molécule découverte comme composant caractéristique de l'arôme des vins de Sauvignon blanc, est la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (**4MSP**) (Darriet, 1993; Darriet *et al.*, 1995). Plusieurs autres thiols volatils odorants ont été ensuite identifiés dans les vins de Sauvignon blanc : le 3-sulfanylhexyl acétate (**A3SH**) (Tominaga *et al.*, 1996); le 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-ol (**4MSPOH**), le 3-sulfanylhexanol (**3SH**), le 3-méthyl-3-sulfanylbutanol (**3M3SB**) (Tominaga *et al.*, 1998a; Tominaga *et al.*, 2000a); le 3-sulfanylpropanol (**3SP**), le 2-sulfanyléthyl acétate (**AE2S**) (Lavigne *et al.*, 1998); le 3-sulfanylpropyl acétate (**A3SP**) (Tominaga *et al.*, 1998a; Tominaga *et al.*, 2000b; Tominaga *et al.*, 2003a); l'éthyl-2-sulfanylpropionate (**E2SP**), l'éthyl-3-sulfanyl-propionate (**E3SP**) (Tominaga *et al.*, 2003b); le benzènemethanethiol (**BMT**) (Tominaga *et al.*, 2003a; Tominaga *et al.*, 2003b) et les 2-méthyl-3-sulfanylbutanol (**2M3SB**), 3-sulfanylpentanol (**3SPOH**) et 3-sulfanylheptanol (**3SHP**) dans les vins liquoreux de Sauvignon blanc issus des raisins infectés par la pourriture noble (Sarrazin *et al.*, 2007b). Les thiols volatils participent également, dans une moindre mesure, à l'arôme des vins des cépages Scheurebe (Guth, 1997), Sémillon, Petit et Gros Manseng (Tominaga *et al.*, 2000a), Petite Arvine (Fretz *et al.*, 2005a; Fretz *et al.*, 2005b), Albariño, Malvasia, Parellada, Verdejo (Campo *et al.*, 2005), Maccabeu (Escudero *et al.*, 2004) et Kosu (Kobayashi *et al.*, 2010).

Certains thiols ont également été identifiés dans les vins rouges. Il s'agit du 3-sulfanylhexanol (**3SH**) (Bouchilloux *et al.*, 1998b; Culleré *et al.*, 2004); le 2-sulfanyléthyl acétate (**AE2S**), 3-sulfanylpropyl acétate (**A3SP**) (Bouchilloux *et al.*, 1998a; Bouchilloux *et al.*, 1998b); le 3-sulfanylhexyl acétate (**A3SH**) (Bouchilloux *et al.*, 1998a; Bouchilloux *et al.*, 1998b; Culleré *et al.*, 2004); le 2-méthyl-3-sulfanylpropanol (**2M3SP**) (Bouchilloux *et al.*, 1998b; Bouchilloux *et al.*, 2000); le 2-méthyl-3-furanthiol (**2M3FT**) (Bouchilloux *et al.*, 1998a; Kotseridis & Baumes, 2000), le 2-furanméthanethiol (**2FMT**) (Blanchard, 1999; Marchand *et al.*, 2000; Tominaga *et al.*, 2000b); l'éthyl-2-sulfanylpropionate (**E2SP**) (Blanchard *et al.*, 1999); le 2-thiophènethiol (**2TPT**) (Marchand *et al.*, 2000) et la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (**4MSP**) (Culleré *et al.*, 2004). De nouvelles méthodes ont été mises en place de manière à déterminer leur impact organoleptique.

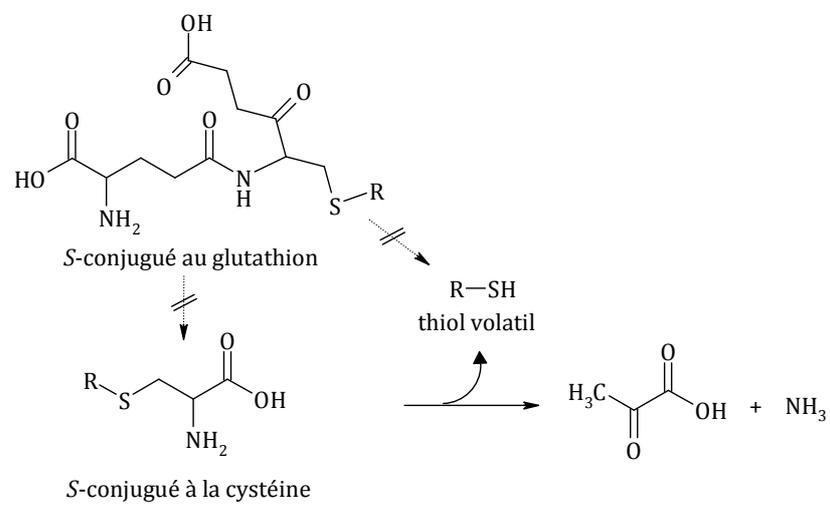


Figure 2. Voies de libération de thiols volatils variétaux à partir de leurs précurseurs de type S-conjugué au glutathion et S-conjugué à la cystéine

Les thiols volatils du vin peuvent être distingués en deux groupes selon leur voie de formation. Le premier groupe concerne les thiols volatils variétaux présents dans le raisin et le moût sous la forme de précurseurs inodores de type *S*-conjugué à la cystéine (*S*-Cys). Ils sont révélés, lors de la fermentation alcoolique, grâce à l'intervention de β -lyases de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Tominaga *et al.*, 1998c). Les teneurs en thiols volatils dans les vins de Sauvignon blanc sont fortement corrélées aux celles en précurseurs cystéinylés présents dans le moût (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000). Enfin, la présence d'un précurseur de type *S*-conjugué au glutathion (*S*-GSH) a été mise en évidence dans le moût de Sauvignon blanc (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b) pour le *S*-3-hexan-1-ol-glutathion puis récemment confirmée par des techniques de CLHP-SM (Capone *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2010; Roland *et al.*, 2010a) et démontrée pour le 4-*S*-glutathionyl-4-méthylpentan-2-one (Fedrizzi *et al.*, 2009).

Les *S*-conjugués du glutathion peuvent être considérés comme pro-précurseurs d'arôme, c'est-à-dire en amont du précurseur cystéinylé. La biotransformation en thiols volatils du *S*-3-hexan-1-ol-glutathion au cours de la fermentation alcoolique, a été également étudiée récemment (Capone *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2010; Roland *et al.*, 2010a; Roland *et al.*, 2010b). Il semble que le *S*-conjugué au glutathion du **3SH** puisse participer à la biogenèse des thiols volatils. Les voies de biogenèse des thiols volatils dans le vin pendant la fermentation alcoolique suivent la voie proposée dans le schéma ci-dessous (**Figure 2**). Cependant, les résultats sont contradictoires selon les auteurs quant à la proportion de biotransformation du précurseur conjugué au glutathion par rapport à celui conjugué à la cystéine.

Globalement, la contribution du précurseur glutathionylé au potentiel aromatique des vins est réelle. Toutefois, elle apparaît moindre par rapport à celle du précurseur cystéinylé.

Le second groupe de thiols volatils se compose de molécules formées au cours de la fermentation alcoolique en barriques ou pendant l'élevage des vins en fût de chêne. Ces thiols volatils contribuent à l'arôme empyreumatique (**BMT**) (Tominaga *et al.*, 2003a), torréfié (**2FMT**) (Blanchard *et al.*, 2001) et au bouquet du vieillissement (**E2SP**, **E3SP**, **BMT**, **2FMT**, **2M3FT**) des vins blancs et rouges (Bouchilloux *et al.*, 1998b; Tominaga *et al.*, 2003b).

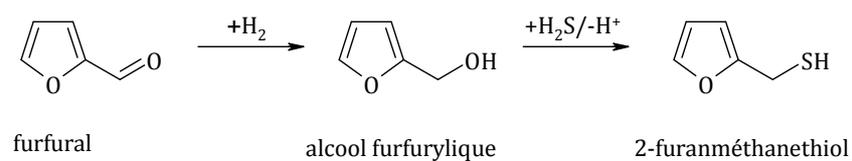


Figure 3. Hypothèse de formation du 2-furanméthanethiol à partir du furfural réduit en alcool furfurylique par substitution nucléophile du groupement hydroxyle par l'hydrogène sulfuré

Curieusement, à part pour le **2FMT**, les voies de formation de ces thiols volatils restent inconnues et seulement des hypothèses ont pu être formulées afin d'expliquer leur origine dans les vins.

Concernant les esters (**E2SP**, **E3SP**), ils proviendraient d'une estérification chimique entre l'alcool correspondant et l'acide acétique (Tominaga *et al.*, 2003a).

Concernant le **2FMT**, de nombreuses voies de formation de ce thiol, responsable des notes de café torréfié retrouvées dans le vin, ont été envisagées à partir de la réaction de Maillard (Shibamoto & Russell, 1976; Munch *et al.*, 1997). Cependant, dans les conditions du vin, seulement peu de ces voies sont possibles.

Blanchard *et al.* (2001) propose que la voie de formation du 2-furanméthanethiol (**2FMT**), dans les vins blancs fermentés en fûts soit plus en relation directe avec le métabolisme soufré des levures et en particulier avec la production de SH qu'avec une réaction de Maillard. Plus précisément, il est décrit par ces mêmes auteurs que le **2FMT** serait formé à partir du furfural, cédé par le bois, sous l'action du métabolisme des levures. Dans cet esprit, la **Figure 3** propose un mécanisme hypothétique de formation du **2FMT**. Il s'agit d'une substitution nucléophile du groupement hydroxyle de l'alcool furfurylique (provenant de la réduction du furfural) par un groupement thiol issu du métabolisme soufré de la levure. Cette hypothèse est supportée par le fait que la formation du composé **2FMT** par la levure, en présence de furfural, est accrue dans les conditions favorables à la production excédentaire d'anion SH^- . La formation des hétérocycles dans les conditions du vin semble ne pas suivre le schéma traditionnel de la réaction de Maillard et reste donc à élucider.

1.2 LA CHIMIE DES THIOLS

Les thiols dérivent de H_2S et sont donc des analogues soufrés des alcools. A la différence des alcools, les liaisons SH sont relativement peu polarisées et donc ne donnent pas lieu à la réalisation de liaison hydrogène très efficaces.

L'électronégativité du soufre est inférieure à celle de l'oxygène, ce qui assure à la liaison S-H un moment dipolaire permanent plus faible que celui de la liaison O-H. Il est constaté que les thiols sont plus acides que l'eau et les alcools. En effet, leur pKa est compris entre 9 à 12, tandis que celui des alcools varie autour de 15. Ceci s'explique par la taille volumineuse du soufre et de ses orbitales diffuses. La polarisabilité du

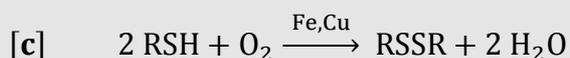
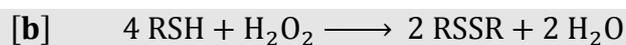
groupement SH est donc supérieure à celle du groupement OH. Cette propriété, souvent utilisée en synthèse organique pour une attaque nucléophile sur l'atome du soufre, confère une grande réactivité à ce type de composé.

1.2.1 L'OXYDABILITE DES THIOLS.

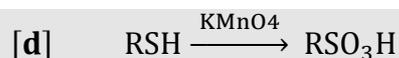
Les thiols peuvent intervenir dans des mécanismes d'oxydation, mais Il n'y a pas d'oxydation des thiols en absence de catalyseurs. Les facteurs, influençant leur vitesse d'oxydation, sont la température, le pH, la composition du milieu réactionnel, le type du catalyseur, la tension d'oxygène et la nature et la concentration de la molécule soufrée. La vitesse d'oxydation des thiols s'accroît avec le pH, suggérant la participation des groupements RS^- . L'oxydation des thiols consiste essentiellement dans le transfert de deux électrons et dans la production de disulfures [a] :



Une oxydation douce induite par l'eau oxygénée (Pascal & Tarbell, 1975) ou par l'oxygène moléculaire, catalysé par des ions métalliques (le fer et le cuivre), conduit à la formation des disulfures [b et c] (Schubert, 1933; Cavallini *et al.*, 1969; Hofmann *et al.*, 1996; Mestres *et al.*, 1997; Mestres *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2002) :



En revanche, la seule présence d'oxydants puissants comme le permanganate de potassium ou l'acide nitrique conduisant à une oxydation énergétique permet la formation d'acide sulfonique [d] (Vollhardt & Schore, 1995) :



Récemment, un produit d'oxydation du **3SH**, le 3,3'-disulfanediyldihexan-1-ol (**3SSH**) a été identifié par Sarrazin *et al.* (2010) dans les vins blancs liquoreux issus de raisins atteints par la pourriture noble due à *Botrytis cinerea*. Comme le **3SSH** n'est pas détectable dans les extraits de vins blancs secs (Sarrazin *et al.*, 2007a), il semblerait que la composition particulière des vins liquoreux puisse permettre la formation de ce composé.

D'ailleurs, de récents travaux ont démontré que la consommation d'oxygène dissous est beaucoup plus lente dans les vins liquoreux que dans les vins blancs secs

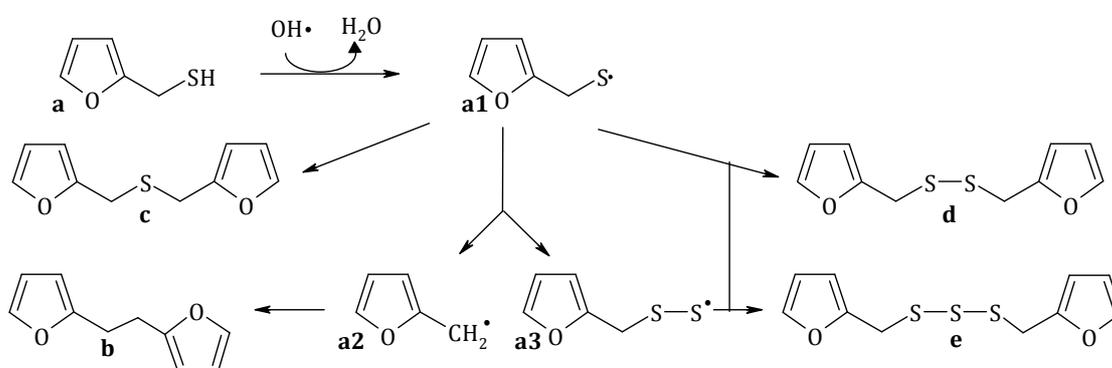


Figure 4. Schéma hypothétique de l'oxydation radicalaire du 2-furanméthanethiol (**a**) liée à la réaction de Fenton. Les produits volatils issus de sa dégradation sont le difurfuryl (**b**), le bifurfuryl monosulfide (**c**), le difurfuryl disulfure (**d**) et le difurfuryl trisulfure (**e**) (Blank *et al.*, 2002)

(Poupot, communication personnelle). En conséquence, le mécanisme de dimérisation des thiols, et en particulier du **3SH**, pourrait être favorisé dans ce type de vin (Jocelyn, 1972).

De plus, comme les vins liquoreux présentent des teneurs en **3SH** plus élevées que les vins blancs secs, la loi d'action de masse pourrait favoriser cette réaction chimique.

La présence d'un produit d'oxydation du **3SH** dans une matrice spécifique [pauvre en composés phénoliques (Voyatzis, 1984; Biau, 1996)] comme les vins liquoreux de pourriture noble, ouvre des perspectives sur la recherche des mécanismes réactionnels impliqués sur la perte d'arôme que l'on détaillera par la suite.

1.2.2 L'OXYDATION RADICALEIRE DES THIOLS PAR L'INTERMEDIAIRE DE LA REACTION DE FENTON

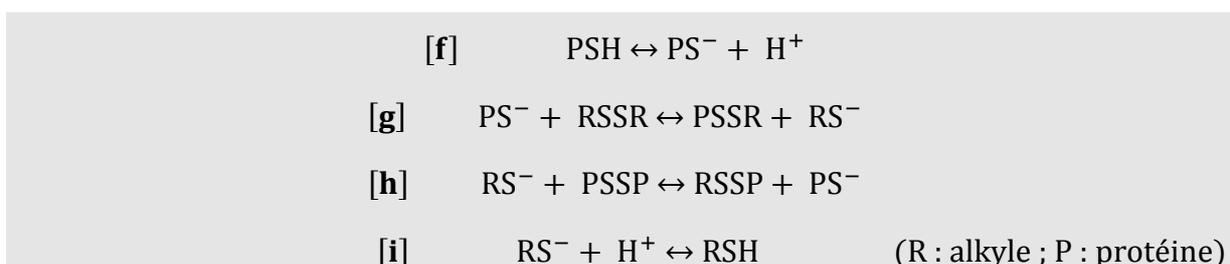
Les thiols sont de forts antioxydants mais ils peuvent également agir comme prooxydants par la promotion de la réaction de Fenton, après la réduction du fer ferrique en fer ferreux. Une étude (Blank *et al.*, 2002) menée sur l'oxydation radicalaire du **2FMT** par le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$), produit par la réaction de Fenton [e] a mis en évidence, en solution aqueuse, des mécanismes radicalaires. Ceux-ci semblent être impliqués dans la dégradation du **2FMT** (**Figure 4**) dans le café.



Lors de la réduction du fer ferreux en fer ferrique, le peroxyde d'hydrogène libère un radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$). La cascade de dégradation radicalaire du **2FMT** débute par une attaque du radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$), conduisant à la production de radicaux du **2FMT** (**Figure 4**; **a1**, **a2** et **a3**). Ceux-ci sont très instables et peuvent entrer directement dans des réactions de dimérisation pour former des disulfures (**Figure 4**; **d**). La réaction de dimérisation est favorisée par rapport à la production d'autres produits d'oxydation comme le difurfuryl, bifurfuryl monosulfide et le difurfuryl trisulfure (**Figure 4**; **b**, **c** et **e**). Dans le vin, la cascade d'oxydation radicalaire des thiols n'a pas encore été étudiée.

1.2.3 EVOLUTION DES PRODUITS D'OXYDATION DES THIOLS

Les disulfures formés par oxydation des thiols peuvent être réduits en thiols correspondants (Guth *et al.*, 1995). Les RSSR peuvent se scinder au niveau du pont disulfure et ainsi redonner une forme (RS^-), qui peut alors se complexer avec d'autres antioxydants présents dans le milieu. Il s'agit par exemple d'une réaction d'échange entre les protéines possédant des groupements soufre (de type résidus de la cystéine) et les RSSR (Adams *et al.*, 2001) :



Cette réaction d'échange est dépendante des paramètres physico-chimiques du milieu, et en particulier son potentiel réducteur. La force d'échange augmente avec la température et le pH. En conditions œnologiques, une réaction similaire a été décrite par Lavigne & Dubourdieu (1996) expliquant l'élimination des défauts olfactifs de réduction des vins élevés sur lies fines. Cette remarquable propriété des lies s'explique par la formation de ponts disulfures entre les groupements SH libres des mannoprotéines pariétales de la levure et ceux des thiols volatils. Elle se traduit par une diminution des teneurs en méthane-thiol et en éthane-thiol dans les vins. Le mécanisme de rupture des ponts disulfures en milieu réducteur peut également expliquer la re-libération du méthane-thiol et éventuellement de l'éthane-thiol dans les lies au fond des cuves, où le potentiel d'oxydoréduction est plus faible qu'en haut de la cuve.

Par ailleurs, des travaux récents ont mis en évidence que le 3,3'-disulfanediyldihexan-1-ol (**3SSH**) est susceptible d'être oxydé en 3-propyl- γ -sultine, stade ultime de l'oxydation du **3SH**. Ce composé a été identifié dans le fruit de la passion (Yolka *et al.*, 2002).

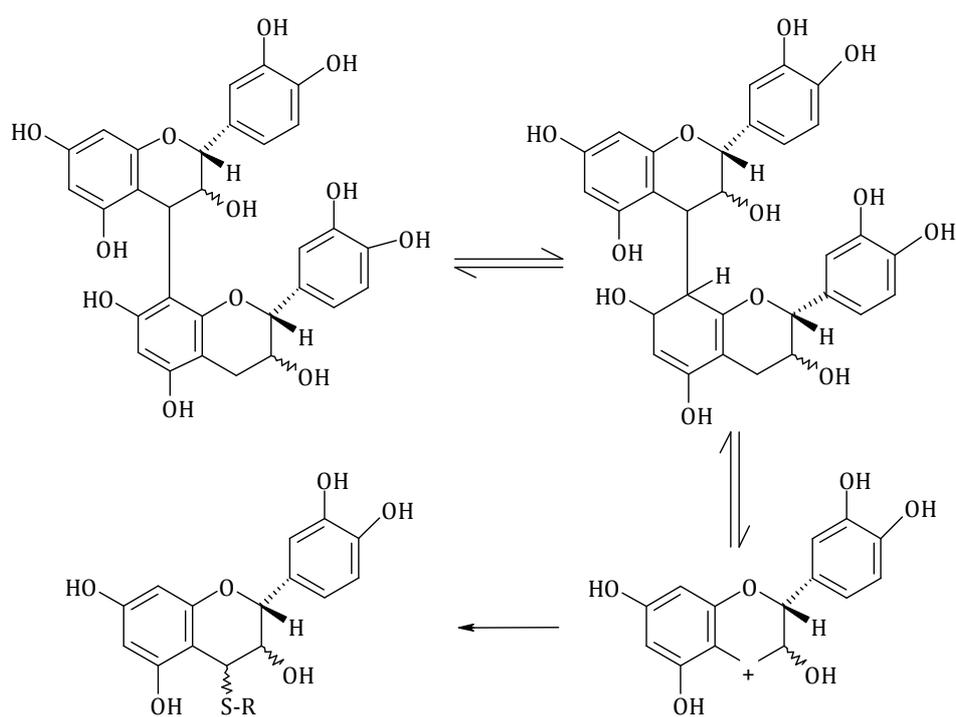
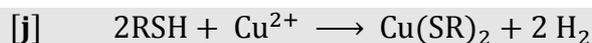


Figure 5. Addition d'un thiol sur un carbocation (de Freitas, 1995)

1.2.4 LA COMPLEXATION DES THIOLS AVEC LES METAUX

Une autre propriété des thiols qui a été beaucoup exploitée au laboratoire est leur capacité de former des complexes stables avec les métaux comme le cuivre [j] et le mercure (Schubert, 1933; Cavallini *et al.*, 1969).



Ce type de réaction a servi entre autre pour le développement de méthodes spécifiques de dosage des thiols volatils à l'état de traces dans les vins (ng/L) (Tominaga *et al.*, 1998a; Tominaga & Dubourdieu, 2006; Sarrazin *et al.*, 2007b). De plus, la supplémentation des vins avec le cuivre, sous diverses formes de sel (sulfate de cuivre, acétate de cuivre) a permis d'évaluer au laboratoire, par analyse sensorielle, la participation globale des thiols volatils sur la typicité des vins de différents cépages.

Le cuivre a été utilisé, par le passé, comme traitement curatif des défauts olfactifs de réduction imputables à des thiols volatils nauséabonds (**MT**, **ET**) (Lavigne, 1996). Il a aussi été démontré que certains traitements phytosanitaires de la vigne, à base de cuivre pouvaient avoir une influence néfaste sur l'arôme variétal des vins de Sauvignon blanc (Hatzidimitriou *et al.*, 1996; Darriet *et al.*, 2001a) et la composante thiol de l'arôme des vins de Cabernet sauvignon et Merlot (Darriet *et al.*, 2001a; Darriet *et al.*, 2001b).

1.2.5 LES PROPRIETES NUCLEOPHILES DES THIOLS ET LEUR REACTIVITE AVEC DIFFERENTS ELECTROPHILES

Les thiols sont des nucléophiles; leur réactivité est supérieure à celle des alcools dans certaines conditions, grâce à la plus forte polarisation des électrons du soufre. Les thiols peuvent donc intervenir dans des réactions de substitution (SN) ou d'addition nucléophile (AN). Ces réactions sont favorisées lorsqu'ils sont sous la forme anionique.

Les thiols, au titre de nucléophiles, peuvent donc s'additionner soit sur des sites électrophiles (cations) soit sur des carbones insaturés (alcènes, aldéhydes, cétones). De Freitas, (1995) a décrit l'addition de thiols sur un carbocation, issu de la décomposition des procyanidines en milieu acide (**Figure 5**). Cette réaction est basée la technique de la thiolyse. Il s'agit d'une méthode applicable pour l'étude structurale des oligomères

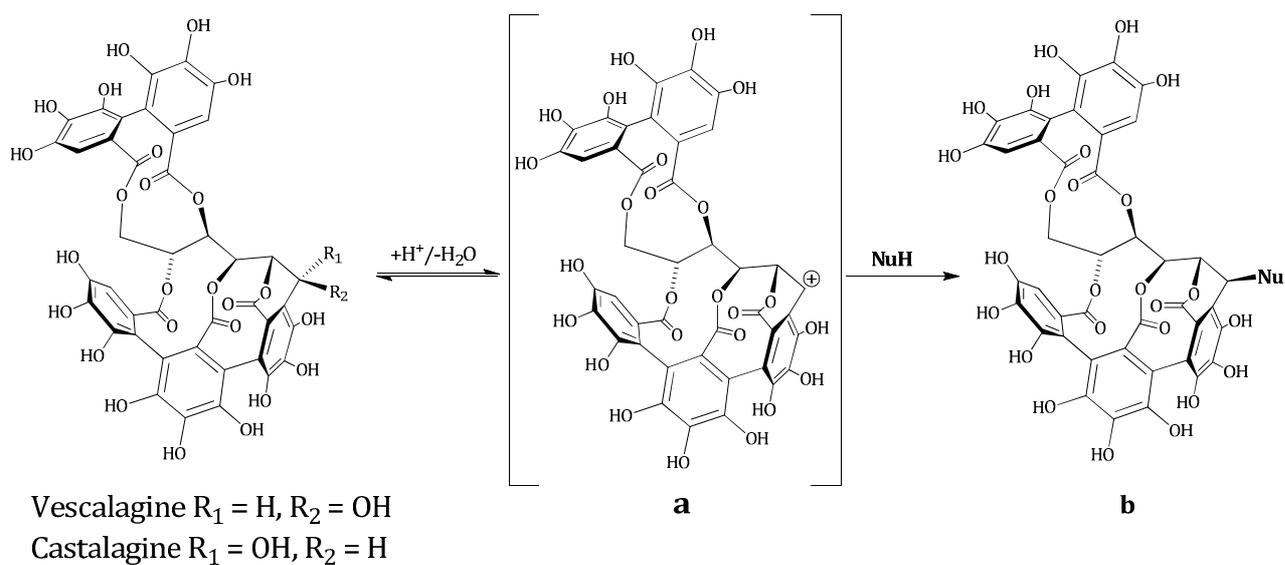


Figure 6. Substitution nucléophile (Nu) des ellagitanins C-glycosidiques dans le vin

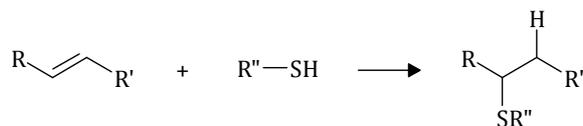


Figure 7. Addition nucléophile de thiol sur un alcène

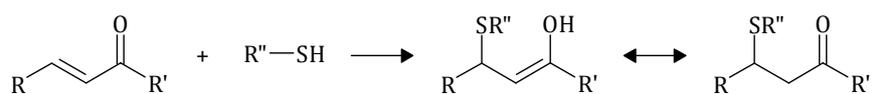


Figure 8. Addition nucléophile de thiol, réaction de Michaël

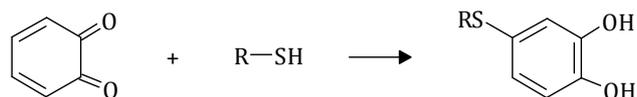


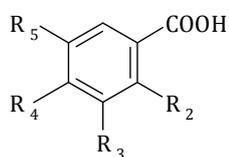
Figure 9. Addition nucléophile d'un thiol sur une quinone

procyanidiques, en utilisant différents thiols (toluène- α -thiol, benzène-thiol) comme agents nucléophiles (Matthews *et al.*, 1997; Labarbe *et al.*, 1999). La thiololyse conduit à la détermination du DP_m (degré de polymérisation moyen) des polymères.

Le même type de réaction peut expliquer la formation des flavono-ellagitanins au cours d'élevage des vins en fût de chêne (Quideau *et al.*, 2005). Les flavono-ellagitanins sont constitués d'une unité tanin hydrolysable, généralement une unité ellagitanin C-glycosidique (vescalagine, castalagine), liée avec une unité flavan-3-ol. La vescalagine et la castalagine peuvent subir une déshydroxylation de leur alcool benzylique pour conduire à la formation du carbocation benzylique (**Figure 6 ; a**). Cet intermédiaire peut alors subir l'attaque nucléophile des flavan-3-ols présents dans le vin, mais aussi celles d'autres nucléophiles présents comme l'éthanol, les anthocyanes, les procyanidines ou le glutathion pour conduire à la formation de structures de type **b** (**Figure 6**). Cette réaction pourrait aussi expliquer la disparition du glutathion dans les vins élevés en barriques (Lavigne *et al.*, 2007).

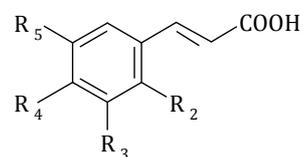
L'addition nucléophile des composés possédant un groupement thiol sur un alcène (**Figure 7**) (March, 1992) est favorisée par la présence d'un carbone insaturé en position β (carbonyl). Cette réaction est alors appelée réaction de Michaël (**Figure 8**). De telles réactions, ont été mises en évidence pour l'addition de thiol sur des quinones (**Figure 9**) de l'acide caftarique (Cheynier *et al.*, 1986; Salgues, 1986), de l'acide caféique (Cilliers & Singleton, 1990), de l'acide gallique (Quideau *et al.*, 1995), de la catéchine (Moridani *et al.*, 2001) et de la (-)-épicatechine (Tanaka *et al.*, 2002).

La réactivité des thiols (non volatils) avec les quinones de composés phénoliques est largement décrite dans la littérature. En œnologie, cette réactivité est utilisée dans le cadre du développement de nouveaux antioxydants (cystéine, acide thioglycolique, thiocresol) (Cilliers & Singleton, 1990) contre le brunissement des moûts afin d'éviter une baisse de la qualité gustative des vins et plus précisément pour la stabilisation de la couleur (Cheynier *et al.*, 1989c; Cheynier *et al.*, 1990b; Ibern-Gomez *et al.*, 2000), la protection des arômes fruités et la conservation de la typicité variétale (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998, 2004).

**Acides benzoïques**

Acide *p*-hydroxybenzoïques
 Acide protocatéchique
 Acide vanillique
 Acide galique
 Acide syringique
 Acide salicylique
 Acide gentistique

	R₂	R₃	R₄	R₅
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïques	H	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
Acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H
Acide galique	H	OH	OH	OH
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentistique	OH	H	H	OH

**Acides cinnamiques**

Acide *p*-coumarique
 Acide caféique
 Acide férulique
 Acide sinapique

Figure 10. Les acides phénols du raisin et du vin

1.3 LES COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN ET DU VIN BLANC

Les composés phénoliques sont des substances qui jouent un rôle très important en œnologie. Ces molécules proviennent de différentes parties de la grappe du raisin et sont extraites au cours des étapes de la vinification. Leur structure varie beaucoup au cours de l'élevage et du vieillissement du vin en fonction des conditions physico-chimiques telles que, le pH, la température, l'oxygène ou encore la composition du milieu. Les mécanismes impliqués dans ces modifications chimiques ne sont pas encore parfaitement connus.

Les principaux composés phénoliques du raisin et du vin blanc peuvent être classés en deux grandes familles : les non-flavonoïdes et les flavonoïdes.

1.3.1 LES COMPOSES NON-FLAVONOÏDES

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénols et leurs dérivés. Les acides phénols contiennent des acides benzoïques et des acides cinnamiques. Leur concentration dans le vin blanc varie entre 10-20 mg/L selon le cépage et l'appellation (Singleton & Trousdale, 1983; Goldberg *et al.*, 1999; Ibern-Gomez *et al.*, 2000; Chamkha *et al.*, 2003; Mozetic *et al.*, 2006; Kallithraka *et al.*, 2009).

Les acides benzoïques possèdent un squelette carboné de type C₆-C₁. Sept de ces acides sont connus (**Figure 10**). Deux sont à l'état de traces dans les vins (ou les moûts) : l'acide salicylique (acide orthohydroxybenzoïque) et l'acide gentisique (acide 2',5'-dihydroxybenzoïque). Ils se différencient par la substitution de leur noyau benzénique. Ils sont retrouvés dans le raisin majoritairement sous forme de combinaisons glycosidiques, libérés par hydrolyse acide, et de type ester, dont ils sont libérés par hydrolyse alcaline.

Les acides cinnamiques possèdent, quant à eux, un squelette carboné C₆-C₃ (**Figure 10**). Ils sont retrouvés en faible quantité sous leur forme libre, mais ils sont majoritairement estérifiés essentiellement avec l'acide tartrique (Ribéreau-Gayon, 1965); ils peuvent également être simplement des hétérosides du glucose (Biau, 1996). Les esters conjugués avec l'acide tartrique en particulier l'acide caftarique (ou acide caféoyl-tartrique) sont les constituants de la pulpe de raisin les plus sensibles à

Tableau 1. Concentration des principaux acides phénols et de leurs dérivés dans les moûts et les vins selon leur origine, le cépage et le type du pressurage

Type d'échantillon	Cépage	Région	t-acide caftarique	acide c- coutarique	Références
Vin ^a	Chenin blanc	Californie	11,5-33,5	-	(Singleton & Trousdale, 1983)
Vin ^a	Colombard	Californie	0,7-8,9	-	(Singleton & Trousdale, 1983)
Vin ^a	Sémillon	Californie	1,9-12,3	-	(Singleton & Trousdale, 1983)
Vin ^a	Variés	Espagne	10,5-13,3	-	(Betes-Saura <i>et al.</i> , 1996)
Vin ^b	Chardonnay	France	9,8-18,7	-	(Ibern-Gomez <i>et al.</i> , 2000)
Vin ^b	Chardonnay	France	29-31	-	(Chamkha <i>et al.</i> , 2003)
Vin	Sauvignon Blanc	N. Zélande	9,3*	-	(Makhotkina & Kilmartin, 2009)
Vin	Chardonnay	N. Zélande	3,0-6,8*	-	(Makhotkina & Kilmartin, 2009)
Vin ^a	Sauvignon Blanc	N. Zélande	1,0-3,5*	1,0-1,2*	(Patel <i>et al.</i> , 2010)
Vin ^c	Sauvignon Blanc	N. Zélande	0,6-1,3	4,4-6,0	(Patel <i>et al.</i> , 2010)
Moût	Variés	Espagne	14,8-19,5	-	(Betes-Saura <i>et al.</i> , 1996)
Moût ^a	Sauvignon blanc	N. Zélande	32,5-36,8	1,5-3,1	(Maggu <i>et al.</i> , 2007)
Moût ^c	Sauvignon blanc	N. Zélande	1,4-3,8	6,8-14,5	(Maggu <i>et al.</i> , 2007)
Moût ^a	Sauvignon blanc	N. Zélande	20,4-21,6*	1,5-2,5	(Patel <i>et al.</i> , 2010)
Moût ^c	Sauvignon blanc	N. Zélande	0,9-12,6*	0,5-9,4	(Patel <i>et al.</i> , 2010)

^a vins et jus de goutte ; ^b vins de champagne blanc de blanc ; ^c vins et jus de presse ; concentrations dans les moûts et les vins en mg/L ; * concentrations en équivalent acide caféique ; - : non déterminé

l'oxydation et sont à l'origine du brunissement du moût blanc (Cheynier *et al.*, 1989a; Cheynier *et al.*, 1989b; Cheynier *et al.*, 1989c; Cheynier *et al.*, 1990b; Fernandez-Zurbano *et al.*, 1995; Fernandez-Zurbano *et al.*, 1998).

L'acide caftarique se trouve en concentration relativement importante dans les vins blancs (10-100 mg/L) selon le cépage et l'origine des raisins (Singleton & Trousdale, 1983; Goldberg *et al.*, 1999; Ibern-Gomez *et al.*, 2000; Chamkha *et al.*, 2003; Kallithraka *et al.*, 2009) (**Tableau 1**). L'acide caftarique représente presque 80 % du contenu phénolique total des vins blancs. Ce composé est localisé majoritairement dans la pulpe des raisins et il est libéré dès le début du pressurage. C'est pour cette raison que les vins et les moûts de goutte sont plus riches en ce composé que les vins et les moûts de fin de pressée (**Tableau 1**).

Sur le plan organoleptique, les acides phénols et leurs dérivés ne présentent ni une saveur ou odeur particulière. En revanche, sous l'action de certains microorganismes, ils peuvent être transformés en phénols volatils tels que les vinyl phénols, conduisant ainsi à des déviations aromatiques dans les vins blancs. Ces composés proviennent essentiellement de la dégradation de l'acide *p*-coumarique et de l'acide férulique (Chatonnet, 1995).

Enfin, le tyrosol ou alcool *p*-hydroxy-phényl-éthylique est également retrouvé dans les vins blancs (20-30 mg/L). Il est formé pendant la fermentation alcoolique à partir de la tyrosine (*p*-hydroxyphénylalanine), elle-même synthétisée par la levure. Ce composé, dont la concentration est relativement constante au cours du vieillissement, participe avec les dérivés de la quercétine, l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique à la couleur des vins blancs secs (Biau, 1996).

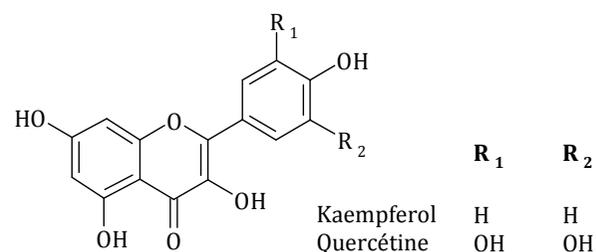
1.3.2 LES COMPOSES FLAVONOÏDES

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de la vigne, localisés dans la partie solide du raisin comme les pépins et la pellicule. Ils sont extraits dans le cas du vin blanc au cours du pressurage et de la macération pré-fermentaire.

Tableau 2. Concentrations de principaux flavonols et de leurs dérivés glycosylés des jus et des vins de différents cépages et régions

Type d'échantillon	Cépage	Région	Quercétine	Quercétine-3-glu	Kaempferol	Références
Vin	Variés	Espagne	-	0,2-0,3	-	(Betes-Saura <i>et al.</i> , 1996)
Vin	Chardonnay	Californie	nd	nd	nd	(Vuorinen <i>et al.</i> , 2000)
Vin	Riesling	Allemagne	nd	nd	nd	(Vuorinen <i>et al.</i> , 2000)
Vin ^a	Chardonnay	France	-	0,05-0,1	-	(Ibern-Gomez <i>et al.</i> , 2000)
Vin	Muscadinia	Florida	0,4-1,5	-	-	(Talcott & Lee, 2002)
Vin ^a	Chardonnay	France	0,02-0,1	-	-	(Chamkha <i>et al.</i> , 2003)
Vin	Zalema	Espagne	-	0,1-1,3	-	(Hernanz <i>et al.</i> , 2007)
Vin	Vinho Verde	Portugal	9,5*	1*	-	(Dopico-Garcia <i>et al.</i> , 2007)
Vin	Variés	Australie	tr-2,0	nd	nd	(Jeffery <i>et al.</i> , 2008)
Moût	Variés	Espagne	-	0,3-0,6	-	(Betes-Saura <i>et al.</i> , 1996)
Moût	Muscadinia	Florida	1,8-5	-	-	(Talcott & Lee, 2002)
Moût	Zalema	Espagne	-	0,5-1,9	-	(Hernanz <i>et al.</i> , 2007)
Moût	Sauvignon blanc	N. Zélande	-	0,07-11,5**	-	(Maggu <i>et al.</i> , 2007)

^a vins de champagne blanc de blanc ; concentrations dans les vins en mg/L ; *mg/k d'extrait sec ; ** eq. quercétine ; nd : non détecté ; tr : traces ; - : non déterminé

**Figure 11.** Structure chimique des flavonols aglycones du raisin blanc

Les flavonoïdes forment une grande famille des composés phénoliques ayant une structure commune en C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane (**Figure 12**) qui se divisent en deux sous familles : les flavonols et les flavanols se distinguant par le degré d'oxydation et par la substitution en position 3 et 4 du cycle pyranique C.

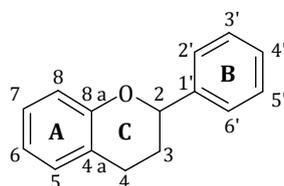


Figure 12. Structure générale des flavonoïdes

Les flavan-3-ols sont les principaux flavonoïdes présents dans la baie de raisins blancs de type *Vitis vinifera* et donc retrouvés dans les vins blancs.

1.3.2.1 Les flavonols

Les flavonols présentent une structure à deux cycles benzéniques reliés par un hétérocycle oxygéné, dérivant du 2-phényl chromone. Ces composés sont des pigments jaunes qui contribuent à la coloration des baies. Ils sont présents dans les pellicules du raisin, sous forme de glucosides en position 3 (Ribéreau-Gayon, 1964; Cheynier & Rigaud, 1986).

La **Figure 11** représente les deux principaux flavonols identifiés dans le raisin blanc sous la forme aglycone : la kaempferol et la quercétine (Ribéreau-Gayon, 1964; Masa & Vilanova, 2008). Ces molécules ont des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancers ou encore des activités antitumorales et chimiopréventives. En effet, la majorité des études corrélient la présence de ces composés dans le vin avec leur capacité antioxydante. Dans le vin blanc, leur concentration peut atteindre 1 mg/L à 3 mg/L ce qui représente jusqu'à 1,5 % du contenu phénolique global (**Tableau 2**).

Selon le **Tableau 2**, la quercétine-3-O-glycoside est la plus répandue dans les vins blancs. Sa concentration varie entre 0,01-1,94 mg/L selon le cépage et l'origine du vin.

Tableau 3. Concentrations en flavan-3-ols dans les vins, les moûts et les raisins blancs issus de différents cépages et régions

Type d'échantillon	Cépage	Région	(+)- Catéchine	(-)- Epicatéchine	Dimères (B1 ; B2 ; B3 ; B4)	Références
Vin	Chenin blanc	Californie	9,3-90,8	28,6-47,4	-	(Singleton & Trousdale, 1983)
Vin	Colombard	Californie	31,6-123,9	3,4-80,8	-	(Singleton & Trousdale, 1983)
Vin	Sémillon	Californie	2,6-46	0,4-13,3	-	(Singleton & Trousdale, 1983)
Vin	Variés	France	3,4	6,6	-	(Voyatzis, 1984)
Vin ^a	Variés	France	10,1	2,2	-	(Voyatzis, 1984)
Vin	Variés	France	9,8	5,3	0,8-1,3 ; nd ; 0,9-2,1 ; 0,2-0,4	(Carando <i>et al.</i> , 1999a; Carando <i>et al.</i> , 1999b)
Vin ^b	Chardonnay	France	0,71-2,2	0,5-1,15	-	(Chamkha <i>et al.</i> , 2003)
Vin	Chardonnay	France	7,5	7	0,8 ; 4,7 ; 7,6 ; 1,1	(Landrault <i>et al.</i> , 2003)
Vin	Savatiano	Grèce	11,8-40	10-45	-	(Proestos <i>et al.</i> , 2005)
Vin	Sauvignon blanc	N. Zélande	3,9	-	-	(Makhotkina & Kilmartin, 2009)
Vin	Chardonnay	N. Zélande	1,6-4,1	-	-	(Makhotkina & Kilmartin, 2009)
Moût	Penedès	Espagne	3,6	1,19	nd ; 1,3 ; 2,4 ; nd	(Betes-Saura <i>et al.</i> , 1996)
Moût	Concord	Canada	0,15-10,8	0,21-16,4	0,2-34,7 ; 0,1-21,5 ; 0,01-1,8 ; 0,01-1,0	(Fuleki & Ricardo da Silva, 2003)
Moût	Chardonnay	Canada	0,12-4,1	0,05-4,8	tr-4,0 ; 0,02-0,9 ; tr-0,08 ; tr-0,2	(Fuleki & Ricardo da Silva, 2003)
Pépins	Riesling/Chardonnay	Ontario	25-42	24-99	54-126	(Fuleki & Ricardo da Silva, 1997)
Pépins	Riesling	Allemagne	226*	790*	-	(Kammerer <i>et al.</i> , 2004)
Pellicule	Riesling	Allemagne	790*	674*	-	(Kammerer <i>et al.</i> , 2004)
Pellicule	Chenin blanc	Californie	tr-66,8	tr-40,9	-	(Singleton & Trousdale, 1983)
Pellicule	Colombard	Californie	0,9-13,8	13,3-384,6	-	(Singleton & Trousdale, 1983)
Pellicule	Sémillon	Californie	56,8-214	164-313	-	(Singleton & Trousdale, 1983)

^a vins blancs liquoreux issus de la pourriture noble ; ^b champagne blanc de blanc ; concentrations dans les vins en mg/L et dans les raisins en mg/K de matière fraîche ; *mg/K d'extrait sec ; nd : non détecté ; - : non déterminé

1.3.2.2 Les flavan-3-ols monomères

Les flavan-3-ols dérivent du squelette phényl-2-benzopyrane (**Figure 12**). Ils existent sous la forme des monomères et de molécules condensées connues comme procyanidines ou tanins condensés. Les flavan-3-ols sont caractérisés par la présence d'un hydroxyle sur l'hétérocycle central en position 3 (**Figure 13**). Le noyau A est de type phloroglucinol (fonctions hydroxyles en 5 et 7 et éther en 8a). Le noyau B est de type catéchol (fonctions hydroxyles en 3' et 4'). Ces composés sont souvent désignés sous le nom générique des catéchines. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3 et par leur niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les (+)-catéchines et (-)-épicatéchines qui sont dihydroxylées et les (+)-gallocatéchines et (-)-épigallocatéchines qui sont trihydroxylées (**Figure 13**).

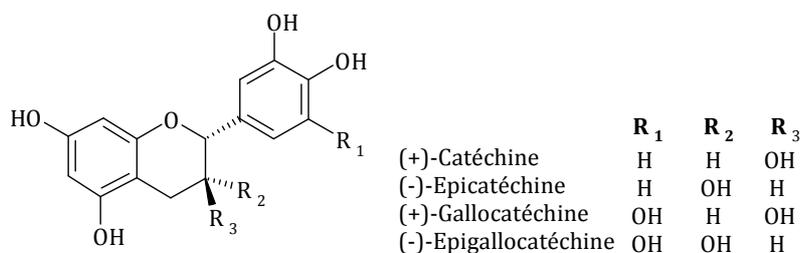


Figure 13. Structure chimique des principaux monomères des flavan-3-ols

Dans certains travaux, les auteurs quantifient globalement les flavan-3-ols monomères mais dans la plupart des cas, la distinction est faite entre (+)-catéchine et (-)-épicatéchine. Les concentrations varient selon le cépage, la région et le mode d'élaboration du vin. Pour la (+)-catéchine, la fourchette de concentration est située entre quelques mg/L et une centaine de mg/L (**Tableau 3**). Dans la plupart des cas, les teneurs en (-)-épicatéchine sont bien moins importantes que celles de la (+)-catéchine (en moyenne 15 de mg/L). Cependant, le rapport (+)-catéchine sur (-)-épicatéchine est très variable selon les cépages.

Les flavan-3-ols monomériques tels que la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine sont plus concentrés dans la pellicule que dans les pépins expliquant ainsi un contenu en catéchine plus élevé dans les vins issus d'une macération pelliculaire ou dans des moûts de la fin de pressée (Singleton & Trousdale, 1983; Cheynier *et al.*, 1989c; Fernandez-Zurbano *et al.*, 1999).

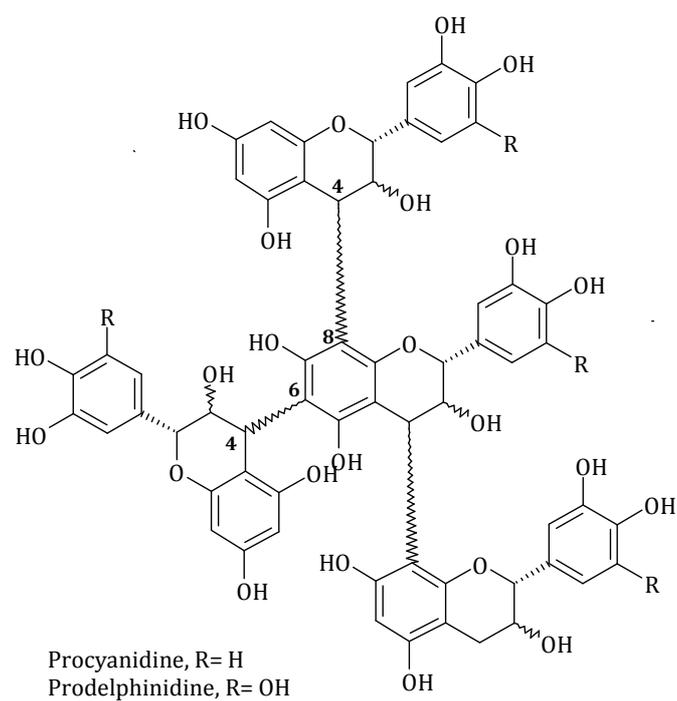


Figure 14. Structure générale des proanthocyanidines du raisin

Les concentrations rapportées varient de 0 à 380 mg/K dans la pellicule et de 0 à 100 mg/K dans les pépins.

1.3.2.3 Les polymères des flavan-3-ols

Les formes plus ou moins polymérisées de monomères de flavan-3-ols constituent les tanins. Ces composés sont caractérisés par leurs unités constitutives, leur nombre d'unités et le type de liaison entre ces unités. Les tanins sont responsables des nombreuses propriétés organoleptiques des vins. La principale est l'astringence qui résulte de leur capacité à donner des combinaisons stables avec les protéines et notamment les protéines salivaires (Haslam, 1974; Haslam, 1981; McManus *et al.*, 1985). Les tanins condensés également appelés proanthocyanidines sont présents essentiellement dans la pellicule et les pépins de raisin.

Dans la pellicule, les tanins se trouvent sous forme libre dans les vacuoles mais aussi liés aux protéines et aux polysaccharides de la paroi cellulaire et du tonoplaste (Thorngate & Singleton, 1994; Gény *et al.*, 2003; Gagné *et al.*, 2006). Au niveau des pépins, ils sont présents dans les enveloppes externes et internes situées sous la cuticule et les cellules épidermiques. Certains auteurs estiment que seuls les tanins localisés dans les trois ou quatre premières couches de cellules de l'enveloppe externe sont extractibles (Joutei *et al.*, 1994; Thorngate & Singleton, 1994).

Les tanins condensés ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide et à chaud par rupture de la liaison intermonomérique. Dans le raisin, deux types de proanthocyanidines sont considérées suivant la nature de l'anthocyane libérée. D'une part, les procyanidines (polymères de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine) libèrent la cyanidine et d'autre part, les prodelphinidines (polymères de (+)-gallocatéchine et de (-)-épigallocatéchine), libèrent la delphinidine.

Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre elles. Le type B se caractérise par une liaison intermonomérique qui peut être en C4 - C8 ou en C4 - C6 et de conformation *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C3 (**Figure 14**). La stéréochimie du carbone C2 est généralement de configuration (*R*), mais il existe quelques exceptions. Ces types de liaisons existent aussi bien dans les dimères (Lea *et al.*, 1979; Boukharta, 1988; Ricardo da Silva *et al.*, 1991; de Freitas *et al.*, 1998; de Freitas & Glories, 1999; Sun *et al.*, 1999) que dans les trimères (Romeyer *et al.*, 1985; Boukharta, 1988; Ricardo da Silva *et al.*,

1991; Santos-Buelga *et al.*, 1995; de Freitas & Glories, 1999; Sun *et al.*, 1999) ou les tétramères (Tsai Su & Singleton, 1969). Les proanthocyanidines sont aussi présentes sous la forme estérifiée par l'acide gallique (Boukharta, 1988; Ricardo da Silva *et al.*, 1991; Escribano-Bailon *et al.*, 1992; Santos-Buelga *et al.*, 1995). Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C2 et les hydroxyles en position 5 ou 7 du noyau A (Jacques *et al.*, 1974; Vivas *et al.*, 1996).

De part leur représentativité dans le monde végétal certains des oligomères possèdent des noms particuliers. Ainsi le procyanidine **B1** correspond au dimère (-)-épicatéchine-(C4 β →C8) (+)-catéchine, le procyanidine **B2** correspond au dimère (-)-épicatéchine (C4 β →C8) (-)-épicatéchine, le procyanidine **B3** correspond au dimère (+)-catéchine (C4 α →C8) (+)-catéchine, le procyanidine **B4** correspond au dimère (+)-catéchine (C4 α →C8) (-)-épicatéchine, le procyanidine **B5** correspond au dimère (-)-épicatéchine (C4 β →C6) (-)-épicatéchine, le procyanidine **B6** correspond au dimère (+)-catéchine (C4 α →C8) (+)-catéchine, le procyanidine **B7** correspond au dimère (-)-épicatéchine (C4 β →C8) (+)-catéchine et le procyanidine **B8** correspond au dimère (+)-catéchine (C4 α →C8) (-)-épicatéchine. L'ensemble de ces dimères ainsi que les dérivés du **B1** et **B2** estérifiés avec de l'acide gallique ont été identifiés dans le jus et le raisin blanc (Fuleki & Ricardo da Silva, 1997; de Freitas & Glories, 1999; Fuleki & Ricardo da Silva, 2003).

Les dimères majoritaires du jus sont les procyanidines **B1** et **B2**. Au cours de la maturation du fruit les concentrations maximales de ces procyanidines sont atteintes dans les premiers stades de la maturation. Les procyanidines dimères **B1**, **B4** et **B6** représentent la majorité des procyanidines au premier stade du développement des pépins. Par contre à maturation complète, les dimères **B2** et **B4** prédominent. Bien qu'une diminution du taux global des procyanidines soit observée au cours de la maturation, la concentration du dimère **B2** augmente. Le dimère **B1** est le plus représenté dans la pellicule (de Freitas & Glories, 1999).

Les teneurs en proanthocyanidines sont très faibles, de l'ordre de quelques milligrammes (0,01-9,7 mg/L) dans le jus et les raisins blancs, en comparaison avec dans les cépages noirs (5-250 mg/L) (Carando *et al.*, 1999b; Fuleki & Ricardo da Silva, 2003), et varient selon le cépage et l'appellation (**Tableau 3**). Très peu d'études

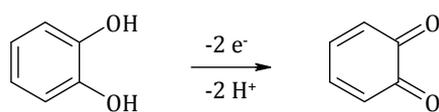


Figure 15. Les *o*-quinones : les formes oxydées de composés phénoliques

scientifiques sur ces composés ont été publiées dans la littérature. Il est également à noter l'absence d'études complètes sur les proanthocyanidines du vin blanc.

Le procyanidine **C1**, correspondant au trimère (-)-épicatéchine (C4 β →C8) (-)-épicatéchine (C4 β →C8) (-)-épicatéchine et le **T2** (-)-épicatéchine (C4 β →C8) (-)-épicatéchine (C4 β →C8) (+)-catéchine, a aussi été identifié dans le jus et le raisin blanc (Fuleki & Ricardo da Silva, 1997; Fuleki & Ricardo da Silva, 2003). Selon les mêmes auteurs, ces composés représentent seulement 6,3 % du taux des procyanidines totales du jus et du raisin blanc.

La complexité structurale des tanins est à l'origine de la diversité gustative des vins. L'évolution des tanins au cours du temps est fortement impliquée dans les phénomènes d'assouplissement de la saveur d'astringence des vins rouges (Chira, 2009). Contrairement aux vins rouges, les tanins sont considérés comme néfastes dans les vins blancs car leur présence affecte l'équilibre gustatif des vins et peut conduire à une perte de complexité et de typicité aromatique variétale. En effet, les tanins subissent de nombreuses transformations physico-chimiques au cours de l'élaboration du vin blanc qui les rendent réactifs vis-à-vis des thiols volatils. En dehors des données empiriques acquises sur le terrain, peu d'études portent sur l'influence des tanins et plus généralement des composés phénoliques sur l'arôme des vins blancs.

1.4 VOIES DE FORMATION DES QUINONES DANS LE MOUT ET LE VIN

Les modifications de la composition des polyphénols impliquent à la fois, des réactions d'oxydations enzymatiques et chimiques. Les premières ne sont présentes qu'aux premiers stades du processus d'élaboration des vins blancs (pressurage, débourage, fermentation alcoolique) tandis que les secondes débutent après l'inactivation des enzymes et se poursuivent tout au long du vieillissement du vin. Quelle que soit l'origine des modifications (réaction d'oxydation enzymatique ou chimique) elles sont basées principalement sur la réactivité des composés phénoliques en présence d'oxygène mais aussi sur la présence des groupes hydroxyles dans la molécule, par rapport à la présence ou non de cofacteurs d'oxydation comme les métaux.

Les quinones sont des composés cyclohexadiéniques comportant deux fonctions cétoniques conjuguées connues comme *o*-quinones. Elles correspondent à la forme oxydée d'un diphenol avec perte de deux électrons (**Figure 15**).

1.4.1 OXYDATION ENZYMATIQUE

Les majeures enzymes qui catalysent les réactions des polyphénols sont des enzymes d'oxydation qui proviennent des raisins mais aussi de contaminations fongiques notamment de *Botrytis cinerea*.

1.4.1.1 Enzymes catalysant l'oxydation des polyphénols

Les polyphénols peuvent être oxydés par trois catégories d'enzymes : les peroxydases, les laccases et les catéchol oxydases.

Les peroxydases (EC 1.11.1.7) sont des enzymes de type oxydase capables de catalyser l'oxydation d'une grande variété de substrats, en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène. Ces enzymes typiquement réduisent un peroxyde et oxydent un donneur d'hydrogène (Steenken & Neta, 1979). Le principal peroxyde substrat est le peroxyde d'hydrogène. Dans le jus de raisins, sa concentration est faible et constitue le facteur limitant la participation des peroxydases à l'oxydation des polyphénols durant le processus de la vinification. Les donneurs d'hydrogène qu'elles peuvent accepter sont nombreux et incluent certains composés phénoliques du moût des raisins comme les flavan-3-ols.

Les laccases (EC 1.10.3.2) catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en eau par l'intermédiaire de composés organiques divers (*o*-diphénols, polyphénols, polyamines, lignines, etc.). Ce sont des oxydases à plusieurs sites de fixation d'atomes de cuivre. Elles sont capables de déméthyliser la lignine et les acides méthoxyphénols (Yaropolov *et al.*, 1994). Leur origine est essentiellement fongique (ex. *Botrytis cinerea*) et elles n'existent que dans les moûts issus des vendanges attaquées par la pourriture grise. D'ailleurs le dosage spécifique de la laccase permet d'apprécier analytiquement l'état sanitaire des vendanges.

Le terme polyphénoloxydase (PPO) est un terme générique qui peut désigner plusieurs types d'enzymes, notamment les peroxydases, les laccases et les catéchol oxydases. Mais, dans le contexte de notre étude, il désignera l'enzyme qui possède les activités catécholase.

Les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1) ont pour substrats l'oxygène moléculaire et un composé phénolique. L'oxygène moléculaire est fixé en premier (Marques *et al.*, 1995). Le mécanisme catalytique est séquentiel (Mayer & Harel, 1979). Ces enzymes

prennent le nom de tyrosinases chez les animaux ou les champignons et de PPO chez les végétaux. Leur principale activité est l'activité catécholase (**Figure 16**) : un *o*-diphénol est oxydé en sa quinone et l'oxygène est réduit en eau. Cette catégorie d'enzymes est la plus impliquée dans l'oxydation des polyphénols lors du processus de la vinification.



Figure 16. Réaction d'oxydation enzymatique catalysée par la polyphénoloxydase

Les polyphénoloxydases sont probablement présentes dans tous les raisins quels que soient le cépage et l'origine. (Golan-Goldhirsh & Whitaker, 1984; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1989; Zawistowski *et al.*, 1991; Rodriguez-Lopez *et al.*, 1994; Amiot *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1995; Whitaker & Lee, 1995; Chazarra *et al.*, 1996; Cantos *et al.*, 2002; Nunez-Delicado *et al.*, 2005). Leur réactivité est particulièrement élevée dans les raisins riches en polyphénols. Par ailleurs, il est bien établi que les moûts riches en composés phénoliques présentent une capacité au brunissement plus élevée que les moûts pauvres en composés phénoliques. Les conséquences organoleptiques sur le vin fini ont été bien illustrées et mettent en cause quelques pratiques œnologiques comme l'hydroxydation (Dubourdieu *et al.*, 1986; Schneider, 1998; Ribereau-Gayon *et al.*, 1998, 2004). L'activité de la PPO est considérablement liée au cépage, au stade de la maturation du fruit et au terroir.

Le pH du milieu réactionnel influence également la spécificité des PPO de manière non négligeable. Ainsi, Janovitz-Klapp *et al.* (1989) ont démontré que les protons agissaient comme des inhibiteurs vis-à-vis de l'oxydation des *o*-diphénols par la PPO de pomme.

L'activité enzymatique de la PPO augmente en fonction du pH et de la température, avec un optimum à pH 6,0 et à 40°C (Yokotsuka & Singleton, 1997). Aux conditions œnologiques, à pH proche de 4,0 dans le moût, la PPO atteint 80 % de son activité optimale (Yokotsuka & Singleton, 1997). La présence du dioxyde de soufre inhibe partiellement sa réactivité sans l'arrêter totalement. D'après certains auteurs, l'activité de cette enzyme, diminue au cours de la fermentation alcoolique et a totalement disparu lors de son l'achèvement (Kidron *et al.*, 1978).

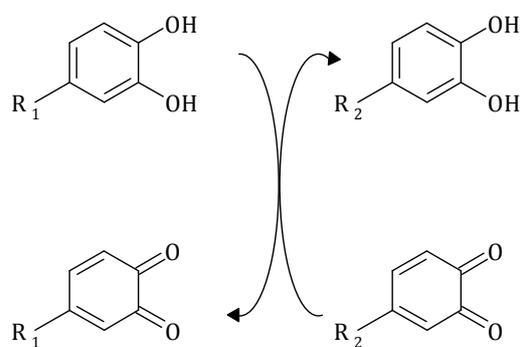


Figure 17. Schéma de principe de l'oxydoréduction couplée

1.4.1.2 Substrats de la polyphénoloxydase du raisin

Comme il a été évoqué précédemment la PPO a comme substrat l'oxygène moléculaire et un composé phénolique. L'affinité de la PPO du raisin pour l'oxygène est variable suivant le co-substrat (ex : $K_m O_2 = 18,4$ mmol/L pour le catéchol) mais toujours très élevée (Okuda *et al.*, 1999; Nunez-Delicado *et al.*, 2005). Cependant, la concentration de saturation en oxygène d'une solution en contact avec l'air à 30 °C est proche de 0,28 mmol/L : l'oxygène est donc un facteur limitant de l'oxydation enzymatique. Les K_m des substrats phénoliques donnés dans la littérature sont donc des K_m apparents car ils sont généralement obtenus avec l'air comme source d'oxygène.

Dans le moût, la PPO a pour substrats presque exclusivement les acides cinnamiques et leurs esters de l'acide tartrique (acide caftarique et acide coutarique) ; elle transforme l'acide caftarique en quinone (Gunata *et al.*, 1987; Rigaud *et al.*, 1991). En raison de l'activité crésolase de l'enzyme, l'acide coutarique donne la même quinone que l'acide caftarique. Ces réactions d'oxydation sont extrêmement rapides. La vitesse de consommation d'oxygène dans un moût au début de son contact avec l'air, peut dépasser 2 mg/L par minute, alors que dans un vin elle est de l'ordre de 1 à 2 mg/L par jour.

Certains polyphénols du moût sont des substrats secondaires de la PPO. Il s'agit de la quercétine-3-*O*-glucoside (Walker, 1964; Oleszek *et al.*, 1989), des procyanidines B1 à B4 (Cheynier *et al.*, 1988; Oleszek *et al.*, 1989; Cheynier & Ricardo da Silva, 1991; Bajaj *et al.*, 1997) et probablement tous les autres polymères de flavan-3-ols.

En revanche, la (+)-catéchine (Walker, 1964; Cheynier *et al.*, 1988; Guyot *et al.*, 1995), la (-)-épicatéchine (Walker, 1964; Cheynier *et al.*, 1988), la (-)-épicatéchine gallate (Cheynier *et al.*, 1988) et l'acide caféique (Walker, 1964; Cheynier & Moutounet, 1992) sont des substrats avec une affinité relativement importante pour la PPO du raisin.

1.4.2 REACTIONS D'OXYDORÉDUCTION COUPLEES

L'oxydoréduction couplée correspond au transfert de deux électrons d'une *o*-quinone à un *o*-diphénol de potentiel redox inférieur (**Figure 17**). Une nouvelle *o*-quinone est alors formée et l'*o*-quinone initiale est régénérée en son *o*-diphénol. Un

noyau *o*-diphénol dans la structure du donneur d'électrons semble être nécessaire à ce transfert.

Pour expliquer la consommation préférentielle de certains polyphénols par rapport à d'autres, l'hypothèse d'une oxydoréduction couplée a été proposée. Cette réaction a été mise en évidence en solution modèle par réaction de la quinone d'acide caftarique avec les catéchines [(+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (-)-épicatéchine galate] et avec les procyanidines (de **B1** à **B4**) (Cheynier & Ricardo da Silva, 1991). Elle se produit également entre la quinone d'acide caftarique et les catéchines (Cheynier *et al.*, 1989a; Oszmianski & Lee, 1990). Cette voie réactionnelle peut facilement être envisagée dans le moût. L'acide caftarique qui se trouve en concentrations relativement importantes dans le moût blanc peut jouer le rôle de transporteur d'électron et ainsi oxyder les *o*-diphénols de potentiels redox inférieurs (comme les catéchines) en leurs *o*-quinones. Ce mécanisme permet aussi la ré-oxydation de produits d'oxydation comportant un noyau *o*-diphénol, même si ceux-ci ne sont pas substrats de la PPO. Un produit d'oxydation du jus de raisin, l'acide 2-S-glutathionylcaféoyltartrique (**GRP**), peut participer aux réactions d'oxydations couplées (Cheynier & Van Hulst, 1988).

Le mécanisme d'oxydoréduction couplée a deux conséquences principales. Premièrement, certains *o*-diphénols du moût, qui ne sont pas ou sont de mauvais substrats de la PPO, tout en ayant des potentiels redox plus faibles que ceux du couple : quinone d'acide caftarique/acide caftarique (flavan-3-ols, procyanidines, anthocyanes et flavonols), peuvent être oxydés en leurs quinones. Deuxièmement, ce mécanisme préserve, lors de l'oxydation, l'acide caftarique aux dépens d'autres polyphénols du moût jusqu'à la consommation totale d'oxygène ou l'inactivation de la PPO (Cheynier *et al.*, 1988; Rigaud *et al.*, 1991). Cette protection n'est pas totale puisque l'oxydoréduction couplée est accompagnée d'une disparition d'un quart de la quantité initiale d'acide caftarique, qui est probablement incorporé dans des produits d'oxydation (Singleton, 1987).

1.4.3 OXYDATION CHIMIQUE

1.4.3.1 Les agents d'oxydation

Les mécanismes oxydatifs mis en jeu sont très complexes, surtout dans un milieu acide comme le vin. La lumière, la température et certains métaux favorisent la formation des radicaux oxygénés. L'oxygène moléculaire, O_2 , possède une structure bi-radicalaire, $\cdot \overline{O} | \overline{O} \cdot$ (structure de Lewis du dioxygène). Cette structure limite sa réactivité et l'oxygène ne peut pas former des liaisons en acceptant des couples d'électrons. Néanmoins, l'oxygène moléculaire peut devenir un radical hydroperoxyde ou un anion superoxyde par l'addition d'un seul électron à l'origine de l'oxydation de différents métaux, principalement du fer (Miller *et al.*, 1990; Danilewicz, 2003; Waterhouse & Laurie, 2006) (**Figure 18**). Le transport initial d'un électron conduit à la formation d'ions superoxydes qui au pH du vin existent sous la forme radical hydroperoxyde (**Figure 18** ; réaction **1** et **1a**). Cette étape de réaction impose la présence d'un métal comme le fer. Le transport du deuxième électron conduit à la formation d'un peroxyde qui est la forme générée dans le vin (**Figure 18** ; réaction **2** et **2a**). Via la réaction de Fenton [e] entre le peroxyde d'hydrogène et l'ion Fe^{2+} un agent oxydatif plus réactif que les précédents est créé (**Figure 18** ; réaction **3**) (Green & Hill, 1984). Il s'agit du radical hydroxyle. Cette dernière réaction produit de l'eau qui est le produit final de la réduction d'oxygène.

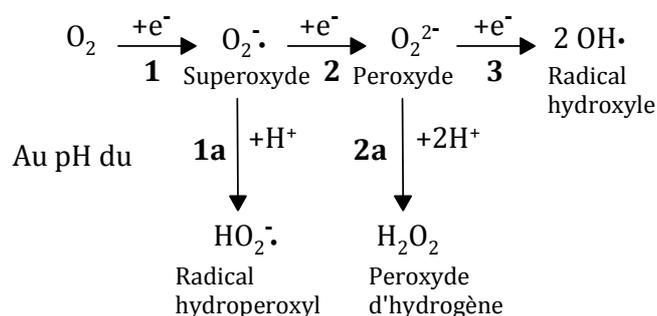


Figure 18. Production des radicaux libres pendant la réduction d'oxygène moléculaire

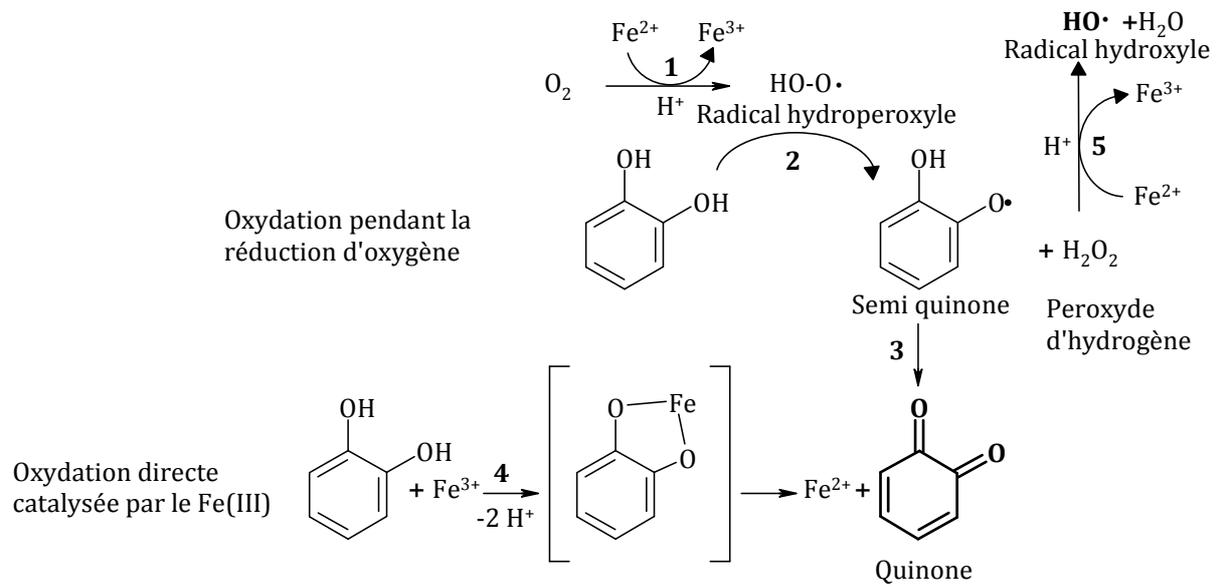


Figure 19. Oxydation chimique des composés phénoliques dans les conditions du vin

1.4.3.2 Les processus d'oxydation chimique

La concentration relativement importante des composés phénoliques dans le vin est à l'origine des principaux substrats d'oxydation (Singleton, 1987). Les espèces oxygénées réactives (ROS) peuvent être réduites facilement par les polyphénols. De ce fait, ils sont de meilleurs oxydants que l'oxygène. Quand les polyphénols réagissent avec les radicaux libres d'oxygène comme le radical hydroperoxyde, la vitesse de la réaction de chaque polyphénol dépend de leur capacité à former un radical stable : la forme semi-quinone. Elle-même s'oxyde ensuite en quinone (**Figure 19** ; réaction **3**). Les composés qui contiennent des fonctions 1,2,3-trihydroxyles (pyrogallol) ou des cycles aromatiques dihydroxy (catéchol), s'oxydent facilement grâce à leur radical phénoxy quinone. Celui-ci peut être stabilisé par un deuxième atome d'oxygène. En conséquence, les catéchines apparaissent comme étant les espèces les plus réactives en présence des radicaux hydroperoxydes puisqu'elles forment des semi quinones stables (Singleton, 1987) (**Figure 19** ; réaction **2**). Au cours de cette réaction, le radical hydroperoxyde se réduit, par l'addition d'un hydrogène, en peroxyde d'hydrogène.

Parmi les catéchines, la (-)-épicatéchine est plus oxydable que la (+)-catéchine. Pour les procyanidines dimères présentant une liaison interflavane C4-C8, l'oxydation dépend de la nature de l'unité structurale supérieure. Dans le cas de liaison C4-C6, l'unité structurale inférieure est à l'origine de l'oxydabilité. La présence de la (+)-catéchine dans ces dimères confère à ces molécules une plus grande oxydabilité que la (-)-épicatéchine. Pour une même unité de base [(-)-épicatéchine], l'oxydabilité augmente avec le degré de polymérisation. Ainsi le trimère **C1** est plus oxydable que le dimère **B2** et que le monomère (+)-catéchine certainement en raison du nombre élevé de sites oxydables.

1.4.3.3 Le rôle clé des métaux

Le rôle des métaux comme catalyseurs ou initiateurs des réactions d'oxydation était bien étudié. Les conclusions de ces nombreuses études effectuées dans le vin varient selon les auteurs.

Ribèreau-Gayon, (1933) a noté un effet catalytique du cuivre et des sels du fer. En revanche, il n'a noté aucun effet du manganèse sur l'oxydation du vin, même si à cette époque les moyens pour analyser les effets d'oxydation des métaux étaient limités. Berg & Akiyoshi (1956) ont observé qu'en présence de fortes concentrations d'oxygène, le

cuivre, le fer et leurs mélanges, accélèrent le brunissement de vin. Cacho *et al.* (1995) en analysant les effets d'ajout de différents métaux (fer, cuivre et sulfate de manganèse) sur l'oxydation des composés phénoliques du vin rouge, ont constaté clairement que le processus d'oxydation dans le vin était dépendant de la concentration de ces métaux. Oszmianski *et al.* (1996) ont démontré, en solution modèle, un effet catalytique des ions de fer (Fe^{2+}) sur l'oxydation de la catéchine quand celle-ci était en forte concentration. De plus, Makris & Rossiter (2000) ont observé une augmentation de la dégradation oxydative de la quercétine et de la rutine en présence des catalyseurs comme le sulfate de cuivre et les métaux ferreux, à 97 °C et pH 8,0. Par contre, Benitez *et al.* (2002) n'ont observé aucune influence d'un ajout de cuivre, de fer ou de sulfate de manganèse sur le brunissement des vins de Jerez, à des concentrations proches de celles retrouvées dans le vin. Seule l'addition de fer à des concentrations plus élevées, c'est-à-dire en dehors de la fourchette des concentrations retrouvées dans le vin (de 9 à 12 mg/L), corrélait avec l'accentuation du brunissement. Le manganèse en concentration inférieure à 0,8 mg/L peut empêcher l'effet oxydant du fer. Contrairement à ce phénomène d'antagonisme du manganèse, de récents travaux (Danilewicz, 2007; Danilewicz & Wallbridge, 2010) ont montré que le cuivre a un effet synergique avec le fer sur l'oxydation de catéchol.

Dans le vin, le fer présente un niveau de concentration fluctuant entre 2 et 5 mg/L. Il joue un rôle clé sur les réactions d'oxydation. Le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par les polyphénols pendant l'oxydation (**Figure 19** ; réaction 4). En présence d'oxygène, le fer ferreux (Fe^{2+}) s'oxyde en fer ferrique (Fe^{3+}) jusqu'à l'oxydation totale des composés phénoliques (Powell & Taylor, 1982). D'après Oszmianski *et al.* (1996), l'addition du sulfate de fer ferreux augmente la vitesse d'oxydation de la (+)-catéchine.

Evidemment, le Fe^{3+} agit comme catalyseur de la réduction, ce qui est défavorable, au niveau thermodynamique pour les électrons pendant le processus d'oxydation (Miller *et al.*, 1990). L'oxydation directe des polyphénols s'effectue par le fer ferrique (Fe^{3+}) et la réduction du peroxyde d'hydrogène par le fer ferreux (Fe^{2+}), ce qui conduit à la formation d'un radical hydroxyle (**Figure 19** ; réaction 5).

Les métaux présents même à l'état de traces dans certains vins (Elias *et al.*, 2009a), jouent un rôle déterminant sur les réactions d'oxydation des composés phénoliques, provoquant la détérioration de l'arôme du vin (Wildenradt & Singleton, 1974; Irwin *et al.*, 1991; Uchida & Ono, 1996).

1.4.3.4 Les principaux antioxydants

1.4.3.4.1 Le dioxyde de soufre

L'utilisation du dioxyde de soufre est à l'heure actuelle incontournable en œnologie. Son utilisation dans les vins remonte vraisemblablement au XVIII^e siècle et en dépit de ses inconvénients, aucune molécule de remplacement n'a été proposée.

Ses nombreuses propriétés en font un auxiliaire indispensable :

Grâce à son pouvoir antiseptique, il inhibe le développement des micro-organismes et son activité est plus grande sur les bactéries que sur les levures. A dose suffisante (25 mg/L de libre), il préserve le vin du développement de microorganismes et permet d'éviter ainsi les problèmes de refermentation et de déviation aromatique (Millet & Lonvaud, 1999).

Les propriétés antioxydantes du dioxyde de soufre font l'objet d'une controverse. En effet, bien que son activité antiradicalaire soit reconnue (Pontallier, 1981), certains auteurs contestent ses propriétés antioxydantes dans les vins (Ribéreau-Gayon, 1933; Vivas, 1997). Pendant des années, les propriétés antioxydantes de dioxyde de soufre ont été attribuées à sa réaction avec l'oxygène. Cependant, cette réaction, dans les conditions du vin, semble être inhibée. En effet, l'oxydation du dioxyde de soufre peut être empêchée par la présence des polyphénols (Danilewicz, 2007). Le taux d'oxydation du sulfite dans une solution modèle proche du vin est dépendante de la concentration et du type de polyphénol (Danilewicz, 2007; Danilewicz & Wallbridge, 2010). Ces résultats sont en conformité avec l'hypothèse selon laquelle le sulfite ne réagit pas directement avec l'oxygène moléculaire, mais avec le peroxyde d'hydrogène, produit d'oxydation des composés phénoliques (Boulton *et al.*, 1996; Waterhouse & Laurie, 2006; Danilewicz & Wallbridge, 2010). Saucier & Waterhouse (1999) ont mis en évidence une activité antiradicalaire synergique entre le dioxyde de soufre et la (+)-catéchine.

D'autre part, le dioxyde de soufre a une forte activité antioxydasique, car il inhibe instantanément le fonctionnement des enzymes d'oxydation (tyrosinase et laccase). Le

dioxyde de soufre protège ainsi les moûts d'une oxydation enzymatique, avant le départ en fermentation.

En solution hydroalcoolique au pH du vin, le dioxyde de soufre est principalement sous la forme nucléophile HSO_3^- . Il peut donc se combiner à différentes molécules possédant un site électrophile comme l'éthanal et les molécules carbonylées (Blouin, 1966; Glories, 1984).

1.4.3.4.2 Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly) naturellement présent dans le raisin sous la forme réduite ou oxydée. Le glutathion s'accumule dans la baie des raisins à partir la véraison (Adams & Liyanage, 1993; Okuda & Yokotsuka, 1999). Sa concentration dans le moût est dépendante du cépage (Cheynier *et al.*, 1989d), de la conduite du vignoble (Choné *et al.*, 2006) et des conditions d'élaboration (oxydation, pasteurisation) (Cheynier *et al.*, 1989c; Maggu *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2010).

Le glutathion est un thiol de faible poids moléculaire et le plus abondant chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, représentant environ 1 % de son poids sec (Penninckx & Elskens, 1993). Le glutathion est une source endogène et exogène essentielle de soufre pour *Saccharomyces cerevisiae* (Grant *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2003). Cette fonction explique la disparition du glutathion au cours des premiers jours de la fermentation alcoolique et sa libération à la fin de la fermentation (Park *et al.*, 2000). Par conséquent, la concentration du glutathion dans les vins est dépendante de la souche de levure employée (Lavigne *et al.*, 2007). Vraisemblablement lors de l'autolyse des levures en fin de fermentation alcoolique, il pourrait être libéré dans le vin.

Sa concentration dans les moûts diminue rapidement puisqu'il se combine très facilement au cours des opérations prefermentaires avec les *o*-quinones d'acide caftarique pour former le **GRP** (Singleton *et al.*, 1984; Singleton *et al.*, 1985; Cheynier *et al.*, 1986). Le glutathion est décrit comme un bon inhibiteur des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques du brunissement des jus de fruits et d'autres aliments (Friedman, 1996). La présence du glutathion dans le moût et le vin comme molécule présentant un potentiel redox beaucoup plus fort que celui des thiols volatils,

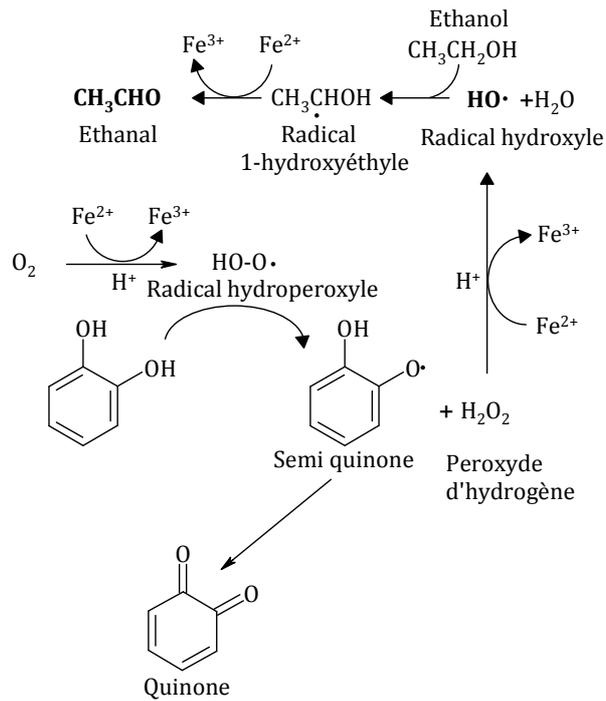


Figure 20. Production d'éthanal au cours de la cascade d'oxydation des composés phénoliques

peut donc jouer un rôle protecteur vis à vis de ceux-ci dans les vins au cours du vieillissement (Lavigne Cruège *et al.*, 2003; Lavigne *et al.*, 2007).

1.4.3.5 Les produits secondaires de l'oxydation et leur impact sur l'arôme du vin

L'oxydation chimique du vin impliquant une évolution de son arôme global, est généralement associée à la formation des composés carbonylés (Wildenradt & Singleton, 1974; Escudero *et al.*, 2000b; Escudero *et al.*, 2002; Loscos *et al.*, 2010).

Wildenradt & Singleton (1974) étudièrent, les premiers, les mécanismes oxydatifs conduisant à la formation de composés volatils odorants dans les vins. Ils ont démontré que la présence des polyphénols est indispensable à la production des aldéhydes volatils. Ils ont également mis en évidence le rôle catalytique des polyphénols dans la réaction d'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde en présence d'oxygène moléculaire. Dans cette série de réactions d'oxydoréduction, l'acétaldéhyde apparaît comme un produit secondaire de l'oxydation des polyphénols en présence du peroxyde d'hydrogène, selon le schéma réactionnel présenté dans la **Figure 20** (Boulton, 2003; Danilewicz, 2003).

Des études récentes suggèrent que les métaux à l'état de traces constituent également de bons catalyseurs des principales réactions d'oxydation retrouvées dans le vin, comme celles de l'oxygène moléculaire, des polyphénols, du dioxyde de soufre et de l'éthanol (Laurie & Waterhouse, 2006; Danilewicz, 2007; Danilewicz *et al.*, 2008; Elias *et al.*, 2008). Selon Elias *et al.* (2009a), les métaux sont nécessaires pour réduire le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle (HO \cdot) par la réaction de Fenton. Ce radical est très instable et peut réagir immédiatement avec des alcools supérieurs (Danilewicz, 2003; Laurie & Waterhouse, 2006), des acides organiques (Fulcrand *et al.*, 1998; Es-Safi *et al.*, 2000; Laurie & Waterhouse, 2006; Elias *et al.*, 2009a) mais aussi avec l'éthanol pour produire l'acétaldéhyde (Elias & Waterhouse, 2010). Par ailleurs, des études sur la bière ont établi un lien direct entre la production du radical hydroxyle, *via* l'oxydation des composés phénoliques catalysée par les métaux, l'augmentation de l'intensité du caractère oxydé perçu à la dégustation et les teneurs en aldéhydes (nonanal, propanal, phénylacétaldéhyde) (Irwin *et al.*, 1991; Uchida & Ono, 1996).

Elias *et al.* (2009b; 2009a), en exploitant la méthode RPE (Résonance paramagnétique Electronique), ont réussi à identifier et quantifier les principaux facteurs qui réagissent sur la formation des radicaux libres oxygénés dans les vins

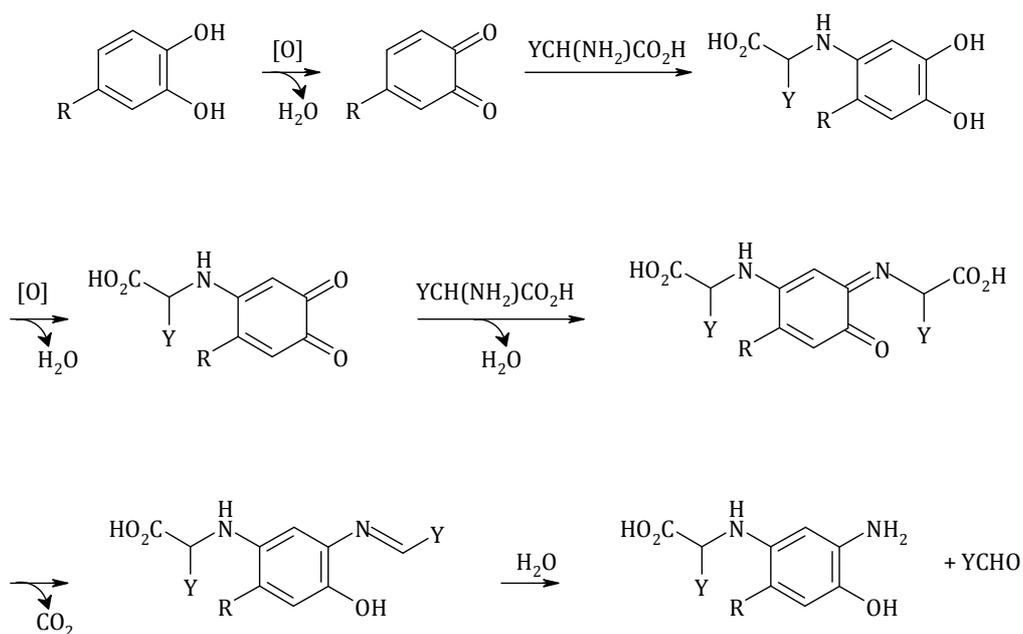
blancs et rouges. Ils en concluent que le radical 1-hydroxyéthyle ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\cdot$), produit par la réaction d'oxydation de l'éthanol avec le radical hydroxyle, est le radical majoritaire de l'oxydation du vin par intermédiaire de la réaction de Fenton.

Selon Elias & Waterhouse (2010), dans une solution modèle de composition proche du vin blanc, en conditions d'oxydation [$300 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, $50 \mu\text{M Fe(II)}$], la production maximale du radical 1-hydroxyéthyle est observée en présence d'un polyphénol modèle, le 4-méthylcatéchole (12 mM), et en absence d'oxygène. Dans les mêmes conditions expérimentales, et pour des concentrations croissantes en dioxyde de soufre (0 à $250 \mu\text{M}$), aucun effet antioxydant du dioxyde de soufre n'est observé.

Par ailleurs, une corrélation entre les teneurs de la (+)-catéchine et la formation du radical 1-hydroxyéthyle est également établie dans les vins blancs (Elias *et al.*, 2009a). Cette corrélation précise le rôle prooxydant de la (+)-catéchine dans le vin. L'addition du dioxyde de soufre à des concentrations comprises entre 40 et 80 mg/L n'a aucun effet inhibiteur sur la formation de ce radical dans les vins blancs (Elias *et al.*, 2009a).

Dans les vins blancs, les teneurs en acétaldéhyde atteignent selon le niveau d'oxydation des vins blancs selon les auteurs, 20 à 439 mg/L (Flanzy, 1998; Liu & Pilone, 2000; Elias *et al.*, 2008). Au pH du vin, l'acétaldéhyde est produit principalement au cours de la fermentation alcoolique. Il est retrouvé majoritairement sous la forme combinée avec le dioxyde de soufre (HSO_3^-). Par ailleurs, la corrélation entre l'augmentation des teneurs en acétaldéhyde et les nuances oxydatives des vins dans des conditions du vieillissement accéléré reste à nos jours loin d'être établie (Escudero *et al.*, 2002).

La forme activée de l'acétaldéhyde (le radical 1-hydroxyéthyl), produite au cours de la cascade des réactions d'oxydation chimique des composés phénoliques dans le vin, peut jouer un rôle clé sur la genèse des composés volatils, marqueurs du vieillissement prématuré des vins blancs. Pons *et al.* (2010) ont démontré que la réaction d'aldolisation entre l'acétaldéhyde et l'acide α -cétobutyrique est un des mécanismes responsables de



Y: résidu des acides aminés
R: résidu des flavonols

Figure 21. Schéma de la réaction de la dégradation de Strecker des acides aminés induit par l'oxydation des flavonols (Rizzi, 2006)

la production du sotolon (3-hydroxy-4,5-diméthyl-2(5*H*)-furanone). Le sotolon est un hétérocycle volatil possédant une intense odeur de curry, et de noix dont la contribution à l'arôme de vieillissement défectueux des vins blancs sec est aujourd'hui clairement établie (Escudero *et al.*, 2000a; Lavigne Cruège *et al.*, 2003; Silva Ferreira *et al.*, 2003a). Son seuil de perception dans un vin blanc sec est de 8 µg/L (Lavigne *et al.*, 2008). Selon Pons *et al.* (2010), en présence de 10 mg/L d'acide α-cétobutyrique et 1 mg/L d'acétaldéhyde, la formation du sotolon est possible dans un milieu modèle conservé à 40°C, après 30 jours d'incubation.

D'autres composés carbonylés ont, aujourd'hui, été identifiés comme de bons marqueurs d'un vieillissement oxydatif des vins blancs secs, tels que le phénylacétaldéhyde et le méthional. Ces composés sont connus sous le nom des aldéhydes de Strecker. Le phénylacétaldéhyde, à l'odeur caractéristique de rose fanée, participe également avec le méthional (Escudero *et al.*, 2000b) à l'odeur caractéristique du vin blanc évolué (Silva Ferreira *et al.*, 2003b). Les seuils de perception du phénylacétaldéhyde et du méthional dans une solution modèle du vin sont respectivement, 1 et 0,5 µg/L (Culleré *et al.*, 2007). Les teneurs de ces aldéhydes dans les vins blancs varient de 10 à 220 µg/L selon le degré d'oxydation (Silva Ferreira *et al.*, 2002; Sarrazin *et al.*, 2007a; Bueno *et al.*, 2010; Loscos *et al.*, 2010).

Les mécanismes de formation de ces aldéhydes *via* les mécanismes de Strecker à partir des acides aminés sont largement décrits dans la littérature (Yaylayan, 2003). Il s'agit d'une réaction de décarboxylation intramoléculaire des acides aminés après leur réaction avec des composés dicarboxylés, conduisant à la formation de composés aldéhydiques présentant un atome de carbone de moins que l'acide aminé. Les substrats α-dicarboxylés, tels que le glyoxal et le pyruvaldéhyde, ont été majoritairement étudiés dans les mécanismes de Strecker. En règle générale, tous les composés dicarboxylés constituent des substrats potentiels pour cette réaction.

En effet, les composés phénoliques lors de leur oxydation en *o*-quinones peuvent être impliqués dans les réactions de formation des composés volatils par l'intermédiaire de la réaction de dégradation de Strecker (**Figure 21**) (Mathew & Parpia, 1971; Rizzi, 2006).

1.5 MECANISMES REACTIONNELS DES THIOLS VOLATILS AVEC LES COMPOSES PHENOLIQUES

1.5.1 DECOUVERTES EMPIRIQUES ET OBSERVATIONS SCIENTIFIQUES ACQUISES

C'est à partir des années 1990 que la nature chimique des principaux composés responsables de l'arôme caractéristique de vins issus du cépage Sauvignon blanc a été identifiée. La découverte de la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (**4MSP**) par Darriet *et al.* (1995) a ouvert la voie à l'identification d'autres arômes soufrés. En même temps, plusieurs techniques œnologiques ont été mises en cause et optimisées pour préserver les thiols volatils du vin. La maîtrise de l'apport d'oxygène au cours du processus de vinification du vin blanc est devenue le facteur clé synonyme de qualité.

Dubourdieu & Lavigne (1990) ont montré que l'absence de protection des moûts contre l'oxydation, affecte considérablement l'arôme du Sauvignon blanc. La teneur en **4MSP** des vins est d'autant plus faible que le moût a été moins bien protégé de l'oxydation.

Tominaga (1998), a observé que les vins de Sauvignon blanc issus de moûts de presse apparaissaient à la dégustation comme moins aromatiques. Il a démontré que le contenu en thiols volatils était moins important dans ces vins par rapport à ceux issus de moût de goutte.

✓ *La pauvreté aromatique paradoxale du vin de presse laisse à penser que certains constituants du vin, relativement plus abondants dans le moût de presse que dans le moût de goutte agissent comme « piège » à arôme.*

Le moût de presse est beaucoup plus chargé en composés phénoliques que le moût de goutte. Pendant l'extraction des raisins au cours du pressurage, il y a dissolution des composés phénoliques de la pellicule, du pépin et des rafles en particulier des catéchines, ainsi qu'une augmentation du pH, liée à l'extraction du potassium des parties solides du raisin. La dissolution des composés phénoliques totaux au cours du pressurage peut être appréciée par mesure de l'indice des composés phénoliques (densité à 280 nm). Tominaga (1998), a corrélé l'extraction poussée des raisins avec l'augmentation importante de l'indice des polyphénols à 280nm.

✓ *Les composés phénoliques, abondants dans les vins de presse, sont les principaux composants suspects impliqués dans le piégeage des thiols.*

De plus, Singleton *et al.* (1980) et Cheynier *et al.* (1989c) ont démontré que les conditions du pressurage affectent les concentrations en glutathion et modifient la composition phénolique des vins blancs issus des cépages Chardonnay et Grenache blanc. Le rôle antioxydant du glutathion contre l'oxydation des moûts est parfaitement démontré. Sa capacité à réagir avec les quinones des composés phénoliques est bien établie (Cheynier *et al.*, 1993; Makhotkina & Kilmartin, 2009).

✓ *L'éventuelle modification de la composition du moût par l'oxygène, illustre bien que la maîtrise du mécanisme d'oxydation des composés phénoliques est l'étape clé de la vinification des vins blancs de qualité.*

Tominaga (1998) a observé au cours du vieillissement en bouteille, une baisse des composés intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. Cette diminution des teneurs en thiols volatils dans le vin est variable selon la molécule considérée. Les teneurs en **3SH** et en **4MSP** diminuent plus lentement que celles en acétate (**A3SH**).

✓ *Derrière la chimie réactionnelle des thiols volatils se cachent les facteurs qui expliquent leur stabilité ou leur dégradation dans le vin.*

Les travaux de Herbst *et al.* (2008) ont montré qu'au cours de la conservation du vin de Sauvignon blanc en bouteille, le **3SH** se dégrade régulièrement au cours du temps. Le contenu en acides phénols reste stable dans le vin et seules les concentrations en (+)-catéchine et en (-)-épicatéchine diminuent significativement après 24 mois. De plus, il a été montré que la perméabilité de l'obturateur en oxygène (capsule à vis ou bouchon liège naturelle) influençait la stabilité des thiols volatils. En effet les vins conservés en bouteilles fermées avec des bouchons en liège sont moins stables.

✓ *L'oxydation des catéchines semble être le facteur clé qui influence la dégradation du **3SH** dans le vin blanc.*

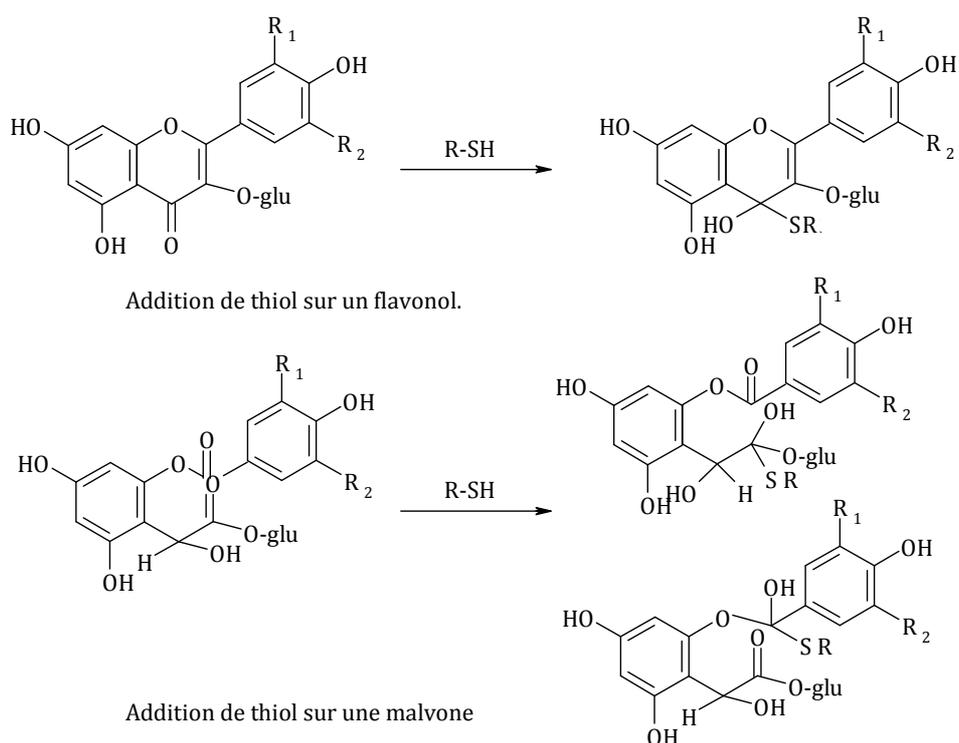


Figure 22. Addition nucléophile de thiol sur un flavonol et une malvone

De études menées dans notre laboratoire sur le vin rouge (Murat *et al.*, 2003; Blanchard *et al.*, 2004) ont montré en milieu modèle que le 3-sulfanylhéxan-1-ol, est stabilisé en présence des anthocyanes. Une diminution de l'ordre de 10 % du **3SH** a été observée si la solution contenait des anthocyanes et ceci en absence d'oxygène (Blanchard, 2000). Nous pouvons donc formuler l'hypothèse que les anthocyanes limitent les phénomènes oxydatifs qui semblent être à l'origine de la disparition des thiols volatils. Sachant que l'oxydation des anthocyanes peut conduire à la formation de malvone et de flavonol (**Figure 22**) (Monterea, 1969; Hrazdina, 1970; Galvin, 1993), il est possible que ces deux molécules possédant une fonction cétone, puissent réagir par addition nucléophile avec les thiols volatils pour former un hémimercaptal (**Figure 22**). Il est également possible d'envisager une addition électrophile de thiols sur le carbone 2 de l'hétérocycle oxygéné. Cependant, la faible disparition de thiols en présence des anthocyanes nous incite à penser que de telles additions nucléophiles restent limitées, et ce malgré une forte consommation d'oxygène dissous (Blanchard, 2000; Blanchard *et al.*, 2004).

Blanchard *et al.* (2004), ont noté une diminution de la concentration en **3SH** après aération du vin rouge. Cet effet n'est pas lié directement à la dissolution d'oxygène mais bien à la présence d'autres composés qui, s'oxydant sous l'action de l'oxygène, induisent une diminution de la concentration en **3SH**. Cette diminution semble commencer dès la fin de la consommation totale de l'oxygène dissous par la matrice.

Afin de mieux comprendre l'impact de l'oxydation des composés phénoliques sur le **3SH**, une étude en solution modèle a été menée par ces mêmes auteurs. La catéchine présente dans une solution modèle du vin saturé en oxygène, est capable de provoquer une diminution de la teneur en **3SH** de l'ordre de 60 % après une semaine d'incubation à 20°C. Cet effet est atténué en présence du dioxyde de soufre. Par conséquent, l'état d'oxydation de la (+)-catéchine est le facteur majeur influençant la consommation en **3SH** par la matrice.

✓ *La réactivité des thiols volatils est dépendante de la nature chimique du composé phénolique, et en particulier de son oxydabilité.*

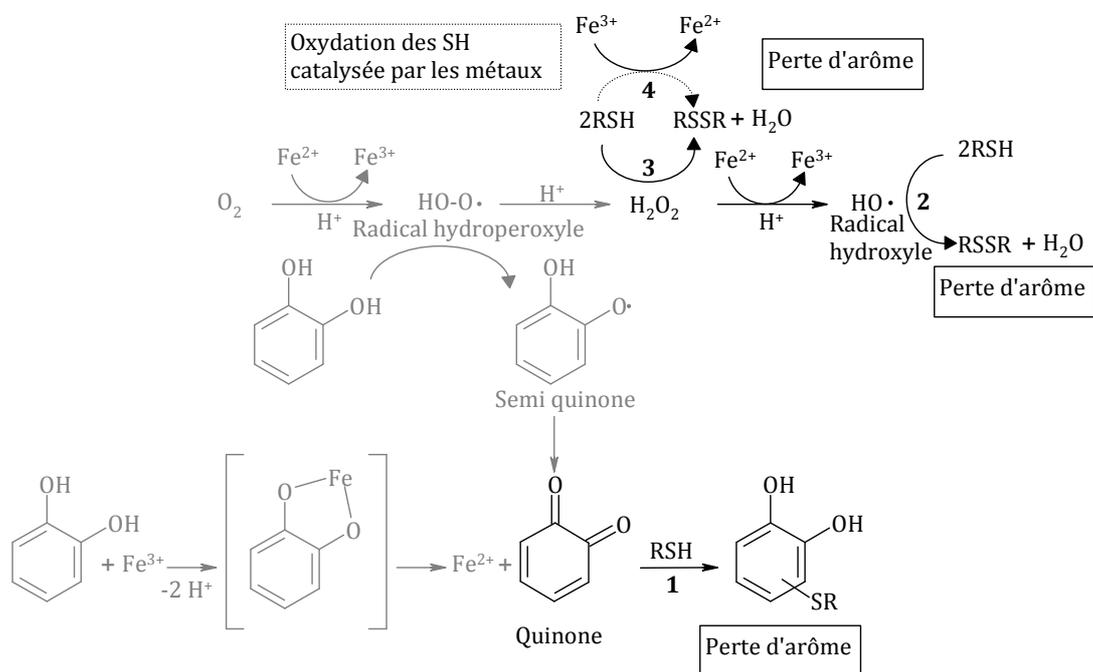


Figure 23. Voies hypothétiques de la dégradation des thiols volatils (RSH) dans les conditions du vin

1.5.2 MECANISME PROPOSE

On sait aujourd'hui que les différents thiols volatils jouant un rôle essentiel dans l'arôme variétal de plusieurs cépages, sont extrêmement sensibles aux réactions d'oxydation. Nous avons vu également qu'ils peuvent être considérés comme des nucléophiles, et de ce fait peuvent participer à des réactions d'addition avec les quinones, produites après l'oxydation des composés phénoliques.

Dès leur libération au cours de la fermentation alcoolique et tout au long du vieillissement du vin, les thiols volatils sont susceptibles de donner des réactions d'addition avec les quinones présentes dans le vin. Quelle que soit la voie de production des quinones (enzymatique ou chimique), le mécanisme résultant de la dégradation de thiols volatils reste identique.

Cette combinaison est dépendante de la nature et de la teneur en composés phénoliques et en particulier de leurs niveaux d'oxydation. Le mécanisme proposé en **Figure 23** présente une explication possible de la diminution de concentration de ces composés impliqués dans les perceptions de fraîcheur et de complexité des vins blancs.

Par ailleurs, la principale question que nous pouvons nous poser est : Quel est le devenir d'un vin blanc jeune de Sauvignon blanc avec des teneurs en thiols volatils importantes ?

Le mécanisme proposé pour répondre à cette question est présenté en **Figure 23**. Il décrit, dans les conditions de vieillissement du vin, la dégradation des thiols volatils résultant de leur réaction avec les produits d'oxydation des composés phénoliques. Au cours du vieillissement du vin, les thiols volatils agissant comme nucléophiles peuvent s'additionner sur les sites électrophiles des composés phénoliques oxydés (**Figure 23** ; réaction **1**) mais aussi se dégrader par autoxydation en présence de forts oxydants comme les espèces activés d'oxygène et les métaux (**Figure 23** ; réaction **2, 3 et 4**). Dans tous les cas, la dégradation des thiols volatils induit une perte d'arôme.

Dans ces mécanismes, des composés antioxydants, tels que le glutathion (Lavigne Cruège *et al.*, 2003; Lavigne *et al.*, 2007), le dioxyde de soufre sont susceptibles de limiter les phénomènes réactionnels (Danilewicz, 2003; Blanchard *et al.*, 2004; Danilewicz, 2007; Danilewicz *et al.*, 2008; Danilewicz & Wallbridge, 2010) et l'oxygène, les métaux, susceptible de l'accroître.

2

Matériels et méthodes

2.1 ANALYSES DES COMPOSES VOLATILS

2.1.1 TECHNIQUES D'EXTRACTION

2.1.1.1 Extraction non sélective des composés odorants

Un volume de 500 mL de vin préalablement centrifugé est extrait au dichlorométhane (2 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, centrifugées 10 minutes à 4000 rpm pour casser l'émulsion et séparées dans une ampoule à décanter. La phase organique est séchée au sulfate de sodium anhydre, puis concentrée sous flux d'azote, jusqu'à un volume de 500 μ L.

2.1.1.2 Extraction non-sélective des furanones et des aldéhydes

La méthode utilisée pour l'extraction du sotolon est celle décrite par Pons *et al.* (2008). Cette méthode a été adaptée au dosage du phénylacétaldéhyde.

Au préalable, 100 μ L d'étalon interne (octan-3-ol) en solution alcoolique (100 mg/L) et 15 g de sulfate d'ammonium $[\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2]$ sont ajoutés à 100 mL du vin afin de favoriser la volatilisation des composés. On procède à trois extractions liquide-liquide successives par 10, 5 et 5 mL de dichlorométhane (agitation magnétique 10, 5 et 5 minutes à 750 rpm). Les phases organiques sont récupérées, assemblées, séchées sur sulfate de sodium anhydre, puis concentrées sous flux d'azote inerte, jusqu'à un volume de 500 μ L.

2.1.1.3 Extraction non-sélective des esters éthyliques d'acides gras, acétates d'alcools supérieurs et des alcools en C6

La méthode utilisée pour l'extraction des esters éthyliques d'acides gras et acétates d'alcools supérieurs est celle décrite par Pineau (2007) puis validée pour le dosage des alcools en C6.

50 mL de vin, préalablement additionnés de 100 μ L de solution d'octan-3-ol à 10 mg/L, utilisé comme étalon interne, sont successivement extraits par 5, 5 et 5 mL d'un mélange de solvants pentane/éther (1:1, v/v), pendant 5 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique à 600 rpm. Les phases organiques assemblées, puis séchées sur sulfate de sodium anhydre sont concentrées sous flux d'azote inerte jusqu'à un volume de 250 μ L.

2.1.1.4 Extraction sélective des thiols volatils

2.1.1.4.1 Méthode en grand volume

La méthode utilisée pour extraire sélectivement les thiols volatils en grand volume est celle décrite par Tominaga *et al.* (1998b) et modifiée en 2000 (Tominaga *et al.*, 2000b).

Un volume de 500 mL de vin ou de moût préalablement centrifugé et contenant 2,5 nmol d'étalon interne [1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol (1,3,3MMB)] est extrait par du dichlorométhane (2 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, centrifugées 10 minutes à 4000 rpm pour casser l'émulsion et séparées dans une ampoule à décanter. Les phases organiques sont ensuite extraites avec une solution de *p*-hydroxymercurebenzote de sodium (*p*-HMB) (1 mM) dans un tampon Trizma® base [2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol] (0,2 M ; pH 10 ; 2 x 20 mL).

Les adduits *p*-HMB/thiols sont fixés sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1X2 ; 50-100 mesh ; 1,5 x 3 cm) préalablement réactivée par de l'acide chlorhydrique (0,1 M). La colonne est lavée par 50 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium (0,1 M ; pH 7). Les thiols volatils sont libérés par 60 mL d'une solution de cystéine (pH 7 ; 35 mM).

L'éluat contenant les thiols volatils est additionné de 500 μ L d'acétate d'éthyle (CHROMASOLV®), puis extrait au dichlorométhane (4 puis 3 mL) pendant 10 minutes à

900 rpm. Les deux phases organiques sont rassemblées et séchées au sulfate de sodium anhydre, puis concentrées sous flux d'azote inerte, jusqu'à 100 μL .

2.1.1.4.2 Méthode en petit volume

La méthode utilisée pour extraire sélectivement les thiols volatils en petit volume est celle décrite par Tominaga & Dubourdieu (2006).

7,5 mL d'une solution d'acide *p*-hydroxymercuribenzoate de sodium (*p*-HMB) (2 mM), préparée dans un tampon Trizma® base [2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol] sont ajoutés à un volume de 50 mL de vin préalablement centrifugé et contenant 1,2 nmol d'étalon interne [1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol (1,3,3MMB)] (0,1 M ; pH 10). Le pH est ajusté à pH 7 avec une solution de soude (NaOH, 10N) et la complexation des thiols volatils avec le *p*-HMB se réalise sous agitation magnétique à 600 rpm pendant 10 minutes.

Les adduits *p*-HMB/thiols sont fixés sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1X2 ; 50-100 mesh ; 1,5 x 3 cm) réactivée à l'acide chlorhydrique (0,1 M). La colonne est lavée par 50 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium (0,1 M ; pH 7). Les thiols volatils sont libérés par 60 mL d'une solution de cystéine (pH 7 ; 35 mM).

500 μL d'acétate d'éthyle (CHROMASOLV®) sont additionnés dans l'éluat ainsi récupéré. Puis celui-ci est extrait par du dichlorométhane (4 puis 3 mL) pendant 10 minutes à 900 rpm. Les deux phases organiques sont rassemblées et séchées au sulfate de sodium anhydre, puis concentrées sous flux d'azote inerte, jusqu'à 50 μL .

2.1.2 FRACTIONNEMENT D'EXTRAITS ORGANIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

2.1.2.1 Conditions chromatographiques

Le protocole utilisé est adapté de celui proposé par Ferreira *et al.* (1999) et modifié par Pineau *et al.* (2009). Un volume de 250 μL d'un extrait organique préparé à partir de 500 mL de vin est injecté sur un système analytique DIONEX Ultimate 3000 équipé d'un dégazeur, d'une pompe tertiaire (Ultimate 3000), d'un passeur automatique (Ultimate 3000), et d'un collecteur automatique de fractions (Ultimate 3000) piloté par le logiciel d'acquisition « Chromeleon ».

La colonne utilisée est une phase inverse du type C18 (Varian Polaris C18-Ether, 250 × 4,6 mm). Les solvants sont l'eau ultra-pure (MilliQ, Milipore) (solvant A) et l'éthanol (HPLC grade, Prolabo) (solvant B). Le gradient d'élution est le suivant : de 0 à 100 % de B en 50 min. Le débit est de 1 mL/min. L'éluat est récolté par fraction de 1 mL. 50 fractions sont ainsi collectées.

2.1.2.2 Extraction des fractions

Les fractions obtenues sont diluées dans l'eau ultra-pure (MilliQ, Milipore) pour obtenir un titre alcoométrique volumique de 10 % à 14 % v/v. Puis, les fractions sont extraites à deux reprises par du dichlorométhane (rapport des phases organique et aqueuse : 1/10). Les phases organiques sont rassemblées, séchées au sulfate de sodium anhydre, puis concentrées sous flux d'azote inerte, jusqu'à 25 µL.

2.1.3 ANALYSE DU 3,3'-DISULFANEDIYLDIHEXAN-1-OL (DISULFURE DU 3SH)

Pour l'analyse qualitative (présence ou non) du disulfure du **3SH**, le protocole utilisé est celui décrit par Sarrazin *et al.* (2010). 10 µL d'étalon interne (cystine, 1 ng/µL, en solution hydrochlorydrique 1 M) sont ajoutés à 2 mL du milieu réactionnel préalablement filtré (0,45 µm). Le mélange est ensuite extrait, successivement par 2 et 1 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite assemblées, séchées au sulfate de sodium anhydre, puis évaporées à sec sous flux d'azote inerte dans un flacon de 1 mL. 30 µL de pyridine anhydre et 20 µL d'agents de dérivations pour silylation (BSTFA : *t*-BDMCS) sont additionnés directement dans le flacon à l'aide d'une seringue. La réaction a lieu à 70°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, 1 µL est directement injecté en CPG-SM (Méthode 5). La détection a été réalisée en mode de sélection d'ions (méthode SIM). Les ions sélectionnés sont : *m/z* 410 pour le dérivé du disulfure du **3SH** et *m/z* 292 pour le dérivé de l'étalon interne.

2.1.4 MESURE COLORIMETRIQUE DE LA CONCENTRATION EN THIOLS

La mesure colorimétrique de la concentration en thiols permet de les quantifier dans les solutions mères commerciales pour la réalisation des gammes étalon et leur utilisation en solution modèle (chapitre 3 et 4).

L'échantillon à doser est dilué dans une solution tampon phosphate (0,1 M, pH 8), puis additionné d'une solution tamponnée de l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)

(DTNB, « réactif d'Ellman ») (4 g/L), (Ellman, 1959). Ce dernier donne un anion coloré jaune, 5-sulfanyl-nitro-2-benzoate dont on mesure l'absorbance à 412 nm. Il s'agit d'un réactif spécifique permettant la détection des fonctions thiols (sulfanyl). La coloration est proportionnelle au nombre de groupements thiols présents. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de 10^{-4} M.

L'appareil de mesure de la densité optique à 412 nm est un spectrophotomètre à double faisceau, modèle LAMBDA EZ 201 (Perkin Elmer). Les cuves, en polymère, ont un trajet optique de 1 cm.

La concentration en thiol est alors calculée à l'aide du coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}$) du chromophore libéré par la réaction de combinaison d'une molécule thiol au DTNB.

2.1.5 ANALYSE D'EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)

2.1.5.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG-O)

L'analyse sensorielle des extraits organiques de vin est réalisée à partir du couplage de la chromatographie en phase gazeuse (Hewlett Packard 5890, Agilent Technologies) et de l'olfactométrie (système ODO-1, SGE). 3 μL d'extrait organique sont injectés en mode *splitless* (temps de fermeture 1 min, débit de purge 50 mL/min) à 230°C puis séparés sur une colonne polaire [BP20, SGE, 50 m x 0,25 mm de diamètre interne (d.i.) ; 0,22 μm d'épaisseur de film (e.f.)] ou apolaire [BPX5, SCE, 50 m x 0,22 mm (d.i.) ; 1 μm (e.f.)]. La température du four est programmée comme suit : 45°C pendant 1 min, puis 3°C/min jusqu'à 230°C (BP20) ou 250°C (BPX5), avec un isotherme final de 20 min. Le gaz vecteur est l'hydrogène U (Air Liquide, France), appliquant une pression en tête de colonne de 20 psi.

L'analyse sensorielle est le plus souvent associée à une détection physique en ionisation de flamme (FID) afin de vérifier si l'odeur perçue en olfactométrie correspond à un pic chromatographique.

2.1.5.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

Trois systèmes CPG-SM ont été utilisés pour les analyses des différents composés odorants. Dans un souci de clarté, les caractéristiques techniques des appareils ainsi que les conditions d'analyses chromatographiques sont présentées sous forme de fiches.

Appareillage Thermo Fisher Scientific : Système Trace GC ultra, couplé à un spectromètre de masse quadripolaire (DSQ II) fonctionnant en impact électronique (énergie d'ionisation : 70 eV, température de source : 185°C). La ligne de transfert est maintenue à 210°C. Pilotage informatique par le logiciel d'acquisition « Xcalibur ».

Appareillage Agilent Technologies : Système Agilent 6890 couplé à un spectromètre de masse quadripolaire (MSD 5975) fonctionnant en impact électronique (énergie d'ionisation : 70 eV, température de source : 230°C). La ligne de transfert est maintenue à 250°C. Pilotage informatique par le logiciel d'acquisition « MSD Chemstation ».

Appareillage Hewlett Packard : Système Hewlett Packard 5890 couplé à un spectromètre de masse quadripolaire (MSD 5973) fonctionnant en impact électronique (énergie d'ionisation : 70 eV, température de source : 230°C). La ligne de transfert est maintenue à 250°C. Piloté par le logiciel d'acquisition « MSD Chemstation ».

Méthode 1

Appareil : système Thermo Fisher Scientific

Mode d'acquisition : Full Scan dans une gamme de m/z allant de 40 à 300

Mode d'injection : *splitless*, température d'injecteur : 230°C,

temps de fermeture : 60 s ; débit de purge : 50 mL/min

Température initiale du four : 45°C

Colonne : BP20, SGE, 50 m x 0,25 mm (d.i.) ; 0,22 μm (e.f.)

Programme de température : 45°C pendant 1 min, puis 3°C/min jusqu'à 230°C

Pression en tête de colonne : 22 psi

Gaz vecteur : hélium

Méthode 2

Appareil : système Agilent Technologies

Mode d'acquisition : SIM

Mode d'injection : *splitless*, température d'injecteur : 230°C,

temps de fermeture : 60 s, débit de purge : 50 mL/min

Température initiale du four : 40°C

Colonne : BP20, SGE, 50 m x 0,25 mm (d.i.) ; 0,22 μm (e.f.)

Programme de température : 45°C pendant 10 min, puis 3°C/min jusqu'à 230°C, isotherme final 15 min

Pression en tête de colonne : 22 psi

Gaz vecteur : hélium

Méthode 3

Appareil : système Thermo Fisher Scientific

Mode d'acquisition : SIM

Mode d'injection : *splitless*, température d'injecteur : 180°C

temps de fermeture : 60 s, débit de purge : 50 mL/min

Température initiale du four : 45°C

Colonne : BP20, SGE, 50 m x 0,25 mm (d.i.) ; 0,22 µm (e.f.)

Programme de température : 45°C pendant 1 min, puis 3°C/min jusqu'à 158°C, puis 25°C/minute jusqu'à 230°C, isotherme final 10 min

Pression en tête de colonne : 22 psi

Gaz vecteur : hélium

Méthode 4

Appareil : système Agilent Technologies

Mode d'acquisition : SIM

Mode d'injection : *splitless*, température d'injecteur : 230°C;

temps de fermeture : 60 s, débit de purge : 50 mL/min

Température initiale du four : 45°C

Colonne : BP20, SGE, 50 m x 0,25 mm (d.i.) ; 0,22 µm (e.f.)

Programme de température : 45°C pendant 1 min, puis 3°C/min jusqu'à 230°C, isotherme final 10 min

Pression en tête de colonne : 22 psi

Gaz vecteur : hélium

Méthode 5

Appareil : système Hewlett Packard

Mode d'acquisition : SIM

Mode d'injection : *splitless*, température d'injecteur : 250°C,

temps de fermeture : 60 s ; débit de purge : 50 mL/min

Température initiale du four : 45°C

Colonne : DB-1, J & W, 60 m x 0,25 mm (d.i.), 0,25 µm (e.f.)

Programme de température : 45°C pendant 1 min, puis 5°C/min jusqu'à 280°C, isotherme final de 10 min

Pression en tête de colonne : 22 psi

Gaz vecteur : hélium

Tableau 4. Paramètres de la courbe de calibration des composés dosés : ions utilisés pour la détection et la quantification, coefficient de détermination (R^2) et gamme de linéarité

Composés	Ions utilisés pour la détection (m/z)	Ions utilisés pour la quantification (m/z)	Courbe de calibration	R^2	Gamme de validation	
3-Sulfanylhexan-1-ol	134, 116 et 100	134	$y = 0,001x + 0,14$	0,988	3,1-2000	ng/L
Acétate de 3-sulfanylhexyl	101 et 116	101	$y = 0,02x + 0,34$	0,987	2,8-150	
4-Méthyl-4-sulfanylpentan-2-one	132, 99 et 75	75	$y = 0,03x + 0,04$	0,976	2,5-80	
Acétate de 3-sulfanyl propyl	134, 43 et 74	74	$y = 0,01x + 0,17$	0,978	2,7-150-	
Ethyl-2-sulfanylpropionate	134, 61 et 88	134	$y = 0,02x + 0,43$	0,988	4,25-100	
Ethyl-3-sulfanylpropionate	134, 61 et 88	88	$y = 0,02x + 0,67$	0,989	3,1-100	
3-Hydroxybutanoate d'éthyle	88 et 117	88	$y = 0,0005x + 0,01$	0,997	4,5-640	$\mu\text{g/L}$
Acétate d'isoamyle	55 et 61	55	$y = 0,01x + 0,53$	0,985	45,1-3200	
Acétate de phényléthyle	91 et 164	164	$y = 0,31x + 2,04$	0,998	7,4-320	
Butanoate d'éthyle	88 et 102	88	$y = 0,16x - 0,35$	0,994	10,1-320	
<i>cis</i> -3-hexenol	41, 67 et 82	67	$y = 0,58x + 0,24$	0,994	2,4-300	
Heptanoate d'éthyle	88, 101 et 102	88	$y = 0,03x + 0,47$	0,994	2,1-30	
Hexanoate d'éthyle	88 et 99	88	$y = 0,02x + 0,11$	0,999	10-1280	
Hexanol	56, 39 et 69	69	$y = 0,81x + 0,25$	0,996	1,4-30	
Lévulinate d'éthyle	99 et 102	102	$y = 0,48x + 0,28$	0,989	1-32	
Méthional	104	104	$y = 0,10x + 0,02$	0,985	0,6-15	
Octanoate d'éthyle	88 et 127	88	$y = 0,05x - 1,02$	0,992	10-1280	
Phénylacétaldéhyde	120, 91 et 65	120	$y = 0,08x + 0,00$	0,998	10-200	
Sotolon	128 et 83	83	$y = 0,01x + 0,01$	0,974	0,5-30	
<i>trans</i> -3-hexénol	41, 55 et 67	67	$y = 0,96x + 0,31$	0,984	0,4-30	

2.1.5.3 Indices linéaires de rétention

Les indices linéaires de rétention, appelés aussi indices de Kovats, sont déterminés à partir du temps de rétention d'une série de n-alcanes linéaires (Kovats, 1958). Ils sont obtenus en injectant une solution d'alcanes normaux dans les mêmes conditions d'analyse que les extraits. A partir du temps de rétention de chaque composé, on détermine son indice linéaire de rétention en appliquant la formule ci-dessous :

$$\text{Indice de Rétention} = \frac{\text{TR}(\text{composé}) - \text{TR}(\text{alc précédent})}{\text{TR}(\text{alc suivant}) - \text{TR}(\text{alc précédent})} \times 100 + C_n \times 100$$

où C_n représente le nombre d'atomes de carbone de l'alcane précédent et TR le temps de rétention.

2.1.5.4 Dosage des composés volatils par CPG-SM

La quantification des composés odorants est effectuée par CPG-SM dans le mode SIM (Selected Ion Monitoring) en sélectionnant des ions spécifiques de chaque molécule. Le dosage des composés volatils d'intérêt est réalisé en mesurant l'abondance de leurs ions caractéristiques rapportée à celle des ions caractéristiques des étalons internes. Les ions utilisés pour la détection et la quantification des différentes molécules sont spécifiés dans le **Tableau 4**.

Les thiols volatils sont dosés à partir d'extraits sélectifs de moût ou de vin (§ 2.1.1.4, Méthode 2). Le 1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol (1,3,3MMB) est utilisé comme étalon interne et détecté avec les ions m/z 134 et 100 et quantifié avec l'ion m/z 134.

Le sotolon, le méthional et le phénylacétaldéhyde sont quantifiés à partir d'extraits non sélectifs de vin (§ 2.1.1.2, Méthode 3). L'octan-3-ol (100 mg/L) est utilisé comme étalon interne. Il est détecté avec les ions m/z 83 et 59 et quantifié avec l'ion m/z 83.

Les esters éthyliques d'acides gras, acétates d'alcools supérieurs et les alcools en C6 sont quantifiés à partir d'extraits non sélectifs de vin (§ 2.1.1.3, Méthode 4). L'octan-3-ol est également utilisé comme étalon interne.

Pour chaque composé, une courbe d'étalonnage est réalisée. Un vin blanc est supplémenté avec cinq concentrations du composé à doser. Ces échantillons sont ensuite extraits dans les conditions décrites précédemment et analysés par CPG-SM en mode SIM. Les rapports entre les surfaces des ions spécifiques du composé à doser et

celles de l'étalon interne sont calculés pour les différentes concentrations. L'équation de la droite de régression linéaire ainsi que le coefficient de détermination (R^2) sont déterminés. L'ensemble des résultats sont présentés dans le **Tableau 4**. La concentration du composé dans un échantillon donné est calculée grâce à l'équation de la droite de régression linéaire.

2.2 ANALYSES DES COMPOSES NON-VOLATILS

2.2.1 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

2.2.1.1 Analyse du précurseur cystéinylé du 3SH

2.2.1.1.1 Purification

Le procédé de purification du P-S-Cys-3SH est basé sur le protocole décrit par Thibon *et al.* (2008b). Un volume de 500 μL de moût préalablement centrifugé contenant 200 pg d'étalon interne (*S*-benzyl-L-cystéine) est ajusté à pH 10 et directement percolé sur une colonne de Chelating Sépharose activée au cuivre, préalablement stabilisée par 3 mL de tampon carbonate de sodium (Na_2CO_3 , 50 mM, pH 10). La colonne est lavée par 2 mL d'une solution tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7). Les *S*-conjugués à la cystéine sont ensuite décrochés de la colonne par percolation de 3 mL de solution d'acide chlorhydrique (25 mM). L'éluat ainsi obtenu est évaporé à sec et repris dans 500 μL d'éthanol. La fraction soluble est à nouveau évaporée sous vide à 70°C dans un flacon de 2 mL.

2.2.1.1.2 Procédure de dérivation

La dérivation est réalisée directement sur les extraits secs préalablement obtenus et séchés sous flux d'azote avant d'être capsulés. 40 μL de pyridine anhydre et 20 μL d'agents de dérivations silylés (MTBSTFA : *t*-BDMCS) sont additionnés à l'aide d'une seringue dans le flacon. La réaction a lieu à 70°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, 1 μL est directement injecté en CPG-SM pour le dosage.

2.2.1.1.3 Conditions chromatographiques

Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire BPX35 [SGE, 50 m x 0,25 mm (d. i.), 0,25 μm (e.f.)]. L'injection se fait en mode splitless (temps de fermeture : 1 min, température de l'injecteur : 200°C). Le débit du gaz vecteur (Hélium) est de 1

mL/min et le programme est le suivant : 50°C pendant 1 min, puis 6°C par min jusqu'à 320°C avec un isotherme final de 10 min. La détection s'effectue en mode MS/MS.

2.2.1.1.4 Dosage

Le dérivé du P-S-Cys-3SH est quantifié conformément à la méthode décrite par Thibon *et al.* (2008b) et l'ion fils sélectionné est: m/z 506 \rightarrow m/z 478. L'équation de la droite de régression linéaire est : $y = 2,87 x$ ($R^2 = 0,997$). La gamme de linéarité s'étend de 0,01 à 200 μ M.

2.2.1.2 Analyse du glutathion dans le moût et le vin

La méthode d'analyse du glutathion dans le moût et le vin est celle décrite par Lavigne *et al.* (2007).

2.2.1.2.1 Procédure de dérivation

200 μ L d'échantillon de moût ou de vin sont additionnés à 10 μ L d'une solution de (2S,3S)-1,4-bis-sulfanylbutane-2,3-diol (DDT) (10 mM), et à 145 μ L de tampon acide (cyclohexylamino)-2-éthane-sulfonique (CHES) (500 μ M), et enfin 50 μ L de monobromobimane (MBB) (50 mM, préparé dans l'acétonitrile). Les concentrations finales des réactifs sont respectivement de 0,25 mM (DDT), 179 mM (CHES) et 6,2 mM (MBB). Après agitation du flacon, les échantillons sont incubés pendant 20 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. A la fin de l'incubation les échantillons sont immédiatement injectés sur électrophorèse capillaire.

2.2.1.2.2 Séparation chromatographique

Nous avons utilisé un tampon phosphate (50 mM) dont le pH est ajusté à 7 avec de l'acide chlorhydrique (N). La longueur totale du capillaire en silice non greffée (Agilent) est de 120 cm, la longueur efficace est de 105 cm, le diamètre interne est de 50 μ m. L'injection de l'échantillon, de type hydrostatique (3 s, 50 mbar) est suivie par injection de tampon (1 s, 50 mbar) afin d'améliorer la résolution des pics chromatographiques. Une tension de +30 kV appliquée tout au long de la séparation, génère un courant de 47 μ A. Ces conditions sont atteintes en 20 s. La séparation est effectuée à une température constante de 21°C. Le capillaire doit être rincé après chaque analyse en suivant la procédure suivante : NaOH (N/10) durant 3 minutes; eau durant 3 minutes et tampon durant 3 minutes.

2.2.1.2.3 Dosage par électrophorèse capillaire fluorescence (EC-LIF)

La solution mère de glutathion (1 g/L) est préparée dans une solution d'HCl/EDTA. Une gamme de concentration allant de 0,5 mg/L à 20 mg/L, est préparée dans un vin blanc sec afin d'obtenir cinq concentrations différentes. L'équation de la droite de régression linéaire est : $y = 2,8 x$ ($R^2 = 0,998$). La gamme de linéarité s'étend de 0,02 à 20 mg/L.

2.2.1.3 Analyse des quinones

Les formes oxydées de la (+)-catéchine et de l'acide caftarique dans le moût sont identifiées et quantifiées après sulfonation selon la méthode décrite par Cheynier *et al.* (1989b).

5 mL d'échantillon de moût sont supplémentés avec 12,5 mg de cristaux de l'acide benzène sulfonique. Après agitation pendant 15 sec, les sulfones sont stabilisées avec l'addition du dioxyde de soufre (0,2 %). Après filtration à 0,45 μm , 20 μL d'échantillon sont injectés en CLHP-ESI-SM (Méthode 15).

Le dosage des sulfones est effectué en CLHP-ESI-SM en mode SIM, en sélectionnant l'ion $m/z = 429$ pour le sulfone de la (+)-catéchine, et le $m/z = 451$ pour le sulfone de l'acide caftarique. Les concentrations des sulfones de la (+)-catéchine et de l'acide caftarique ont été exprimés en équivalent (+)-catéchine.

2.2.2 APPAREILLAGES UTILISES

2.2.2.1 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

De nombreux systèmes CLHP ont été utilisés, donc pour souci de clarté, les caractéristiques techniques des différents appareils ainsi que les conditions d'analyses et les gradients utilisés sont présentés sous forme de fiche technique.

Appareillage pour la CLHP analytique : Le système Thermo-Finnigan est équipé d'un dégazeur, de pompes (P400), d'un passeur (AS3000), d'un détecteur barrette de diode UV (UV 6000LP). Il est piloté par le logiciel d'acquisition « Chrom-Quest 4.2 ».

Appareillage pour la CLHP semi-préparative : Le système Hewlett Packard 1090 est équipé de pompes (79835 AX) et d'un détecteur UV (HP 1050). Il est piloté par le logiciel « Chem station ».

Appareillage pour la CLHP couplée à un détecteur de masse (CLHP-ESI-SM) : La partie CLHP est un système Thermo-Finnigan équipé d'un dégazeur, de pompes (Surveyor), d'un passeur automatique (Surveyor). Il est couplé à un spectromètre de masse du type piège ionique (LCQ deca XP MAX) équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI). Ces deux systèmes sont pilotés par le logiciel d'acquisition « Xcalibur ».

Le paramétrage du détecteur de masse est le suivant :

Détection : mode négatif Débit dans la source : 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ Température de source : 250°C Débit d'azote de séchage : 3 L/h Tension dans le capillaire : -9 V Tension de spray : 5 kV
--

Les analyses en CLHP-SM ont été effectuées au laboratoire de Chimie Appliquée de la Faculté d'Œnologie de l'Université de Bordeaux 2.

Méthode 6

Appareillage : CLHP analytique
Débit : 1 mL/min
Colonne : Nucleosil 100-5 C18 (5 μm - 4,0 x 250 mm) protégée par une pré-colonne de la même phase
Volume d'injection : 10 μL
Détection : 280 nm et 320 nm
Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique
Gradient : de 3 à 31 % de B en 5 min
 de 31 à 38 % de B en 20 min
 de 38 à 48 % de B en 15 min
 de 48 à 100 % de B en 13 min
 100 % de B pendant 5 min
 de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 7

Appareillage : CLHP-ESI-SM
Débit : 1 mL/min
Colonne : Nucleosil 100-5 C18 (5 μm - 4,0 x 250 mm), protégée par une pré-colonne de la même phase
Volume d'injection : 10 μL
Détection : SIM ou Full SCAN
Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique
Gradient : de 3 à 31 % de B en 5 min
 de 31 à 38 % de B en 20 min
 de 38 à 48 % de B en 15 min
 de 48 à 100 % de B en 13 min
 100 % de B pendant 5 min
 de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 8

Appareillage : CLHP semi-préparative

Débit : 4 mL/min

Colonne : Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, protégée par une pré-colonne de la même phase

Volume d'injection : 250 μ L

Détection : 280 nm

Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique

Gradient : de 3 à 32 % de B en 1 min
de 32 à 37 % de B en 2 min
de 37 à 45 % de B en 20 min
de 45 à 50 % de B en 2 min
de 50 à 100 % de B en 13 min
100 % de B pendant 5 min
de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 9

Appareillage : CLHP analytique

Débit : 1 mL/min

Colonne : Nucleosil 100-5 C18 (5 μ m - 4,0 x 250 mm) protégée par une pré-colonne de la même phase

Volume d'injection : 10 μ L

Détection : 280 nm

Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique

Gradient : de 3 à 35 % de B en 5 min
de 35 à 45 % de B en 20 min
de 45 à 70 % de B en 25 min
de 70 à 100 % de B en 5 min
à 100 % de B pendant 5 min
de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 10

Appareillage : CLHP-ESI-SM

Débit : 1 mL/min

Colonne : Nucleosil 100-5 C18 (5 μ m - 4,0 x 250 mm), protégée par une pré-colonne de la même phase

Volume d'injection : 10 μ L

Détection : SIM ou Full SCAN

Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique

Gradient : de 3 à 35 % de B en 5 min
de 35 à 45 % de B en 20 min
de 45 à 70 % de B en 25 min
de 70 à 100 % de B en 5 min
à 100 % de B pendant 5 min
de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 11

Appareillage : CLHP semi-préparative

Débit : 4 mL/min

Colonne : Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, protégée par une pré-colonne de la même phase

Volume d'injection : 250 μ L

Détection : 280 nm

Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique

Gradient : de 3 à 38 % de B en 5 min
de 38 à 50 % de B en 15 min
de 50 à 65 % de B en 15 min
de 65 à 100 % de B en 5 min
à 100 % de B pendant 5 min
de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 12

Appareillage : CLHP semi-préparative

Débit : 4 mL/min

Colonne : Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, protégée par une pré-colonne de la même phase

Volume d'injection : 250 μ L

Détection : 280 nm

Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique

Gradient : de 3 à 41 % de B en 4 min
de 41 à 45 % de B en 11 min
de 45 à 100 % de B en 3 min
à 100 % de B pendant 5 min
de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 13

Appareillage : CLHP analytique

Débit : 1 mL/min

Colonne : Ultrasphère ODS (5 μ m – 4,6 x 250 mm) (Beckman Coulter), protégée par une pré-colonne de la même phase

Volume d'injection : 20 μ L

Détection : 254 nm et 320 nm

Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique

Gradient : de 3 à 20 % de B en 30 min
de 20 à 30 % de B en 20 min
de 30 à 50 % de B en 10 min
de 50 à 100 % de B en 2 min
100 % de B pendant 5 min
de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 14

Appareillage : CLHP analytique

Débit : 1 mL/min

Colonne : Ultrasphère ODS (5 μm - 4,6 x 250 mm) (Beckman Coulter), protégée par une pré-colonne de la même phase

Volume d'injection : 20 μL

Détection : 320 nm

Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique

Gradient : isocratique 0 % de B pendant 5 min

de 3 à 10 % de B en 5 min

de 10 à 20 % de B en 15 min

à 20 % de B pendant 3 minutes

de 20 à 40 % de B en 12 min

de 40 à 100 % de B en 3 min

de 100 à 3 % de B en 5 min

Méthode 15

Appareillage : CLHP-ESI-SM

Débit : 700 $\mu\text{L}/\text{min}$

Colonne : Nucleosil 100-5 C18 (5 μm - 4,0 x 250 mm), protégée par une pré-colonne de la même phase

Volume d'injection : 10 μL

Détection : SIM

Solvant : (A) Eau + 0,4 % acide formique ; (B) méthanol + 0,4 % acide formique

Gradient : de 3 à 31 % de B en 5 min

31 à 40 de B en 9 min

40 à 100 de B en 1 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 3 % de B en 5 min

Tableau 5. Paramètres des courbes de calibration des composés dosés : mode de détection, coefficient de détermination (R^2) et gamme de linéarité

Composés	Mode de détection	Courbe de calibration	R^2	Gamme de validation	Unité
(+)-Catéchine	UV 280 nm	$y=42162x+5414$	0,998	0,91-100	mg/L
(+)-Catéchine	SIM m/z 289	$y=532112x-2E+06$	0,996	1,25-100	mg/L
(-)-Épicatéchine	UV 280 nm	$y=38162x+1674$	0,999	1,32-100	mg/L
Acide caftarique	UV 320 nm	$y=38162x+1674$	0,999	2,42-200	mg/L
2-S-Glutathionylcaféoyltartrique (GRP)	UV 320 nm	$y=532112x-2E+06$	0,996	0,14-200	mg/L eq. Caté
Acide caféique	SIM $m/z = 179$	$y=532112x-2E+06$	0,996	1,25-100	mg/L eq. Caté
Quercétine	SIM $m/z = 301$	$y=532112x-2E+06$	0,996	1,25-100	mg/L eq. Caté
6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (C1a)	UV 280 nm	$y=5E+06x-568,5$	0,999	0,01-11	mM
6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (C1b)	UV 280 nm	$y=9E+06x-1184$	0,999	0,02-11	mM
5'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (C2)	UV 280 nm	$y=1E+07x-22052$	0,998	0,01-11	mM
5',6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (C3)	UV 280 nm	$y=1E+07x-22052$	0,998	0,01-11	mM eq.C2
2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (E1a)	UV 280 nm	$y=1E+07x-12709$	0,999	0,02-11	mM
2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (E1b)	UV 280 nm	$y=1E+06x-3455,2$	0,998	0,01-11	mM
5'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (E2)	UV 280 nm	$y=1E+07x+34579$	0,993	0,01-11	mM
2',5'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (E3)	UV 280 nm	$y=1E+07x+34579$	0,998	0,01-11	mM eq.E2
2'-(3''-sulfanylhexanol)-(-)-caftarique acide (Caf2)	UV 320 nm	$y=1E+07x+2532$	0,997	0,02-22	mM

2.2.2.2 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMQC et HMBC) ont été enregistrés sur des appareils BRUKER Avance 700 et 400. Pour chaque composé, le solvant est précisé lors de la description des spectres (acétone- d_6 ou méthanol- d_4). Les déplacements chimiques sont exprimés en δ (ppm) relatif au solvant utilisé comme référence interne (acétone- d_6 : δ 2,09 ppm pour la RMN ^1H et δ 29,8 ppm pour la RMN ^{13}C ; méthanol- d_4 : δ 3,31 ppm pour la RMN ^1H et δ 49,00 ppm pour la RMN ^{13}C). Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hz. Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire la multiplicité des signaux : s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), q (quadruplet), m (massif complexe, multiplet). Les analyses ont été effectuées à l'Institut Européen de Chimie et Biologie de l'Université de Bordeaux 1.

2.2.2.3 Electrophorèse capillaire (EC-LIF)

Les analyses en électrophorèse capillaire sont réalisées sur un système d'électrophorèse capillaire HP3D (Hewlett Packard) couplée à une détection par fluorescence induite par laser Zetalif (Picometrics, Toulouse-Ramonville, France) avec $\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$, 15 mW.

2.2.2.4 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CPG-SM²)

Les expérimentations par CPG-SM² sont réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse de type Trace GC (Thermo Electron Corporation, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse équipé d'un piège ionique de type PolarisQ (Thermo Electron Corporation, Milan, Italie).

2.2.3 DOSAGE DES COMPOSES NON VOLATILS

2.2.3.1 Par étalonnage externe

En fonction des besoins de différentes expérimentations, le dosage de la (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, et acide caftarique sont effectués par CLHP-UV/SM. Le dosage de ces composés est réalisé par étalonnage externe. Les gammes d'étalonnage ont été établies en utilisant les standards commerciaux. Les équations de la droite de régression linéaire, le coefficient de détermination (R^2) et la gamme de linéarité pour chaque composé selon le mode de détection sont présentés dans le **Tableau 5**.

2.2.3.2 Dosage des adduits par étalonnage interne

Pour le suivi cinétique de la formation des différents types d'adduits, leur dosage est effectué par étalonnage interne. Dans ce cas, l'acide chlorogénique (20 mg/L) est utilisé comme étalon interne. Le dosage des composés d'intérêt est réalisé en mesurant l'aire de leurs pics caractéristiques rapportée à celles des étalons internes. Pour le suivi cinétique de la formation des différents adduits, leur dosage est effectué en détection UV. Les longueurs d'onde de quantification pour chaque adduit sont spécifiées dans le **Tableau 5**. Pour chaque composé, une courbe d'étalonnage est réalisée. L'équation de la droite de régression linéaire ainsi que le coefficient de détermination sont calculés. La concentration du composé est calculée grâce à l'équation de la droite de régression linéaire.

2.3 SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS

2.3.1 EXTRACTION DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE

La méthode d'extraction de la PPO utilisée est celle décrite par Singleton *et al.* (1985) et modifiée par Cheynier & Ricardo da Silva (1991).

L'extraction de la PPO est réalisée à partir de raisins de Merlot (Millésime 2008) congelés à -20°C. 400 g de baies congelées sont mixés dans 200 mL d'une solution tampon phosphate (pH 5) contenant 10 mg/L d'acide ascorbique. L'homogénéisation se fait à l'aide d'un homogénéiseur de type mécanique (Warning Blendor). Le produit obtenu est filtré grossièrement puis centrifugé (4000 rpm) pendant 15 min. Le culot récupéré, contenant l'enzyme, est lavé quatre fois successives avec une solution d'acétone/eau (80 : 20, v/v) et séché sous azote inerte. La température tout au long du processus d'extraction est maintenue au dessous de 4°C. L'extrait sec (6,58 g) est stocké au congélateur à -20°C.

2.3.2 SYNTHÈSE DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (+)-CATECHINE

Les adduits entre le **3SH** et la (+)-catéchine sont synthétisés par addition de Michaël, en présence d'un extrait brut de PPO à 10 g/L en milieu aqueux acidifié avec 5 g/L d'acide tartrique. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 3,5 par addition de soude (5M). La (+)-catéchine (500 mg) et le **3SH** (10 µg) préalablement solubilisés dans une solution éthanolique sont ensuite incorporés dans le milieu modèle. Le milieu

réactionnel est maintenu à température ambiante, sous agitation. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP-UV-SM (Méthode 7). Lorsque la réaction est finie (environ 24 h), le mélange réactionnel est lavé trois fois (v/v) au chloroforme pour éliminer l'excès de **3SH**. La phase aqueuse, préalablement filtrée sur du papier Whatman 1, est évaporée sous pression réduite. Le résidu brut ainsi obtenu est resolubilisé dans l'eau, puis congelé à -20°C avant lyophilisation pour conduire à 10,25 g d'une poudre blanche. La séparation des produits de la réaction, d'un échantillon de 2,7 g d'extrait brut, est réalisée par CLHP semi-préparative (Méthode 8). Après évaporation et lyophilisation nous avons obtenu 33,7 mg de 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C1a**), 32,8 mg du 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C1b**) et 109,6 mg du 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C2**), ce qui représente un rendement de 17 %, de 16,5 % et de 55,5 %.

Spectre RMN de l'adduit 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C1a**)

^1H RMN (400 MHz, MeOH- d_4): δ ppm 0,81 (t, $J = 7,19$ Hz, 3H, H-12'), 1,32 (m, 1H, H-11'), 1,53 (m, 1H, H-10 α '), 1,69 (m, 1H, H-8 α '), 1,75 (m, 1H, H-10 β '), 1,88 (m, 1H, H-8 β '), 2,57 (dd, $J = 16,05, 8,26$ Hz, 1H, H-4 α), 2,86 (dd, $J = 16,05, 5,38$ Hz, 1H, H-4 β), 3,32 (m, 1H, H-7'), 3,73 (m, 1H, H-9 α '), 3,82 (m, 1H, H-9 β '), 4,08 (s, 1H, H-3), 5,50 (d, $J = 7,65$ Hz, 1H, H-2), 5,82 (d, $J = 2,24$ Hz, 1H, H-8), 5,94 (d, $J = 2,24$ Hz, 1H, H-6), 6,86 (br, 2H, H-2', H-5'). ^{13}C NMR (100 MHz, MeOH- d_4): 14,3 [C-12'], 20,5 [C-11'], 28,8 [C-4], 37,4 [C-8'], 38,5 [C-10'], 47,5 [C-7'], 60,7 [C-9'], 68,5 [C-3], 80,4 [C-2], 95,4 [C-8], 96,2 [C-6], 100,9 [C-4a], 117,0 [C-5'], 119,5 [C-2'], 121,4 [C-6'], 135,3 [C-1'], 145,9 [C-4'], 147,5 [C-3'], 157,2 [C-8a], 157,6 [C-5], 157,6 [C-7].

Spectre RMN de l'adduit 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C1b**)

^1H RMN (400 MHz, acétone- d_6): δ ppm 0,85 (t, $J = 7,13$ Hz, 3H, H-12'), 1,45 (m, 1H, H-11'), 1,53 (m, 1H, H-10 α '), 1,65 (m, 1H, H-10 β '), 1,73 (m, 1H, H-8'), 2,55 (dd, $J = 16,02, 8,92$ Hz, 1H, H-4 α), 2,93 (dd, $J = 16,02, 5,51$ Hz, 1H, H-4 β), 3,36 (m, 1H, H-7'), 3,61 (m, 2H, H-9'), 4,16 (m, 1H, H-3), 5,42 (d, $J = 8,23$ Hz, 1H, H-2), 5,80 (d, $J = 2,22$ Hz, 1H, H-8), 6,01 (d, $J = 2,22$ Hz, 1H, H-6), 6,89 (br, 2H, H-2', H-5'). ^{13}C NMR (100 MHz, acétone- d_6): 14,1 [C-12'], 20,3 [C-11'], 29,2 [C-4], 37,1 [C-10'], 37,4 [C-8'], 47,2 [C-7'], 59,8 [C-9'], 67,3 [C-3], 79,8 [C-2], 94,9 [C-8], 95,9 [C-6], 100,3 [C-4a], 116,6 [C-5'], 119,5 [C-2'], 120,8 [C-6'], 134,6 [C-1'], 145,2 [C-4'], 147,1 [C-3'], 156,8 [C-8a], 157,0 [C-5], 157,4 [C-7].

Spectres RMN des adduits 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (C2)*-Diastéréoisomère 1*

^1H RMN (400 MHz, MeOH- d_4): δ ppm 0,88 (t, $J = 7,10$ Hz, 3H, H-12'), 1,50 (m, 4H, H-10', H-11'), 1,70 (m, 1H, H-8 α '), 1,77 (m, 1H, H-8 β '), 2,52(dd, $J = 16,62, 7,86$ Hz, 1H, H-4 α), 2,80 (dd, $J = 17,20, 5,28$ Hz, 1H, H-4 β), 3,18 (m, 1H, H-7'), 3,69 (m, 1H, H-9 α '), 3,75 (m, 1H, H-9 β '), 3,98 (s, 1H, H-3), 4,60 (d, $J = 5,02$ Hz, 1H, H-2), 5,89 (d, $J = 2,19$ Hz, 1H, H-8), 5,94 (d, $J = 2,19$ Hz, 1H, H-6), 6,81 (d, $J = 1,67$ Hz, 1H, H-2'), 6,91 (d, $J = 1,67$ Hz, 1H, H-6'). ^{13}C NMR (100 MHz, MeOH- d_4): 14,3 [C-12'], 20,8 [C-11'], 28,1 [C-4], 38,2 [C-10'], 38,4 [C-8'], 46,6 [C-7'], 60,7 [C-9'], 68,7 [C-3], 82,2 [C-2], 95,5 [C-8], 96,3 [C-6], 100,7 [C-4a], 114,9 [C-2'], 120,5 [C-5'], 125,8 [C-6'], 132,0 [C-1'], 146,2 [C-4'], 146,9 [C-3'], 156,7 [C-8a], 157,6 [C-5], 157,8 [C-7].

-Diastéréoisomère 2

^1H RMN (400 MHz, MeOH- d_4): δ ppm 0,88 (t, $J = 7,10$ Hz, 3H, H-12'), 1,50 (m, 4H, H-10', H-11'), 1,70 (m, 1H, H-8 α '), 1,77 (m, 1H, H-8 β '), 2,52(dd, $J = 16,62, 7,86$ Hz, 1H, H-4 α), 2,80 (dd, $J = 17,20, 5,28$ Hz, 1H, H-4 β), 3,18 (m, 1H, H-7'), 3,69 (m, 1H, H-9 α '), 3,75 (m, 1H, H-9 β '), 3,98 (s, 1H, H-3), 4,60 (d, $J = 5,02$ Hz, 1H, H-2), 5,89 (d, $J = 2,19$ Hz, 1H, H-8), 5,94 (d, $J = 2,19$ Hz, 1H, H-6), 6,81 (d, $J = 1,67$ Hz, 1H, H-2'), 6,91 (d, $J = 1,67$ Hz, 1H, H-6'). ^{13}C NMR (100 MHz, MeOH- d_4): 14,3 [C-12'], 20,9 [C-11'], 28,2 [C-4], 38,3 [C-10'], 38,4 [C-8'], 46,7 [C-7'], 60,7 [C-9'], 68,7 [C-3], 82,3 [C-2], 95,5 [C-8], 96,3 [C-6], 100,7 [C-4a], 114,9 [C-2'], 120,6 [C-5'], 125,8 [C-6'], 132,0 [C-1'], 146,2 [C-4'], 146,9 [C-3'], 156,7 [C-8a], 157,6 [C-5], 157,8 [C-7].

2.3.3 SYNTHÈSE DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (-)-ÉPICATÉCHINE

Le protocole mis en œuvre pour la synthèse des adduits entre la (-)-épicatéchine (500 mg) et le **3SH** (10 μg) est identique à celui précédemment décrit dans le cas de la (+)-catéchine. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP-UV-SM (Méthode 10). Le résidu brut ainsi obtenu est resolubilisé dans l'eau, puis congelé à -20°C avant lyophilisation pour conduire à 9,47 g d'une poudre blanche. La séparation des produits créés, d'un échantillon de 3,2 g d'extrait brut, est réalisée par CLHP semi-préparative (Méthode 11). Après évaporation et lyophilisation nous avons obtenu 40 mg du 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (**E1a**), 38,9 mg du 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-

épicatéchine (**E1b**) et 130 mg du 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (**E2**), ce qui représente un rendement respectif de 17,2 %, de 16,6 % et de 55,9 %.

Spectre RMN de l'adduit 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (**E1a**)

^1H RMN (700 MHz, MeOH- d_4): δ ppm 0,91 (t, $J = 6,96$ Hz, 3H, H-12'), 1,48 (m, 1H, H-10 α'), 1,53 (m, 2H, H-11'), 1,61 (m, 1H, H-10 β'), 1,73 (m, 2H, H-8'), 2,82 (d, $J = 16,61$ Hz, 1H, H-4 α), 2,90 (dd, $J = 16,62, 4,27$ Hz, 1H, H-4 β), 3,36 (m, 1H, H-7'), 3,59 (m, 2H, H-9'), 4,20 (d, $J = 1,55$ Hz, 1H, H-3), 5,48 (s, 1H, H-2), 5,92 (d, $J = 2,10$ Hz, 1H, H-8), 5,96 (d, $J = 2,10$ Hz, 1H, H-6), 6,86 (d, $J = 8,40$ Hz, 1H, H-5'), 7,16 (d, $J = 8,40$ Hz, 1H, H-6'). ^{13}C NMR (176 MHz, MeOH- d_4): 14,4 [C-12'], 20,9 [C-11'], 29,9 [C-4], 37,8 [C-8'], 38,4 [C-10'], 46,8 [C-7'], 60,6 [C-9'], 66,6 [C-3], 78,1 [C-2], 96,1 [C-8], 96,5 [C-6], 100,0 [C-4a], 116,3 [C-5'], 118,5 [C-2'], 120,7 [C-6'], 135,1 [C-1'], 145,6 [C-4'], 147,8 [C-3'], 157,61 [C-5], 157,1 [C-7], 158,2 [C-8a].

Spectre RMN de l'adduit 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (**E1b**)

^1H RMN (400 MHz, acétone- d_6): δ ppm 0,70 (t, $J = 7,24$ Hz, 3H, H-12'), 1,25 (m, 1H, H-10 α'), 1,36 (m, 1H, H-10 β'), 1,45 (m, 2H, H-11'), 1,64 (m, 1H, H-8 α'), 1,86 (m, 1H, H-8 β'), 2,78 (dd, $J = 16,83, 1,69$ Hz, 1H, H-4 α), 2,85 (dd, $J = 16,74, 4,18$ Hz, 1H, H-4 β), 3,30 (m, 1H, H-7'), 3,70 (m, 1H, H-9 α'), 3,80 (m, 1H, H-9 β'), 4,13 (s, 1H, H-3), 5,46 (s, 1H, H-2), 5,89 (d, $J = 2,32$ Hz, 1H, H-8), 6,01 (d, $J = 2,33$ Hz, 1H, H-6), 6,88 (d, $J = 8,36$ Hz, 1H, H-5'), 7,13 (d, $J = 8,36$ Hz, 1H, H-6'). ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6): 14,0 [C-12'], 19,7 [C-11'], 29,3 [C-4], 36,4 [C-8'], 37,8 [C-10'], 46,6 [C-7'], 59,7 [C-9'], 65,7 [C-3], 77,5 [C-2], 95,3 [C-8], 96,0 [C-6], 99,3 [C-4a], 115,8 [C-5'], 117,9 [C-2'], 120,2 [C-6'], 134,6 [C-1'], 144,8 [C-4'], 146,7 [C-3'], 157,0 [C-5], 157,1 [C-7], 157,5 [C-8a].

Spectres RMN des adduits 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (**E2**)

-Diastéréoisomère 1

^1H RMN (400 MHz, MeOH- d_4): δ ppm 0,90 (t, $J = 7,31$ Hz, 3H, H-12'), 1,50 (m, 2H, H-11'), 1,54 (m, 2H, H-10'), 1,72 (m, 1H, H-8 α'), 1,79 (m, 1H, H-8 β'), 2,70 (d, $J = 17,20$ Hz, 1H, H-4 α), 2,86 (dd, $J = 17,20, 4,30$ Hz, 1H, H-4 β), 3,20 (m, 1H, H-7'), 3,69 (m, 1H, H-9 α'), 3,76 (m, 1H, H-9 β'), 4,18 (s, 1H, H-3), 4,82 (s, 1H, H-2), 5,93 (d, $J = 2,15$ Hz, 1H, H-8), 5,95 (d, $J = 2,15$ Hz, 1H, H-6), 6,94 (d, $J = 2,15$ Hz, 1H, H-2'), 7,01 (d, $J = 2,15$ Hz, 1H, H-6'). ^{13}C NMR (125 MHz, MeOH- d_4): 14,3 [C-12'], 20,8 [C-11'], 29,1 [C-4], 38,2 [C-8'], 38,3

[C-10'], 46,6 [C-7'], 60,6 [C-9'], 67,4 [C-3], 79,5 [C-2], 95,8 [C-8], 96,4 [C-6], 100,1 [C-4a], 115,3 [C-2'], 120,3 [C-5'], 125,3 [C-6'], 131,9 [C-1'], 145,9 [C-4'], 146,6 [C-3'], 157,1 [C-8a], 157,6 [C-5], 157,9 [C-7].

-Diastéréoisomère 2

¹H RMN (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ ppm 0,90 (t, *J* = 7,31 Hz, 3H, H-12'), 1,50 (m, 2H, H-11'), 1,54 (m, 2H, H-10'), 1,72 (m, 1H, H-8α'), 1,79 (m, 1H, H-8β'), 2,70 (d, *J* = 17,20 Hz, 1H, H-4α), 2,86 (dd, *J* = 17,20, 4,30 Hz, 1H, H-4β), 3,20 (m, 1H, H-7'), 3,69 (m, 1H, H-9α'), 3,76 (m, 1H, H-9β'), 4,18 (s, 1H, H-3), 4,82 (s, 1H, H-2), 5,93 (d, *J* = 2,15 Hz, 1H, H-8), 5,95 (d, *J* = 2,15 Hz, 1H, H-6), 6,94 (d, *J* = 2,15 Hz, 1H, H-2'), 7,01 (d, *J* = 2,15 Hz, 1H, H-6'). ¹³C NMR (125 MHz, MeOH-*d*₄): 14,3 [C-12'], 20,9 [C-11'], 29,1 [C-4], 38,2 [C-8'], 38,3 [C-10'], 46,7 [C-7'], 60,6 [C-9'], 67,4 [C-3], 79,5 [C-2], 95,8 [C-8], 96,4 [C-6], 100,1 [C-4a], 115,4 [C-2'], 120,3 [C-5'], 125,4 [C-6'], 131,9 [C-1'], 145,9 [C-4'], 146,6 [C-3'], 157,1 [C-8a], 157,6 [C-5], 157,9 [C-7].

2.3.4 SYNTHÈSE DE L'ADDUIT ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET L'ACIDE CAFTARIQUE

Le protocole mis en œuvre pour la synthèse des adduits entre l'acide caftarique (70 mg) et le **3SH** (10 μg) est identique à celui précédemment décrit dans le cas de la (+)-catéchine. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP-UV-SM (Méthode 7). Le résidu brut obtenu en fin de réaction (10 h) est resolubilisé dans l'eau, puis congelé à -20°C avant lyophilisation pour conduire à 6,1 g d'une poudre mauve. La purification de 31,2 mg d'extrait brut est réalisée par CLHP semi-préparative (Méthode 12) pour conduire après évaporation et lyophilisation à 25,4 mg d'acide 2'-(3''-sulfanylhexanol)-(-)-caftarique (**Caf 2**), ce qui représente un rendement de 74,4 %.

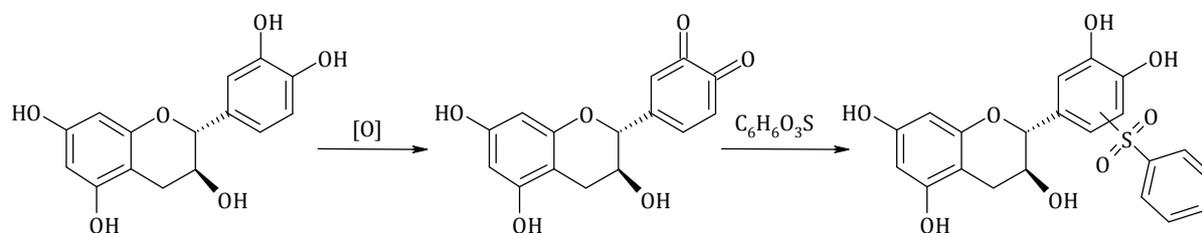


Figure 24. Synthèse du sulfone de la (+)-catéchine

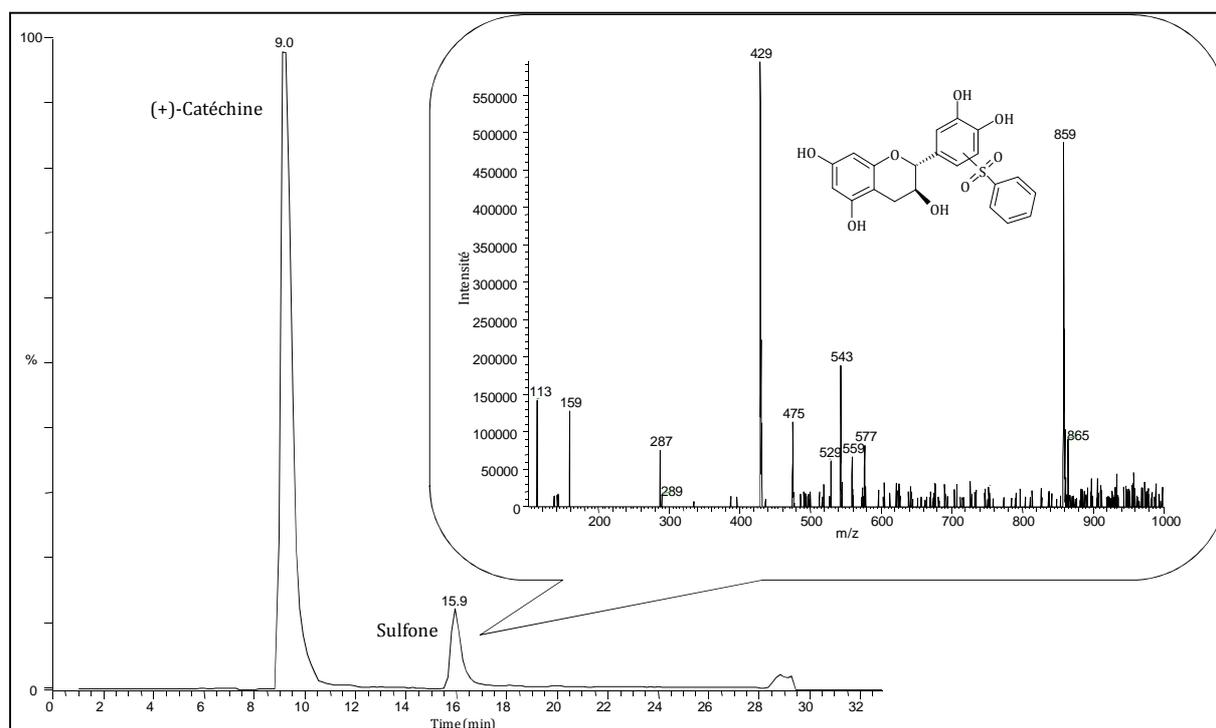


Figure 25. Chromatogramme (TIC) et spectre de masse en mode Full Scan du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des sulfones de la (+)-catéchine (15,9 min)

Spectres RMN des adduits 2'-(3''-sulfanylhexanol)-(-)-caftarique acide (Caf2)*Diastéréoisomère 1*

¹H RMN (400 MHz, acétone-*d*₆): δ ppm 0,81 (t, *J* = 7,08 Hz, 3H, H-6''), 1,38 (m, 1H, H-5''α), 1,53 (m, 2H, H-4''), 1,55 (m, 1H, H-5''β), 1,71 (m, 1H, H-2''α), 1,83 (m, 1H, H-2''β), 3,15 (m, 1H, H-3''), 3,73 (m, 1H, H-1''α), 3,84 (m, 1H, H-1''β), 4,85 (d, *J* = 2,55 Hz, 1H, H-3), 5,59 (d, *J* = 2,55 Hz, 1H, H-2), 6,40 (d, *J* = 16,10 Hz, 1H, H-8'), 6,95 (d, *J* = 8,32 Hz, 1H, H-5'), 7,38 (d, *J* = 8,32 Hz, 1H, H-6'). 8,47 (d, *J* = 16,10 Hz, 1H, H-7'). ¹³C NMR (100 MHz, acétone-*d*₆): 14,2 [C-6''], 20,0 [C-5''], 36,8 [C-4''], 37,6 [C-2''], 48,4 [C-3''], 59,8 [C-1''], 71,2 [C-3], 73,9 [C-2], 116,3 [C-8'], 117,1 [C-2'], 117,2 [C-5'], 120,0 [C-6'], 131,9 [C-1'], 143,2 [C-3'], 147,8 [C-7'], 148,6 [C-4'], 161,7 [C-9'], 170,7 [C-1], 173,9 [C-4].

-Diastéréoisomère 2

¹H RMN (400 MHz, acétone-*d*₆): δ ppm 0,82 (t, *J* = 7,08 Hz, 3H, H-6''), 1,38 (m, 1H, H-5''α), 1,53 (m, 2H, H-4''), 1,55 (m, 1H, H-5''β), 1,71 (m, 1H, H-2''α), 1,83 (m, 1H, H-2''β), 3,16 (m, 1H, H-3''), 3,73 (m, 1H, H-1''α), 3,84 (m, 1H, H-1''β), 4,86 (d, *J* = 2,49 Hz, 1H, H-3), 5,60 (d, *J* = 2,49 Hz, 1H, H-2), 6,41 (d, *J* = 15,91 Hz, 1H, H-8'), 6,95 (d, *J* = 8,32 Hz, 1H, H-5'), 7,39 (d, *J* = 8,41 Hz, 1H, H-6'). 8,48 (d, *J* = 15,91 Hz, 1H, H-7'). ¹³C NMR (100 MHz, acétone-*d*₆): 14,3 [C-6''], 20,1 [C-5''], 36,9 [C-4''], 37,9 [C-2''], 48,5 [C-3''], 59,9 [C-1''], 71,3 [C-3], 73,9 [C-2], 116,4 [C-8'], 117,2 [C-2'], 117,3 [C-5'], 120,1 [C-6'], 132,1 [C-1'], 143,2 [C-3'], 147,8 [C-7'], 148,6 [C-4'], 161,7 [C-9'], 170,7 [C-1], 173,9 [C-4].

2.3.5 HEMISYNTHESE DES SULFONES DE LA (+)-CATECHINE ET DE L'ACIDE CAFTARIQUE

L'hémisynthèse des sulfones de l'acide caftarique et de la (+)-catéchine est réalisée selon le mécanisme présenté sur la **Figure 24**. Ce mécanisme se décompose en deux étapes : l'oxydation du substrat polyphénolique [(+)-catéchine, acide caftarique] par la PPO, puis l'addition nucléophile de l'acide benzène sulfonique.

La hémisynthèse des sulfones de la (+)-catéchine et de l'acide caftarique est réalisée en présence d'un extrait brut de PPO (10 g/L) en milieu aqueux (10 mL) acidifiée avec 5 g/L d'acide tartrique. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 3,5 par addition de soude (5M). La (+)-catéchine (34 μM) et l'acide caftarique (32 μM) préalablement solubilisés respectivement dans une solution éthanolique et dans l'eau,

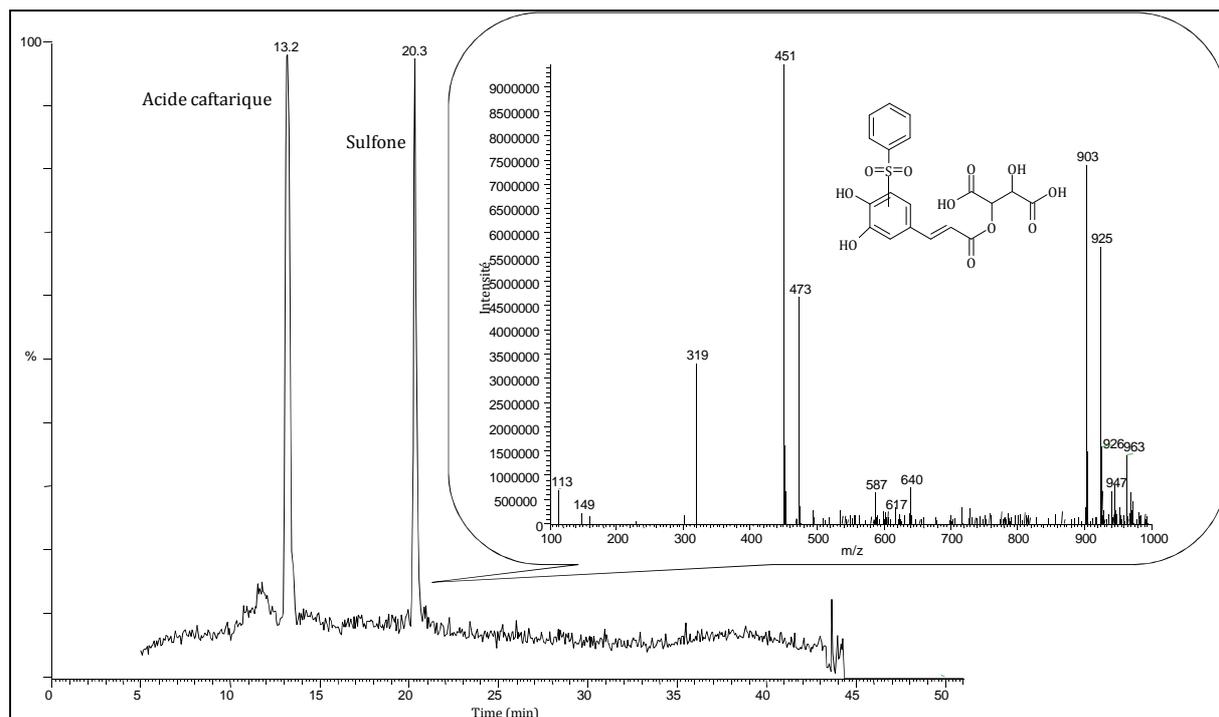


Figure 26. Chromatogramme (TIC) et spectre de masse en mode Full Scan du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des sulfones de l'acide caftarique (20,3 min)

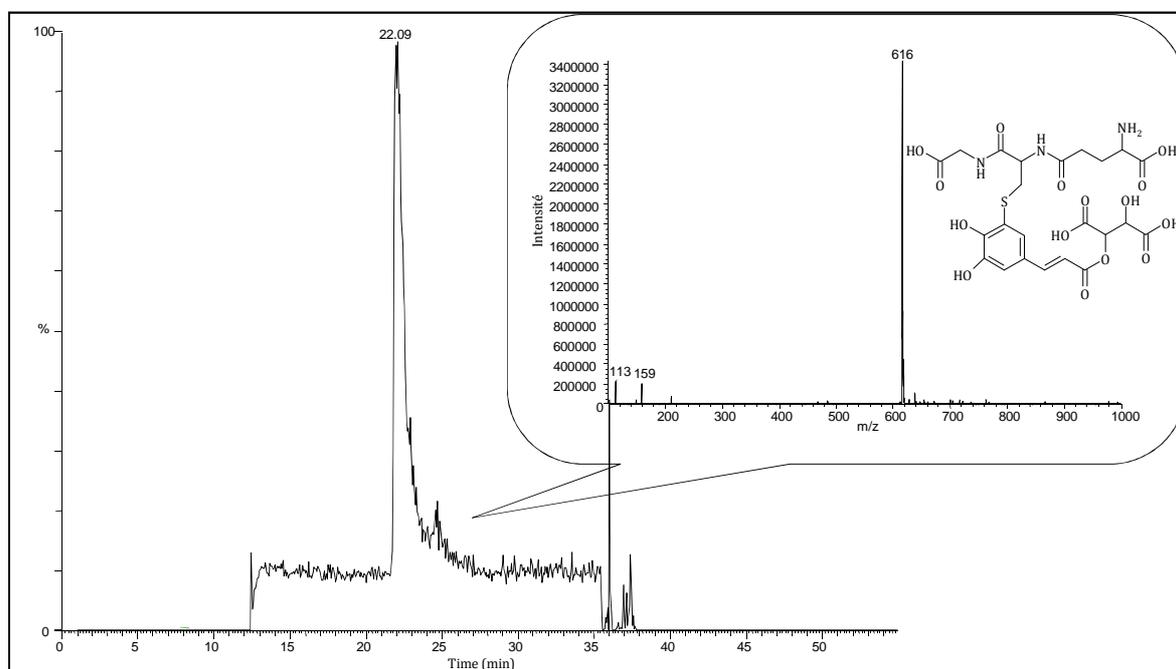


Figure 27. Chromatogramme (TIC) et spectre de masse en mode Full Scan du milieu réactionnel de l'hémisynthèse de l'acide 2-S-glutathionylcaféoyltartrique (22,09 min)

sont ensuite incorporés dans le milieu modèle. Celui-ci est maintenu à température ambiante, sous agitation pendant 30 min. A la fin de l'incubation les sulfones sont produits par l'addition de cristaux de l'acide benzène sulfonique (15,5 mM). Après agitation pendant 15 s, les sulfones sont stabilisés par addition d'une solution de dioxyde de soufre (0,2 %). Le milieu réactionnel est ensuite extrait à l'acétate d'éthyle (2 x 5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, filtrées et concentrées jusqu'à un volume de 100 μ L. Les produits de la réaction sont caractérisés d'après les analyses en CLHP-ESI-SM (Méthode 15). Cette analyse montre que les dérivés benzènesulfiniques de (+)-catéchine et de l'acide caftarique ont une masse moléculaire respective de 430 ($[M-H]^- = 429$) et de 452 ($[M-H]^- = 451$) (**Figure 25** et **Figure 26**).

2.3.6 HEMISYNTHESE DE L'ACIDE 2-S-GLUTATHIONYLCAFEOYLTRARIQUE (GRP)

L'hémisynthèse de l'acide 2-S-glutathionylcaféoyltartrique (GRP) est réalisée par addition de Michaël. L'acide caftarique (2 mM) et le glutathion (4 mM) sont dissous dans 10 mL d'une solution aqueuse, acidifiée à 3 g/L d'acide tartrique. L'extrait brut de la PPO (2 g/L) est ajouté. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 400 rpm, à température ambiante, pendant 1 heure. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP-UV (Méthode 14). Lorsque la réaction est finie, le milieu réactionnel est ensuite extrait par l'acétate d'éthyle (2 x 3 mL). Les phases organiques sont rassemblées, filtrées et concentrées jusqu'à 50 μ L. Le produit de la réaction, caractérisé par CLHP-ESI-SM (Méthode 7), présente une masse molaire de 617 ($[M-H]^- = 616$) (**Figure 27**).

2.4 ANALYSES CENOLOGIQUES

2.4.1 ANALYSES COURANTES DES MOÛTS ET DES VINS

Les analyses courantes des moûts (TAVP %, teneurs en sucres, acidité totale, pH, et azote assimilable) et des vins (degré d'éthanol, sucres résiduels) sont effectuées par réflectance aux rayons infrarouges à l'aide de l'appareil Infra-Analyser 450 (Technicon, France). Le dosage de ces paramètres a été réalisé par le laboratoire d'analyse SARCO, membre du réseau COFRAC.

2.4.2 DOSAGE DE L'OXYGENE DISSOUS DANS LES BOUTEILLES BOUCHEES

L'oxygène dissous est mesuré grâce à une électrode à oxygène. Cette sonde de type polarographique, brevetée par Orbisphère (modèle 31120), est équipée d'une chambre à circulation Derlin, reliée à un système de perçage-échantillonnage qui permet de mesurer la teneur en oxygène dissous directement dans la bouteille bouchée par application d'une contre pression d'azote inerte (Air Liquide, France).

L'étalonnage quotidien est effectué dans l'air saturé en eau à température ambiante. Un test, qui consiste à mesurer de très faibles teneurs en oxygène, est réalisé dans l'eau désoxygénée par l'ajout de sulfite de sodium. La réponse de l'électrode est considérée comme optimale lorsque la mesure d'une teneur en oxygène inférieure à 10 µg/L est atteinte en moins de 10 minutes (recommandations du constructeur). Le débit du liquide est maintenu à 130 mL/min durant la mesure. Chaque mesure est effectuée en triplicata.

2.4.3 DOSAGE DU DIOXYDE DE SOUFRE LIBRE

Le dioxyde de soufre libre est dosé selon la méthode colorimétrique de Ripper (OIV, 1990).

2.5 MICROVINIFICATIONS

Afin de préserver autant que possible la fermentescibilité des moûts et se situer en adéquation avec les conditions pratiques, la turbidité des moûts de Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* cv. Sauvignon) est ajustée à 200 NTU avec les bourbes fines issues de jus de raisin de ce cépage, conservées à -20°C. Les teneurs en dioxyde de soufre libre se situent à 20 mg/L, et si nécessaire la teneur en azote assimilable est ajustée à 200 mg N/L.

Lors des expériences de microvinification, un levain de *Saccharomyces cerevisiae* (souche Zymaflore X5®, Laffort Œnologie, France) est préparé dans le jus de raisin dilué au demi (200 mg/L, 37°C, 20 min) (Bely *et al.*, 2005). L'ensemencement est réalisé le lendemain en bouteilles stériles de 750 mL.

L'implantation de la souche de levure est contrôlée par comparaison du caryotype de la souche industrielle initiale avec celui de la biomasse par électrophorèse à champ pulsé (Frezier & Dubourdieu, 1992).

Les moûts en fermentation sont placés en chambre thermostatée à 20°C et le suivi de la fermentation est réalisé par mesure du dégagement de CO₂ (perte de poids). Chaque fermentation est réalisée en triplicata. Lorsque le taux de sucres résiduels est inférieur à 2 g/L, les vins sont sulfités à 30 mg/L et placés à 10°C.

2.6 TESTS SENSORIELS

2.6.1 DETERMINATION DU SEUIL DE PERCEPTION OLFACTIVE

Des solutions de concentrations croissantes du composé à étudier sont préparées dans un milieu modèle de référence dont la composition est la suivante : acide tartrique 4 g/L ; éthanol (HPLC grade) 12 % vol ; pH = 3,5 (NaOH, 5 N). 30 mL de cette solution sont placés dans des verres aux normes AFNOR. Le jury se compose de personnes entraînées des deux sexes et d'âge compris entre 20 et 50 ans. Il est réuni dans une salle climatisée à 19°C et sans bruit. Le nombre de dégustateurs est variable (10-60 personnes) et sera précisé pour chaque expérimentation. Chaque concentration fait l'objet d'un test triangulaire directionnel. Cinq concentrations sont testées successivement de la plus faible à la plus forte. La courbe de fréquence des bonnes réponses en fonction de la concentration est calculée afin de déterminer la concentration limite perçue par 50% des dégustateurs (Boidron *et al.*, 1988). Cette valeur fournit la meilleure estimation (Harper, 1982).

L'estimation du seuil de perception du composé dans le vin blanc sec est réalisée selon le même protocole. Le choix du vin est primordial : il doit être le plus neutre possible. Le dosage des composés dans le vin utilisé pour la détermination du seuil est effectué avant la dégustation.

2.7 ANALYSES STATISTIQUES

Les tests statistiques utilisés pour l'analyse des données ont été réalisés avec le logiciel Statistica V.7 (Statsoft Inc, Tulsa, OK) (analyse de variance, test de normalité Shapiro-Wilk et le test de Tukey HSD) ou avec le logiciel Unscrambler 10.0 pour la régression PLS (Partial Least Squares) et les analyses en composantes principales (ACP).

Tableau 6. Origine des produits chimiques utilisés

Substances chimiques	Pureté	Fournisseurs	Localité
(-)-Epicatéchine	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
(+)-Catéchine	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
1-Méthoxy-3-méthyl-butanethiol	≥ 98%	Oxford Chemicals	Hartlepool, Angleterre
2-Furanméthanethiol	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
3,3'-disulfanediyldihexan-1-ol	≥ 95%	Faculté d'œnologie	Bordeaux
3-Hydroxybutanoate d'éthyle	≥ 98%	Alfa Aesar	Schiltigheim, France
3-Sulfanylhéxan-1-ol	≥ 98%	Lancaster	Bischheim, France
3-Sulfanylhéxyl acétate	≥ 98%	Interchim	Montluçon, France
4-Méthyl-4-sulfanylpentan-2-one	≥ 98%	Interchim	Montluçon, France
Acétate d'éthyle	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Acétate d'isoamyle	≥ 99%	Janssen	Issy les Moulineaux, France
Acétate de phényléthyle	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Acétate de sodium	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Acide ascorbique	≥ 95%	VWR	Fontenay sous Bois, France
Acide benzène sulfonique	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Acide caféique	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Acide caftarique	≥ 98%	Dalton Pharma Services	Toronto, Canada
Acide chlorhydrique	≥ 38%	VWR	Fontenay sous Bois, France
Acide sulfurique	≥ 98%	VWR	Fontenay sous Bois, France
Acide tartrique	≥ 99,5%	VWR	Fontenay sous Bois, France
BSTFA	≥ 95%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Butanoate d'éthyle	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Carbonate de sodium	≥ 99%	VWR	Fontenay sous Bois, France
Chelating Sépharose	-	VWR	Fontenay sous Bois, France
CHES	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
<i>cis</i> -3-hexénol	≥ 98%	Lancaster	Bischheim, France
Cystéine HCL	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Cystine	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
DDT	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Dioxyde de soufre	≥ 10%	Laffort Œnologie	Bordeaux, France
Dowex 1X2	-	Acros Organics	Noisy-le-Grand, France
DTNB	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
EDTA	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Ethyl-2-sulfanyl acétate	≥ 98%	Alfa Aesar	Schiltigheim, France
Ethyl-2-sulfanylpropionate	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Ethyl-3-sulfanylpropionate	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Glutathion	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Heptanoate d'éthyle	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Hexanoate d'éthyle	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Hexanol	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Iode	≥ 99,9%	VWR	Fontenay sous Bois, France
Lévulinate d'éthyle	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Monobromobimane	≥ 93%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
MTBSTFA : t-BDMCS	≥ 98%	Interchim	Montluçon, France
Octan-3-ol	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Octanoate d'éthyle	≥ 98%	Lancaster	Bischheim, France
Phénylacétaldéhyde	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Phosphate de potassium	≥ 99%	VWR	Fontenay sous Bois, France
<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoate de sodium	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Pimaricine	≥ 98%	DMS	Heerlen, Pays bas
Procyanidine B1	≥ 80%	Extrasynthèse	Genay, France
Procyanidine B2	≥ 80%	Extrasynthèse	Genay, France
Pyridine anhydre	≥ 99%	Interchim	Montluçon, France
Quercétine	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
<i>S</i> -benzyl-L-cystéine	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Sotolon	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Sulfate d'ammonium	≥ 98%	VWR	Fontenay-sous-Bois
Sulfate de sodium anhydre	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Thiodène	≥ 98%	VWR	Fontenay sous Bois, France
<i>trans</i> -3-hexénol	≥ 98%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Trizma® base	≥ 99,8%	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France

2.8 PRODUITS CHIMIQUES EMPLOYES

Les substances chimiques utilisées ont été fournies par les firmes Sigma-Aldrich, Extrasynthèse, Dalton, VWR, Acros Organics, Oxford Chemicals, Interchim, DMS et Lacanster. La provenance des différentes substances utilisées est détaillée dans le **Tableau 6**.

Les solvants organiques nécessaires aux extractions ont été fournis par les firmes Sigma-Aldrich et Prolabo et sont utilisés sans purification supplémentaire, excepté le pentane préalablement distillé. Les gaz vecteurs (CPG-SM/FID) ou gaz secs (SM), de pureté industrielle sont fournis par Air Liquide (France).

PREMIERE PARTIE

Etude des mécanismes réactionnels des thiols volatils
avec les composés phénoliques

3

Réactivité des thiols volatils avec les polyphénols : Impact de l'oxygène, du fer et du dioxyde de soufre

Les propriétés de réactivité de diverses familles phénoliques des raisins et des vins avec les thiols volatils sont encore mal connues. Cette première étude concerne les travaux réalisés en milieu modèle de composition proche du vin pour préciser d'une part, le niveau de réactivité chimique des principaux flavonoïdes du raisin et du vin blanc avec divers thiols volatils contribuant à l'arôme des vins, et d'autre part déterminer le rôle des métaux sur l'oxydabilité des polyphénols, mesurée au travers de leur réactivité avec les thiols volatils. L'approche expérimentale consiste à suivre l'évolution de la concentration du 3-sulfanylhexanol (**3SH**), de la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (**4MSP**) et du 2-furanméthanethiol (**2FMT**) en présence de la (+)-catéchine, de la (-)-épicatéchine, et éventuellement de fer et de dioxyde de soufre, à une teneur fixe en oxygène.

3.1 PREPARATION DU MILIEU REACTIONNEL

La réactivité des monomères de flavan-3-ols avec différents thiols volatils est étudiée en solution modèle de composition proche du vin, en conditions d'inertage ou non. Pour cette raison, nous avons mis en place un système de préparation des échantillons qui nous permet d'avoir un taux d'oxygène dissous précis. La réaction est réalisée dans des piluliers transparents de 60 mL. Le volume de la réaction est fixé à 50 mL selon le protocole d'extraction des thiols volatils en petit volume (§ 2.1.1.4.2).

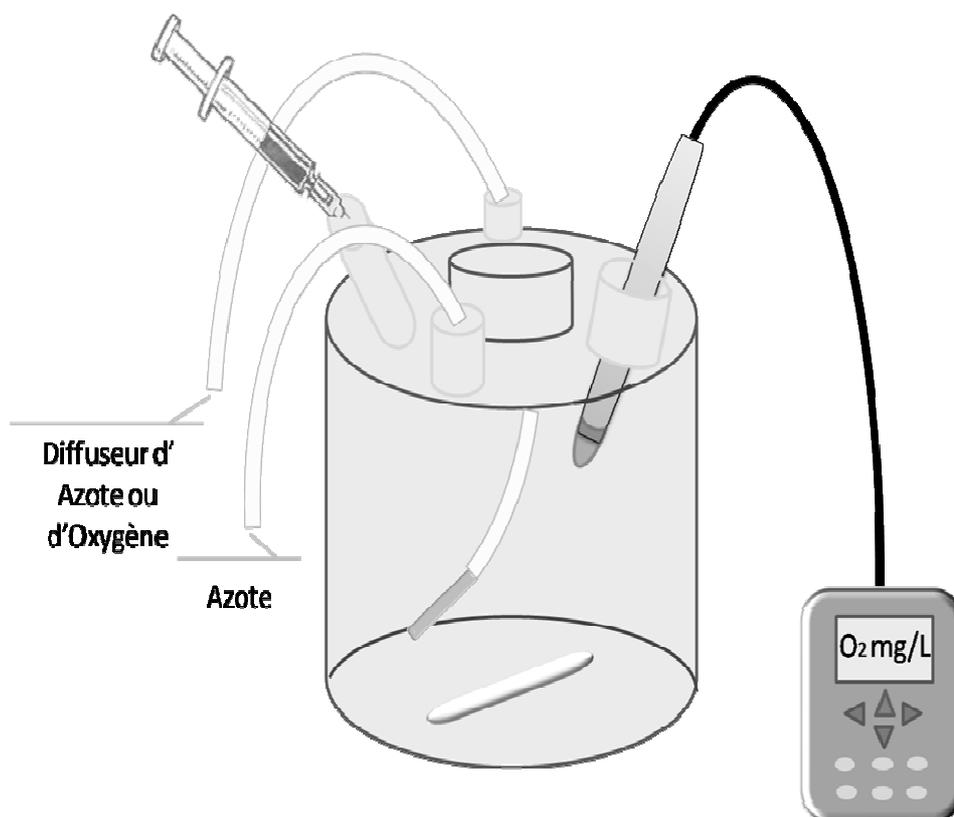


Figure 28. Réacteur batch utilisé pour l'ajustement du taux d'oxygène dans le milieu réactionnel

3.1.1 PREPARATION DES PILULIERS

Pour s'assurer de la bonne répétabilité des conditions de la réaction, il est nécessaire d'inertiser les piluliers, c'est-à-dire de remplacer l'air par de l'azote. Pour cela, chaque pilulier est d'abord rempli avec de l'eau ultra pure (milli Q, Millipore) et bouché avec un septum en silicone (SUPELCO, Saint-Quentin Fallavier, France) de 20 mm de diamètre. Pour s'assurer de l'étanchéité, le pilulier est serti par des cercles d'aluminium (SUPELCO, Grip Cap, Aluminium, Saint-Quentin Fallavier, France). Puis les piluliers sont remplis d'azote en éliminant l'eau par contre pression. L'inertage de chaque pilulier s'effectue donc sous flux d'azote.

3.1.2 MILIEU REACTIONNEL

Le milieu modèle est constitué d'une solution hydro-alcoolique à 12 % (v/v) d'éthanol (HPLC grade) dans de l'eau déminéralisée (Acros, teneur en métaux inférieure à 0,01 ppm) contenant également 5 g/L d'acide tartrique. La valeur de pH est ajustée à 3,5 (NaOH, 10 N).

3.1.3 AJUSTEMENT DU TAUX D'OXYGÈNE DANS LE MILIEU REACTIONNEL

La solution modèle est placée dans un réacteur du type Batch (Prémont, Bordeaux) (**Figure 28**) de 3L, permettant l'ajustement de la teneur en oxygène dissous. Le réacteur possède cinq orifices d'introduction. Une entrée nous a servi pour placer la sonde de l'oxymètre LDO™ HQ10 (Hach, Düsseldorf, Germany) à membrane semi-perméable, fonctionnant selon le principe de LDO (Luminescent Dissolved Oxygen). La teneur en oxygène dissous est mesurée par une couche sensible à l'oxygène qui réagit à la lumière bleue. Elle renvoie la lumière rouge (effet de luminescence). Le temps entre la réaction et le renvoi correspond à la teneur en oxygène dans la solution. Une seconde entrée est utilisée pour introduire le diffuseur de gaz (POREX) avec un diamètre de pores: 12 μm . La troisième sert pour le prélèvement, à l'aide d'une seringue. Les autres entrées sont bouchées hermétiquement.

Dans un premier temps, l'oxygène dissous est éliminé par un barbotage à l'azote (Air liquide, France) de la solution modèle en agitation jusqu'à une concentration en oxygène de 0,1 mg/L. Une fois que la valeur indiquée par l'oxymètre est stable pendant

au moins 5 minutes, le prélèvement des échantillons est réalisé par contre pression d'azote.

Dans un deuxième temps, l'oxygène est amené à une concentration définie (5 mg/L) par diffusion avec un débit fixe (15 mL/min, Air Liquide, France) grâce à un débitmètre (Sho-Rate, Serv Instrumentation, Irigny, France).

Les échantillons de milieux modèles inertés ou non sont introduits dans les piluliers inertés à l'aide d'une seringue.

3.1.4 MODALITES EXPERIMENTALES

Pour l'étude de la réactivité des différents composés phénoliques avec les thiols volatils les modalités suivantes sont préparées :

M1 (Thiol), **M2** (Thiol + O₂), **M3** (Thiol + polyphénol), **M4** (Thiol + polyphénol + O₂), **M5** (Thiol + polyphénol + SO₂), **M6** (Thiol + polyphénol + SO₂ + O₂), **M7** (Thiol + Fe³⁺), **M8** (Thiol + Fe³⁺ + O₂), **M9** (Thiol+ polyphénol + Fe³⁺ + SO₂), **M10** (Thiol + polyphénol + Fe³⁺ + SO₂ + O₂), **M11** (Thiol + polyphénol + Fe³⁺) et **M12** (Thiol + polyphénol + Fe³⁺ + O₂).

Les teneurs en (+)-catéchine et en (-)-épicatéchine sont ajustées à 500 mg/L et celles des **3SH**, **2FMT** et **4MSP** à 2 nM. Le dioxyde de soufre et le fer sont additionnés à une concentration respective de 50 mg/L et de 5 µg/L.

Les modalités sont préparées en triplicata. Les échantillons sont incubés à température ambiante (20°C) recouverts avec du papier aluminium, à l'abri de la lumière.

Le dosage des thiols volatils dans les différentes modalités est effectué à trois temps différents : au temps zéro (0 jour), à une semaine (7 jour) et à deux semaines (15 jour) d'incubation.

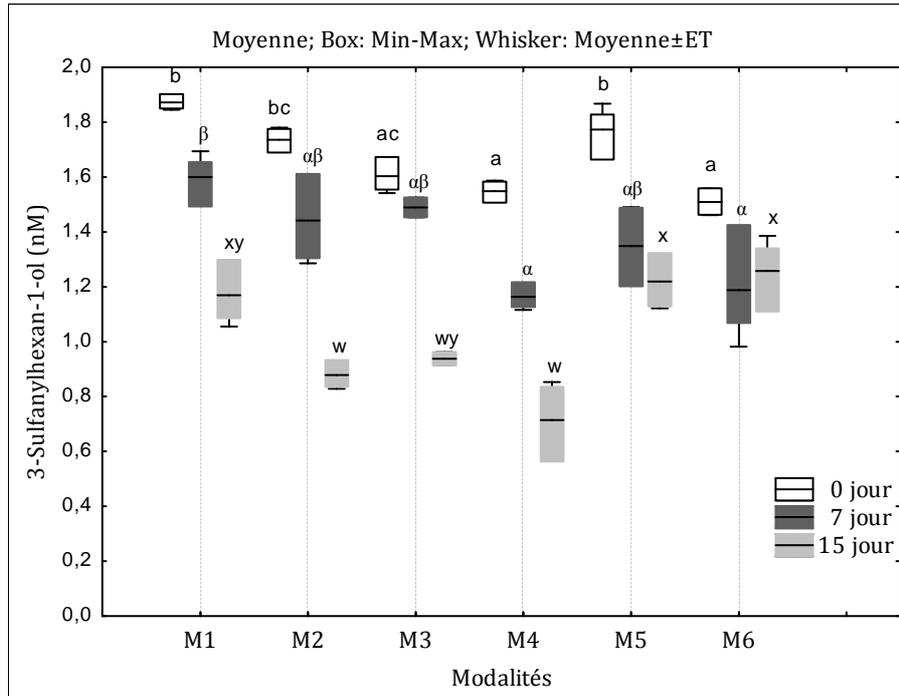


Figure 29. Réactivité du 3-sulfanylhéxan-1-ol avec la (+)-catéchine. Incidence de la présence d'oxygène et du dioxyde de soufre. Les valeurs désignées par des lettres différentes, pour les diverses modalités, au niveau de chaque point du temps, indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (Test Tukey, $p \leq 0,05$). Un alphabet différent est utilisé pour chaque temps de prélèvement. **M1** (3SH), **M2** (3SH + O₂), **M3** (3SH + (+)-catéchine), **M4** (3SH + (+)-catéchine + O₂), **M5** (3SH + (+)-catéchine + SO₂) et **M6** (3SH + (+)-catéchine + SO₂ + O₂)

3.2 REACTIVITE DU 3-SULFANYLHEXANOL : INCIDENCE DE LA PRESENCE D'OXYGENE, DE FER ET DE DIOXYDE DE SOUFRE

3.2.1 INFLUENCE DE LA (+)-CATECHINE

A t_{jour0} , la teneur en **3SH** est légèrement inférieure par rapport à la quantité initialement ajoutée (moins de 12 %) pour les modalités M4 et M6 (**Figure 29**). On constate donc un effet immédiat, au seuil de $p = 0,05$, de la (+)-catéchine sur la diminution de la teneur en **3SH** dans le milieu modèle en présence d'oxygène.

Après une semaine d'incubation, à t_{jour7} , l'atténuation de la teneur en **3SH** est renforcée à un niveau de l'ordre de 10 % par la présence de la (+)-catéchine (M3) dans la solution modèle. La saturation du milieu en oxygène (M4) (5mg/L d'oxygène dissous) conduit à une baisse de l'ordre de 25 % de plus (diminution totale de près de 37 %). Avec ce résultat, on confirme les résultats des premiers travaux de Blanchard *et al.* (2004) qui avaient noté à t_{jour7} , une diminution importante des teneurs en **3SH** en présence d'oxygène et de (+)-catéchine, par rapport à la modalité de référence avec oxygène mais sans (+)-catéchine (50 % de diminution en présence de la (+)-catéchine).

Par ailleurs, l'addition du dioxyde de soufre (50 mg/L) en présence de la (+)-catéchine et de l'oxygène, a atténué significativement la diminution des teneurs en **3SH** dans la solution modèle. Le niveau de la diminution totale des teneurs en **3SH** n'a pas dépassé le seuil de 10 % après 7 jours d'incubation. Le dioxyde de soufre libre a des propriétés antioxydantes vis-à-vis des quinones de la (+)-catéchine (Saucier & Waterhouse, 1999) que l'on observe ici au travers d'une moindre réactivité de la (+)-catéchine avec le **3SH** en présence de dioxyde de soufre.

Enfin, l'effet protecteur du dioxyde de soufre contre la dégradation de la teneur en **3SH** dans le milieu réactionnel est bien illustré après deux semaines d'incubation. A t_{jour15} , nous observons une diminution plus au moins intense des teneurs en **3SH** en fonction de la présence ou pas de la (+)-catéchine dans le milieu pour toutes les modalités (M1, M2, M3 et M4), sauf dans le cas où le dioxyde de soufre est présent dans le milieu réactionnel, avec ou sans oxygène (M5 et M6).

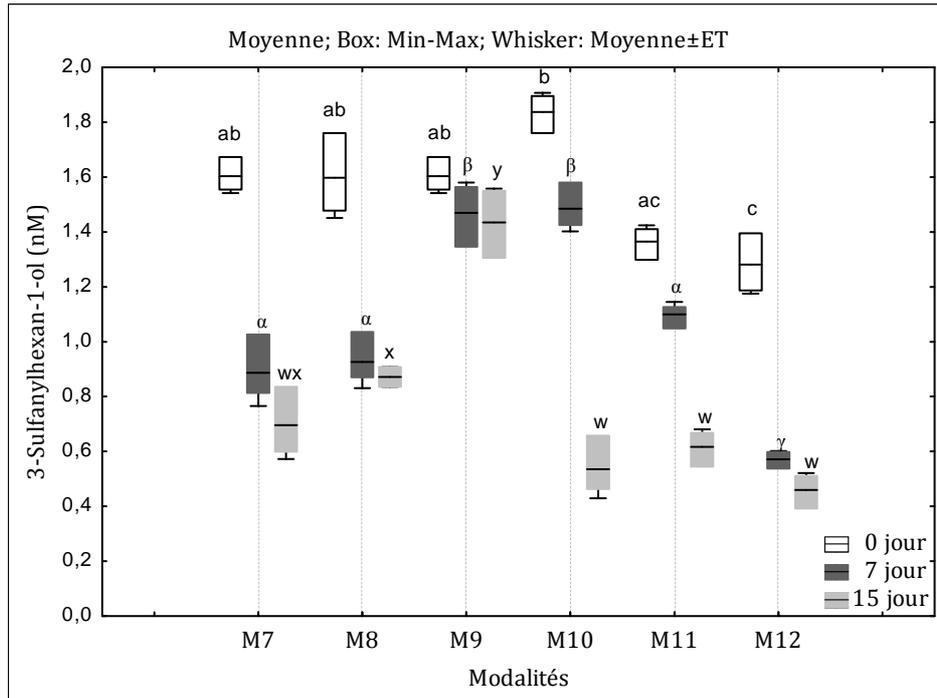


Figure 30. Réactivité du 3-sulfanylhéxanol avec la (+)-catéchine. Incidence de la présence d'oxygène, de fer et de dioxyde de soufre. Les valeurs désignées par des lettres différentes, pour les diverses modalités, au niveau de chaque point du temps, indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (Test Tukey, $p \leq 0,05$). Un alphabet différent est utilisé pour chaque temps de prélèvement. **M7** (3SH + Fe³⁺), **M8** (3SH + Fe³⁺ + O₂), **M9** (3SH+ (+)-catéchine + Fe³⁺ + SO₂), **M10** (3SH + (+)-catéchine + Fe³⁺ + SO₂ + O₂), **M11** (3SH + (+)-catéchine + Fe³⁺) et **M12** (3SH + (+)-catéchine + Fe³⁺+ O₂)

L'incidence de l'addition de métaux sur le contenu en **3SH** du milieu réactionnel a été ensuite étudiée. La seule présence de fer sous la forme Fe^{3+} , n'a aucun effet significatif, au seuil de 5 %, sur la diminution de la teneur en **3SH** à t_{jour} , concernant les modalités témoins M7 (**3SH** + Fe^{3+}) et M8 (**3SH** + Fe^{3+} + O_2) (**Figure 30**). Cependant, la propriété du fer en tant que catalyseur de réactions d'oxydation directe (Hynes & O Coinceanainn, 2001; Fernandez *et al.*, 2002; Danilewicz, 2007) ou indirecte (Waterhouse & Laurie, 2006) de la (+)-catéchine en quinone, est exprimée dès le début de la réaction M11 [(+)-catéchine + Fe^{3+}] et M12 [(+)-catéchine + Fe^{3+} + O_2]. En conséquence, la présence du fer sous forme Fe^{3+} à 5 $\mu\text{g/L}$ et de la (+)-catéchine en milieu riche en oxygène (5 mg/L) provoque une diminution considérable (30 %) de la concentration du **3SH**, dès le déclenchement de la réaction. Cette diminution n'est pas observée en présence du dioxyde de soufre, qui agit comme antioxydant dans le milieu réactionnel.

Après une semaine d'incubation, à t_{jour7} , le pouvoir oxydatif direct du Fe^{3+} sur la (+)-catéchine est très prononcé, [modalité M11 : (+)-catéchine + Fe^{3+} , **Figure 30**]. Avec l'addition d'oxygène, on observe une baisse très importante (de l'ordre de 57 %), de la teneur en **3SH** [M12 : (+)-catéchine + Fe^{3+} + O_2]. L'action du fer et de l'oxygène sur la catéchine provoquent une diminution rapide de la teneur en **3SH** après 7 jours d'incubation (t_{jour7}) sans pour autant qu'il y ait évolution ensuite de la concentration en **3SH**, comme les dosages à t_{jour15} le démontrent. Le phénomène est ralenti en absence d'oxygène car, dans ce cas, une diminution de la concentration du **3SH** de seulement 20 % est notée au bout d'une semaine [M11 : (+)-catéchine + Fe^{3+}]. Cependant, en présence d'oxygène, la concentration du **3SH** dans la modalité M11 est significativement différente de celle de la modalité témoin (M8) sans (+)-catéchine. Ce résultat confirme, encore une fois, l'effet catalytique de métaux sur l'oxydation de la (+)-catéchine et illustre indirectement les conséquences de l'oxydation de la (+)-catéchine sur la perte d'arôme (Waterhouse & Laurie, 2006; Danilewicz, 2007; Danilewicz *et al.*, 2008).

Après 15 jours d'incubation, les différences s'estompent et la concentration en **3SH** dans toutes les modalités devient presque identique et non significative, avec ou sans oxygène, excepté pour la modalité M9 [**3SH**+ (+)-catéchine + Fe^{3+} + SO_2] dans laquelle la concentration en **3SH** est maintenue à des niveaux bien supérieurs (en moyenne 1,4 mM) à ceux des autres modalités (en moyenne de 0,4 à 0,8 mM).

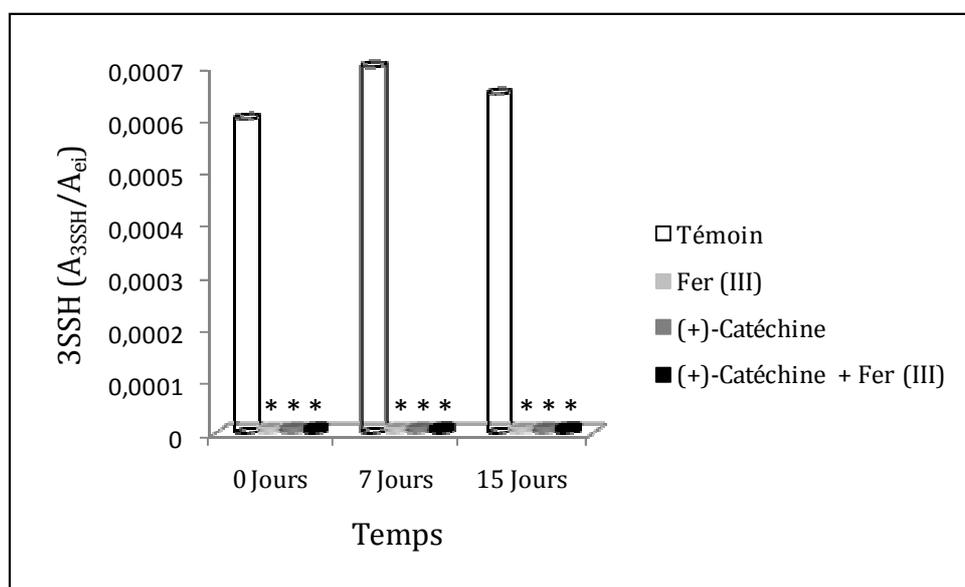


Figure 31. Recherche de la formation du 3,3'-disulfanediyldihexan-1-ol (**3SSH**) dans les différentes modalités d'incubation du **3SH** en présence ou non du fer(III) et de la (+)-catéchine. Le témoin positif correspond à la molécule de synthèse pour chaque point du temps. * non détecté

Il a déjà été mentionné dans la littérature que les thiols volatils ne s'oxydent pas facilement sous l'action de l'oxygène moléculaire mais que leur oxydation est catalysée par la présence des métaux (fer, cuivre) (Jocelyn, 1972). Il est donc probable que la diminution de la teneur en **3SH** (M7 et M8) dans le témoin non additionné en (+)-catéchine, soit provoquée par l'oxydation directe du **3SH**, catalysée par le Fe^{3+} , en présence d'oxygène (**Figure 23** ; réaction 4). La présence de résidus de métaux à des concentrations inférieures à $1 \mu\text{g/L}$ dans la solution modèle ne peut pas cependant être exclue. Les mêmes mécanismes pourraient également expliquer la diminution des teneurs en **3SH** dans la modalité M2 en présence de grandes quantités d'oxygène (5 mg/L) (diminution de plus de 50 % de la teneur en **3SH** pendant 15 jours, par rapport à la modalité (M1) conservée à l'abri d'oxygène).

À la lumière de ces résultats, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la diminution des concentrations du **3SH** dans notre milieu réactionnel. La première hypothèse concerne le fait que la diminution du **3SH** est due à son oxydation (dimérisation) catalysée par le fer (**Figure 23** ; réactions 4) (Jocelyn, 1972). La deuxième hypothèse est que le fer en tant que catalyseur du mécanisme d'oxydation de la (+)-catéchine (Waterhouse & Laurie, 2006), forme des radicaux libres qui oxydent la (+)-catéchine en quinone. Les quinones donnent ensuite des réactions d'addition avec le **3SH** (**Figure 23**; réaction 1). Il en résulte alors une perte d'arôme. En même temps que les quinones sont produites, il y a formation de peroxyde d'hydrogène, éventuellement après avoir été réduit en radicaux hydroxyles (**Figure 23**; réactions 2 et 3), qui favorise également l'autoxydation du **3SH**.

L'analyse par CPG-SM de notre milieu modèle concernant la formation du produit majeur d'autoxydation du **3SH**, le 3,3'-disulfanediyldihexan-1-ol (**3SSH**) a été négative (**Figure 31**). Ce résultat renforce l'acceptation de la deuxième hypothèse formulée pour expliquer la perte du **3SH** en présence de la (+)-catéchine selon laquelle la dégradation du **3SH** dans le milieu réactionnel est due au mécanisme d'addition du **3SH** sur les formes quinoniques de la (+)-catéchine.

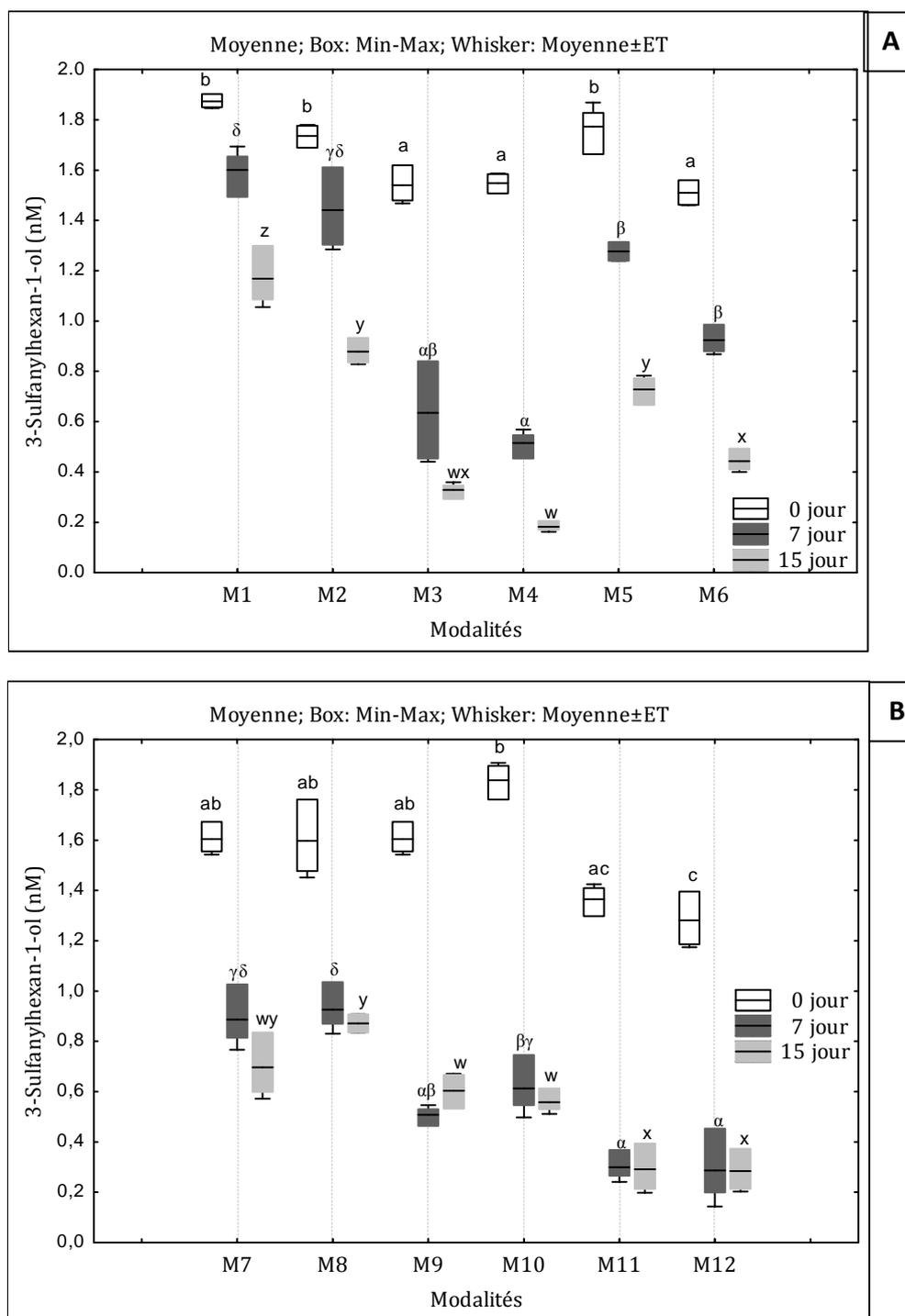


Figure 32. Réactivité du 3-sulfanylhéxanol avec la (-)-épicatéchine. Incidence de la présence d'oxygène, du fer et du dioxyde de soufre. Les valeurs désignées en lettres différentes, pour les diverses modalités, au niveau de chaque point du temps, indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (Test Tukey, $p \leq 0,05$). Un alphabet différent est utilisé pour chaque temps de prélèvement. **(A)** M1 (3SH), M2 (3SH + O₂), M3 (3SH + (-)-épicatéchine), M4 (3SH + (-)-épicatéchine + O₂), M5 (3SH + (-)-épicatéchine + SO₂), M6 (3SH + (-)-épicatéchine + SO₂ + O₂), **(B)** M7 (3SH + Fe³⁺), M8 (3SH + Fe³⁺ + O₂), M9 [3SH+ (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂], M10 [3SH + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂ + O₂], M11 [3SH + (-)-épicatéchine + Fe³⁺] et M12 [3SH + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + O₂]

3.2.2 INFLUENCE DE LA (-)-EPICATECHINE

A $t_{\text{jour}0}$, après l'addition de la (-)-épicatéchine nous observons (**Figure 32, A**) un effet matrice vis-à-vis de la concentration en **3SH**, qui est similaire à celui observé dans le cas de la (+)-catéchine (**Figure 29**). Après une semaine d'incubation, à $t_{\text{jour}7}$, la présence de la (-)-épicatéchine indépendamment de la présence d'oxygène, M3 [**3SH** + (-)-épicatéchine] et M4 [**3SH** + (-)-épicatéchine + O₂], provoque une diminution considérable de la concentration en **3SH** (près de 64 %), soit une diminution deux fois plus importante que dans le cas de la (+)-catéchine pour des conditions opératoires similaires (**Figure 32, A**). L'oxydabilité de la (-)-épicatéchine semble être indépendante du taux d'oxygène dissous dans la matrice. Plus précisément, à $t_{\text{jour}7}$, l'oxydabilité de la (-)-épicatéchine notée au travers de la diminution de la concentration en **3SH** est très prononcée même en présence de traces d'oxygène (M3 : témoin inerté sans oxygène). L'incidence de la forte oxydation de la (-)-épicatéchine sur la dégradation du **3SH** dans le milieu est clairement illustrée au bout de 15 jours d'incubation.

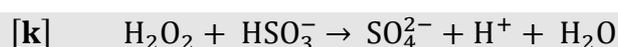
De plus, le fait que le dioxyde de soufre n'ait aucun effet antioxydant pour limiter la dégradation du **3SH** en présence de la (-)-épicatéchine, **Figure 32, A** : M5 [**3SH** + (-)-épicatéchine + SO₂] et M6 [**3SH** + (-)-épicatéchine + SO₂ + O₂], confirme la forte oxydabilité de ce flavan-3-ol. Il semble que la (-)-épicatéchine réagisse avec l'oxygène plus rapidement que le dioxyde de soufre. En fait, l'interaction de dioxyde de soufre et d'oxygène apparaît bloquée en la présence de concentrations élevées (500 mg/L) en (-)-épicatéchine (Danilewicz, 2007). Par conséquent, dans notre étude la (-)-épicatéchine semble être plus réactive que la (+)-catéchine vis-à-vis du **3SH**.

L'ajout de fer ferrique a un effet immédiat sur le contenu en **3SH** dans le milieu réactionnel (**Figure 32, B**). Un effet significatif au seuil de 5 % de la matrice est ainsi observé après l'addition du Fe³⁺ sur les modalités de contrôle M7 (**3SH** + Fe³⁺) et M8 (**3SH** + Fe³⁺ + O₂) à $t_{\text{jour}0}$. En même temps, une diminution supplémentaire de l'ordre de 28 % est provoquée vis à vis de la concentration en **3SH** par addition de la (-)-épicatéchine, M11 [**3SH** + (-)-épicatéchine + Fe³⁺] et M12 [**3SH** + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + O₂]. L'effet de la matrice par ajout du fer, sur le contenu en **3SH** du milieu réactionnel, est identique à celui observé dans notre expérimentation avec la (+)-catéchine.

Cependant, le rôle du fer, en temps que catalyseur d'oxydation de la (-)-épicatéchine, est clairement démontré au cours de la période d'incubation. La **Figure 32, B** à $t_{\text{jour}7}$, montre une chute radicale de la concentration du **3SH** en présence de la (-)-épicatéchine sous conditions de forte oxydation, pour les modalités M9 [**3SH**+ (-)-épicatéchine + Fe^{3+} + SO_2], M10 [**3SH** + (-)-épicatéchine + Fe^{3+} + SO_2 + O_2], M11 [**3SH** + (-)-épicatéchine + Fe^{3+}] et M12 [**3SH** + (-)-épicatéchine + Fe^{3+} + O_2]. En présence du fer, d'une part, la (-)-épicatéchine fait chuter fortement les teneurs en **3SH** (0,6 nM dans les modalités M9 - M10 et de 0,3 nM dans les modalités M11 et M12) et d'autre part, le SO_2 devient totalement inefficace en temps qu'antioxydant (M9 et M10).

En conséquence, en présence de fer ferrique, le dioxyde de soufre apparaît incapable de bloquer l'oxydation de la (-)-épicatéchine et de stabiliser la concentration en **3SH** dans le milieu. Ce résultat n'a pas été observé en présence de la (+)-catéchine et illustre clairement d'une part, une différence de réactivité entre ces deux flavan-3-ols avec le **3SH** et d'autre part, une oxydabilité variable de ces molécules polyphénoliques plus au moins limitée par la présence de dioxyde de soufre.

D'après certains auteurs, le phénomène d'accentuation ou de diminution de la capacité antioxydante du dioxyde de soufre en présence de différents polyphénols peut être lié à la diminution rapide de la teneur en dioxyde de soufre libre et à l'augmentation résultante des teneurs en dioxyde de soufre combiné dans le milieu, par la présence de peroxyde d'hydrogène [**k**] produit au cours de l'oxydation des polyphénols.



De plus, l'autooxydation du dioxyde de soufre est catalysée par les métaux comme le fer et le cuivre conduisant à une perte supplémentaire de la teneur en dioxyde de soufre libre (Danilewicz, 2007). La variation de la réactivité du dioxyde de soufre en fonction du niveau d'oxydoréduction de la matrice (présence des polyphénols et des métaux) dans notre étude se traduit par l'instabilité du **3SH** dans milieu et la perte d'arôme conséquente.

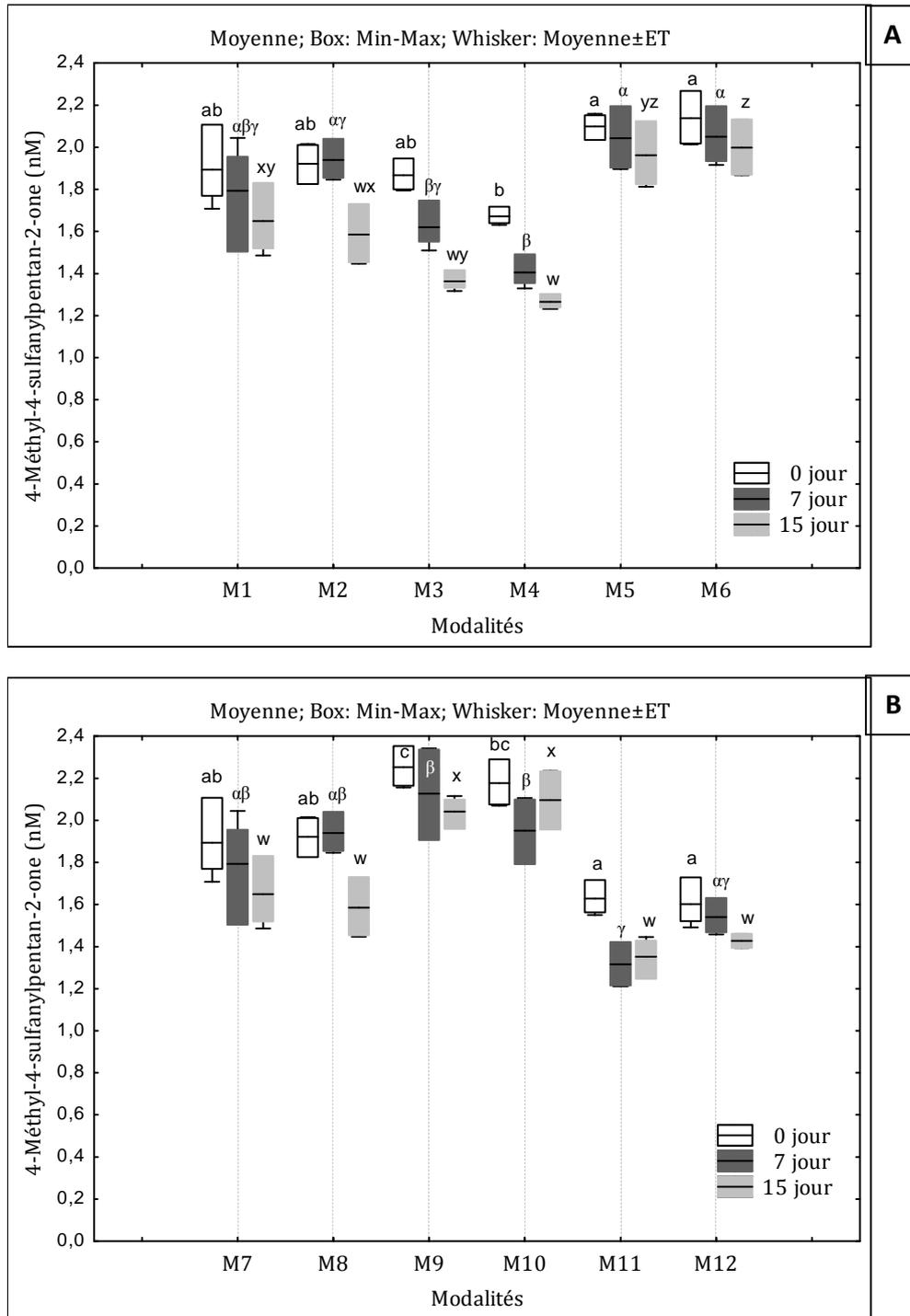


Figure 33. Réactivité de la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one avec la (+)-catéchine. Incidence de la présence d'oxygène, du fer et du dioxyde de soufre. Les valeurs désignées par des lettres différentes, pour les diverses modalités, au niveau de chaque point du temps, indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (Test Tukey, $p \leq 0,05$). Un alphabet différent est utilisé pour chaque temps de prélèvement. **(A)** M1 (4MSP), M2 (4MSP + O₂), M3 (4MSP + (+)-catéchine), M4 [4MSP + (+)-catéchine + O₂], M5 [4MSP + (+)-catéchine + SO₂], M6 [4MSP + (+)-catéchine + SO₂ + O₂], **(B)** M7 (4MSP + Fe³⁺), M8 (4MSP + Fe³⁺ + O₂), M9 [4MSP + (+)-catéchine + Fe³⁺ + SO₂], M10 [4MSP + (+)-catéchine + Fe³⁺ + SO₂ + O₂], M11 [4MSP + (+)-catéchine + Fe³⁺] et M12 [4MSP + (+)-catéchine + Fe³⁺ + O₂]

3.3 REACTIVITE DE LA 4-METHYL-4-SULFANYLPENTAN-2-ONE : INCIDENCE DE LA PRESENCE D'OXYGENE, DE FER ET DE DIOXYDE DE SOUFRE

3.3.1 INFLUENCE DE LA (+)-CATECHINE

L'étude de la réactivité de la **4MSP** avec la (+)-catéchine a révélé que la **4MSP** est un thiol volatil relativement stable, réagissant très peu avec la (+)-catéchine dans des conditions d'oxydation d'un milieu modèle de composition proche du vin (**Figure 33, A** et **B**).

Les traitements statistiques des données n'ont démontré aucune différence significative ($p = 0,05$) entre les quatre modalités M1 (**4MSP**), M2 (**4MSP** + O₂), M3 [**4MSP** + (+)-catéchine] et M4 [**4MSP** + (+)-catéchine + O₂] au début de la réaction, à t_{jour0} (**Figure 33, A**). En effet, aucun effet matrice n'existe vis-à-vis de la concentration en **4MSP** lors de l'addition de la (+)-catéchine et de l'oxygène dans la solution réactionnelle. Ce résultat s'explique vraisemblablement par une stabilité chimique de la **4MSP** plus importante que le **3SH**.

La réactivité de la **4MSP** avec la (+)-catéchine, en présence d'oxygène [M4 : **4MSP** + (+)-catéchine + O₂] est peu marquée. La **Figure 33, A** montre ainsi une diminution légère de la concentration en **4MSP**, après l'addition de la (+)-catéchine (seulement 0.25nM de perte de la concentration de la **4MSP**, à t_{jour7}). Cette diminution de concentration en **4MSP** est proportionnellement répétée à 15 jours d'incubation (t_{jour15}) pour la même modalité [**Figure 33, A** : M4 (**4MSP** + (+)-catéchine + O₂)]. De plus, à t_{jour15} , il y a une diminution limitée de la teneur en **4MSP** pour toutes les modalités (de M1 à M6). Cette réduction peut être due à la dégradation naturelle de la molécule dans le milieu réactionnel. Néanmoins, cette diminution ne peut pas être corrélée avec la présence de la (+)-catéchine et de l'oxygène.

En outre, la présence du fer ferrique, en absence du dioxyde de soufre dans le milieu modèle (**Figure 33, B**), entraîne une légère mais significative diminution (0,4 nM) de la concentration de la **4MSP**, à t_{jour0} M7 (**4MSP** + Fe³⁺), M8 (**4MSP** + Fe³⁺ + O₂). Cette diminution se poursuit en présence de la (+)-catéchine à t_{jour7} , M11 [**4MSP** + (+)-catéchine + Fe³⁺] et M12 [**4MSP** + (+)-catéchine + Fe³⁺ + O₂], ainsi jusqu'à la fin de la réaction à t_{jour15} . L'effet du dioxyde de soufre sur la concentration de la **4MSP**, dans notre

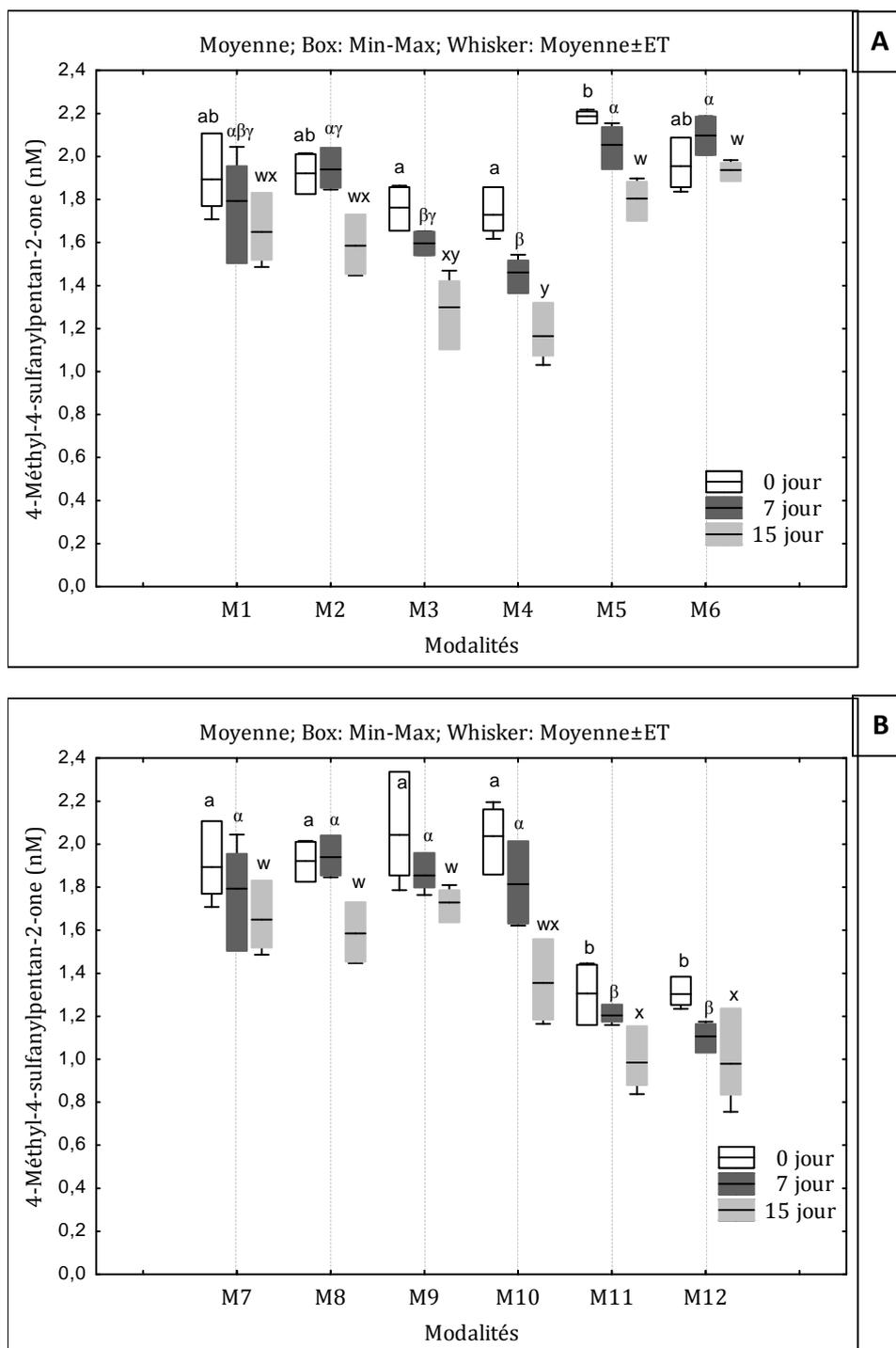


Figure 34. Réactivité de la 4-méthyl-4-sulfanyl-pentan-2-one avec la (-)-épicatéchine. Incidence de la présence d'oxygène, du fer et du dioxyde de soufre. Les valeurs désignées par des lettres différentes, pour les diverses modalités, au niveau de chaque point du temps, indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (Test Tukey, $p \leq 0,05$). Un alphabet différent est utilisé pour chaque temps de prélèvement. **(A)** M1 (4MSP), M2 (4MSP + O₂), M3 [4MSP + (-)-épicatéchine], M4 [4MSP + (-)-épicatéchine + O₂], M5 [4MSP + (-)-épicatéchine + SO₂], M6 [4MSP + (-)-épicatéchine + SO₂ + O₂], **(B)** M7 (4MSP + Fe³⁺), M8 (4MSP + Fe³⁺ + O₂), M9 [4MSP + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂], M10 [4MSP + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂ + O₂], M11 [4MSP + (-)-épicatéchine + Fe³⁺] et M12 [4MSP + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + O₂]

milieu modèle, a été clairement illustré sur une période de 15 jours, même dans les conditions de forte oxydation (présence du fer).

3.3.2 INFLUENCE DE LA (-)-EPICATECHINE

Aucun changement n'est observé vis-à-vis de la teneur en **4MSP** en présence de la (-)-épicatéchine à $t_{\text{jour}0}$ (**Figure 34, A et B**). En effet, il n'existe pas d'effet matrice vis-à-vis de la **4MSP** en lien avec la présence de la (-)-épicatéchine et d'oxygène dans la solution réactionnelle.

À $t_{\text{jour}7}$ et $t_{\text{jour}15}$, la (-)-épicatéchine induit une diminution de la **4MSP** (au total 30 % de diminution après 15 jours d'incubation), même en présence de traces d'oxygène: M3 [**4MSP** + (-)-épicatéchine] et M4 [**4MSP** + (-)-épicatéchine + O₂]. Ces résultats indiquent que la (-)-épicatéchine est plus réactive avec la **4MSP** que la (+)-catéchine, et mettent en évidence, encore une fois, la forte oxydabilité de cette molécule phénolique en comparaison avec son stéréoisomère, la (+)-catéchine.

Cependant, l'ajout du dioxyde de soufre dans le milieu modèle (**Figure 34, A : M5 et M6**) a significativement atténué la diminution de la concentration de la **4MSP**, contrairement à l'effet observé pendant l'incubation du **3SH** avec la (-)-épicatéchine.

L'addition de fer ferrique à la matrice (**Figure 34, B**) renforce la réactivité de la **4MSP** avec la (-)-épicatéchine (30 % de plus diminution qu'avec la (+)-catéchine), M11 [**4MSP** + (-)-épicatéchine + Fe³⁺] et M12 [**4MSP** + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + O₂]. Par ailleurs, la (-)-épicatéchine, en raison de sa capacité oxydante élevée, même en présence de faibles concentrations d'oxygène, ne montre aucune différence significative de réactivité pour les modalités M11 [**4MSP** + (-)-épicatéchine + Fe³⁺] et M12 [**4MSP** + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + O₂]. En présence de fer, la (-)-épicatéchine est très facilement oxydée, indépendamment du taux d'oxygène dissous présent dans la solution.

De plus, l'ajout du dioxyde de soufre en présence du fer n'a pas pu empêcher la réactivité de la (-)-épicatéchine avec la **4MSP** (**Figure 34, B**). En présence de (-)-épicatéchine, le dioxyde de soufre a pu seulement retarder la diminution de la teneur

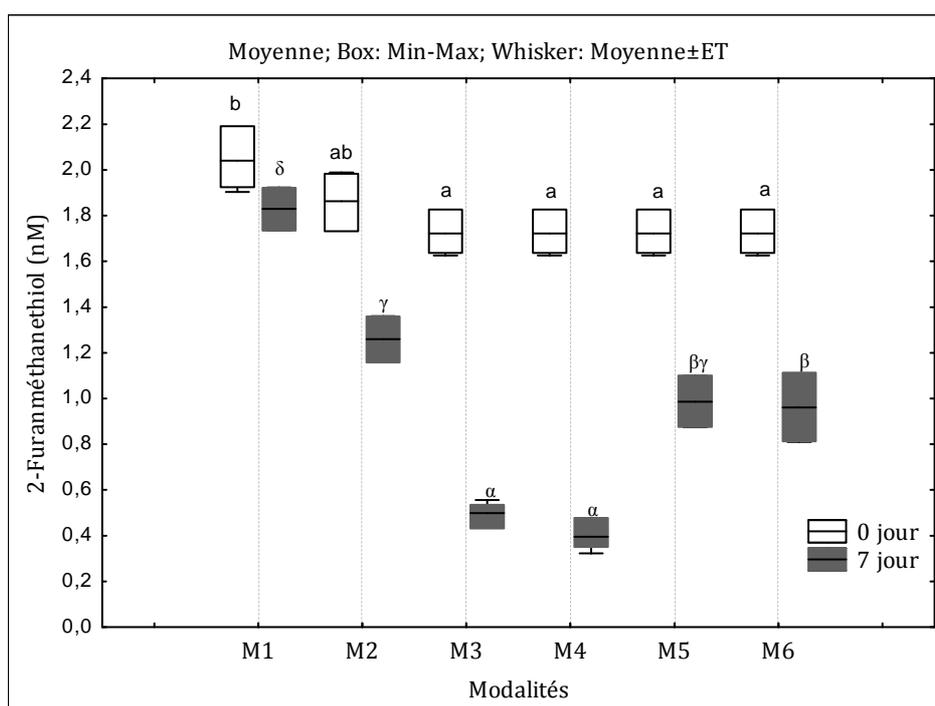


Figure 35. Réactivité du 2-furanméthanethiol avec la (+)-catéchine. Incidence de la présence d'oxygène, du fer et du dioxyde de soufre. Les valeurs désignées par des lettres différentes, pour les diverses modalités, au niveau de chaque point du temps, indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (Test Tukey, $p \leq 0,05$). Un alphabet différent est utilisé pour chaque temps de prélèvement. **M1** [2FMT], **M2** [2FMT + O₂], **M3** [2FMT + (+)-catéchine], **M4** [2FMT + (+)-catéchine + O₂], **M5** [2FMT + (+)-catéchine + SO₂] et **M6** [2FMT + (+)-catéchine + SO₂ + O₂]

en **4MSP** dans la solution modèle, M9 [**4MSP**+ (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂] et M10 [**4MSP** + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂ + O₂]. Par contre, au bout de 15 jours d'incubation, les différences au niveau de la dégradation de la **4MSP** induites par la présence de la (-)-épicatéchine, entre les modalités supplémentées (M9 et M10) ou pas en dioxyde de soufre (M11 et M12) s'estompent. A travers la réactivité de la **4MSP** avec la (-)-épicatéchine, il est bien clair dans notre étude, que la (-)-épicatéchine à une concentration donnée (500 mg/L) et en présence du fer, est capable de consommer beaucoup plus rapidement l'oxygène que le dioxyde de soufre.

3.4 REACTIVITE DU 2-FURANMETHANETHIOL : INCIDENCE DE LA PRESENCE D'OXYGENE, DE FER ET DE DIOXYDE DE SOUFRE

3.4.1 INFLUENCE DE LA (+)-CATECHINE

Notre expérience portant sur la réactivité du **2FMT** avec la (+)-catéchine, démontre que le **2FMT** fait partie des molécules de la famille des thiols volatils très instable, qui réagit intensivement avec la (+)-catéchine indépendamment de la présence d'oxygène.

A t_{jour0} , aucun effet significatif de la matrice n'est observé vis-à-vis de la concentration initiale en **2FMT** (**Figure 35**). Au bout de 7 jours d'incubation (à t_{jour7}), le **2FMT** présente une réactivité intense avec la (+)-catéchine, M3 [**2FMT** + (+)-catéchine] et M4 [**2FMT** + (+)-catéchine + O₂], conduisant à une perte de thiol de l'ordre de 70 % par rapport à la concentration initialement ajoutée. 10 % de cette diminution sont le résultat de la seule action de l'oxygène (M2).

En même temps, l'ajout du dioxyde de soufre, à t_{day7} , dans le milieu modèle présente un effet antioxydant limité contre la dégradation du **2FMT** en présence de la (+)-catéchine, ce qui conduit à une diminution d'environ 30 %, au lieu de 60 %, de la concentration en thiol (M3 et M4, privées du dioxyde de soufre) pour les modalités M5 et M6. En dépit de la protection antioxydante du dioxyde de soufre, il est impossible de détecter le **2FMT** après 15 jours d'incubation (**2FMT**_{LOD} = 0,1 nM). Cette situation est généralisée pour toutes les modalités et illustre la grande instabilité de ce thiol volatil.

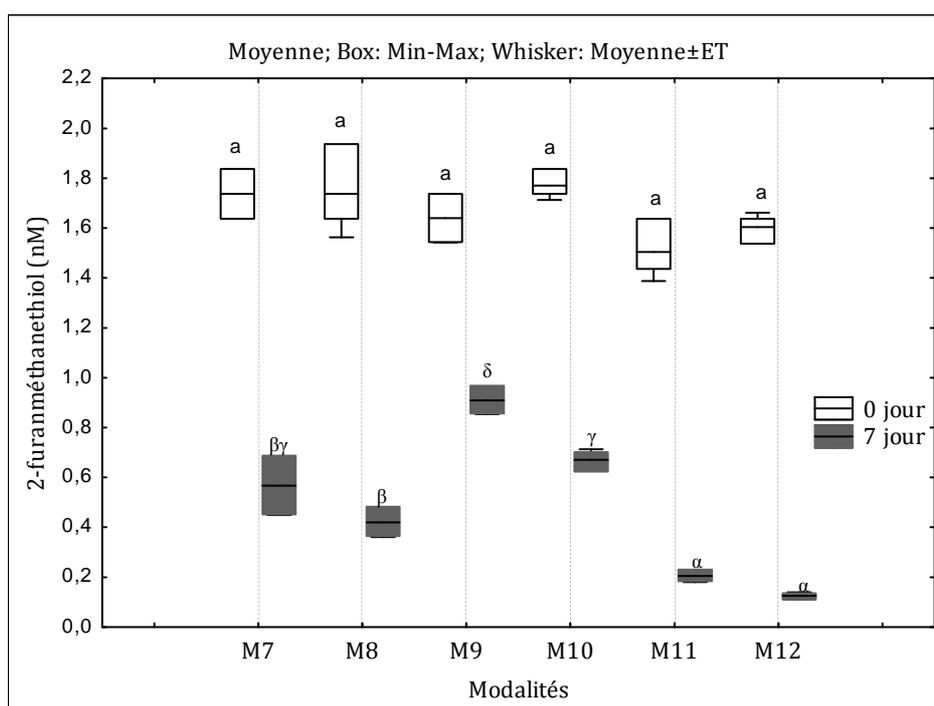


Figure 36. Réactivité du 2-furanméthanethiol avec la (+)-catéchine. Incidence de la présence d'oxygène, du fer et du dioxyde de soufre. Les valeurs désignées par des lettres différentes, pour les diverses modalités, au niveau de chaque point du temps, indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (Test Tukey, $p \leq 0,05$). Un alphabet différent est utilisé pour chaque temps de prélèvement. **M7** [2FMT + Fe³⁺], **M8** [2FMT + Fe³⁺ + O₂], **M9** [2FMT + (+)-catéchine + Fe³⁺ + SO₂], **M10** [2FMT + (+)-catéchine + Fe³⁺ + SO₂ + O₂], **M11** [2FMT + (+)-catéchine + Fe³⁺] et **M12** [2FMT + (+)-catéchine + Fe³⁺ + O₂]

Par ailleurs, à travers l'étude de la cinétique de la disparition du **2FMT** après addition de fer ferrique au milieu modèle (**Figure 36**), il semble que le fer catalyse la réduction d'oxygène mais aussi l'autoxydation du **2FMT**. A t_{jour7} , nous avons observé une diminution intense et brusque (1,3 nM de perte) de la concentration du **2FMT** contenu dans les modalités M7 (**2FMT** + Fe^{3+}) et M8 (**2FMT** + Fe^{3+} + O_2). La présence du fer ferrique indépendamment de la présence d'oxygène accélère ainsi la disparition du **2FMT** dans la solution modèle. Cependant, une fois la (+)-catéchine ajoutée dans la matrice (M11 et M12), les concentrations de **2FMT** atteignent à t_{jour7} des valeurs de l'ordre de 0,2 nM. La (+)-catéchine est responsable pour 60 % de cette diminution tandis que 40 % de diminution sont liés à la seule présence du fer (M7 et M8).

A l'abri d'oxygène, la présence du dioxyde de soufre dans le milieu réactionnel contenant du fer ferrique et de la (+)-catéchine, protège partiellement la dégradation du **2FMT** (**Figure 36**). A t_{jour7} , nous constatons que la concentration du **2FMT** pour les modalités sans oxygène, est maintenue à un niveau de concentration proche de la valeur 1nM [M9 (**2FMT**+ (+)-catéchine + Fe^{3+} + SO_2)]. En revanche, une fois que l'oxygène est présent dans la solution modèle [M10 (**2FMT** + (+)-catéchine + Fe^{3+} + SO_2 + O_2)], le dioxyde de soufre semble perdre sa capacité à empêcher l'action de la (+)-catéchine sur la dégradation du **2FMT**. Ainsi, une diminution supplémentaire de la teneur en **2FMT** (de l'ordre de 0,3 nM) est mesurée en comparaison avec la modalité incubée en absence d'oxygène [M9 (**2FMT** + (+)-catéchine + Fe^{3+} + SO_2)]. Malgré l'effet antioxydant du dioxyde de soufre dans la matrice, similaire à celui observé dans notre étude sur la réactivité de la (+)-catéchine avec le **2FMT** en absence du fer ferrique, le **2FMT** est totalement dégradé au bout de 15 jours d'incubation pour toutes les modalités.

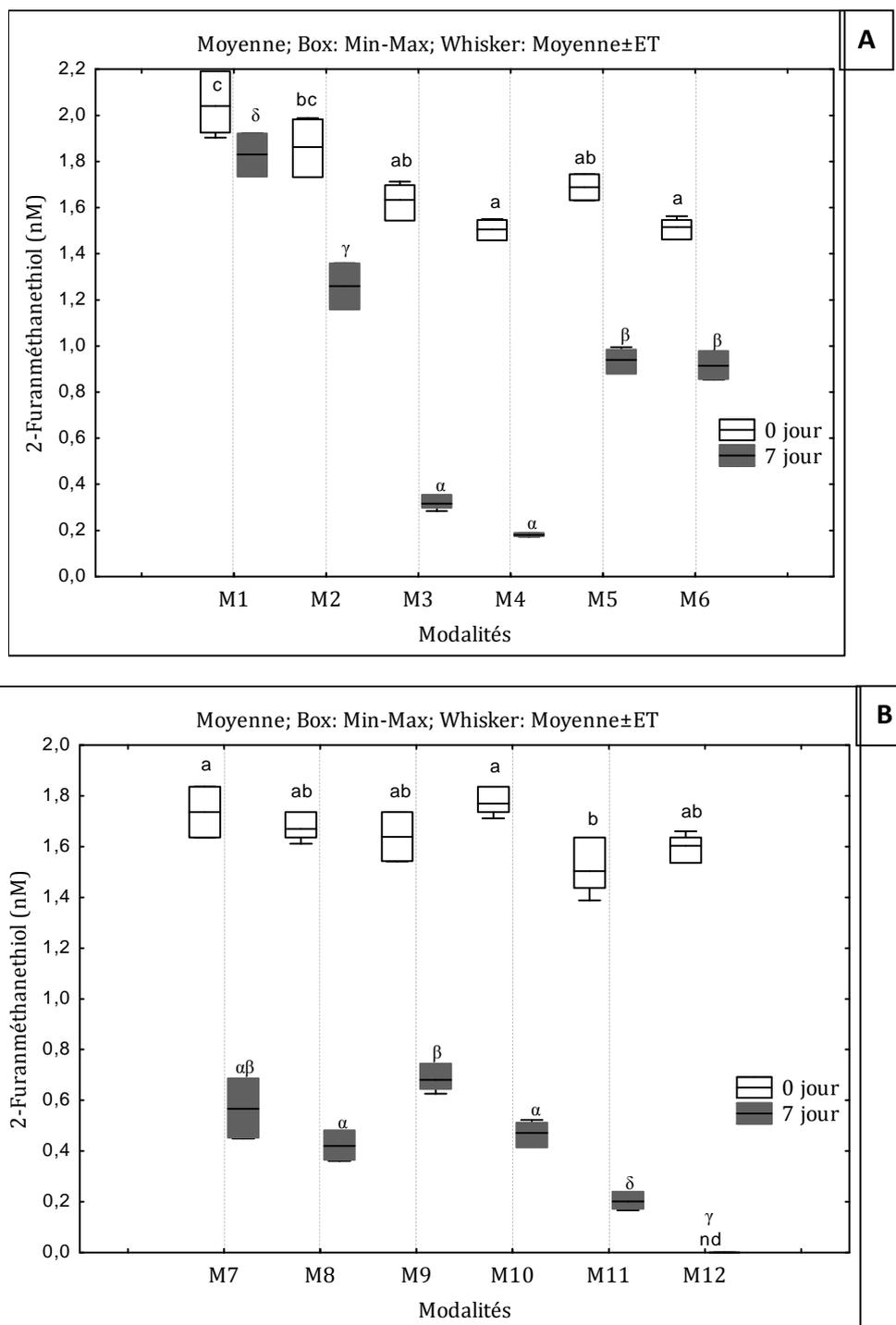


Figure 37. Réactivité du 2-furanméthanethiol avec la (-)-épicatéchine. Incidence de la présence d'oxygène et du dioxyde de soufre. Les valeurs désignées par des lettres différentes, pour les diverses modalités, au niveau de chaque point du temps, indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (Test Tukey, $p \leq 0,05$). Un alphabet différent est utilisé pour chaque temps de prélèvement. **(A)** M1 (2FMT), M2 (4MSP + O₂), M3 (2FMT + (-)-épicatéchine), M4 [2FMT + (-)-épicatéchine + O₂], M5 [2FMT + (-)-épicatéchine + SO₂], M6 [2FMT + (-)-épicatéchine + SO₂ + O₂], **(B)** M7 (2FMT + Fe³⁺), M8 (2FMT + Fe³⁺ + O₂), M9 [2FMT + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂], M10 [2FMT + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂ + O₂], M11 [2FMT + (-)-épicatéchine + Fe³⁺] et M12 [2FMT + (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + O₂]

3.4.2 INFLUENCE DE LA (-)-ÉPICATECHINE

La (-)-épicatéchine est plus réactive avec le **2FMT** que la (+)-catéchine (**Figure 37, A et B**). Dès le déclenchement de la réaction, l'ajout de la (-)-épicatéchine dans le milieu réactionnel provoque un effet matrice significatif au seuil de 5 %, indépendamment de la présence du dioxyde de soufre et d'oxygène. Cet effet matrice se traduit par une diminution de l'ordre de 0,3 nM de la teneur en **2FMT** dans les modalités M3 [**2FMT** + (-)-épicatéchine], M4 [**2FMT** + (-)-épicatéchine + O₂], M5 [**2FMT** + (-)-épicatéchine + SO₂] et M6 [**2FMT** + (-)-épicatéchine + SO₂ + O₂].

A $t_{\text{jour}7}$, la concentration du **2FMT** est réduite de l'ordre de 89 % par la (-)-épicatéchine M3 et M4 en présence ou en absence d'oxygène (**Figure 37, A**). L'action de la (-)-épicatéchine sur la dégradation du **2FMT** est 10 % plus importante que celle observée dans notre étude en présence de la (+)-catéchine.

Le dioxyde de soufre est donc incapable d'empêcher la dégradation du **2FMT** en présence de la (-)-épicatéchine, comme c'est le cas pour la (+)-catéchine : modalités M5 [**2FMT**+ (-)-épicatéchine + SO₂] et M6 [**2FMT**+ (-)-épicatéchine + SO₂ + O₂] (**Figure 37, A**). Cependant, l'étude réactionnelle en présence de **2FMT**/(-)-épicatéchine valide l'instabilité de ce thiol volatil, montrant qu'après 15 jours d'incubation le **2FMT** était totalement dégradé (non détectable) dans la matrice.

La présence du fer ferrique et de la (-)-épicatéchine (**Figure 37, B**) en combinaison avec la présence de traces d'oxygène dissous dans le milieu réactionnel, accélère la disparition du **2FMT**. En présence du fer, l'addition de l'oxygène dans la matrice, rend la (-)-épicatéchine très réactive vis-à-vis le **2FMT** ce qui produit une dégradation totale du **2FMT** à $t_{\text{jour}7}$. Cet effet met en évidence encore une fois l'importance des métaux sur le processus d'oxydation des polyphénols par l'intermédiaire de leur réactivité avec les thiols volatils.

En revanche, l'addition du dioxyde de soufre en présence de la (-)-épicatéchine, du fer et de l'oxygène dans la solution modèle, produit un effet antioxydant qui s'oppose à la diminution de la concentration du **2FMT**, à $t_{\text{jour}7}$. Le dioxyde de soufre sans oxygène, (**Figure 37, B**) [M9 (**2FMT**+ (-)-épicatéchine + Fe³⁺ + SO₂)], peut freiner la réactivité de la (-)-épicatéchine avec le **2FMT** en empêchant une diminution supplémentaire de l'ordre de 0,5 nM de la concentration du **2FMT**, comme cela est observé pour la modalité

M11 [**2FMT** + (-)-épicatéchine + Fe³⁺] privée de dioxyde de soufre. Par ailleurs, en milieu supplémenté en oxygène dissous, le dioxyde de soufre perd 29 % de sa capacité antioxydante vis-à-vis de la réaction de la (-)-épicatéchine avec le **2FMT** en présence de fer [M10 (**2FMT** + (+)-catéchine + Fe³⁺ + SO₂ + O₂)].

Notre étude portant sur la réactivité des flavan-3-ols avec le **2FMT** souligne ainsi l'importance de la compréhension des mécanismes impliqués dans la dégradation de ce thiol au cours d'élevage du vin afin de préserver sa contribution au "bouquet" aromatique.

3.5 CONCLUSION

Les études menées en solution modèle apportent de nouvelles données quant à la nature des mécanismes réactionnels impliquant divers thiols volatils des vins associés aux arômes variétaux (**3SH** et **4MSP**) et au bouquet de vieillissement (**2FMT**) avec deux monomères de flavonoïdes la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine, en présence d'oxygène, de traces de métaux (fer) et de dioxyde de soufre. Ces travaux ont permis d'établir une réactivité différente selon les thiols volatils vis à vis des formes oxydées de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine, d'une part, et d'autre part une oxydabilité différente et donc une réactivité différente selon le monomère de flavonoïdes considéré.

Nos résultats établissent clairement que la (+)-catéchine est moins réactive avec les thiols volatils que la (-)-épicatéchine. De plus, la grande oxydabilité de la (-)-épicatéchine est aussi démontrée. La (-)-épicatéchine peut facilement s'oxyder même en présence de traces d'oxygène présentes dans la solution modèle. A notre connaissance, ces mécanismes de réactivité entre plusieurs composés clés de l'arôme des vins et plusieurs types des flavonoïdes ne sont pas décrits dans la littérature.

De plus, notre étude illustre que le fer joue un rôle de catalyseur vis-à-vis des réactions entre les deux composés phénoliques et les thiols volatils. En effet, il favorise vraisemblablement la formation de quinones, composés capables de réagir par addition avec les thiols. Concernant le dioxyde de soufre, bien que ce composé présente des propriétés antioxydantes qui limitent la dégradation de thiols volatils, il semble perdre son efficacité antioxydante en présence de la (-)-épicatéchine, et dans une moindre mesure de la (+)-catéchine. Les interactions du dioxyde de soufre avec les composés

phénoliques et l'oxygène en présence de **3SH** seront approfondies dans le chapitre suivant.

En comparant la réactivité de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine avec le **3SH**, la **4MSP** et le **2FMT** en présence de fer, d'oxygène et de dioxyde de soufre, il est clair que la **4MSP** a une moindre affinité avec les quinones des flavan-3-ols étudiées [(+)-catéchine et (-)-épicatéchine]. Par conséquent, le **2FMT** et le **3SH** réagissent plus facilement avec ces monomères que la **4MSP**.

Nos résultats démontrent clairement que le **2FMT** est plus réactif que le **3SH** et la **4MSP**. La différence de réactivité peut s'expliquer par la nature chimique du composé odorant et en conséquence, par les propriétés nucléophiles de la molécule de chaque thiol volatil étudié. Le **2FMT** est un thiol primaire, tandis que le **3SH** est secondaire et la **4MSP** est un thiol tertiaire. Comme cela a déjà été documenté pour les thiols volatils du café (Charles-Bernard *et al.*, 2005), la constante de vitesse de réactivité des thiols augmente avec l'accroissement de la propriété nucléophile de la fonction thiol (SH) : primaire > secondaire > tertiaire. Ce classement de la réactivité est principalement attribué à l'effet stérique qui diminue du thiol primaire au thiol tertiaire.

4

Identification et cinétique de formation d'adduits entre thiol volatil et composés phénoliques

Le premier objectif de cette étude est d'élucider la nature des mécanismes impliqués dans la dégradation de thiols volatils tout au long de l'élaboration et du vieillissement des vins blancs. Dans la mesure où les principaux composés phénoliques du raisin et du vin blanc sont susceptibles d'être associés à ces mécanismes, il est important de caractériser les produits de la réaction entre les composés phénoliques du raisin et les thiols volatils clés de l'arôme des vins. La cinétique de formation de ces adduits en conditions d'oxydation chimique et enzymatique est aussi un paramètre majeur à intégrer. Aussi, dans notre étude, les produits réactionnels recherchés ont été principalement ceux impliquant les composés phénoliques majoritaires des raisins et vins blancs, à savoir l'acide caftarique, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, avec un thiol volatil odoriférant jouant un rôle clé, dans l'arôme de vins blancs ou rosés : le **3SH**.

Concrètement, dans le but de valider notre première hypothèse de formation d'adduits entre ces composés phénoliques et le **3SH**, il était d'abord nécessaire de les synthétiser. Cette synthèse a été envisagée entre les trois composés phénoliques majoritaires du vin blanc et le **3SH** en milieu aqueux, de composition proche du moût, en présence d'un extrait brut de polyphénoloxydase extraite du raisin (PPO) afin d'augmenter le rendement de la réaction. Cette synthèse a permis l'obtention des produits en quantité suffisante pour la caractérisation structurale par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et pour l'utilisation comme références chromatographiques.

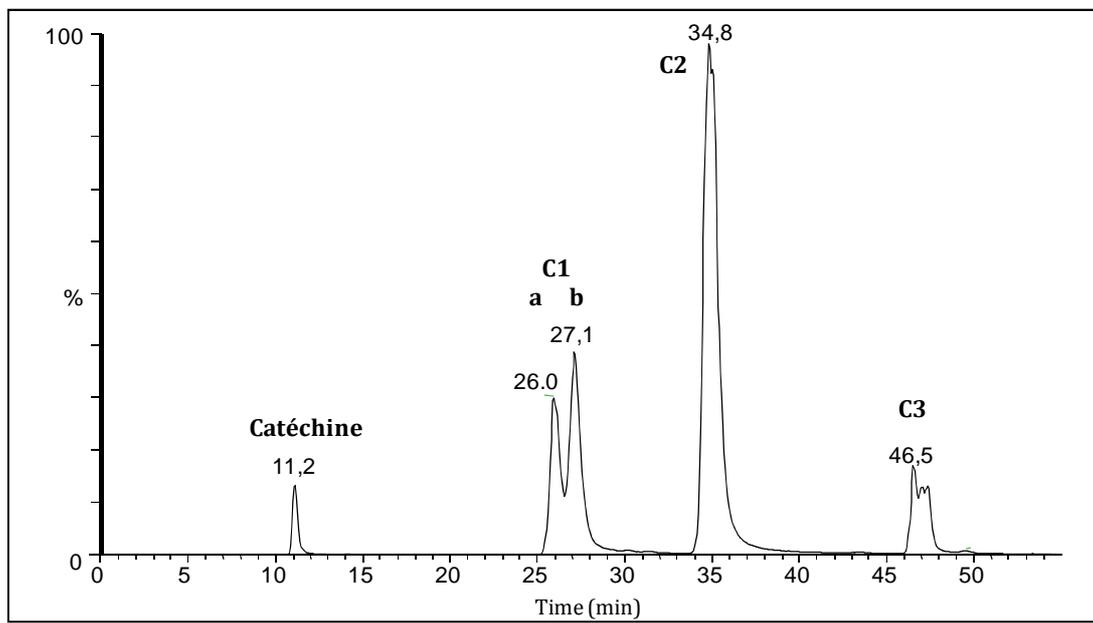


Figure 38. Chromatogramme des produits de synthèse après 20 heures d'incubation de la (+)-catéchine avec le **3SH**

Notre étude s'est poursuivie par le suivi de la cinétique de formation de ces adduits dans les conditions d'oxydation du moût et du vin, afin de pouvoir comprendre le mécanisme de leur formation dans les conditions de la vinification (en particulier au cours de la fermentation alcoolique) et au cours du vieillissement du vin. Le rôle des métaux et du dioxyde de soufre sur la formation de ces adduits a été également considéré. Ensuite, afin d'approfondir nos connaissances sur la formation d'adduits entre d'autres polyphénols minoritaires du moût et du vin et le **3SH**, nous avons conduit des recherches d'identification de ces derniers par CLHP-SM dans un jus de raisin supplémenté en **3SH**.

4.1 SYNTHÈSE DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (+)-CATECHINE EN MILIEU MODÈLE

4.1.1 CONDITIONS OPÉRATOIRES DE LA SYNTHÈSE DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (+)-CATECHINE

La synthèse des adduits entre le **3SH** et la (+)-catéchine est réalisée en milieu aqueux en présence d'un extrait brut de PPO issus de raisins noirs (10 g/L) et acidifié avec 5 g/L d'acide tartrique. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 3,5 par l'addition de soude (5M). La (+)-catéchine et le **3SH** préalablement solubilisés dans une solution éthanolique sont ensuite incorporés dans le milieu modèle. Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante (20°C) sous agitation (400 rpm). L'évolution de la réaction est suivie par CLHP-UV-SM (Méthode 7).

4.1.2 ANALYSE ET PURIFICATION DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (-)-CATECHINE

Après six heures d'incubation, la concentration en (+)-catéchine initialement ajoutée dans le milieu réactionnel a fortement diminué et trois nouveaux groupes de pics apparaissent bien séparés par la méthode CLHP analytique. Leurs temps de rétention chromatographiques sont les suivants : **C1** (**C1a** à 25,9 minutes et **C1b** à 27,1 min) **C2** à 34,8 minutes et **C3** à 46,4 minutes. Les pics apparaissent dans un rapport **C1a : C1b : C2 : C3** de 16 : 16 : 58 : 10 (**Figure 38**). Nous observons la consommation totale du substrat après 24 heures de réaction.

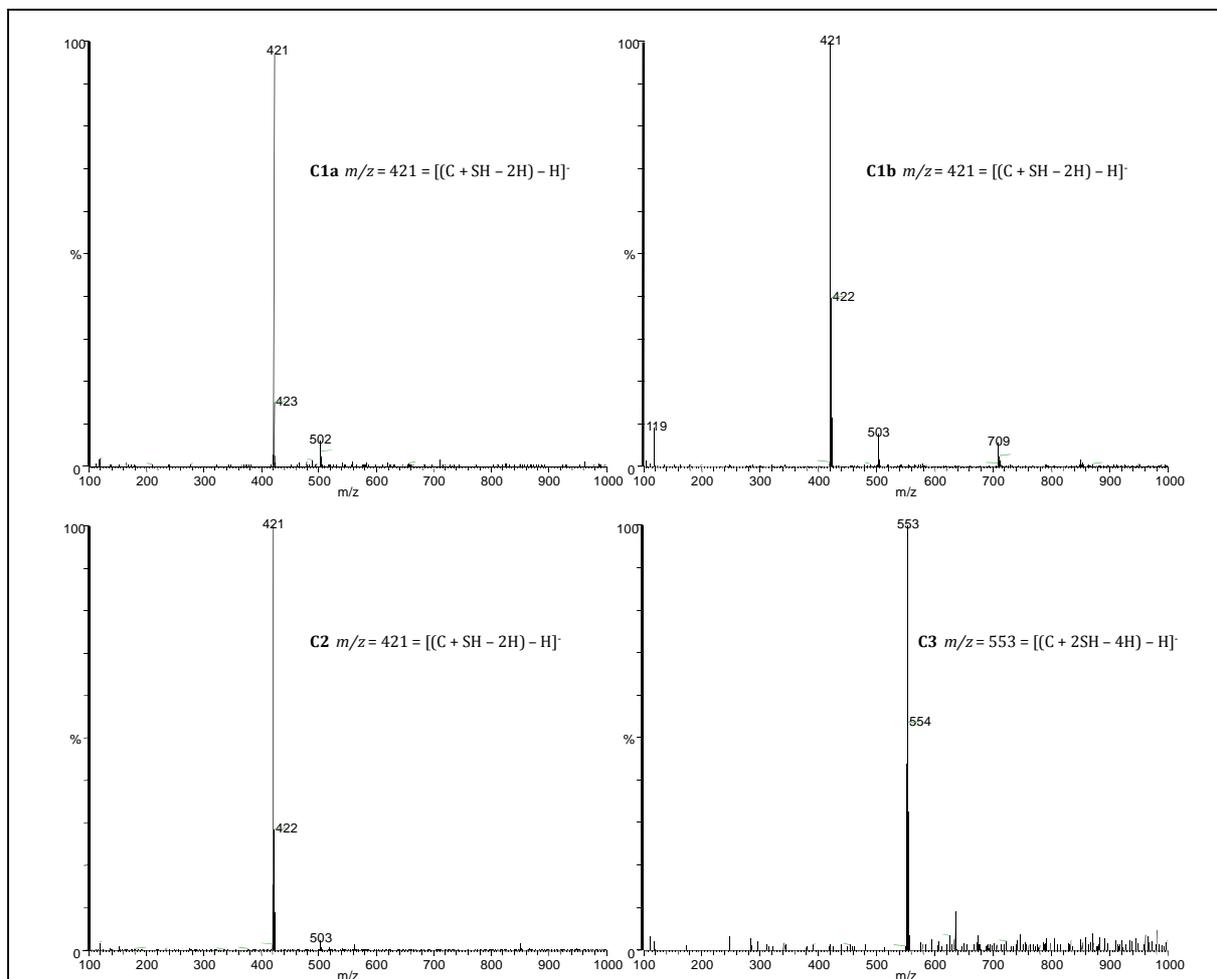


Figure 39. Spectre de masse en mode négatif et en Full Scan sur la gamme des masses 100-1000, des adduits **C1a**, **C1b**, **C2** et **C3** entre le **3SH** et la (+)-catéchine

Afin de purifier ces composés et éliminer le **3SH** en excès, le mélange réactionnel est lavé trois fois (v/v) avec du chloroforme. La phase aqueuse, préalablement filtrée sur du papier Whatman 1, est évaporée sous pression réduite. Le résidu brut ainsi obtenu est resolubilisé dans l'eau, puis congelé avant lyophilisation. Chacun des quatre principaux produits de la réaction **3SH**-catéchine, **C1a**, **C1b**, **C2** et **C3** est purifié par CLHP semi-préparative (Méthode 8). 2,7 g du mélange brut sont solubilisés dans 19 mL d'un mélange de solvant eau-méthanol (90 :10, v/v) afin d'être injecté en CLHP. Les produits **C1a**, **C1b**, **C2** et **C3** sont alors collectés séparément.

4.1.3 ANALYSES STRUCTURALES DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (+)-CATECHINE

4.1.3.1 Analyse par CLHP-ESI-SM des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (+)-catéchine

L'analyse structurale des adduits **C1a**, **C1b**, **C2** et **C3** débute par une analyse en CLHP-ESI-SM (Méthode 7) en mode négatif. Les conditions d'analyse permettent de déterminer la masse moléculaire des composés préalablement observés en CLHP analytique. Le mode d'analyse en ESI-SM permet de détecter les signaux correspondants aux ions pseudo-moléculaires $[M-H]^-$. Cependant cette analyse ne permet pas de différencier les stéréoisomères ou régio-isomères possibles.

Les structures hypothétiques des produits d'addition de la molécule de **3SH** sur la (+)-catéchine ont été formulées en se basant sur la réaction d'addition nucléophile de Michaël. Ainsi, certains adduits peuvent résulter d'une addition nucléophile du **3SH** sur le cycle B de la *o*-quinone de chaque (+)-catéchine. Par conséquent, leur poids moléculaire doit être en conformité avec la formule $[(x M + y M' - 2n)]$ où M et M' correspondent au poids moléculaire de chaque molécule intégrée dans la structure (g/mol) ; x et y sont le nombre de molécules intégrées dans la structure ; et n est le nombre de liaisons covalentes formées après réaction d'addition. L'analyse par CLHP-SM en mode négatif et en Full Scan (Courant Ionique Total) de chaque produit formé après la réaction de la (+)-catéchine et du **3SH** confirme que les produits **C1a**, **C1b**, **C2** et **C3** sont effectivement des adduits du **3SH** sur la (+)-catéchine selon l'addition de Michaël. Les adduits **C1a**, **C1b** et **C2** ont une masse moléculaire de 422 $[(1 \cdot PM_{\text{Catéchine}} + 1 \cdot PM_{\text{3SH}} - 2) = (1 \cdot 290 + 1 \cdot 134 - 2) = 422]$ (**Figure 39**). Cette masse correspond bien à

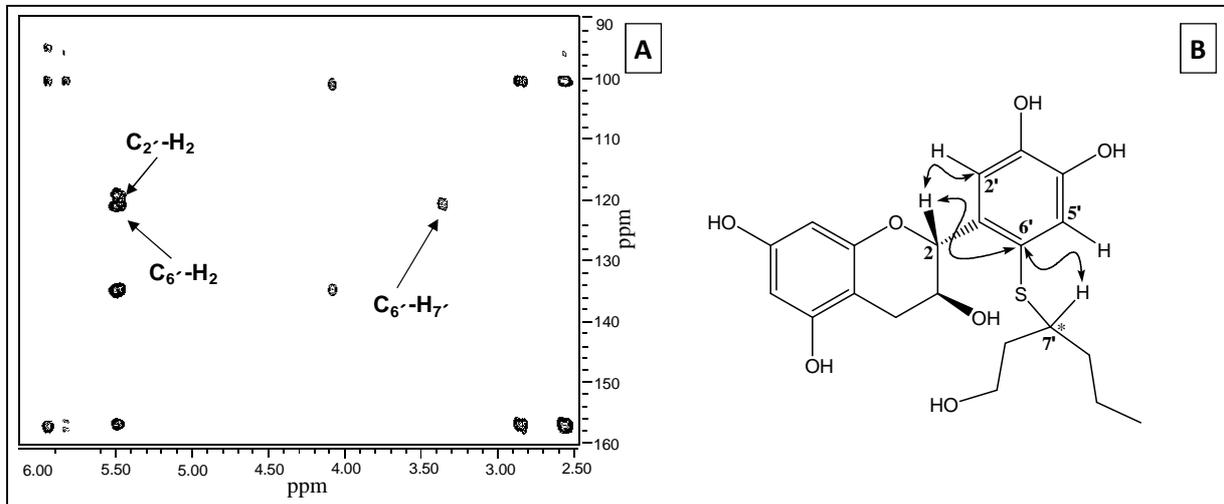


Figure 40. (A) Section de la carte HMBC de l'adduit 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C1a**), (B) structure de l'adduit **C1a** (les flèches représentent les principales corrélations proton-carbone à longue distance observées sur la carte HMBC)

l'addition nucléophile d'une molécule de **3SH** sur un site électrophile du cycle B de la *o*-quinone de la (+)-catéchine. La présence de trois différents pics chromatographiques représentant le même signal $m/z = 421$ peut être liée aux différentes additions intramoléculaires du **3SH** sur les trois carbones électrophiles (le C2', le C5' et le C6') disponibles du cycle B de la *o*-quinone de la (+)-catéchine. De plus, l'adduit **C3** a une masse moléculaire de 554 ($1 \cdot PM_{\text{Catéchine}} + 2 \cdot PM_{\text{3SH}} - 4$) = ($1 \cdot 290 + 2 \cdot 134 - 4$) = 554 (**Figure 39**). Cette masse correspond à l'addition de deux molécules de **3SH** sur la même molécule de la (+)-catéchine qui se trouve après oxydation sous la forme quinonique, résultant d'une attaque nucléophile du thiol.

4.1.3.2 Analyse par RMN des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (+)-catéchine

4.1.3.2.1 Analyse par RMN de l'adduit 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C1a**)

La structure du composé **C1a** est déterminée à partir des spectres RMN à une dimension (proton, carbone) et des cartes RMN à deux dimensions (HMQC et HMBC) ainsi que par comparaison avec les données spectrales déjà publiées. Le point clé dans cette détermination structurale est l'identification du centre de liaison entre l'unité **3SH** et la (+)-catéchine. Elle est effectuée à l'aide des corrélations proton-carbone à longue distance (**Figure 40**). Le spectre HMBC montre notamment une intense tache de corrélation entre le centre du proton H7' ($\delta_{\text{H}} 3,32$ ppm) de l'unité **3SH** et le carbone C6' ($\delta_{\text{C}} 121,4$ ppm) du cycle aromatique B de la (+)-catéchine. Ce dernier est identifié et assigné à l'aide de sa corrélation proton-carbone à longue distance avec le proton H2 ($\delta_{\text{H}} 5,50$ ppm) du cycle aromatique C de la (+)-catéchine, identifié grâce à son déplacement chimique très caractéristique. De plus, cette liaison est confirmée par la présence dans la région des protons aromatiques d'un important singlet intégrant deux protons, à $\delta_{\text{H}} 6,86$ ppm. Ce signal est attribué aux protons H2' et H5' du cycle aromatique B de la (+)-catéchine à l'aide des analyses à deux dimensions. Les autres protons et carbones appartenant à la chaîne aliphatique de l'unité **3SH** et de la (+)-épicatéchine sont assignés à l'aide des corrélations HMQC et HMBC.

En conclusion, cette étude RMN (1D/2D) permet de déterminer avec précision que le composé **C1a**, est l'adduit 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine, résultant de l'addition nucléophile du **3SH** sur le carbone C6' du cycle aromatique B de la (+)-catéchine par une liaison thioéther.

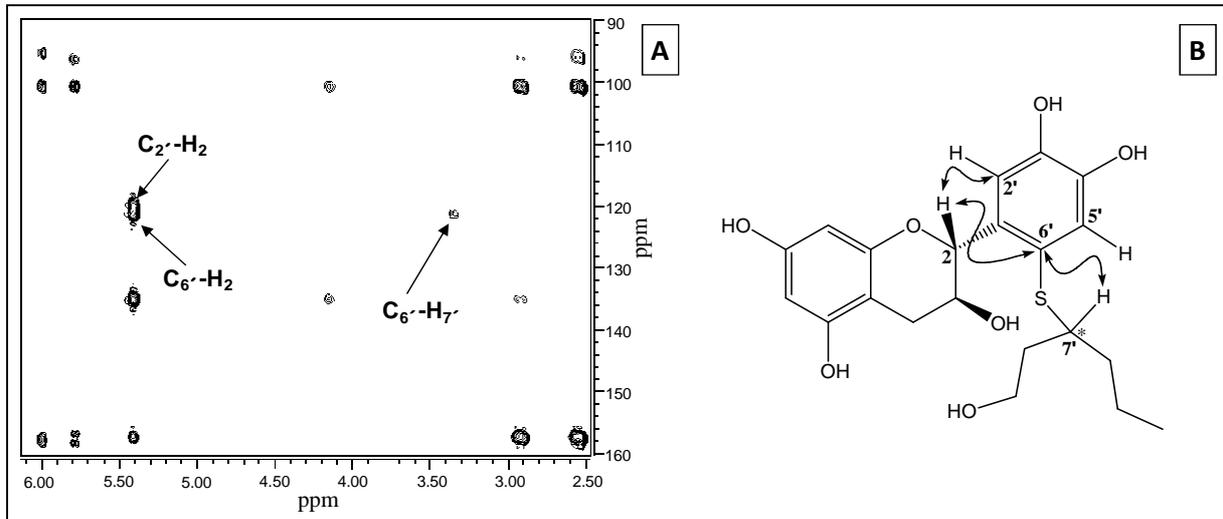


Figure 41. (A) Section de la carte HMBC de l'adduit 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (C1b), (B) structure de l'adduit C1b (les flèches représentent les principales corrélations proton-carbone à longue distance observées sur la carte HMBC)

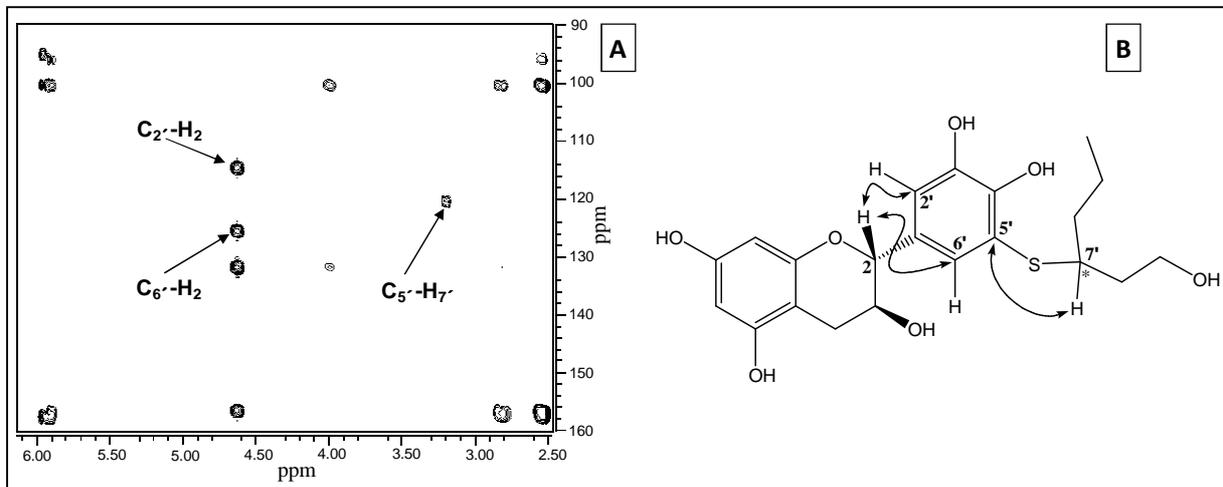


Figure 42. (A) Section de la carte HMBC de l'adduit 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (C2), (B) structure de l'adduit C2 (les flèches représentent les principales corrélations proton-carbone à longue distance observées sur la carte HMBC)

4.1.3.2.2 Analyse par RMN de l'adduit 6'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C1b**)

Les spectres RMN à une dimension (proton, carbone) et les cartes RMN à deux dimensions (HMQC et HMBC) du composé **C1b** sont très proches de ceux du composé **C1a**. L'identification du centre de liaison entre l'unité **3SH** et la (+)-catéchine s'effectue à l'aide des mêmes corrélations proton-carbone à longue distance que pour le composé **C1a** (Figure 41). Le spectre HMBC de **C1b** montre une intense tache de corrélation entre le centre du proton H7' (δ_H 3,36 ppm) de l'unité **3SH** et le carbone C6' (δ_C 120,8 ppm) du cycle aromatique B de la (+)-catéchine, qui lui-même est assigné à l'aide de sa corrélation proton-carbone à longue distance avec le proton H2 (δ_H 5,42 ppm) du cycle aromatique C de la (+)-catéchine. La liaison entre l'unité **3SH** et la (+)-catéchine est confirmée, comme pour **C1a**, par la présence dans la région des protons aromatiques d'un important singlet intégrant pour deux protons à δ_H 6,89 ppm. Ce signal est attribué aux protons H2' et H5' du cycle aromatique B de la (+)-catéchine à l'aide des analyses à deux dimensions. Les autres protons et carbones, appartenant à la chaîne aliphatique de l'unité **3SH** et de la (+)-catéchine sont assignés à l'aide des corrélations HMQC et HMBC.

En conclusion, cette étude RMN (1D/2D) permet de montrer que le composé **C1b** résulte de l'addition nucléophile du **3SH** sur le carbone C6' du cycle aromatique B de la (+)-catéchine par une liaison thioéther comme observé précédemment pour le composé **C1a**. Les deux composés **C1a** et **C1b** sont donc des diastéréoisomères présentant une stéréochimie différente au niveau du centre chiral C7'.

4.1.3.2.3 Analyse par RMN de l'adduit 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**C2**)

Les spectres RMN à une dimension (proton, carbone) du composé **C2** apparaissent comme plus complexes que ceux des composés **C1a** et **C1b**. Néanmoins, une analyse plus fine montre que cette apparente complexité résulte d'un simple dédoublement de la majorité des signaux. En fait, après assignation de tous les signaux observés sur les spectres protons et carbones à l'aide des analyses à deux dimensions (HMQC et HMBC), il apparaît que le composé **C2** est un mélange de deux diastéréoisomères dû au centre chiral en position C7'. Malgré la présence de ces deux diastéréoisomères en mélange, il a été possible de déterminer le centre de liaison entre l'unité **3SH** et la (+)-catéchine, grâce aux corrélations proton-carbone à longue distance (Figure 42). Sur le spectre HMBC, il est notamment possible d'observer une intense

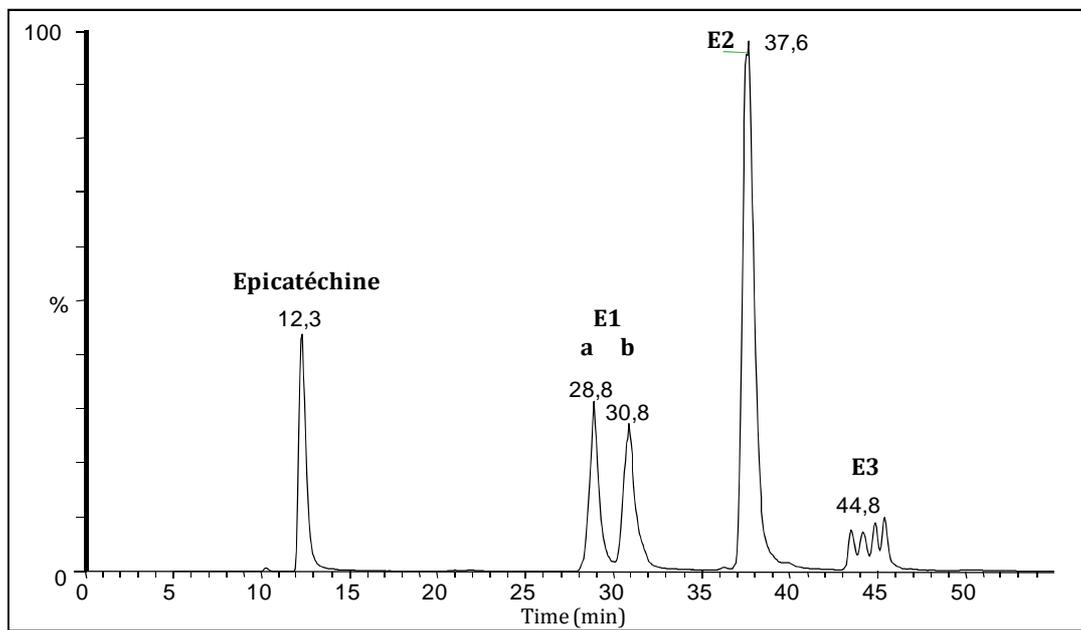


Figure 43. Chromatogramme en masse (TIC) des produits de synthèse après 28 heures d'incubation de la (-)-épicatéchine avec le **3SH**

corrélation entre le proton H7' (δ_H 3,18 ppm) de l'unité **3SH** et le carbone C5' (δ_C 120,6 ppm) du cycle aromatique B de la (+)-catéchine. De plus, la présence dans la région des protons aromatiques de deux doublets avec une constante de couplage faible, à δ_H 6,81 ($J = 1,67$ Hz) et 6,91 ($J = 1,67$ Hz) ppm caractéristique des protons H2' et H6' du cycle aromatique B de la (-)-catéchine, confirme l'absence de proton en C5'.

En conclusion, cette étude RMN (1D/2D) met en évidence que le composé **C2** est le mélange des deux diastéréoisomères de l'adduit 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine résultant de l'addition nucléophile du **3SH** sur le carbone C5' du cycle aromatique B de la (+)-catéchine par une liaison thioéther.

4.2 SYNTHÈSE DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (-)-EPICATECHINE EN MILIEU MODÈLE

4.2.1 CONDITIONS OPÉRATOIRES DE LA SYNTHÈSE DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (-)-EPICATECHINE

Le protocole mis en œuvre pour la synthèse des adduits entre la (-)-épicatéchine et le **3SH** est identique à celui utilisé précédemment avec la (+)-catéchine. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP-UV-SM (Méthode 10).

4.2.2 ANALYSE ET PURIFICATION DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (-)-EPICATECHINE

Le suivi de la formation des produits après la réaction de la (-)-épicatéchine avec le **3SH** sous conditions d'oxydation enzymatique (présence de la PPO) présente un profil chromatographique similaire à celui observé dans le cas de la réaction de la (+)-catéchine avec le **3SH**. Après 24 heures de réaction, la quantité de (-)-épicatéchine a diminué de 75 % alors que trois groupes de pics sont élus à 28,8 minutes pour le **E1a**, à 30,8 minutes pour le **E1b**, à 37,6 minutes pour le **E2** et à 44,8 pour le groupe **E3** (**Figure 43**). Ces produits apparaissent dans un rapport **E1a** : **E1b** : **E2** : **E3** de 16 : 16 : 58 : 10. Le rapport d'apparition de ces produits est identique à celui de la réaction de la (+)-catéchine avec le **3SH**. Cette similarité de profil chromatographique était prévisible car la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine sont deux stéréoisomères. La réaction de la

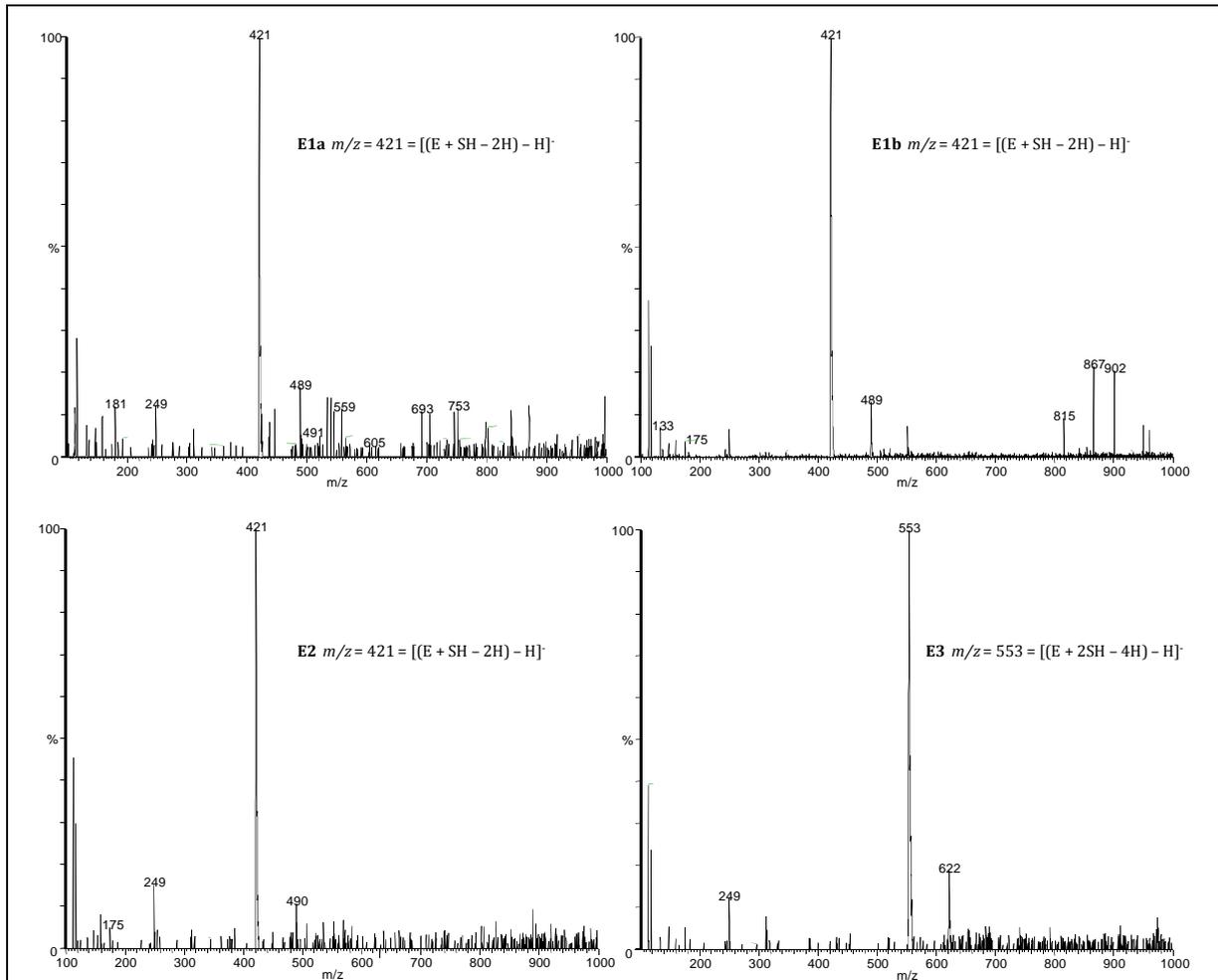


Figure 44. Spectre de masse en mode négatif et en Full Scan dans une gamme de masses 100-1000, des adduits **E1a**, **E1b**, **E2** et **E3** entre le **3SH** et la (-)-épicatechine

(-)-épicatéchine avec le **3SH** est incomplète contrairement à celle de la (+)-catéchine qui s'est trouvée totalement consommée. La réaction entre la (-)-épicatéchine et le **3SH** a été arrêtée après 28 heures d'incubation.

A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est purifié selon le protocole décrit dans le cas de la réaction de la (+)-catéchine avec le **3SH**. Les quatre nouveaux produits mis en évidence sont ensuite purifiés, séparés puis caractérisés par RMN.

La séparation des quatre principaux produits de la réaction **3SH**-épicatéchine (**E1a**, **E1b**, **E2** et **E3**) est effectuée par CLHP semi-préparative (Méthode 11). Des fractions de 3,2 g du mélange brut sont solubilisées, avant injection, dans 13 mL d'un mélange de solvants, eau et méthanol (90 :10, v/v). Les produits **E1a**, **E1b**, **E2** et **E3** sont alors collectés séparément.

4.2.3 ANALYSES STRUCTURALES DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET LA (-)-EPICATECHINE

4.2.3.1 Analyse par CLHP-ESI-SM des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (-)-épicatéchine

L'analyse structurale des quatre produits de la réaction de la (-)-épicatéchine avec le **3SH**, débute comme précédemment par une analyse en CLHP-ESI-SM (Méthode 10) en mode négatif. Cette analyse montre que les trois premiers produits de la réaction (**E1a**, **E1b** et **E2**) ont une masse moléculaire de 422 [(M-H)⁻ = 421] (**Figure 44**). Par conséquent, ces trois pics chromatographiques correspondent à des composés en conformité avec les produits d'addition nucléophile d'une molécule de **3SH** sur la forme oxydée (quinonique) de la (-)-épicatéchine. Le massif **E3** a une masse moléculaire de 554 [(M-H)⁻ = 553] (**Figure 44**). Cette masse correspond au produit d'addition des deux molécules de **3SH** sur la même molécule de (-)-épicatéchine oxydée. Par déduction, les adduits formés entre les monomères de flavan-3-ols étudiés [la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine] et le **3SH** ont une structure vraisemblablement très proche.

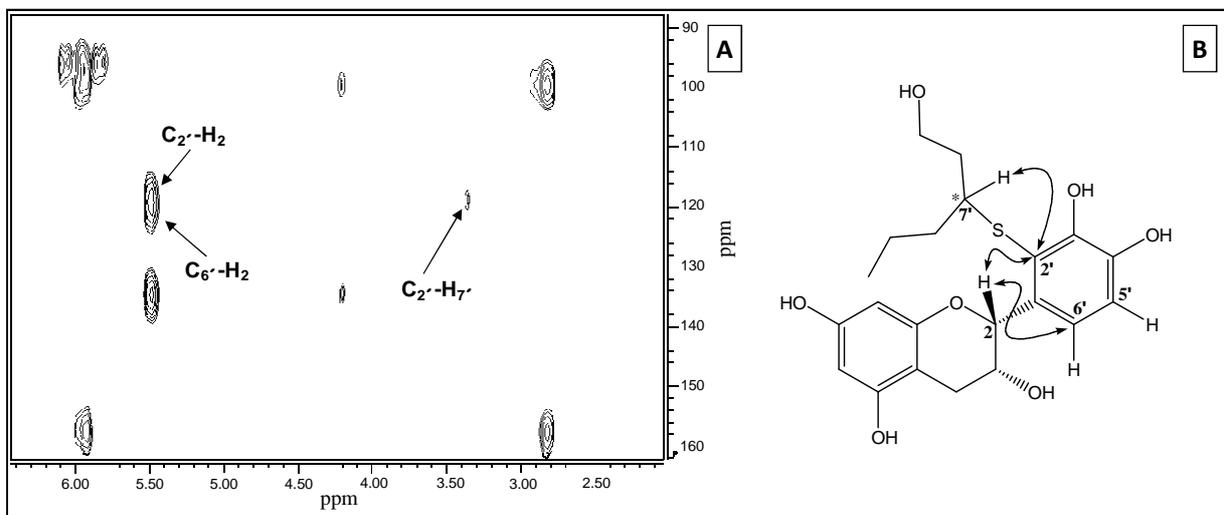


Figure 45. (A) Section de la carte HMBC de l'adduit 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (**E1a**), (B) structure de l'adduit **E1a** (les flèches représentent les principales corrélations proton-carbone à longue distance observées sur la carte HMBC)

4.2.3.2 Analyse par RMN des adduits entre le 3-sulfanylhexanol et la (-)-épicatéchine

4.2.3.2.1 Analyse par RMN de l'adduit 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (**E1a**)

La structure du composé **E1a** est déterminée à partir des spectres RMN à une dimension (proton, carbone) et des cartes RMN à deux dimensions (HMQC et HMBC) ainsi que par comparaison avec les données spectrales déjà publiées. La région aromatique du spectre RMN du proton, montre une paire de doublets ayant une constante de couplage faible, à δ_{H} 5,92 ($J = 2,10$ Hz) et 5,96 ($J = 2,10$ Hz) ppm. Ces deux doublets sont caractéristiques des protons H8 et H6 du cycle aromatique A de la (-)-épicatéchine. Cette région des aromatiques présente également deux doublets ayant une grande constante de couplage, à δ_{H} 6,86 ($J = 8,40$ Hz) et 7,16 ($J = 8,40$ Hz), caractéristiques des protons H5' et H6' du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine. De plus, la présence d'une corrélation entre ces deux protons sur le spectre COSY H-H indique qu'ils sont mutuellement couplés et donc adjacents. Par conséquent, ces deux signaux résultent bien des protons H5' et H6' du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine. En effet, la présence de ces deux protons aromatiques mutuellement couplés indique que le thioéther est connecté au carbone C2' du cycle aromatique B de l'unité de la (-)-épicatéchine. Ce centre de liaison entre l'unité **3SH** et la (-)-épicatéchine est également confirmé par la corrélation proton-carbone à longue distance (**Figure 45**) entre le H7' (δ_{H} 3,36) de l'unité **3SH** et le carbone C2' (δ_{C} 118,5 ppm) du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine. Le carbone C2' (δ_{C} 118,5 ppm) a lui-même été identifié et assigné à l'aide de ces corrélations proton-carbone à longue distance avec le proton H2 et le proton H6'. Les autres protons et carbones appartenant à la chaîne aliphatique de l'unité **3SH** et de la (-)-épicatéchine sont assignés à l'aide des corrélations HMQC et HMBC.

En conclusion, cette étude RMN (1D/2D) permet de déterminer avec précision que le composé **E1a** est l'adduit 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine, résultant de l'addition nucléophile du **3SH** sur le carbone C2' du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine par une liaison thioéther.

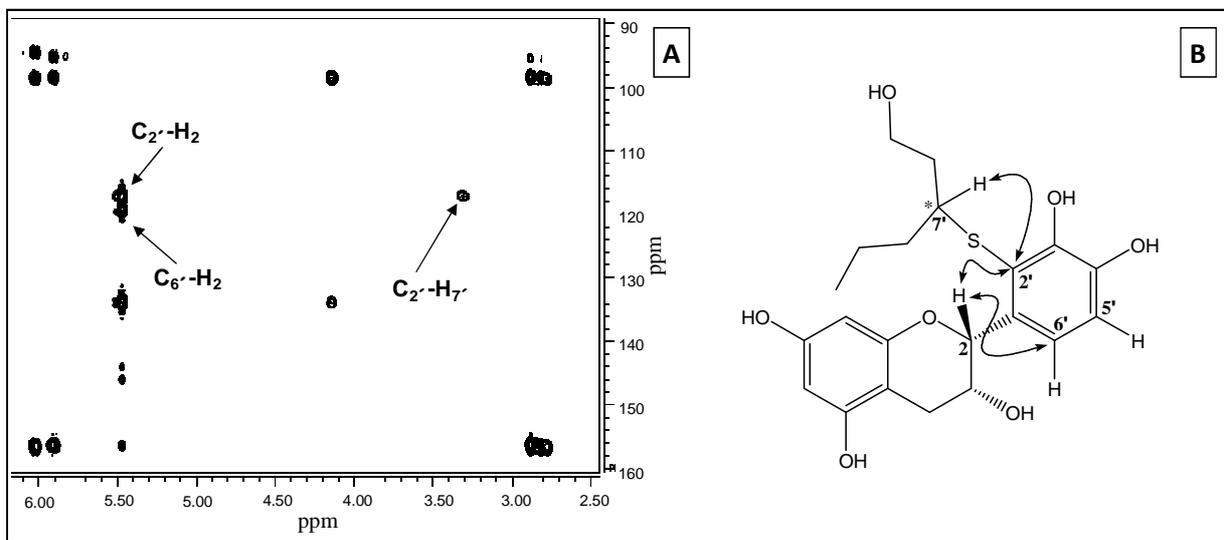


Figure 46. (A) Section de la carte HMBC de l'adduit 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatechine (**E1b**), (B) structure de l'adduit **E1b** (les flèches représentent les principales corrélations proton-carbone à longue distance observées sur la carte HMBC)

4.2.3.2.2 Analyse par RMN de l'adduit 2'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (E1b)

Les spectres RMN à une dimension (proton, carbone) et les cartes RMN à deux dimensions (HMQC et HMBC) du composé **E1b** s'avèrent être très proche de ceux du composé **E1a**. Une analyse plus fine du spectre proton, démontre que, comme dans le cas du composé **E1a**, le composé **E1b** présente, dans sa région aromatique, une paire de doublets avec une constante de couplage faible à δ_H 5,89 ($J = 2,33$ Hz) et 6,01 ($J = 2,33$ Hz) ppm caractéristique des protons H8 et H6 du cycle aromatique A de la (-)-épicatéchine. De plus, toujours dans cette même région du spectre proton, la présence de deux doublets mutuellement couplés caractéristiques des protons H5' et H6' du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine à δ_H 6,88 ($J = 8,36$ Hz) et 7,13 ($J = 8,36$ Hz) est également observée. Par conséquent, comme dans le cas du composé **E1a**, la présence de ces deux protons aromatiques mutuellement couplés, indique que le thioéther est connecté au carbone C2' du cycle aromatique B de l'unité de la (-)-épicatéchine. De plus, le centre de liaison entre l'unité **3SH** et la (-)-épicatéchine est également confirmé par la corrélation proton-carbone à longue distance (**Figure 46**) entre le H7' (δ_H 3,30) de l'unité **3SH** et le carbone C2' (δ_C 117,9 ppm) du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine, lui-même identifié grâce à ses corrélations proton-carbone à longue distance avec les protons H2 et H6'.

En conclusion, cette étude RMN (1D/2D) démontre que le composé **E1b** résulte de l'addition nucléophile du **3SH** sur le carbone C2' du cycle aromatique B de l'(-)-épicatéchine par une liaison thioéther comme le composé **E1a**. Les composés **E1a** et **E1b** sont donc des diastéréoisomères présentant une stéréochimie différente au niveau du carbone C7'. La formation de ces deux diastéréoisomères était attendue puisque le **3SH** utilisé pour la synthèse est sous forme racémique.

4.2.3.2.3 Analyse par RMN de l'adduit 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (E2)

Les spectres RMN à une dimension (proton, carbone) du composé **E2** apparaissent comme plus complexe que ceux des composés **E1a** et **E1b**. Néanmoins, une analyse plus fine démontre que cette apparente complexité résulte du dédoublement d'un très grand nombre de signaux et notamment des signaux provenant des protons et des carbones proches du centre chiral C7'. En fait, après assignation de tous les signaux

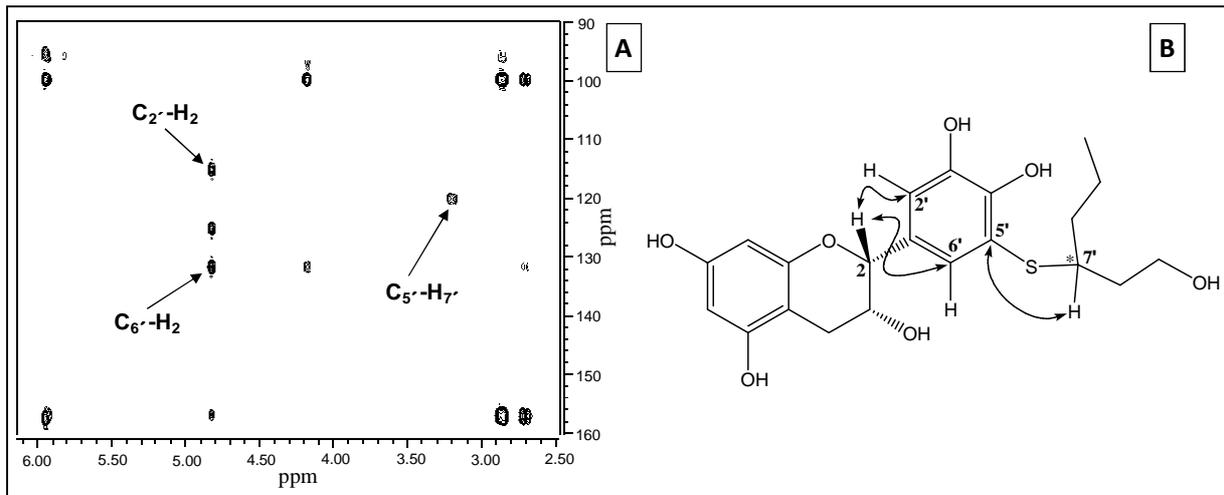


Figure 47. (A) Section de la carte HMBC de l'adduit 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine (**E2**), (B) structure de l'adduit **E2** (les flèches représentent les principales corrélations proton-carbone à longue distance observées sur la carte HMBC)

observés sur les spectres protons et carbones à l'aide des cartes RMN à deux dimensions (HMQC et HMBC), il apparaît que le composé **E2** n'est pas pur mais que c'est un mélange de deux diastéréoisomères dû au centre chiral en position C7'. Malgré la présence de ces deux diastéréoisomères en mélange, il est possible de déterminer le centre de liaison entre l'unité **3SH** et la (-)-épicatéchine, grâce aux corrélations proton-carbone à longue distance (**Figure 47**). Sur le spectre HMBC, il est notamment possible d'observer une intense corrélation entre le proton H7' (δ_{H} 3,20 ppm) de l'unité **3SH** et le carbone C5' (δ_{C} 120,3 ppm) du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine. Ce dernier est lui-même identifié et assigné à l'aide de sa corrélation proton-carbone à longue distance avec le proton H6' (δ_{H} 7,01 ppm). De plus, la présence dans la région des protons aromatiques de deux doublets avec une constante de couplage faible, à δ_{H} 6,95 ($J = 2,15$ Hz) et 7,01 ($J = 2,15$ Hz) ppm caractéristique des protons H2' et H6' du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine, confirme l'absence de proton en C5'.

En conclusion, cette étude RMN (1D/2D) démontre que le composé **E2** est présent en mélange épimérique des deux diastéréoisomères de l'adduit 5'-(7'-sulfanylhexanol)-(-)-épicatéchine résultant de l'addition nucléophile du **3SH** sur le carbone C5' du cycle aromatique B de la (-)-épicatéchine par une liaison thioéther.

4.3 SYNTHÈSE DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET L'ACIDE CAFTARIQUE EN MILIEU MODÈLE

4.3.1 CONDITIONS OPÉRATOIRES DE LA SYNTHÈSE DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET L'ACIDE CAFTARIQUE

Le protocole utilisé pour la synthèse des adduits entre le **3SH** et l'acide caftarique est identique à celui utilisé précédemment pour la synthèse des adduits entre les monomères des flavan-3-ols et le **3SH**. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP-UV-SM (Méthode 7).

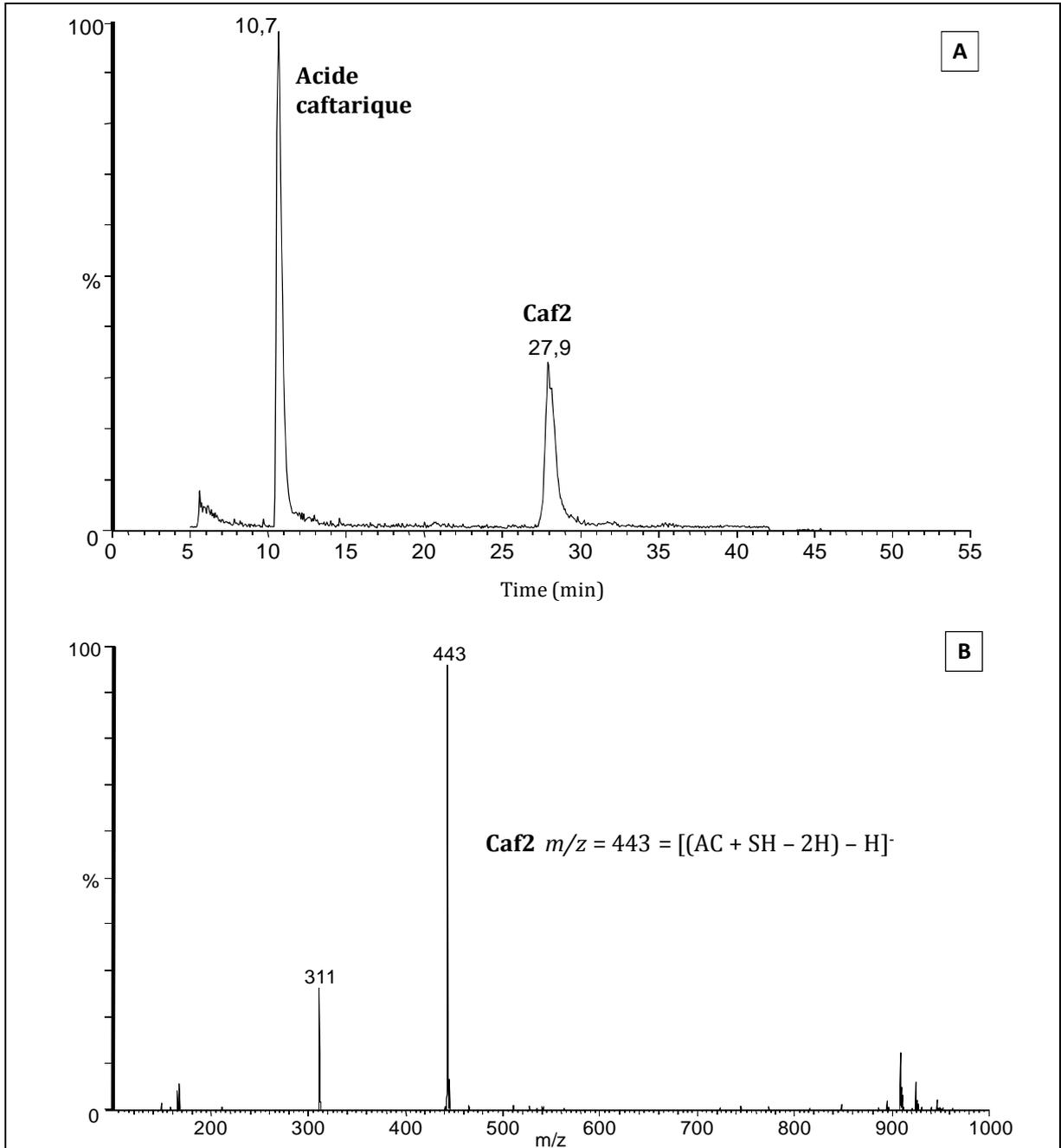


Figure 48. (A) Chromatogramme de masse du produit de synthèse après la réaction de l'acide caftarique avec le **3SH (Caf2)** à six heures d'incubation. **(B)** Spectre de masse en mode négatif et en Full Scan sur la gamme des masses 100-1000 de l'adduit **Caf2**

4.3.2 ANALYSE ET PURIFICATION DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET L'ACIDE CAFTARIQUE

Après une heure de réaction, la quantité initialement ajoutée d'acide caftarique a diminué de moitié alors qu'un nouveau produit (**Caf2**) élué à 28,6 minutes se forme (**Figure 48, A**). La disparition de l'acide caftarique est totale après 10 heures d'incubation. Le produit formé est moins polaire que l'acide caftarique. Ce produit est ensuite purifié pour éliminer l'acide caftarique résiduel, l'excès de **3SH**, mais aussi les impuretés apportées par l'enzyme.

Cette purification s'effectue en deux étapes. La première inclut une extraction liquide-liquide au chloroforme pour éliminer le **3SH** résiduel. La seconde étape implique la séparation du produit réactionnel par CLHP semi-préparative (**Figure 48, A**) (Méthode 12).

4.3.3 ANALYSES STRUCTURALES DES ADDUITS ENTRE LE 3-SULFANYLHEXANOL ET L'ACIDE CAFTARIQUE

4.3.3.1 Analyse par CLHP-ESI-SM de l'adduit entre le 3-sulfanylhéxanol et l'acide caftarique

L'étude structurale du produit unique de la réaction de l'acide caftarique avec le **3SH**, nommé **Caf2**, débute par une analyse en CLHP-ESI-SM (Méthode 7) en mode négatif. Cette analyse démontre que le produit de la réaction entre l'acide caftarique et le **3SH** a une masse moléculaire de 444 $[(M-H)^- = 443]$ (**Figure 48, B**). Cette masse correspond à l'adduit formé par l'addition d'une molécule de **3SH** sur la *o*-quinone de l'acide caftarique, confirmé par la présence d'un fragment de masse 311 correspondant à l'acide caftarique.

4.3.3.2 Analyse par RMN de l'adduit acide 2'-(3''-sulfanylhéxanol)-caftarique (**Caf2**)

De nombreux signaux des spectres RMN à une dimension (proton, carbone) du composé **Caf2** sont dédoublés. Néanmoins, après assignation de tous les signaux observés sur les spectres protons et carbones à l'aide des cartes RMN à deux dimensions (HMOC et HMBC), il apparaît que le composé **Caf2** est un mélange de deux diastéréoisomères dû au centre chiral en position C3'' comme observé précédemment pour les composés **C2** et **E2**. Malgré la présence de ces deux diastéréoisomères, il a été

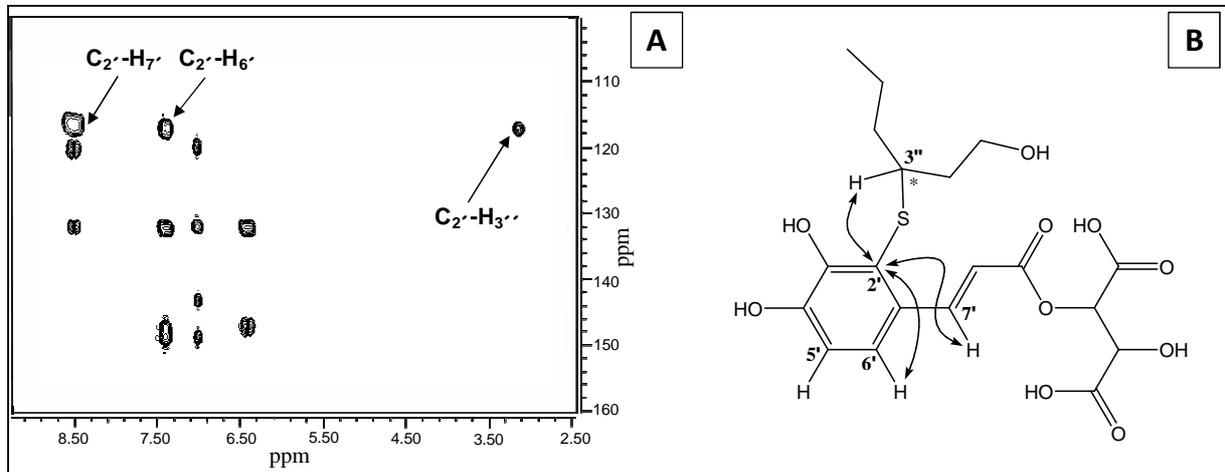


Figure 49. (A) Section de la carte HMBC de l'adduit acide 2'-(3''-sulfanylhexanol)-caftarique (**Caf2**), (B) structure de l'adduit **Caf2** (les flèches représentent les principales corrélations proton-carbone à longue distance observées sur la carte HMBC).

possible de déterminer le centre de liaison entre l'unité **3SH** et l'acide caftarique grâce aux signaux caractéristiques des protons aromatiques H5' et H6' et aux corrélations proton-carbone à longue distance (**Figure 49**). La région aromatique du spectre RMN du proton présente notamment deux doublets avec une grande constante de couplage à δ_H 6,95 ($J = 8,32$ Hz) et 7,38 ($J = 8,32$ Hz) caractéristiques des protons H5' et H6' du cycle aromatique de l'acide caftarique. De plus, la présence d'une corrélation entre ces deux protons sur le spectre COSY H-H indique qu'ils sont mutuellement couplés et donc adjacents ce qui confirme que ces deux signaux résultent bien des protons H5' et H6' du cycle aromatique de l'acide caftarique. Par conséquent, la présence de ces deux protons aromatiques mutuellement couplés et l'absence d'un signal attribuable au proton H2' indiquent que le thioéther est connecté au carbone C2' du cycle aromatique de l'acide caftarique. Ce centre de liaison entre l'unité **3SH** et l'acide caftarique est également confirmé par la corrélation proton-carbone à longue distance (**Figure 49**) entre le proton H3'' (δ_H 3,15) de l'unité **3SH** et le carbone C2' (δ_C 117,1 ppm) du cycle aromatique de l'acide caftarique. Le carbone C2' a lui-même été identifié et assigné à l'aide de ces corrélations proton-carbone à longue distance avec le proton aromatique H6' (δ_H 7,38) et le proton éthylénique H7' (δ_H 8,47). Les autres protons et carbones appartenant à la chaîne aliphatique de l'unité **3SH** et de l'acide caftarique ont été assignés à l'aide des corrélations HMQC et HMBC.

En conclusion, cette étude RMN (1D/2D) montre que le composé **Caf2** correspond au mélange des deux diastéréoisomères de l'acide 2'-(3''-sulfanylhexanol)-caftarique, résultant de l'addition nucléophile du **3SH** sur le carbone C2' du cycle aromatique de l'acide caftarique par une liaison thioéther.

4.4 CINÉTIQUES DE FORMATION DES ADDUITS ENTRE LES THIOLS VOLATILS ET LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Suite à la caractérisation structurale des adduits entre le **3SH** et la (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et acide caftarique, la cinétique de formation de ces adduits en conditions d'oxydation enzymatique et chimique a été étudiée. Pour cette étude, nous considérons les diastéréoisomères **C1a** et **C1b** et **E1a** et **E1b** en tant qu'unités respectivement appelées **C1** et **E1**.

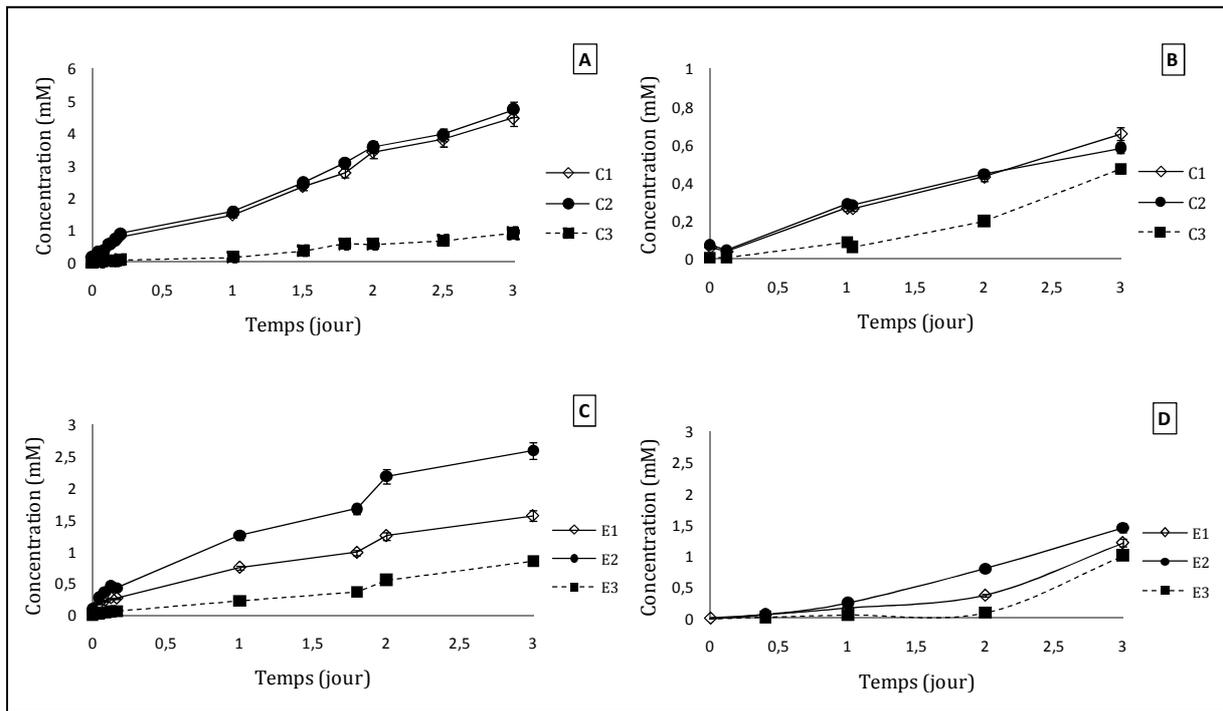


Figure 50. Cinétique de formation des adduits entre le 3SH et les monomères de flavan-3-ols [(+)-catéchine et (-)-épicatéchine] en conditions d'oxydation enzymatique. Incidence de la présence du dioxyde de soufre. Cinétique de formation des adduits **(A) C1, C2 et C3** en présence de la PPO, **(B) C1, C2 et C3** en présence de la PPO et du dioxyde de soufre, **(C) E1, E2 et E3** en présence de la PPO et **(D) E1, E2 et E3** en présence de la PPO et du dioxyde de soufre

4.4.1 FORMATION DES ADDUITS DE LA (+)-CATECHINE, DE LA (-)-EPICATECHINE, DE L'ACIDE CAFTARIQUE AVEC LE 3-SULFANYLHEXANOL EN CONDITIONS D'OXYDATION ENZYMATIQUE.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'addition du **3SH** sur la (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et acide caftarique, les cinétiques de formation des adduits précédemment caractérisés par SM et RMN sont suivis par CLHP-UV (Méthodes 6 et 9). La formation d'adduits implique, dans un premier temps, la production de *o*-quinones de la (+)-catéchine, (-)-épicatéchine ou acide caftarique par oxydation enzymatique catalysée par l'extrait brut de PPO, suivie d'une 1,4-addition du **3SH** sur le cycle benzoïque du polyphénol oxydé, créant ainsi un thioéther.

4.4.1.1 Conditions expérimentales

Le suivi cinétique des formations des adduits entre les trois substrats polyphénoliques [(+)-catéchine, (-)-épicatéchine et acide caftarique] (9 mM) avec le **3SH** (12 mM) est réalisé en milieu aqueux, acidifié à pH 3,5 (5 g/L acide tartrique) en présence (PPO, 10 mg/mL) ou non de dioxyde de soufre (50 mg/L). Les modalités sont préparées en duplicata. Les modalités sont incubées à 35°C et à l'abri de la lumière pendant trois jours. Des prélèvements réguliers, toutes les heures pendant 12 heures puis toutes les six heures, sont effectués pour suivre la formation des différents adduits dans le milieu réactionnel.

4.4.1.2 Formation des adduits en présence de polyphénoloxydase

En présence de PPO et de concentration identique en **3SH** (9 mM), (**Figure 50** et **Figure 51**), le rendement de la réaction d'addition du **3SH** sur la (+)-catéchine (10,6 mM, **Figure 50, A**) est bien supérieur à celui de l'acide caftarique (5 mM, **Figure 51**) et de la (-)-épicatéchine (5 mM, **Figure 50, C**).

Après trois jours d'incubation en présence de la PPO, le niveau de consommation de l'acide caftarique atteint 68,8 % de sa concentration initiale (**Figure 52**), ce qui est en accord avec d'autres travaux (Cheynier *et al.*, 1989a). Ce taux de consommation est bien supérieur à celui de la (+)-catéchine (59 %) et de la (-)-épicatéchine (23 %). Même si l'acide caftarique semble être un substrat primaire de la PPO contrairement aux deux autres, son taux d'oxydation n'est pas corrélé avec la production de l'adduit **Caf2**. Les *o*-quinones de l'acide caftarique semblent avoir une faible affinité pour le **3SH**. Ce

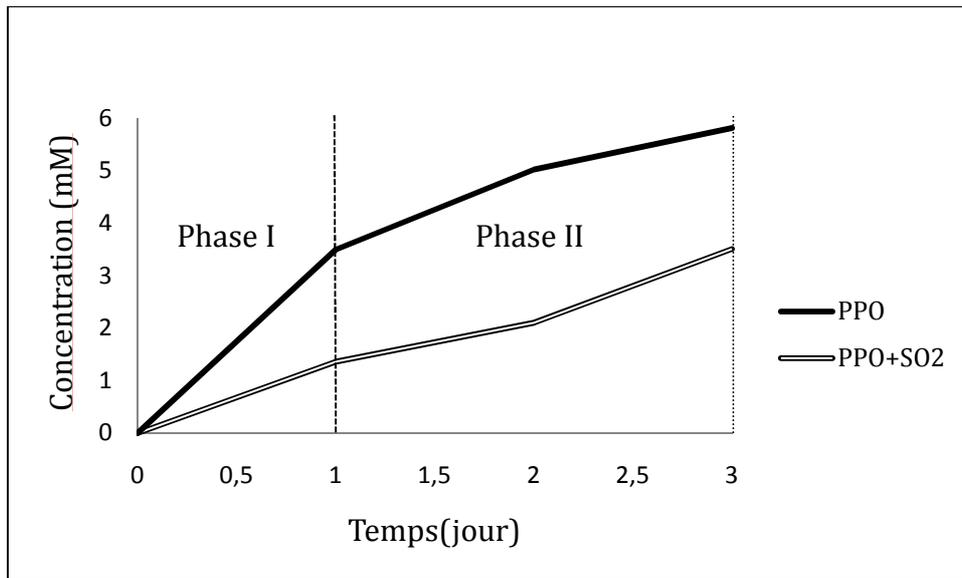


Figure 51. Cinétique de formation de l'adduit Caf2, entre le 3SH et l'acide caftarique, en conditions d'oxydation enzymatique (PPO), en présence (PPO) ou non de dioxyde de soufre (PPO + SO₂) (50 mg/L)

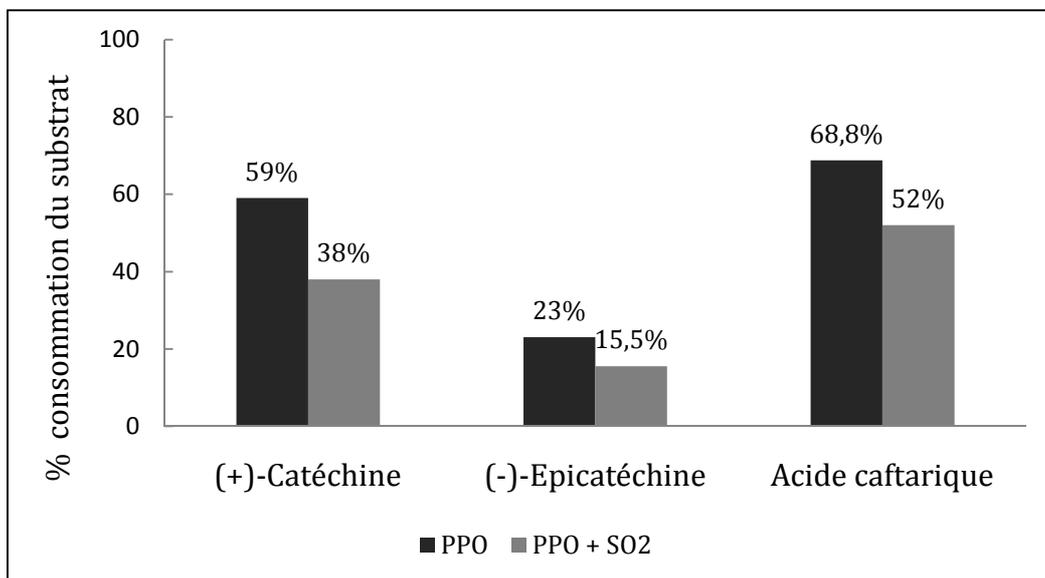


Figure 52. Pourcentage de consommation du substrat polyphénolique [(+)-catéchine, (-)-épicatéchine et acide caftarique] au cours de la formation des adduits avec le 3SH dans des conditions d'oxydation enzymatique en présence (PPO) ou non de 50 mg/L dioxyde de soufre (PPO + SO₂)

résultat pourrait indiquer que chaque *o*-quinone de l'acide caftarique générée par la PPO peut aussi réagir rapidement par réaction radicalaire avec une autre hydroquinone pour donner un produit de condensation (Singleton, 1987). La caractérisation d'autres adduits liés à la formation de produits d'oxydation de l'acide caftarique ou de la (+)-catéchine voire de la (-)-épicatéchine, est située en dehors de notre démarche expérimentale. Néanmoins, nous n'avons pas noté dans les chromatogrammes de pics présentant une abondance significative, après ajout de 3SH qui auraient pu traduire la présence d'adduits constitués par des dimères ou polymères d'acide caftarique ou de flavan-3-ols avec le **3SH**. Dans tous les cas, notre résultat met en évidence qu'en conditions d'oxydation enzymatique, la (+)-catéchine joue un rôle important sur la dégradation du **3SH**.

Pour les trois composés phénoliques étudiés, aucune phase de latence n'est observée lors de la formation des différents adduits polyphénol-thiol (**Figure 50** et **Figure 51**). L'addition du **3SH** à la fois sur la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine suit une régression linéaire. En revanche, la cinétique de formation de l'adduit **Caf2** peut être divisée en deux phases réactionnelles (**Figure 51**). La première inclut la période de t_{jour0} à t_{jour1} , au cours de laquelle la vitesse de formation du **Caf2** est très élevée, atteignant jusqu'à 80 % de son rendement total. La seconde phase (de t_{jour1} à t_{jour3}) est caractérisée par une vitesse de formation du **Caf2** deux fois moins rapide. Dans les deux cas (phase I et II, **Figure 51**), une régression linéaire peut être appliquée.

Le suivi par CLHP-UV de l'évolution des réactions d'addition du **3SH** sur les deux monomères des flavan-3-ols démontre que la production des simples ou doubles adduits entre la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et le **3SH** suit une cinétique similaire. La substitution nucléophile du **3SH** sur le cycle B de l'unité de la (+)-catéchine est quasiment identique pour les positions 5' et 6'. La position 5' du cycle B de la (-)-épicatéchine, est plus favorable à l'addition du **3SH** (**E2** 2,59 mM) que la position 2' (**E1** 1,55 mM). Selon la littérature (Cheynier *et al.*, 1986), la position 2' est doublement activée par la délocalisation d'un électron de la chaîne carbonylée latérale et par la présence d'oxygène sur le cycle benzoïque. Par contre, l'activation pour les positions 5' ou 6' est uniquement induite par la migration des électrons vers l'oxygène du cycle benzoïque. Le taux de formation du **Caf2** est légèrement supérieur à celui du **C2** et deux fois plus élevé que celui du **E2**.

Dans les modalités où les flavan-3-ols sont incubés avec le **3SH**, nous observons que la substitution du thiol peut être multiple permettant ainsi l'apparition des doubles adduits **C3** et **E3**. Le rendement de la réaction de formation de **C3** et **E3** est identique après trois jours d'incubation (**Figure 50**).

La présence d'adduits **C3** et **E3** apporte la preuve de mécanismes de réaction d'oxydation couplée présente dans le milieu réactionnel. Le **C3** et le **E3** se forment ainsi après réaction d'addition d'une deuxième molécule de **3SH** sur l'*o*-quinone des mono adduits **C1**, **C2** et **E1**, **E2**. Par conséquent, **C1**, **C2**, **E1** et **E2** sont des substrats de la PPO. L'absence d'adduit résultant d'une substitution multiple du **3SH** dans le cas de l'acide caftarique, met en évidence que le **Caf2** n'est pas un substrat de la PPO comme il a été déjà mentionné pour l'acide 2-*S*-glutathionylcaftaric (**GRP**) (Singleton *et al.*, 1985).

4.4.1.3 Impact du dioxyde de soufre sur la formation des adduits

L'ajout du dioxyde de soufre dans le milieu réactionnel influence directement le rendement et la vitesse de production des différents adduits (**Figure 50, B et D, Figure 51**). En effet, le dioxyde de soufre en conditions d'oxydation enzymatique, présente un effet inhibiteur vis-à-vis de l'oxydation des polyphénols en réduisant les *o*-quinones en *o*-dihydroxyphénols et surtout en favorisant l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO. Par conséquent, en présence de dioxyde de soufre, la quantité des *o*-quinones produites est limitée.

Lorsque le dioxyde de soufre est introduit dans le milieu réactionnel avec le **3SH**, nous observons une diminution de la consommation des composés phénoliques (**Figure 52**). Par conséquent, le rendement et la vitesse de production des adduits diminuent de manière significative pour les trois composés phénoliques étudiés. L'incidence de la présence du dioxyde de soufre dans la matrice se traduit par une diminution de la formation des adduits de l'ordre de 84 % pour la modalité (+)-catéchine-**3SH**, de 40 % pour la modalité acide caftarique-**3SH** et seulement de 27 % pour la modalité (-)-épicatéchine-**3SH**.

De plus, la présence du dioxyde de soufre pour les modalités contenant des flavan-3-ols induit une phase de latence au début de la réaction dans les deux cas [(+)-catéchine-**3SH** et (-)-épicatéchine-**3SH**]. Après un jour d'incubation, les cinétiques de production des adduits entre la (-)-épicatéchine et le **3SH** d'une part, entre la

(+)-catéchine et le **3SH** d'autre part, suivent le modèle d'une régression linéaire (**Figure 50, D et B**).

Ces résultats nous permettent de formuler l'hypothèse que la (-)-épicatéchine entre plus facilement dans les mécanismes d'oxydation couplée que la (+)-catéchine et que l'acide caftarique, mais aussi que ses *o*-quinones ont une meilleure réactivité avec le **3SH** (Nikolantonaki *et al.*, 2010).

Enfin, le mélange réactionnel acide caftarique-**3SH** incubé en présence de dioxyde de soufre suit le même profil cinétique que celui observé en absence de dioxyde de soufre (**Figure 51**). Le rendement final de la production du **Caf2** est diminué d'un facteur deux par la présence du dioxyde de soufre. Cette réduction est proportionnelle à la diminution de la consommation de l'acide caftarique en présence de PPO (**Figure 52**).

4.4.2 FORMATION DES ADDUITS ENTRE LA (+)-CATECHINE, LA (-)-EPICATECHINE, L'ACIDE CAFTARIQUE ET LE 3-SULFANYLHEXANOL EN CONDITIONS D'OXYDATION CHIMIQUE

La réaction de la (+)-catéchine, de la (-)-épicatéchine et de l'acide caftarique avec le **3SH** est étudiée en milieu modèle saturé en oxygène. Elle est induite par l'addition de peroxyde d'hydrogène. En conditions d'oxydation chimique, les rendements de production des adduits et les vitesses des réactions sont plus faibles que ceux obtenus en conditions d'oxydation enzymatique. Il a déjà été mentionné que l'oxydation des composés phénoliques produit des *o*-quinones beaucoup plus rapidement en conditions enzymatiques que chimiques. En revanche, une fois formées, l'addition nucléophile de thiol sur ces *o*-quinones n'est pas modifiée par les conditions d'oxydation.

4.4.2.1 Conditions expérimentales

Le suivi cinétique de formations des adduits entre les trois substrats polyphénoliques [(+)-catéchine, (-)-épicatéchine, acide caftarique] (9 mM) avec le **3SH** (12 mM) en conditions d'oxydation chimique est réalisé en milieu modèle, acidifié (5 g/L acide tartrique), à pH 3,5 en présence ou non de dioxyde de soufre (50 mg/L) et de Fe²⁺ (50 mM). Les modalités sont préparées en duplicata. Le déclenchement de la réaction est effectué par addition du peroxyde d'hydrogène (300 mM). La concentration en peroxyde d'hydrogène est six fois plus importante que celle du Fe²⁺. Les modalités sont incubées à 35°C à l'abri de la lumière. Des prélèvements réguliers (tous les jours) sont effectués afin de suivre la formation des différents adduits dans le milieu réactionnel.

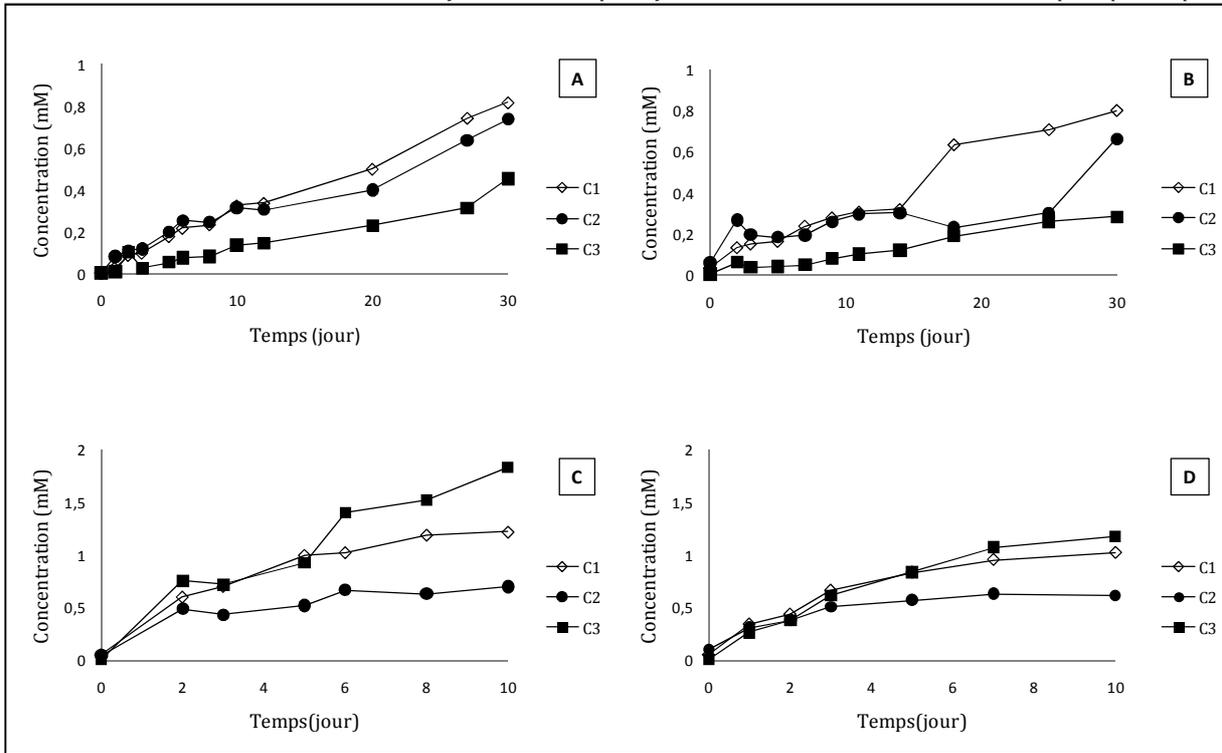


Figure 53. Cinétique de formation des adduits entre la (+)-catéchine et le 3SH (C1, C2 et C3) en conditions d'oxydation chimique. Incidence de la présence de fer ferreux et de dioxyde de soufre. (A) modalité contrôle, (B) en présence de dioxyde de soufre, (C) en présence de fer ferreux et (D) en présence de fer ferreux et de dioxyde de soufre

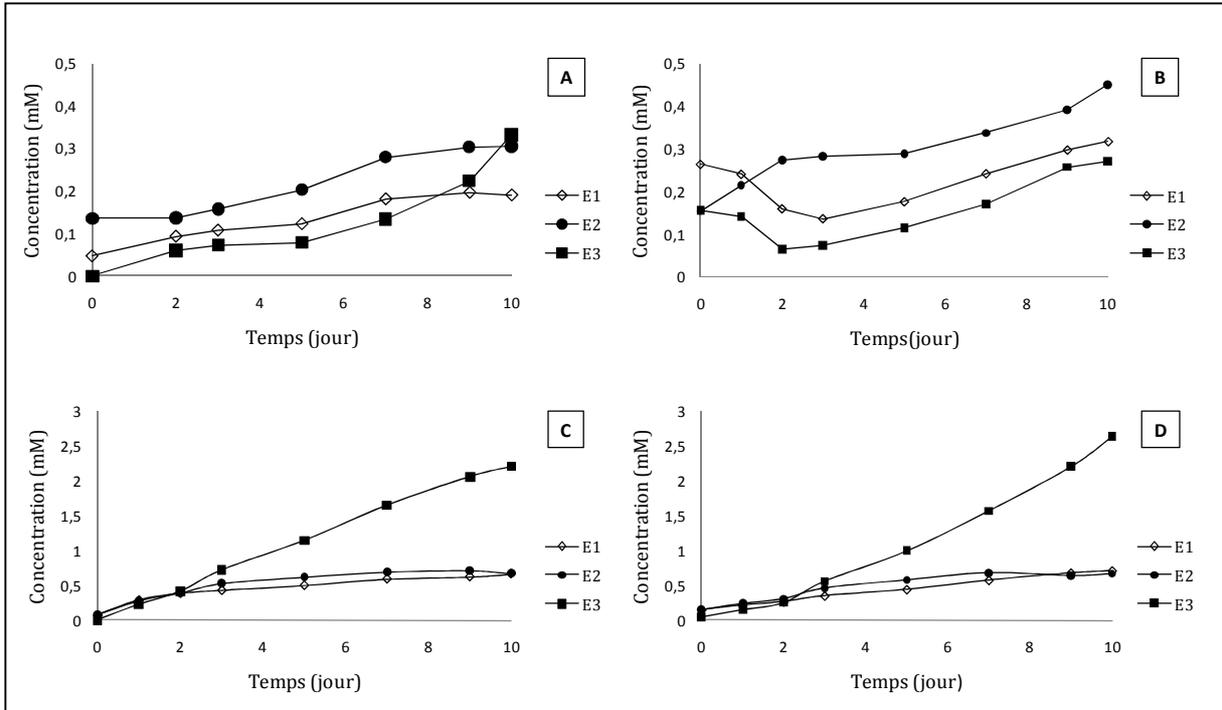


Figure 54. Cinétique de formation des adduits entre la (-)-épicatéchine et le 3SH (E1, E2 et E3) en conditions d'oxydation chimique. Incidence de la présence de fer ferreux et de dioxyde de soufre. (A) modalité contrôle, (B) en présence de dioxyde de soufre, (C) en présence de fer ferreux et (D) en présence de fer ferreux et de dioxyde de soufre

4.4.2.2 Formation des adduits en présence d'oxygène

Dans un milieu réactionnel proche du vin - en présence d'éthanol et en milieu acide (**Figure 53** et **Figure 54**), la production de l'ensemble des adduits entre la (-)-épicatéchine et le **3SH** après dix jours d'incubation, à $t_{\text{jour}10}$ est légèrement supérieure (de l'ordre de 13 %) à celle des adduits de (+)-catéchine.

En présence du **3SH** en excès, le pourcentage d'addition nucléophile du thiol sur le cycle B de la (+)-catéchine est équivalent entre les positions 5' et 6' (**C1** 0,81 mM et **C2** 0,73 mM, **Figure 53, A**). Par contre, pour la (-)-épicatéchine, l'addition du **3SH** se réalise préférentiellement en position 5' par rapport à la position 2' conduisant respectivement à la formation d'adduit **E2** (0,35 mM) et **E1** (0,19 mM), **Figure 54 A**.

En revanche, le rendement de production des doubles adduits avec les deux monomères des flavan-3-ols (**C3** et **E3**) ne présente pas de différence significative après dix jours d'incubation. Nous avons observé ce même comportement en conditions enzymatiques (§ 4.4.1.2, **Figure 50**).

Le suivi de la cinétique de formation des adduits entre la (-)-épicatéchine et le **3SH** est arrêté après 10 jours d'incubation suite à l'apparition des produits d'oxydation de la (-)-épicatéchine (**Figure 55** : pics chromatographiques de 1 à 6) qui ont dénaturé la matrice. Ce phénomène est amplifié en présence de Fe^{2+} à la fois pour la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine.

4.4.2.3 Impact du dioxyde de soufre sur la formation des adduits

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'effet du dioxyde de soufre sur la cinétique de formation des adduits entre les flavan-3-ols et le **3SH** (**Figure 53** et **Figure 54**). De toute évidence, la présence du dioxyde de soufre diminue mais n'empêche pas la production d'adduits entre la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et le **3SH**. Quand la (+)-catéchine est incubée en excès de **3SH**, la simple addition du dioxyde de soufre provoque une diminution de 16 % de la vitesse de réaction entre ces deux molécules (**Figure 53, B**). Cette diminution peut être liée à la présence d'une phase de latence au cours des premiers jours de la réaction. En revanche, la présence du dioxyde de soufre dans les modalités contenant de la (-)-épicatéchine n'a aucun impact sur la vitesse et le rendement de la réaction de ce polyphénol avec le **3SH** (**Figure 54, B**).

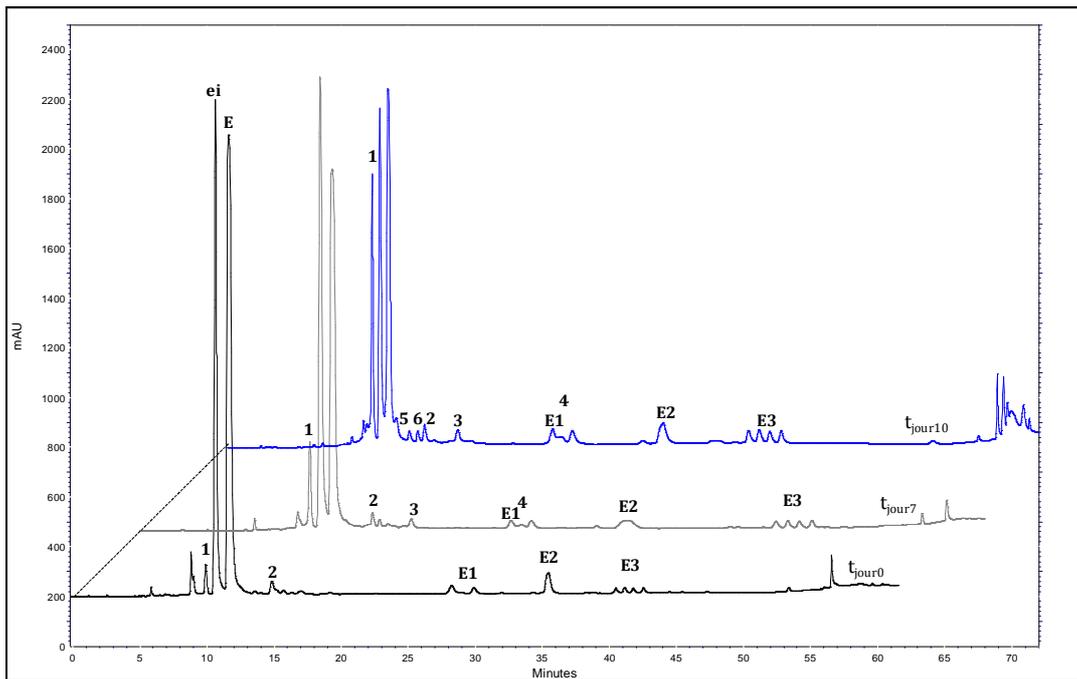


Figure 55. Suivi par CLHP-UV à 280 nm du milieu réactionnel contenant de la (-)-épicatéchine et du 3SH au cours de 10 jours de réaction. Evolution de la formation des adduits entre la (-)-épicatéchine et le 3SH (E1, E2 et E3) mais aussi des produits de dégradation de la (-)-épicatéchine : pics chromatographiques de 1 à 6

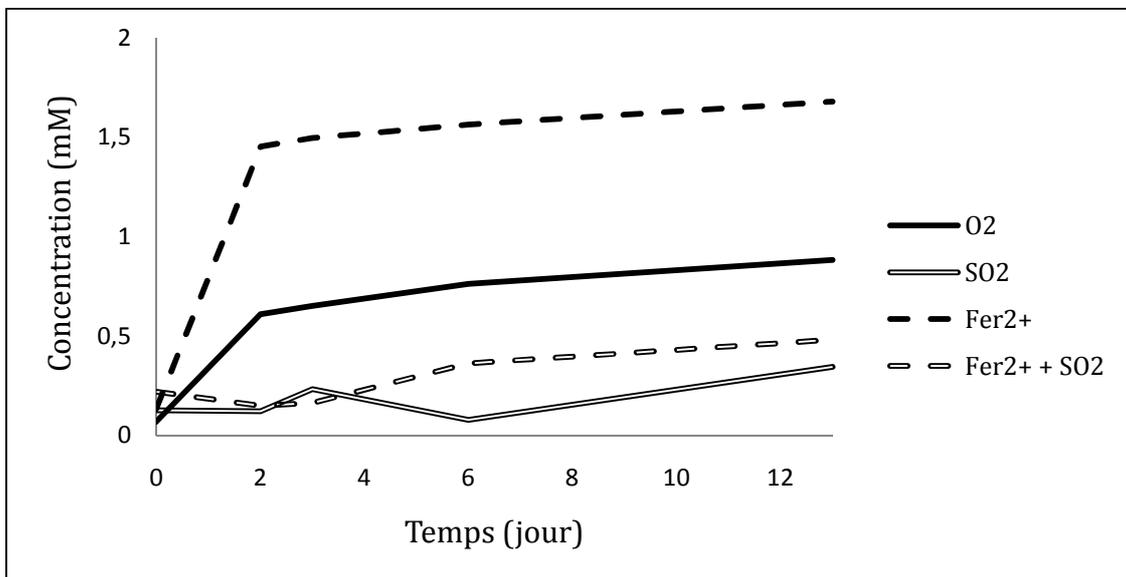


Figure 56. Cinétique de formation du mono adduit (Caf2) entre l'acide caftarique et le 3SH en conditions d'oxydation chimique. Incidence de la présence de fer ferreux (Fe^{2+}) et du dioxyde de soufre (SO_2)

Selon Wildenradt & Singleton (1974) puis Danilewicz (2007), les catéchols aux concentrations proches de celles de notre milieu réactionnel (9mM) semblent s'oxyder beaucoup plus rapidement que le dioxyde de soufre. Le dioxyde de soufre, dans ces conditions, s'oxyde en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène, produit secondaire de l'oxydation des composés phénoliques, et perd ainsi de son efficacité antioxydante. Par conséquent, le dioxyde de soufre en présence de concentrations élevées en polyphénols ne peut plus réduire les quinones des composés phénoliques et ne permet donc pas de limiter le piégeage des thiols.

Ainsi, dans notre milieu réactionnel, le dioxyde de soufre est totalement consommé après deux jours d'incubation (**Figure 53, B** et **Figure 54, B**). En comparant les modalités réactionnelles des deux flavan-3-ols en présence du dioxyde de soufre, il apparaît que la (-)-épicatéchine est plus facilement oxydée que la (+)-catéchine lorsque le rendement de formation des adduits **E1**, **E2** et **E3** est supérieur à celui des adduits **C1**, **C2** et **C3**. Par l'intermédiaire des réactions entre polyphénols et thiols volatils, nous confirmons qu'en conditions d'oxydation en milieu acide, les réactions du dioxyde de soufre avec le peroxyde d'hydrogène peuvent être significativement bloquées par la présence de polyphénols (Danilewicz, 2007).

L'étude de la cinétique de formation d'adduit entre l'acide caftarique et le **3SH** (**Figure 56**), met en évidence une réactivité particulière de ces deux molécules similaire à celle observée en conditions d'oxydation enzymatique. Dans notre étude, le peroxyde d'hydrogène catalyse rapidement l'oxydation de l'acide caftarique et ainsi en présence de **3SH**, le rendement optimal est atteint après deux jours d'incubation. Ce résultat met en évidence que la cinétique de formation du **Caf2** est beaucoup plus rapide que celle observée pour les simples adduits **C2** et **E2** (5 à 15 fois supérieure à **E2** et **C2**).

Après deux jours d'incubation, la réaction d'addition du **3SH** sur la forme oxydée de l'acide caftarique semble atteindre un équilibre, l'augmentation du taux de production d'adduit **Caf2** n'étant plus significative.

Ces résultats pourraient s'expliquer par deux mécanismes: 1) les *o*-quinones d'acide caftarique peuvent être réduites en acide caftarique par les réactions d'oxydo-réduction couplées, avec une vitesse beaucoup plus importante que celles des réactions d'addition de thiol, 2) la formation des produits d'oxydation de l'acide caftarique diminue les disponibilités en *o*-quinones limitant ainsi leur réaction avec le **3SH**. Ces

mécanismes doivent être approfondis afin de mieux comprendre l'oxydation et la réactivité des acides phénols avec les différents nucléophiles de la matrice. Enfin, le dioxyde de soufre semble jouer un rôle important dans ces deux mécanismes réactionnels. La présence du dioxyde de soufre dans les modalités contenant de l'acide caftarique et du **3SH** entraîne une diminution significative de la production d'adduit **Caf2** (Figure 56).

4.4.2.4 Impact du fer ferreux sur la formation des adduits

L'effet du fer ferreux sur la vitesse et le rendement des réactions d'addition a ensuite été étudié. Pour cela, les mêmes expériences, ont été réalisées en solution modèle acide et saturée en oxygène. La concentration en peroxyde d'hydrogène est six fois plus importante que celle du fer ferreux.

La présence de Fe^{2+} augmente le rendement final de la production des mono adduits entre le **3SH** et la (+)-catéchine (**C1** et **C2**) (Figure 53, C), la (-)-épicatéchine (**E1** et **E2**) (Figure 54, C) et l'acide caftarique (**Caf2**) (Figure 56). La vitesse de réaction du système **3SH**-polyphénols dépend du composé phénolique. En effet, la vitesse de formation des adduits **C2** et **E2** est accrue d'un facteur 2, et d'un facteur 2,5 et 4 pour les **E1** et **C1**, dès l'addition du fer ferreux dans la matrice. La présence du fer augmente aussi significativement le rendement et la vitesse de réaction de la formation du simple adduit **Caf2**.

Contrairement à ce que nous avons observé précédemment, en présence du fer ferreux dans le système réactionnel (+)-catéchine-**3SH**, le site d'addition du thiol pour la position 6' est préférentiel par rapport à la position 5' dans le cycle B de la *o*-quinone de la (+)-catéchine. De plus, une augmentation significative, de l'ordre de 1,8 mM, de la production du double adduit (**C3**) est mise en évidence en présence de fer. En revanche, dans le cas de la (-)-épicatéchine, la préférence du site électrophile du cycle B en position 5' est totalement supprimée. Par contre, des réactions de substitutions multiples du thiol sur la molécule oxydée de la (-)-épicatéchine dominant dans le milieu réactionnel. Nous observons une multiplication par quatre de la concentration finale d'adduits **E3** dans le milieu modèle après 10 jours d'incubation par rapport à ce qui est observé pour la modalité non supplémentée en fer.

La production de l'adduit **E3** est supérieure de 17 % par rapport à celle de l'adduit **C3** après 10 jours. Par conséquent, en concentrations équimolaires des deux

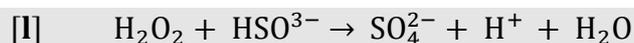
monomères de flavan-3-ols, la (-)-épicatéchine est plus réactive avec le **3SH** que la (+)-catéchine.

Par conséquent, les mono adduits de la (-)-catéchine et de la (-)-épicatéchine avec le **3SH** semblent s'oxyder sous l'action du Fe^{2+} pour ensuite entrer dans les réactions d'oxydation couplée et former des doubles adduits.

4.4.2.5 Impact du fer ferreux et du dioxyde de soufre sur la formation des adduits

Le rôle de catalyseur de l'oxydation des polyphénols du fer est clairement démontré. Cependant, son impact est dépendant du type de composé phénolique. En présence de dioxyde de soufre, les concentrations en **C1**, **C2** et **C3** diminuent légèrement (**Figure 53, D**) contrairement à **E1**, **E2** et **E3** dont les teneurs restent inchangées (**Figure 54, D**). Par conséquent, par l'intermédiaire du mécanisme d'addition du **3SH** sur la (-)-épicatéchine, nous concluons que le dioxyde de soufre en présence du Fe^{2+} et de (-)-épicatéchine devient totalement inefficace en temps qu'antioxydant.

Ce phénomène pourrait être lié, d'une part, à la diminution rapide des teneurs en dioxyde de soufre libre et, d'autre part, à l'augmentation de celles en dioxyde de soufre combiné dans le milieu et ceci, en raison de la production de peroxyde d'hydrogène liée à l'oxydation de la (-)-épicatéchine catalysée par le fer, selon l'équation [I] :



Selon Danilewicz (2007), l'auto-oxydation du dioxyde de soufre serait catalysée par les métaux comme le fer, ce qui pourrait expliquer son incapacité à empêcher la consommation du **3SH** par la (-)-épicatéchine.

Enfin, pour l'acide caftarique, l'addition du dioxyde de soufre dans la matrice contenant du fer ferreux diminue fortement l'oxydabilité de cette molécule en créant une phase de latence au début de la réaction. En présence du dioxyde de soufre, le rendement optimal de la production de **Caf2** est décalé dans le temps (six jours contre deux jours sans dioxyde de soufre) (**Figure 56**). Cette réactivité particulière de l'acide caftarique avec le **3SH**, liée à son mécanisme d'oxydation en présence de fer et de dioxyde de soufre, mériterait des études plus approfondies dans les conditions du vin.

4.5 IDENTIFICATION DES ADDUITS ENTRE LES THIOLS VOLATILS ET LES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LE MOÛT

Après notre étude de formation des adduits entre les principaux composés phénoliques du moût et du vin blanc en solution modèle, il est très important de démontrer que les mécanismes réactionnels du système polyphénols-thiols volatils proposés en solution modèle sont également présents dans une matrice complexe telle que le moût.

Comme le rendement de la réaction de formation des adduits est largement supérieur en conditions d'oxydation enzymatique qu'en conditions chimiques, nous avons recherché les adduits, précédemment identifiés et caractérisés par SM et RMN, dans un moût blanc supplémenté en **3SH**. Dans le but d'évaluer l'importance de la réactivité des flavan-3-ols et de l'acide caftarique avec le **3SH**, cette étude est complétée par la recherche d'adduits issus d'autres composés phénoliques présents dans le moût et dans le vin blanc en relativement faibles concentrations (inférieures à 10 mg/L), et le **3SH** par CLHP-ESI-SM.

4.5.1 PLAN EXPERIMENTAL ET MODE OPERATOIRE

Dans cette étude, nous avons choisi un moût de raisins blancs du cépage Sauvignon blanc, fraîchement produit à une échelle industrielle et contenant 20 mg/L de dioxyde de soufre libre. Le moût natif contient 22 mg/L de (+)-catéchine, 2,7 mg/L de (-)-épicatéchine, 0,8 mg/L (eq. caté) d'acide caféique, 3,4 mg/L (eq. caté) de quercétine et 124 mg/L d'acide caftarique. Deux aliquots de moûts ont été préparés. Le premier est utilisé comme modalité témoin (sans **3SH** ; **-3SH**) et le second a été supplémenté (avec **3SH** ; **+3SH**) à 100 µg/L. Les deux aliquots sont incubés en présence d'extrait de PPO (5 g/L), à température ambiante, à l'abri de la lumière, sous agitation (200 rpm) et en présence de pimarinine (100 mg/L) pour éviter le déclenchement de la fermentation alcoolique.

Le suivi cinétique de la recherche des adduits (tous les jours) est effectué sur un volume de 50 mL de chaque milieu réactionnel. Ce volume, préalablement centrifugé est extrait à l'acétate d'éthyle (v/v). La phase organique est évaporée à sec sous pression

réduite. L'extrait est ré-solubilisé dans 1 mL de méthanol, filtré à 0,45 μm avant d'être analysé par CLHP-ESI-SM.

Le suivi de formation des adduits est effectué par CLHP-ESI-SM (Méthode 7). Pour cela, des acquisitions ont été réalisées en mode négatif et en Full Scan sur la gamme de masse 100 – 1000 pour les deux aliquots de moût (supplémenté ou non en **3SH**). Le rapport m/z correspondant à l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ du composé recherché est extrait du chromatogramme en Full Scan. Les structures hypothétiques des produits d'addition du 3SH sur les différents polyphénols ont été formulées en se basant sur la réaction d'addition de Michaël. Les pics chromatographiques ainsi identifiés ont été attribués d'après leurs spectres de masse. Nous avons considéré les produits d'addition du 3SH exclusivement issus de composés phénoliques. La méthode servant à piloter le spectromètre de masse a été optimisée sur les ions de la (+)-catéchine dans les conditions d'analyses chromatographiques suivantes : débit = 70 $\mu\text{L}/\text{min}$, composition de solvant : eau : méthanol 80 : 20. Les composés d'addition à rechercher sont sélectionnés parmi ceux déjà décrits dans la littérature et obtenus en solution modèle, en temps que thiol réactant (Cheynier *et al.*, 1986; Salgues, 1986; Cilliers & Singleton, 1990; Moridani *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002; Boots *et al.*, 2003). Il est en effet illusoire, en l'état actuel de nos connaissances, de rechercher par CLHP-SM conventionnelle des pics chromatographiques correspondant à des composés inconnus. Les composés à rechercher sont donc des adduits avec la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, l'acide caftarique, l'acide caféique et la quercétine. L'investigation n'est pas exhaustive mais prétend rechercher les produits d'addition potentiellement formés dans un moût et un vin blanc sur la base des connaissances acquises à ce jour. Ainsi, si un composé n'est pas détecté, nous ne pourrions pas conclure de façon absolue qu'il soit totalement absent dans le moût analysé.

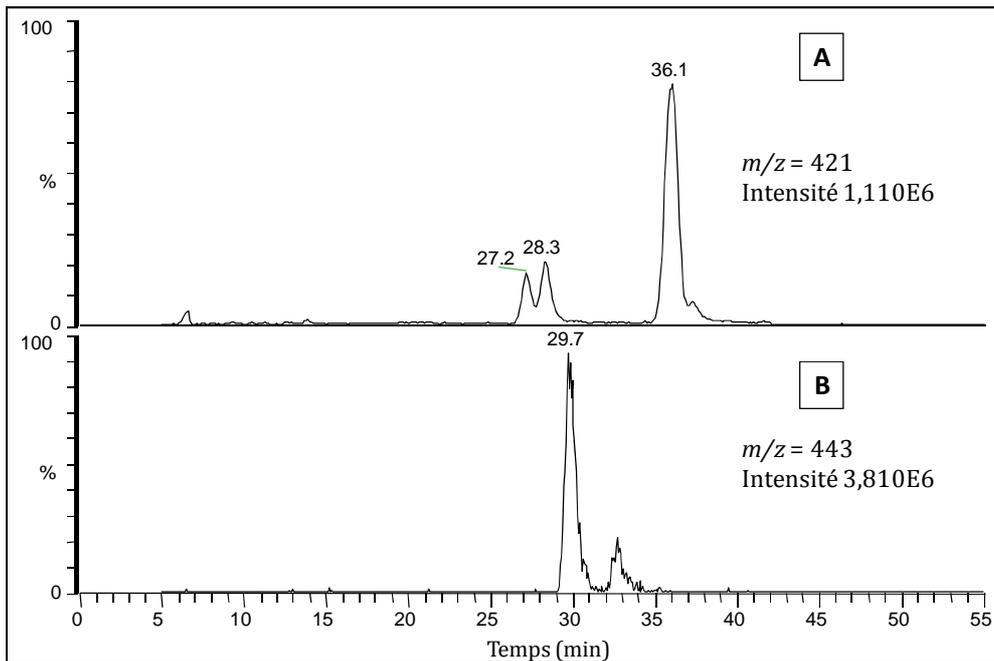


Figure 57. Chromatogrammes en CLHP-ESI-SM d'un extrait organique brut de moût blanc supplémenté en **3SH**. Le chromatogramme **(A)** correspond au chromatogramme extrait à $m/z = 421$ (adduit **C2**) et le **(B)** correspond à l'ion extrait à $m/z = 443$ (adduit **Caf2**)

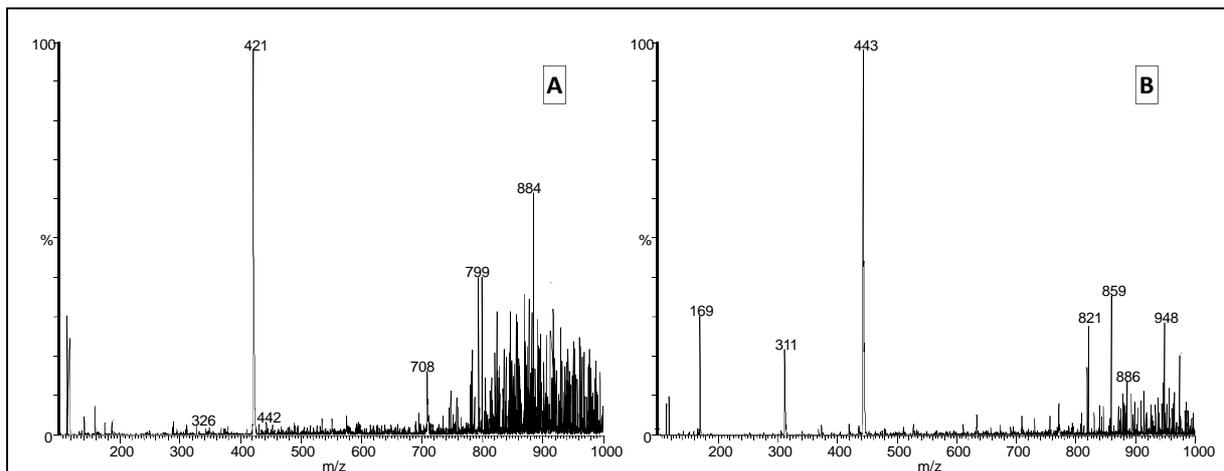


Figure 58. Spectres de masse en mode négatif et en Full Scan sur une gamme de masse 100-1000, des adduits **(A) C2** : 5'-(7''-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine et **(B) Caf2** : acide 2'-(3''-sulfanylhexanol)-caftarique identifiés dans le moût blanc supplémenté en **3SH** à 24 heures d'incubation

4.5.2 IDENTIFICATION

Notre étude a débuté par la recherche des adduits précédemment identifiés et caractérisés par RMN entre la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, l'acide caftarique et le **3SH**. L'extraction de l'ion $m/z = 421$ (**Figure 57, B**) dans le spectre de masse permet de mettre en évidence le profil chromatographique des adduits entre la (+)-catéchine et le **3SH** qui est similaire à celui observé en solution modèle (**Figure 38**). Le massif avec un temps de rétention 27-28,4 minutes est attribué à l'adduit **C1**, identifié comme 6'-(7''-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine, tandis que le pic majoritaire élué à 36,1 minutes est attribué à l'adduit (**C2**) 5'-(7''-sulfanylhexanol)-(+)-catéchine (**Figure 58, A**). L'extraction du chromatogramme à $m/z = 289$ indique qu'aucun de ces pics ne correspond à l'adduit entre le **3SH** et la (-)-épicatéchine.

Le chromatogramme extrait à $m/z = 443$ pour détecter le **Caf2** révèle un pic majoritaire avec un temps de rétention à 29,7 minutes (**Figure 57, C**). Une comparaison avec la molécule standard de **Caf2** [acide 2'-(3''-sulfanylhexanol)-caftarique] nous a permis de confirmer son identité (**Figure 58, B**).

Les analyses par CLHP-ESI-SM nous permettent de démontrer que le mécanisme d'addition de Michaël des thiols volatils sur les composés phénoliques oxydés est activé dans une matrice complexe telle que le jus de raisin.

Le chromatogramme extrait à $m/z = 281$ pour détecter l'adduit entre l'acide caféique et le **3SH** relève de nombreux pics (**Figure 59, A**). Une superposition avec le chromatogramme extrait à $m/z = 281$ d'échantillon de moût non supplémenté en **3SH** (**Figure 59, B**) indique qu'aucun de ces pics ne correspond aux adduits recherchés.

Le chromatogramme extrait à $m/z = 433$ pour détecter l'adduit entre la quercétine et le **3SH** révèle également de nombreux pics (**Figure 60, A**). Une superposition avec le chromatogramme extrait à $m/z = 433$ de l'échantillon de moût non supplémenté en **3SH** (**Figure 60, B**), indique qu'aucun de ces pics ne correspond aux adduits recherchés.

Les résultats ne peuvent pas nous permettre de conclure de façon absolue sur l'absence de formation des adduits entre la quercétine, l'acide caféique et le **3SH**.

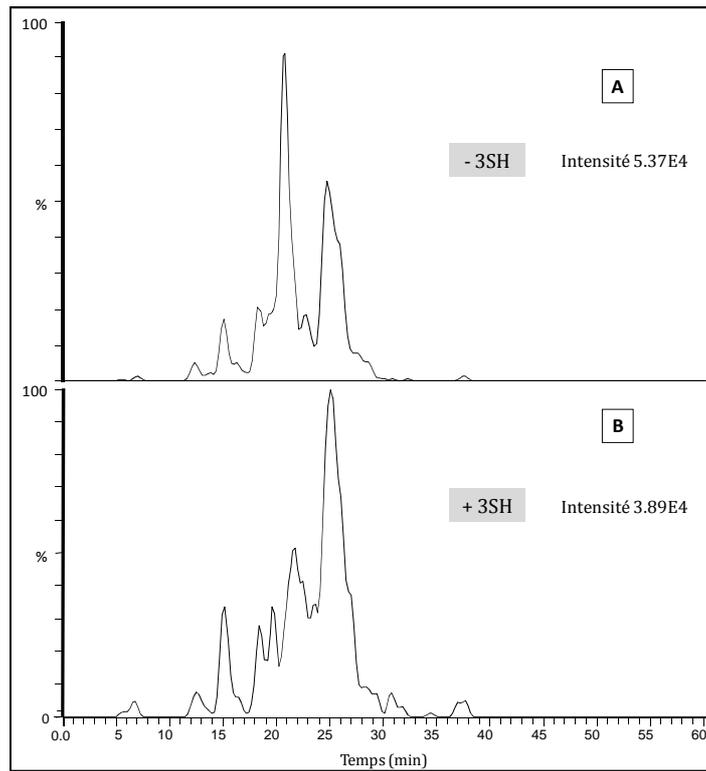


Figure 59. Recherche d'adduit entre l'acide caféique et le **3SH** dans un moût supplémenté **(A)** ou non **(B)** en **3SH**, avec le chromatogramme extrait à $m/z = 281$

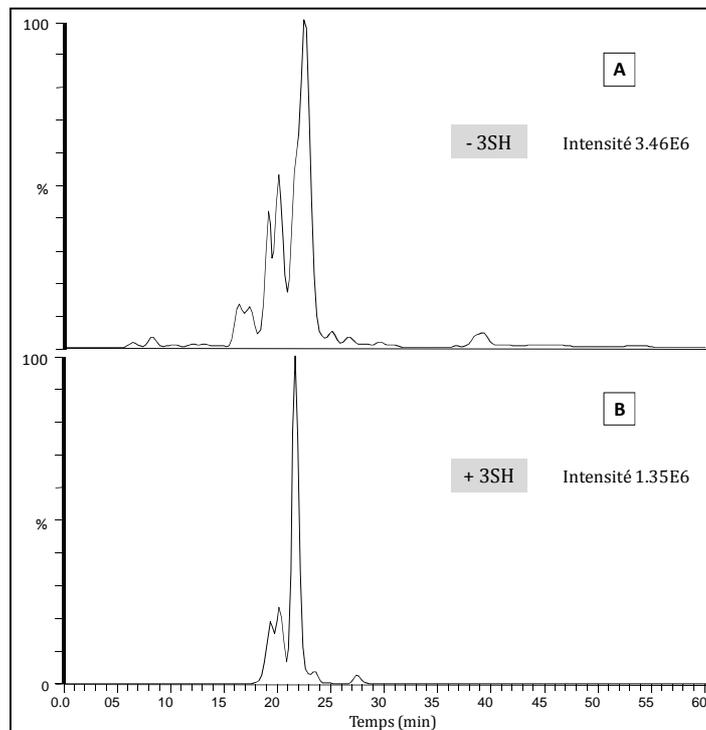


Figure 60. Recherche d'adduit entre la quercétine et le **3SH** dans un moût supplémenté **(A)** ou non **(B)** en **3SH**, avec le chromatogramme extrait à $m/z = 433$

La problématique de la détection des adduits recherchés doit prendre en considération plusieurs éléments : a) les produits d'addition sont naturellement présents en faible quantité, le détecteur doit être sensible, b) les produits d'addition sont souvent coélus car la méthode de séparation n'est actuellement pas complètement satisfaisante. Le détecteur doit être sélectif. La spectrométrie de masse remplit ces deux conditions. Par rapport au moût additionné en **3SH**, les acquisitions en Full Scan pour le moût non additionné en **3SH** (**Figure 61**) font ressortir une nette modification du profil chromatographique. Ces acquisitions fournissent des informations globales intéressantes en peu de temps mais les nombreuses coélutions ne nous permettent pas d'établir de liaison entre les ions pseudomoléculaires et les fragments formés. Dans la source, les composés coélus sont en compétition pour l'ionisation et l'un des composés peut s'ioniser préférentiellement par rapport à l'autre (Tang *et al.*, 2004). Néanmoins, cette représentation permet d'évaluer rapidement l'importance de certains pics. Ces informations sont essentielles pour avancer sur la caractérisation d'autres adduits entre les polyphénols et les thiols volatils.

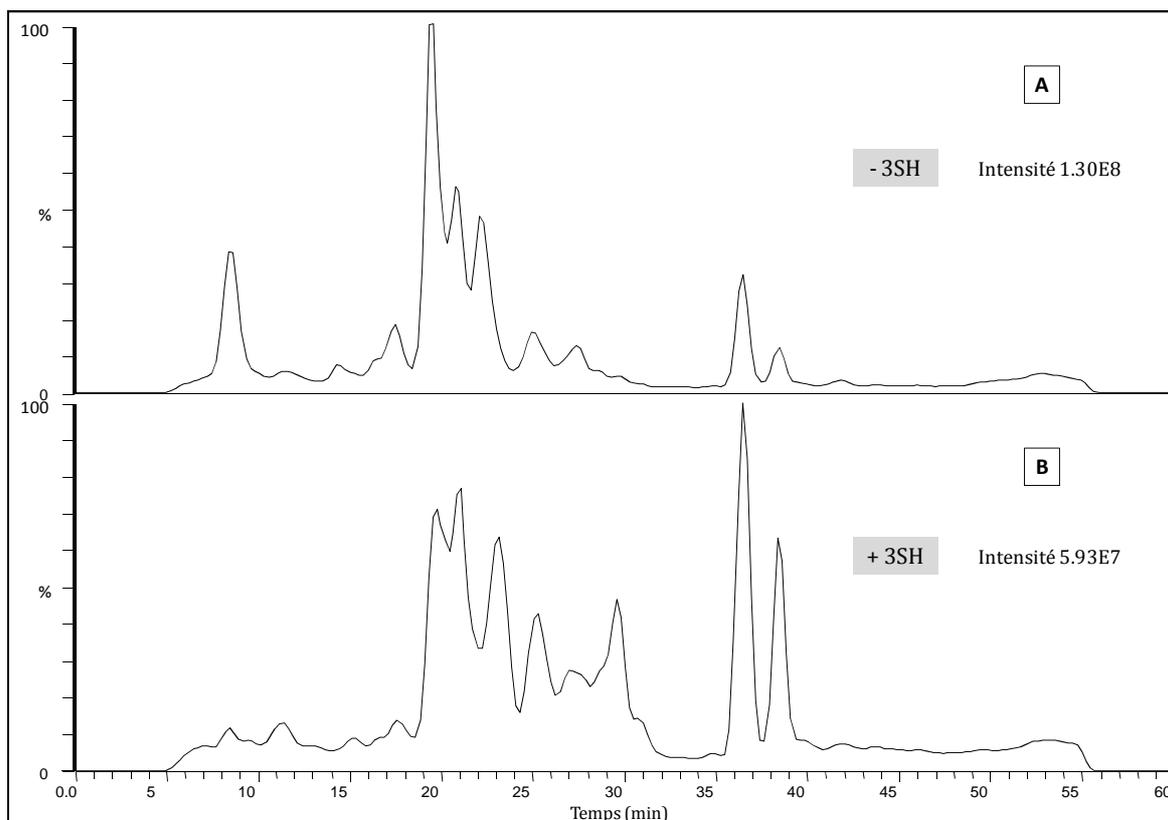


Figure 61. Comparaison des chromatogrammes en CLHP-ESI-SM d'un extrait organique brut de moût blanc additionné (**A**) ou non (**B**) en **3SH**. Les chromatogrammes correspondent aux ions totaux en mode négatif et en Full Scan sur une gamme de masse 100-1000

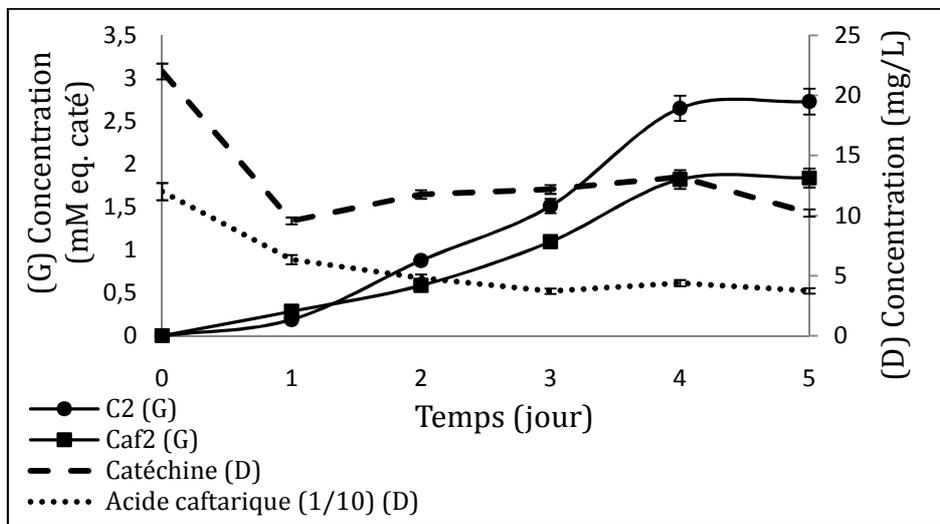


Figure 62. Suivi par CLHP-ESI-SM de la cinétique de production des adduits **C2** et **Caf2**, et de la consommation des substrats polyphénoliques [(+)-catéchine et acide caftarique] dans un moût blanc natif, additionné de **3SH** [cinq jours d'incubation à température ambiante (20°C)]

4.5.3 CINÉTIQUE DE FORMATION

La mise en évidence de la formation d'adduits entre la (+)-catéchine, l'acide caftarique et le **3SH**, dans une matrice native comme le moût blanc après 24 heures d'incubation indique qu'en conditions réelles de la vinification, le mécanisme d'addition des thiols volatils est activé. Par conséquent, ce mécanisme doit pouvoir se mettre en place dans les premiers jours de la fermentation alcoolique lors de la libération des thiols volatils à partir de leurs formes conjuguées (Chapitre 1, **Figure 2**).

Afin de mieux comprendre le mécanisme de formation de ces adduits, le suivi cinétique de leur production dans le moût additionné en 3SH a été étudié. La formation des adduits **C2** et **Caf2** dans ces conditions met en évidence que l'adduit **C2** est prédominant vis-à-vis d'adduit **Caf2** même si dans le moût natif la (+)-catéchine (22 mg/L) est six fois moins concentrée que l'acide caftarique (120 mg/L) (**Figure 62**). D'après ce résultat, il apparaît que la réactivité des différents composés phénoliques avec un thiol volatil n'est pas seulement dépendante de sa concentration mais plus de sa nature chimique.

Au cours de notre étude, il a été observé que l'acide caftarique était consommé (oxydé) beaucoup plus rapidement que la (+)-catéchine dans le moût mais, sa consommation n'est pas proportionnelle à la formation d'adduit **Caf2** (**Figure 62**). Les *o*-quinones de l'acide caftarique semblent avoir une plus grande affinité avec d'autres nucléophiles présents dans la matrice (ex. glutathion) qu'un thiol volatil tel que le **3SH**. De plus, la disparition de l'acide caftarique peut être liée à la formation de produits de condensation avec d'autres composés phénoliques du moût qui se forment plus facilement que ses oligomères (Cheynier *et al.*, 1989a; Oszmianski & Lee, 1990).

4.6 CONCLUSION

La synthèse des adduits entre les principaux composés phénoliques du moût et du vin blanc, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine ainsi que l'acide caftarique avec un thiol volatil clé, le **3SH**, a été réalisée en solution aqueuse de composition proche de celle du jus de raisin, en conditions d'oxydation enzymatique (en présence d'un extrait de polyphénoloxydase de raisin). Leur formation a également été démontrée en milieu hydroalcoolique modèle de composition proche du vin. La formation de ces adduits polyphénol-thiols volatils est donc envisageable au cours de la vinification et dans les

vins et pourrait expliquer la disparition de ces molécules odorantes, contributrices de l'arôme des vins de divers cépages.

La caractérisation structurale des adduits a permis de confirmer qu'ils résultent bien du mécanisme général formulé dans notre hypothèse de travail. Ce mécanisme est une simple ou double addition nucléophile comprenant une attaque nucléophile du thiol volatil sur les sites électrophiles disponibles du cycle B pour le cas des flavan-3-ols et du cycle aromatique pour le cas de l'acide caftarique conduisant à la formation d'un thioéther. Pour la première fois, nous mettons en évidence l'existence de produits d'addition entre des composés non volatils (les polyphénols) et des composés volatils (les thiols volatils). Plus précisément, deux nouveaux adduits simples et un double adduit entre la (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et le **3SH** ont été produits. Dans le cas de l'acide caftarique, un seul produit d'addition été formé, illustrant une réactivité différente de ce composé avec les thiols volatils. De plus, l'étude RMN a mis en évidence une différence de réactivité entre les deux monomères des flavan-3-ols étudiés. Le **3SH** présente une affinité pour les carbones C5' et C6' du cycle B de la (+)-catéchine et pour les carbones C2' et C5' de la (-)-épicatéchine. Une étude supplémentaire par modélisation moléculaire du système d'addition pourrait expliquer cette sélectivité.

Dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans la dégradation des thiols volatils au moment de leur libération lors de la fermentation alcoolique, un suivi de la cinétique de formation des adduits en présence de la PPO a été réalisé. En fait, malgré la grande affinité de l'acide caftarique avec la PPO, le taux d'oxydation de la quinone de l'acide caftarique n'est pas directement corrélé avec la production de l'adduit **Caf2**. Les *o*-quinones d'acide caftarique semblent avoir une plus faible affinité avec le **3SH** que celles de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine. En présence d'un extrait de PPO et à des concentrations équimolaires des trois composés phénoliques étudiés, la (+)-catéchine présente un rendement de formation des adduits avec le **3SH** deux fois supérieur à celui obtenu pour l'acide caftarique et la (-)-épicatéchine. En reliant ce résultat avec le fait que la (-)-épicatéchine est un substrat secondaire de la PPO contrairement à l'acide caftarique, nous concluons que la (+)-catéchine est une molécule jouant un rôle déterminant dans la dégradation du **3SH**.

Notre étude concernant la cinétique de formation des adduits polyphénol-thiol volatil par spectrométrie de masse a mis en évidence que dans une matrice complexe

comme le goût, la réactivité des composés phénoliques avec le **3SH** était faiblement corrélée avec la concentration en substrat, mais au contraire, fortement dépendante de la nature chimique du composé phénolique.

Le suivi de la cinétique de formation des adduits dans un système dynamique « $H_2O_2-Fe^{2+}-SO_2$ » en conditions acides telles que le vin, nous a permis d'une part, de préciser l'impact de certains facteurs ayant des propriétés antioxydantes ou prooxydantes, et d'autre part, de comprendre les mécanismes qui sont susceptibles d'être impliqués dans la dégradation des thiols volatils au cours du vieillissement du vin blanc.

En conditions d'oxydation chimiques, parmi les trois composés phénoliques étudiés, la (+)-catéchine présente la plus forte réactivité avec le **3SH** et le meilleur rendement de production des adduits après dix jours de réaction, suivie par la (-)-épicatéchine et l'acide caftarique en présence ou en absence de dioxyde de soufre. Notre étude met en évidence que la présence du fer ferreux amplifie cette réactivité et estompe la différence au niveau du rendement de production des adduits de la (-)-épicatéchine et de l'acide caftarique avec le **3SH**. Le fer ferreux par son action favorisant l'oxydation des composés phénoliques, augmente, d'une part, la vitesse de formation des mono-adduits des flavan-3-ols avec le **3SH** et, d'autre part, favorise la production de doubles adduits par substitution multiple de la molécule de **3SH** sur la forme oxydée de chaque flavan-3-ol.

Concernant le dioxyde de soufre, bien que ce composé présente des propriétés antioxydantes qui limitent la dégradation de thiols volatils, celui-ci semble perdre son efficacité en présence de la (-)-épicatéchine et dans une moindre mesure de la (+)-catéchine. Par contre, l'oxydation de l'acide caftarique est fortement inhibée par sa présence. Ce résultat mérite une étude approfondie pour comprendre son mécanisme d'oxydation et expliquer sa faible réactivité avec le **3SH**.

A la lumière de ces résultats, nous apportons la démonstration que les flavan-3-ols, lorsqu'ils sont impliqués dans des réactions d'oxydation, constituent des pièges potentiels pour les thiols volatils tant dans les premiers stades de la vinification que pendant le vieillissement du vin. Les conséquences des mécanismes réactionnels décrits dans ce chapitre, tout au long de l'élaboration et la conservation du vin seront par la suite plus amplement étudiées.

SECONDE PARTIE

Etude du rôle des flavan-3-ols sur l'évolution
aromatique des vins au cours du vieillissement

5

Développement d'une méthode de dosage des flavan-3-ols dans les moûts et les vins blancs

Dans le but d'étudier les conséquences des flavonoïdes sur la teneur en thiols et la typicité aromatique des vins, il était nécessaire de pouvoir quantifier ces composés dans les moûts et les vins. Pour cela, une méthode simple de dosage a été développée.

Il existe de nombreuses publications rapportant l'étude du contenu en flavan-3-ols des vins blancs (Lea *et al.*, 1979; Singleton & Trousdale, 1983; Voyatzis, 1984; Ramey *et al.*, 1986; Ricardo da Silva *et al.*, 1993; Carando *et al.*, 1999a; Carando *et al.*, 1999b; Chamkha *et al.*, 2003; Landrault *et al.*, 2003; Proestos *et al.*, 2005; Makhotkina & Kilmartin, 2009) mais très peu d'études concernent le dosage de ces composés dans les moûts blancs (chapitre 1, **Tableau 3**) (Jaworski & Lee, 1987; Betes-Saura *et al.*, 1996; Fuleki & Ricardo da Silva, 2003).

La méthode proposée par Betes-Saura *et al.* (1996), consiste à analyser par CLHP avec une détection UV les différents groupes de phénols, dans des moûts ou des vins blancs après injection directe de l'échantillon brut. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans l'augmentation du bruit de fond chromatographique lié à la complexité de la matrice et à sa richesse en sucres qui peuvent provoquer des problèmes analytiques et raccourcir la durée de vie de la colonne. En regard de ces inconvénients, certains auteurs (Bourzeix *et al.*, 1986; Jaworski & Lee, 1987; Fuleki & Ricardo da Silva, 2003) ont mis au point des méthodes de dosage impliquant une étape de purification par extraction en phase solide (SPE) (de type polyamide TLC6 ou C18 SEP-PAK) avant injection de l'échantillon dans la colonne analytique. L'étape de

purification conduit à l'élimination des composés polaires, en particulier les sucres et les protéines, ce qui permet un gain de sensibilité pour le dosage.

Cependant cette méthode induit un faible rendement de récupération des procyanidines oligomères. En effet, les procyanidines existent essentiellement sous forme de polymères dans les tissus végétaux. Les colonnes utilisées pour ces fractionnements se trouvent rapidement saturées par l'accumulation de formes polymères en tête de colonne, ce qui rend leur nettoyage et leur régénération fastidieux. Par conséquent, ces méthodes de dosage peuvent parfois s'avérer délicates.

5.1 PROTOCOLE D'EXTRACTION DES FLAVAN-3-OLS DANS LE MOUT BLANC

Afin de mettre au point une méthode rapide, simple, sensible et peu contraignante en terme de purification des échantillons de jus de raisins et moûts blancs, on a choisi de remplacer l'étape de purification sur SPE pour une extraction liquide-liquide avec un mélange de solvants organiques. Le dosage des flavan-3-ols a été ensuite effectué par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur par fluorescence (CLHP-FL). Ce choix de détecteur est déterminant pour la robustesse du dosage de ces composés. En effet, compte tenu de la faible abondance des flavan-3-ols dans une matrice complexe telle que le moût ou le vin, la détection par fluorescence permet d'augmenter la sensibilité et la sélectivité du dosage et ainsi d'améliorer la limite de détection par rapport à une détection UV (Chira, 2009).

Le dosage des flavan-3-ols dans les vins, a été effectué par CLHP-FL après injection directe d'échantillon, sans purification.

La méthode d'extraction utilisée est basée sur le principe proposé par Landrault *et al.* (2002). Le volume d'échantillon et le mélange des solvants sont optimisés afin d'accroître le rendement d'extraction des flavan-3-ols du moût blanc.

Ainsi, cinq aliquots de moût de raisin de Sauvignon blanc, correspondant respectivement à 50 mL, 40 mL, 30 mL, 20 mL et 10 mL sont supplémentés en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine à une concentration finale de 10 mg/L. Puis les moûts sont extraits par un volume équivalent d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'acétone (95 : 5 ; v/v). Les extraits organiques sont ensuite analysés par CLHP-FL. Les résultats obtenus mettent en évidence que le rendement d'extraction des flavanols est dépendent

Tableau 7. Incidence du volume d'échantillon sur l'aire du pic des monomères des flavan-3-ols du moût blanc

Volume d'échantillon (mL)	Aire du pic chromatographique de la (+)-catéchine	Aire du pic chromatographique de la (-)-épicatéchine
10	19284129	37637586
20	99273600	95625940
30	104869928	102216441
40	106767636	109463778
50	110255527	118945482

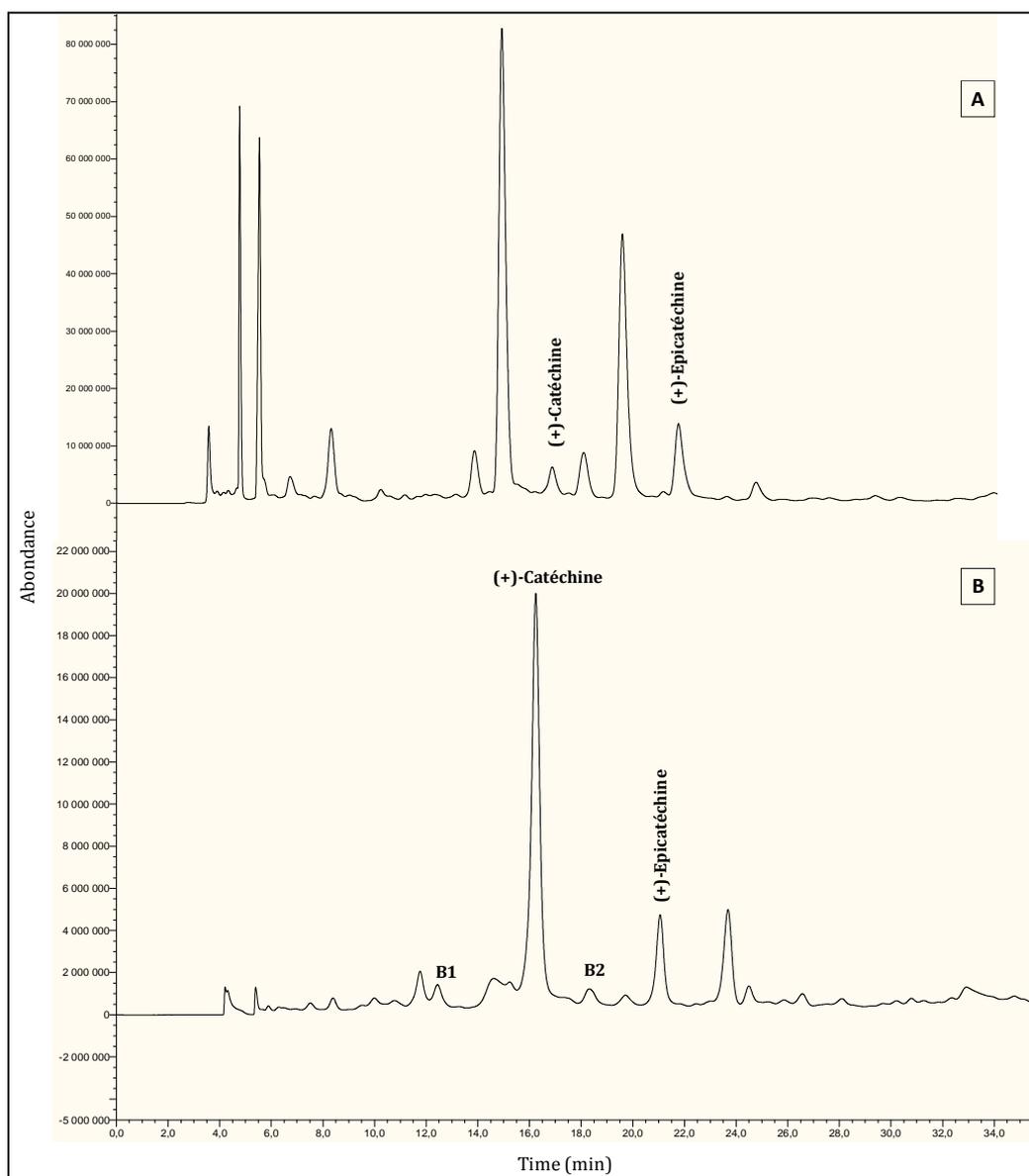


Figure 63. Chromatogramme CLHP-FL ($\lambda_{ex} = 275$ et $\lambda_{em} = 322$) **(A)** d'un vin blanc et **(B)** d'un extrait organique de moût supplémenté de 0,5 mg/L de B1 et B2

du volume initial, le meilleur rendement étant obtenu après l'extraction de 50 mL du moût avec un volume équivalent de mélanges solvants (**Tableau 7**).

Ainsi, le protocole expérimental adopté pour l'extraction des flavan-3-ols du moût consiste à extraire 50 mL du moût limpide (préalablement centrifugé) par un volume équivalent de mélange des solvants : acétate d'éthyle/acétone (95 : 5 ; v/v), en deux fois pendant 15 minutes sous agitation. La phase organique récupérée est amenée à sec sous pression réduite, puis re-solubilisée dans 1 mL de méthanol et filtrée à 0,45 μm avant d'être injectée en CLHP-FL.

5.2 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES POUR LE DOSAGE DES FLAVAN-3-OLS DANS LE MOÛT ET LE VIN BLANC

Les analyses chromatographiques sont réalisées sur un système analytique DIONEX Ultimate 3000 équipé d'un dégazeur, d'une pompe tertiaire (système RS), d'un passeur automatique (WPS-3000RS) et d'un détecteur de fluorescence (FLD-3100) piloté par le logiciel d'acquisition « Chromeleon ».

La colonne utilisée est une phase inverse Beckman Coulter Ultrasphère ODS C18 (250 mm \times 4,6 mm, 5 μm) protégée par une pré-colonne remplie de la même phase. Le débit est fixé à 0,7 mL/min et le volume d'injection à 5 μL . Le solvant A est un mélange d'eau ultrapure et d'acide trifluoroacétique (0,1 %) (95:5, v/v) et le solvant B un mélange d'acétonitrile (65 %) et d'acide trifluoroacétique (95:5, v/v). Le gradient d'élution est présenté ci-après (**Tableau 8**).

Tableau 8. Gradient d'élution pour l'identification et le dosage des flavan-3-ols du moût et du vin blanc

Temps (min)	0	30	35	40	41	46
% de solvant B	15	35	100	100	15	15

Pour l'identification des composés, la chaîne CLHP a été couplée à un détecteur de fluorescence Dionex (**Figure 63**). Les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation ont été fixées à $\lambda_{\text{ex}} = 275$ et $\lambda_{\text{em}} = 322$ (Carando *et al.*, 1999a).

Tableau 9. Paramètres des courbes de calibration des flavan-3-ols pour leur dosage dans le moût et dans le vin blanc par CLHP-FL. Coefficient de variation, taux de recouvrement, coefficient de détermination et gamme de validation

Composé	CV % (n = 5)	Courbe de calibration	R ²	Gamme de linéarité	Limite de détection ^a	Limite de quantification ^a	Taux de recouvrement ^a
<i>Moût</i>							
(+)-Catéchine	3,0	y = 1,917 x	0,993	0,21-100	0,07	0,21	113
(-)-Epicatéchine	4,3	y = 2,575 x	0,990	0,25-100	0,07	0,25	93
B1	5,2	y = 1,806 x	0,997	0,24-10	0,19	0,24	96
B2	4,8	y = 0,642 x	0,999	0,28-10	0,21	0,28	94
<i>Vin</i>							
(+)-Catéchine	1,2	y = 1,688 x	0,997	0,23-100	0,06	0,23	100
(-)-Epicatéchine	1,7	y = 1,607 x	0,998	0,21-100	0,06	0,21	100
B1	1,7	y = 0,582 x	0,996	0,12-10	0,12	0,27	100
B2	1,4	y = 0,602 x	0,998	0,13-10	0,13	0,29	100

^a La limite de quantification et la gamme de linéarité sont exprimées en mg/L tandis que le coefficient de détermination et le taux de recouvrement sont en pourcentage (%)

5.3 COURBES DE CALIBRATION, REPETABILITE ET SENSIBILITE DE LA METHODE DE DOSAGE DES FLAVAN-3-OLS DANS LE MOUT ET LE VIN

Le dosage des flavan-3-ols dans le moût et le vin a été effectué par étalonnage externe. Les gammes d'étalonnage ont été établies aux longueurs d'ondes suivantes : pour l'excitation $\lambda_{\text{ex}} = 275$ et pour l'émission $\lambda_{\text{em}} = 322$ en utilisant les standards commerciaux.

La gamme d'étalon du vin est préparée en ajoutant à une solution méthanolique des concentrations croissantes en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine : de 1 mg/L à 100 mg/L et en B1 et B2 : de 0,5 mg/L à 10 mg/L. Comme le montrent les résultats présentés dans le **Tableau 9**, une corrélation linéaire est observée après le calcul du coefficient de détermination, entre la concentration des flavan-3-ols et la surface des signaux de détection.

La gamme d'étalonnage des flavan-3-ols dans le moût a été réalisée en ajoutant des concentrations croissantes en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine : de 1 mg/L à 100 mg/L et en procyanidines B1 et B2 : de 0,5 mg/L à 10 mg/L. Ces échantillons ont alors été extraits puis analysés selon le protocole expérimental décrit préalablement. Une corrélation linéaire est ainsi observée, après le calcul du coefficient de détermination, entre la concentration en flavan-3-ols dans les extraits organiques du moût et la surface des signaux (**Tableau 9**).

Pour les deux méthodes de dosage des flavan-3-ols, la répétabilité a été déterminée à partir de l'analyse d'un même échantillon de moût blanc et de vin répétée cinq fois. Le coefficient de variation du dosage pour chaque composé est précisé dans le **Tableau 9**. Il est toujours inférieur à 10 %.

Le **Tableau 9** indique aussi les limites de détection et de quantification des flavan-3-ols dans les deux matrices, moût et vin. Elles sont définies comme la concentration minimale qui génère un signal respectivement trois fois et dix fois supérieur au signal du bruit de fond. En conséquence, ces résultats valident la méthode de dosage dans les moûts et les vins blancs.

Tableau 10. Exemples de la fourchette de concentrations (mg/L) en flavan-3-ols* déterminée dans des moûts et vins blancs issus de différents millésimes et appellations

Matrice	Cépage	Appellation	Millésime	(+)-Catéchine	(-)-Epicatéchine	n
Moût	Sauvignon blanc	Graves	2007	10,9-29,1	3,0-6,2	6
	Sauvignon blanc	Pessac Léognan	2007	1,4-2,6	traces	6
	Sauvignon blanc	Entre Deux Mers	2008	3,3-16,3	3,8-7,8	6
	Sauvignon blanc	Graves	2008	12,0-28,1	4,9-14,0	6
	Sauvignon blanc	Pauillac	2008	3,0-43,0	3,0-11,0	6
	Sauvignon blanc	Entre Deux Mers	2009	1,1-27,0	traces-13,6	15
	Sauvignon blanc	Pauillac	2009	0,4-35,6	traces-11,6	33
	Sauvignon blanc	Pessac Léognan	2009	0,3-5,9	traces-2,8	15
	Sauvignon blanc ^a	Pauillac	2009	7,1-10,5	7,1-28,1	4
	Sauvignon blanc ^b	Pauillac	2009	11,2-20,2	30,1-47,2	4
	Riesling	Rheingau	2009	1,2-3,4	0,2-0,7	4
	Chardonnay	Chassagne Montrachet	2009	4,5-10,2	1,5-4,7	3
Vin	Sauvignon blanc	Pessac Léognan	1994	1,1-2,5	8,7-9,5	3
	Sauvignon blanc	Pessac Léognan	2001	3,4-5,1	7,5-8,2	3
	Sauvignon blanc	Pessac Léognan	2003	14,9-18,5	5,6-7,3	3
	Sauvignon blanc	Pauillac	1992	1,8-2,6	1,1-1,6	3
	Sauvignon blanc	Pauillac	2000	11,5-14,5	1,9-2,4	3
	Sauvignon blanc	Pauillac	2003	1,5-9,8	1,6-3,8	3
	Sauvignon blanc	Graves	2008	11,1-21,6	traces	6
	Sauvignon blanc	Entre Deux Mers	2008	traces-11,2	traces	6
	Sauvignon blanc	Entre Deux Mers	2009	3,0-5,9	2,6-3,1	15
	Sauvignon blanc	Pauillac	2009	5,3-12,7	2,5-3,8	18
	Sauvignon blanc	Pessac Léognan	2009	2,2-10,6	traces-2,4	15
	Riesling	Rheingau	2009	0,1-0,5	0,1-2,5	36
	Sauvignon blanc ^c	Sauternes	2009	3,5	nd	2
	Sauvignon blanc ^d	Sauternes	2009	0,3	nd	2
	Sauvignon blanc ^e	Sauternes	2009	0,1	nd	2
	Sémillon ^c	Sauternes	2009	1,1	nd	2
	Sémillon ^d	Sauternes	2009	0,7	nd	2
	Sémillon ^e	Sauternes	2009	0,1	nd	2
	Sauvignon blanc ^c	Loupiac	2010	12,9	3,5	2
	Sauvignon blanc ^d	Loupiac	2010	6,4	3,5	2
Sauvignon blanc ^e	Loupiac	2010	2,5	1,3	2	

* Les composés B1 et B2 sont pas détectés dans les échantillons du moût et du vin ; ^a échantillons avant macération pré-fermentaire, ^b échantillons après macération pré-fermentaire, ^c vins issus de raisins sains, ^d vins issus de raisins infectés par *Botrytis cinerea* au stade « pourri plein », ^e vins issus de raisins infectés par *Botrytis cinerea* au stade « pourri rôti »

5.4 APPLICATION A L'ANALYSE DE MOÛTS ET DE VINS BLANCS

Nous présentons ici à titre d'exemple, le dosage des deux monomères des flavan-3-ols, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine, réalisé dans des moûts et des vins blancs d'origine et de millésimes différents. Nous notons que les composés B1 et B2 ne sont pas détectés dans les échantillons de moûts et de vins. Ainsi, pour la suite de notre étude nous ne présenterons que les résultats concernant les deux monomères de flavan-3-ols, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine.

Les teneurs en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine des moûts et des vins blancs varient d'un millésime à l'autre mais également d'un cru à l'autre (**Tableau 10**). Les moûts issus des cépages Sauvignon blanc et Riesling sont plus riches en (+)-catéchine qu'en (-)-épicatéchine. Les teneurs en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine dans les moûts fluctuent entre 0,3 mg/L et 43 mg/L et entre 0,2 mg/L à 28 mg/L respectivement. De plus, la macération pré-fermentaire des raisins accroît d'un facteur 2 les teneurs de ces flavan-3-ols dans le moût. Par ailleurs, les teneurs en flavan-3-ols des vins sont inférieures à celles des moûts correspondants. Les vins de Riesling sont moins riches en flavan-3-ols que les vins de Sauvignon blanc. Les teneurs moyennes en (+)-catéchine (7 mg/L) dans les vins sont supérieures à celles en (-)-épicatéchine (2 mg/L). Enfin, les vins liquoreux issus de raisins atteints par *Botrytis cinerea* contiennent des teneurs beaucoup plus faibles en flavan-3-ols par rapport aux vins blancs secs des mêmes cépages. L'attaque du champignon, vraisemblablement en impliquant la laccase, semble favoriser la dégradation de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine.

5.5 CONCLUSION

Le développement d'une méthode de dosage des flavan-3-ols dans les moûts nous a permis de doser par CLHP-FL les teneurs de ces composés qui sont globalement comparables à celles décrites dans la littérature (§ 1.3.2.2). L'optimisation des conditions d'extractions ainsi que la performance du système analytique offre ainsi une méthode rapide, simple, sensible et peu contraignante en terme de purification des échantillons des moûts. Cette méthode permet d'analyser avec une bonne répétabilité de grandes séries d'échantillons.

6

Impact des flavan-3-ols sur l'évolution des teneurs en thiols volatils et l'expression aromatique des vins blancs au cours du vieillissement en bouteilles

Les vins blancs secs dits de « grande garde » sont susceptibles de conserver les caractéristiques olfactives du vin jeune tout en développant des nuances spécifiques propres, évoluant vers un bouquet de réduction. Ainsi, les nuances de pamplemousse, et de fruits exotiques de vins de cépage Sauvignon, peuvent parfois évoluer au cours du temps vers des notes minérales et parfois truffées. Le questionnement de chaque vinificateur sur le choix du mode d'élaboration des vins ne s'arrête pas à la production de vins typés mais il tient compte également de son aptitude au vieillissement. En effet, la stabilisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon blanc au cours du vieillissement reste à ce jour une préoccupation majeure.

La teneur en thiols volatils, composés hautement réactifs, diminue fortement, parfois jusqu'à extinction au cours de l'élevage en barriques et du vieillissement en bouteille des vins (Tominaga, 1998; Blanchard *et al.*, 2004; Brajkovich *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2009). Comme nous l'avons démontré aux chapitres 3 et 4, les thiols volatils, par leurs propriétés nucléophiles, peuvent se trouver impliqués dans des réactions d'addition avec des quinones de flavan-3-ols produites en conditions d'oxydation chimique. Ce phénomène produit une perte de pouvoir odorant du vin.

Cependant, très peu d'études approfondies concernent l'incidence de la présence des flavan-3-ols sur l'évolution des teneurs en thiols volatils au cours du vieillissement

Tableau 11. Evolution des teneurs en **3SH, A3SH, 4MSP, 3SPE, 2SPE, (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, acide caftarique, glutathion (GSH), oxygène dissous et dioxyde de soufre** et évaluation de la typicité variétale des vins de Sauvignon blanc issus de deux crus du Bordelais, au cours du vieillissement en bouteilles

Millésime	Variables											
	3SH	A3SH	4MSP	3SPE	2SPE	(+)-Catéchine	(+)-Epicatéchine	A. Caftarique	GSH	O ₂	SO ₂	Typicité
<i>Cru du Médoc</i>												
2009	505,3 ^a ± 84,2 ^b	70,1 ^a ± 7,2	15,2 ^a ± 0,4	17,9 ^a ± 5,2	nd	5,0 ^c ± 0,0	3,9 ^c ± 0,0	64,2 ^c ± 1,7	5,5 ^c ± 4,2	416 ^d ± 490	18 ^c ± 6	5,7 ^e ± 0,4
2008	404,1 ± 67,8	nd	16,6 ± 0,5	70,2 ± 5,5	4,0 ^a ± 0,1	3,8 ± 0,2	2,7 ± 0,0	56,5 ± 2,8	0,3 ± 0,1	22 ± 16	43 ± 21	2,5 ± 0,1
2007	506,2 ± 57,4	nd	24,4 ± 1,2	259,1 ± 27,8	23,7 ± 2	4,9 ± 0,0	4,5 ± 0,1	68,6 ± 1,3	0,2 ± 0,0	35 ± 34	17 ± 14	3,0 ± 0,4
2006	511,9 ± 75,9	nd	nd	518,5 ± 96,1	25,0 ± 5	4,4 ± 0,2	3,5 ± 0,0	67,1 ± 0,6	0,4 ± 0,1	29 ± 14	4 ± 1	2,0 ± 0,0
2005	137,2 ± 7,7	nd	nd	435,4 ± 59,0	11,4 ± 5	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,9	28,0 ± 1,5	0,2 ± 0,2	142 ± 88	4 ± 2	1,7 ± 0,1
2004	130,3 ± 6,0	nd	nd	543,8 ± 62,2	21,2 ± 3	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,0	29,7 ± 0,2	nd	70 ± 27	6 ± 2	0,5 ± 0,0
2003	259,3 ± 51,4	nd	nd	337,6 ± 6,5	11,1 ± 0,5	6,9 ± 3,7	3,0 ± 1,0	13,4 ± 1,2	nd	23 ± 13	4 ± 2	1,5 ± 0,1
2002	319,7 ± 11,7	nd	nd	454,8 ± 40,7	18,6 ± 6	13,3 ± 1,3	5,0 ± 0,2	11,9 ± 0,0	nd	31 ± 19	5 ± 3	1,0 ± 0,0
2001	208,0 ± 6,6	nd	nd	549,8 ± 23,6	18,2 ± 1	15,4 ± 0,5	1,8 ± 0,0	10,6 ± 0,2	nd	30 ± 29	3 ± 2	1,2 ± 0,1
2000	120,8 ± 24,9	nd	nd	689,2 ± 28,2	25,4 ± 6	12,7 ± 1,2	2,1 ± 0,2	13,1 ± 0,2	nd	16 ± 4	4 ± 2	1,0 ± 0,3
1999	180,7 ± 53,4	nd	nd	796,6 ± 116,9	35,0 ± 6	13,2 ± 3,4	1,8 ± 0,1	8,6 ± 1,6	nd	20 ± 14	4 ± 2	*
1998	355,4 ± 83,5	nd	nd	706,7 ± 30,8	22,6 ± 6	18,8 ± 0,5	1,6 ± 0,0	11,8 ± 0,1	nd	7 ± 4	2 ± 0	*
1997	289,5 ± 75,8	nd	nd	672,8 ± 476,7	35,7 ± 9	8,0 ± 0,6	2,0 ± 0,0	10,5 ± 0,0	nd	3 ± 1	2 ± 1	*
1996	212,5 ± 93,9	nd	nd	942,1 ± 417,6	31,2 ± 11	9,6 ± 0,3	5,1 ± 0,5	4,9 ± 0,2	nd	1 ± 0	nd	*
1995	124,6 ± 27,9	nd	nd	690,1 ± 155,3	67,8 ± 12	8,1 ± 0,5	1,5 ± 0,0	5,4 ± 0,2	nd	nd	nd	*
1994	135,0 ± 29,6	nd	nd	789,3 ± 112,7	25,7 ± 1	3,7 ± 0,2	2,6 ± 0,4	6,0 ± 0,1	nd	nd	nd	*
1993	124,7 ± 14,5	nd	nd	608,2 ± 61,4	31,0 ± 2	5,2 ± 2,2	4,3 ± 2,1	nd	nd	nd	nd	*
1992	99,6 ± 15,7	nd	nd	610,3 ± 2,8	41,9 ± 1	2,3 ± 0,2	12,0 ± 0,5	nd	nd	nd	nd	*
<i>Cru du Pessac Léognan</i>												
2008	878,2 ± 54,1	nd	14,8 ± 0,2	54,8 ± 5,6	nd	28,2	15,0 ± 0,4	32,2 ± 3,5	1,8 ± 0,1	18 ± 9	27 ± 7	7 ± 0,3
2007	366,1 ± 12,4	nd	20,0 ± 0,2	121,3 ± 8,7	nd	16,4 ± 0,1	7,5 ± 3,1	41,3 ± 1,2	1,3 ± 0,2	290 ± 401	12 ± 4	7 ± 0,1
2006	478,1 ± 24,6	nd	11,3 ± 0,4	131,1 ± 17,2	nd	16,3 ± 5,5	6,4 ± 1,1	59,8 ± 2,3	1,0 ± 0,1	10 ± 2	9 ± 3	5,5 ± 0,2
2005	452,7 ± 41,2	nd	7,8 ± 0,1	212,4 ± 7,3	3,1 ± 4,4	2,6 ± 3,1	0,7 ± 0,0	15,2 ± 2,4	0,8 ± 0,2	29 ± 26	5 ± 1	5,5 ± 0,1
2004	328,8 ± 74,1	nd	3,7 ± 0,2	163,8 ± 45,2	6,3 ± 1,4	6,1 ± 0,1	3,1 ± 0,5	16,7 ± 1,2	nd	11 ± 4	3 ± 1	5,1 ± 0,1
2003	117,5 ± 15,7	nd	2,2 ± 0,3	185,1 ± 19,0	4,1 ± 1,7	4,4 ± 1,4	9,5 ± 0,4	16,2 ± 0,8	nd	12 ± 7	4 ± 2	4,7 ± 0,4
2002	281,7 ± 16,9	nd	1,1 ± 0,1	196,1 ± 6,3	6,8 ± 0,8	6,7 ± 0,3	3,2 ± 0,2	25,4 ± 0,1	nd	14 ± 13	9 ± 2	5,2 ± 0,0
2001	215,9 ± 2,2	nd	5,8 ± 0,1	251,6 ± 16,3	5,7 ± 2,14	4,2 ± 0,6	7,8 ± 0,4	44,1 ± 0,4	nd	17 ± 5	5 ± 1	4,2 ± 0,1
1998	420,5 ± 145,2	nd	nd	223,7 ± 12,7	11,6 ± 5,3	4,0 ± 1,2	9,9 ± 0,7	2,1 ± 0,4	nd	14 ± 5	nd	4,1 ± 0,4
1997	975,0 ± 195,8	nd	nd	794,4 ± 199,3	35,1 ± 19,4	3,0 ± 0,3	10,3 ± 6,3	2,2 ± 0,1	nd	8 ± 4	nd	3,4 ± 0,0
1996	450,1 ± 61,1	nd	nd	350,3 ± 19,0	9,4 ± 2,0	2,6 ± 1,6	11,6 ± 0,8	1,3 ± 0,0	nd	9 ± 2	nd	1 ± 0,4
1995	436,0 ± 58,2	nd	nd	323,3 ± 21,4	8,6 ± 2,4	1,0 ± 1,9	7,2 ± 1,1	2,4 ± 1,2	nd	8 ± 5	nd	5,6 ± 0,0
1994	166,2 ± 2,7	nd	nd	334,6 ± 13,6	11,9 ± 3,5	1,8 ± 0,9	9,1 ± 0,6	1,4 ± 0,3	nd	6 ± 2	nd	1,3 ± 0,0

nd : non détecté ; * : très évolué ; Concentration moyenne exprimée en : ^a (ng/L), ^c (mg/L), ^d (ppb) ; ^b Ecart type évalué sur trois bouteilles ; ^e typicité variétale moyenne (note de 0 à 10)

du vin blanc. Dans ce chapitre, nous nous proposons d'abord, pour une série de 18 millésimes de vins blancs secs provenant de différents crus du vignoble bordelais, de réaliser un bilan de leur composition en divers marqueurs importants ayant des propriétés antioxydantes (glutathion et dioxyde de soufre) ou prooxydantes (oxygène dissous et flavan-3-ols). Le dosage des thiols volatils associés à la typicité de ces vins est aussi considéré. Les objectifs sont de mettre en évidence des corrélations statistiques entre la typicité variétale des vins et les teneurs en thiols volatils avec les teneurs d'autres composés qualifiés de pro ou antioxydants.

Ensuite, afin d'approfondir nos connaissances concernant l'impact de la présence de flavan-3-ols sur l'évolution de la composante aromatique des vins blancs secs, nous avons suivi, au cours du vieillissement en bouteilles de vins de Sauvignon, l'évolution de la teneur en thiols volatils et de divers paramètres pour des vins blancs ayant des compositions différentes en flavan-3-ols.

Par ailleurs, nous avons souhaité préciser l'impact olfactif lié à la supplémentation en (+)-catéchine de vins de Sauvignon, comme récemment observé en solution modèle par Lund *et al.* (2009).

6.1 CORRELATIONS ENTRE LA COMPOSITION PHENOLIQUE DES VINS BLANCS, LEUR EXPRESSION AROMATIQUE ET LEUR CONTENU EN THIOLS VOLATILS. INCIDENCE DU VIEILLISSEMENT EN BOUTEILLES

Dans le but de mieux comprendre et d'évaluer l'incidence de la présence des flavan-3-ols sur la perte de typicité et l'évolution des vins blancs de Sauvignon, nous avons dosé les teneurs en thiols volatils, en monomères (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, en acide caftarique, en oxygène dissous, en dioxyde de soufre et en glutathion (**Tableau 11**). Pour la représentation graphique, la somme des variables (+)-catéchine et (-)-épicatéchine est considérée comme variable unique nommée Flavan-3-ols. Cette étude a été menée sur une série d'échantillons de vins de 18 millésimes consécutifs (de 1992 à 2009) pour deux crus du Bordelais (Pessac Léognan, Médoc). En plus des thiols volatils variétaux (**3SH**, **4MSP**, **A3SH**), nous nous sommes intéressés au dosage de deux autres thiols, le **E3SP** et le **E2SP** en tant que composés se développant au cours du vieillissement en bouteilles (Tominaga *et al.*, 2003b). Les

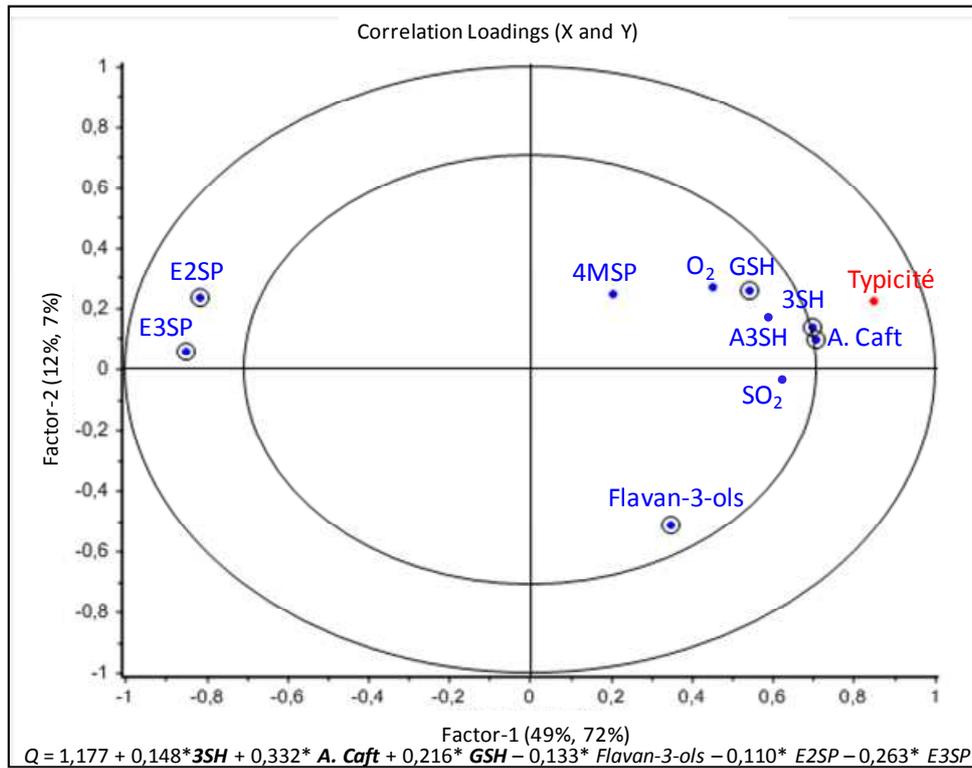


Figure 64. Régression des moindres carrés partielle (PLS) des paramètres physicochimiques (X) et la note de la typicité moyenne des vins de Sauvignon blanc pour 18 millésimes consécutifs issus de deux crus différents (Pessac Léognan, Médoc). Les variables entourées sont celles identifiées comme significatives

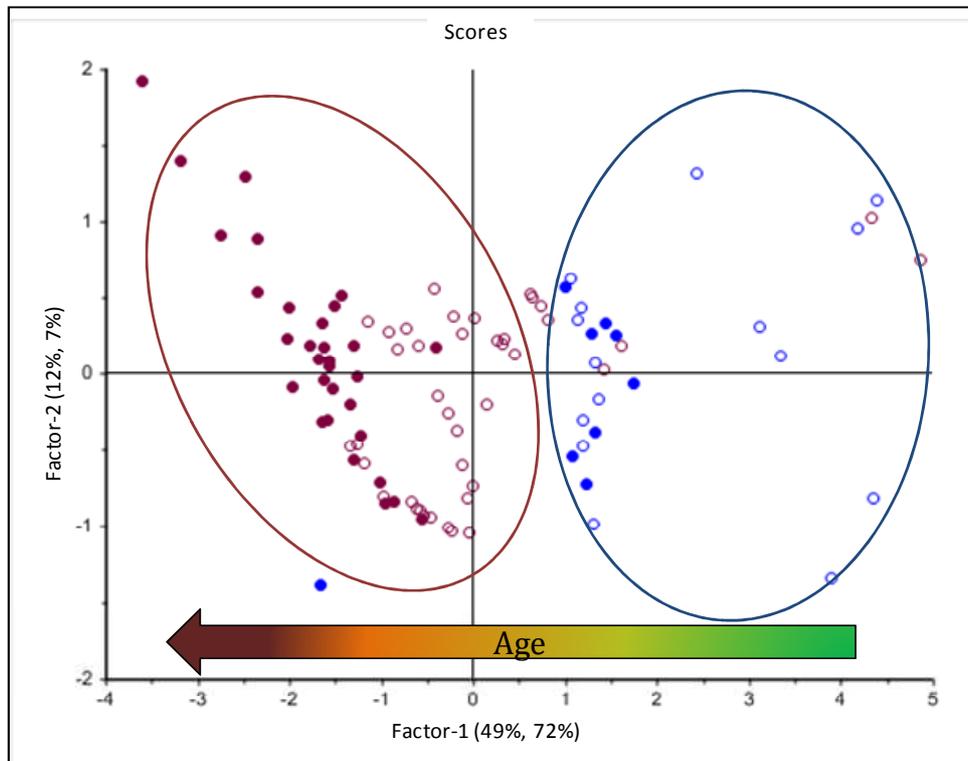


Figure 65. Projection des vins de Sauvignon blanc de 18 millésimes consécutifs issus de deux crus différents (Pessac Léognan en bleu, Médoc en rouge) sur les deux premières dimensions. Classification chronologique. Les millésimes les plus âgés (plus de 10 ans) sont indiqués en couleur et les plus récents (moins de 10 ans) en blanc

échantillons de vins ont été dégustés par un jury de professionnels et notés selon leur typicité variétale sur une échelle de 0 à 10 (du moins au plus typés).

Dans un premier temps, on a recherché le lien entre les notes moyennes de la typicité des vins (individus) et les données analytiques de chaque variable. La matrice des données est composée des concentrations de chacun des dix paramètres physicochimiques (variables) [**3SH**, **4MSP**, **A3SH**, **E3SP**, **E2SP** oxygène dissous, dioxyde de soufre, glutathion (GSH), la somme des monomères de flavan-3-ols (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, l'acide caftarique] et de la note moyenne de typicité. Ensuite, une étude discriminative de ces 31 vins a été effectuée en fonction de leur âge et des paramètres physicochimiques décrits précédemment.

Cette étude statistique a été réalisée selon le modèle PLS (régression des moindres carrés partielle) qui permet de représenter dans l'espace l'ensemble des variables et de mettre en évidence des corrélations entre elles. La Régression PLS remplace l'espace initial des (nombreuses) variables explicatives, par un espace de faible dimensionnalité, sous tendu par un petit nombre de variables appelées "facteurs" ou "variables latentes" qui sont construites l'une après l'autre de façon interactive. Ces facteurs sont alors les nouvelles variables explicatives d'un modèle de régression linéaire classique. La matrice des données (X) comprend les résultats de concentrations des dix paramètres physicochimiques étudiés. La deuxième matrice (Y) correspond au score moyen de la typicité aromatique des 31 vins. Les différentes cartographies obtenues sont représentées dans la

Figure 64 et Figure 65.

Le traitement statistique permet d'obtenir un modèle formé par les axes F1 et F2 qui expliquent 61 % de la variance totale (

Figure 64). Les deux premiers axes expliquent respectivement 49 % et 12 % pour les variables correspondant à l'espace physico-chimique et à la note de typicité. D'après la

Figure 64, nous pouvons observer que la variable relative aux notes de la typicité est projetée du côté positif des deux premiers axes. De ce côté, nous retrouvons notamment les thiols volatils variétaux (**3SH**, **A3SH** et **4MSP**), le glutathion (GSH), le dioxyde de soufre libre, l'oxygène dissous et l'acide caftarique. Parmi ces variables,

seulement celles correspondant au **3SH**, au GSH, à l'**A3SH** et à l'acide caftarique sont significatives dans notre modèle et par conséquent peuvent être considérées comme variables prédictives de la typicité variétale. De plus, la disposition des facteurs significatifs fait apparaître clairement que l'acide caftarique est anti-corrélé avec les flavan-3-ols. Ainsi ce dernier composé n'a aucun impact négatif sur la typicité variétale. Les deux thiols volatils, le **E2SP** et le **E3SP**, marqueur du vieillissement des vins (Tominaga *et al.*, 2003b) se situent du côté négatif de l'axe 1 et sont donc anti-corrélés avec la typicité, prédisant l'évolution du vin au cours du vieillissement en bouteilles. En revanche, la somme des monomères de flavan-3-ols, située dans la partie négative du premier axe se retrouve éloignée de la typicité sans être complètement à l'opposé. Le premier plan distingue donc les variables à effet négatif des variables à effet positif sur la typicité variétale.

La distribution de la matrice des données dans l'espace (**Figure 65**), fait ressortir nettement deux groupes d'individus. Le premier groupe entouré en bleu correspond aux vins provenant de l'appellation Pessac Léognan. Le second indiqué en rouge comprend les vins d'un cru du Médoc. Par conséquent, l'analyse quantitative est cohérente avec l'analyse sensorielle et permet de séparer distinctement les vins par rapport au cru d'origine.

En outre, la cartographie des vins (**Figure 65**) fait apparaître que les vins du cru de Pessac Léognan sont parfaitement corrélés avec la typicité variétale, représentant de bons exemples de vins de Sauvignon blanc avec un important potentiel de garde. En revanche, l'apparente évolution aromatique des vins du cru Médocain notée par l'analyse sensorielle (**Tableau 11**) est bien corrélée avec la genèse des thiols volatils marqueurs de l'évolution (**E2SP**, **E3SP**) et anti-corrélée à la typicité variétale. Il semble, par conséquent, que les facteurs étudiés influencent directement le positionnement des échantillons de vins et les discriminent en fonction de leur provenance.

Par ailleurs, comme le montre la **Figure 65**, le premier axe oppose les vins jeunes (moins de 10 ans, en blanc) aux vins plus âgés (plus de 10 ans, en couleur) pour l'ensemble des échantillons des vins de vins.

Finalement, l'analyse statistique des données multivariées a permis une analyse discriminante d'une série de vins de 18 millésimes consécutifs issus de deux crus du bordelais. Un tel modèle, appliqué sur un important nombre d'échantillons de vins, nous

permet de confirmer l'existence d'une forte corrélation avec les concentrations en **3SH**, en tant que marqueur de la typicité aromatique des vins de Sauvignon blanc, ainsi qu'un effet négatif lié à la présence de monomères des flavan-3-ols sur leur typicité variétale. De plus, le fait que l'acide caftarique se positionne du côté des facteurs prédictibles de la typicité variétale, en s'éloignant du facteur « flavan-3-ols », suppose que ces composés phénoliques contribuent peu ou pas à la perte d'arôme variétal. Par ailleurs, nous confirmons la pertinence des paramètres étudiés sur la notion d'évolution des vins, puisque la projection de l'ensemble des vins présente une bonne corrélation avec l'âge de ceux-ci.

6.1.1 DISCUSSION

Ces résultats valident la contribution des facteurs étudiés sur la typicité variétale des vins de Sauvignon blanc. Parmi les paramètres étudiés, les thiols variétaux, le glutathion et l'acide caftarique sont considérés comme contributeurs de la typicité variétale. En revanche, il semble que le jugement de la perte de typicité variétale puisse être corrélé avec les teneurs en **E3SP** et en **E2SP** des vins. Toutefois, notre plan expérimental nous a permis de juger la contribution des flavan-3-ols sur la perte de typicité. Nous mettons en évidence un effet négatif de ces composés sur la typicité variétale.

6.2 INCIDENCE DE L'ADDITION DE FLAVAN-3-OLS SUR L'EVOLUTION DES TENEURS EN THIOLS VOLATILS DANS DES VINS BLANCS AU COURS DU VIEILLISSEMENT EN BOUTEILLES

Nous nous proposons de vérifier expérimentalement dans cette partie que la supplémentation de (+)-catéchine ou (-)-épicatéchine dans des vins de Sauvignon lors de la mise en bouteilles impacte sur la composition aromatique des vins.

6.2.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

L'expérimentation, conduite sur deux ans, a été réalisée sur un vin blanc du domaine Despagne (Entre deux Mers, Bordeaux, France) élaboré à partir de raisins du cépage Sauvignon blanc récoltés en 2007. L'ajout des monomères des flavan-3-ols [(+)-catéchine et (-)-épicatéchine] (25 mg/L) est effectué au cours de la mise en

bouteilles. Les bouteilles utilisées (Saint-Gobain, Cognac, France) possèdent une capacité nominale de 75 cL à un niveau de remplissage de 63 mm à partir du buvant. Les bouteilles ont été obturées par des capsules à vis (Stelvin®) et stockées dans une chambre thermostatée à 16°C pendant 24 mois. Résultats

Les résultats des dosages effectués sur les vins analysés immédiatement après la mise en bouteilles sont rassemblés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12. Caractéristiques analytiques des vins blancs supplémentés ou non en flavan-3-ols (Analyse effectuée immédiatement après la mise en bouteilles)

Paramètres évalués	Modalités		
	Témoin ^a	(+)-Catéchine ^a	(-)-Epicatéchine ^a
TAV %	12,4	12,4	12,3
pH	3,4	3,4	3,4
Acidité Totale (g/L H ₂ SO ₄)	3,4	3,3	3,3
Acidité Volatile (g/L H ₂ SO ₄)	0,3	0,39	0,3
SO ₂ libre (mg/L)	21,0	21,0	21,0
SO ₂ total (mg/L)	48,0	45,0	45,0
Oxygène dissous (mg/L)	1,7	1,7	1,7
Glutathion (mg/L)	7,0	7,0	7,0
(+)-Catéchine (mg/L)	6,1	31,1	6,1
(-)-Epicatéchine	3,4	3,4	28,4
3SH (ng/L)	1634 ± 124	1729 ± 85	1721 ± 142
A3SH (ng/L)	125 ± 14	134 ± 7	141 ± 26
4MSP (ng/L)	nd	nd	nd

^a Valeurs moyennes sur trois bouteilles ; TAV % : titre alcoométrique volumique ; nd : non détecté

A T0, les teneurs en dioxyde de soufre libre et total mesurées dans les vins, correspondent aux valeurs normalement rencontrées dans des vins jeunes. Les teneurs en oxygène dissous pour les trois modalités d'étude sont équivalentes (1,74 mg/L). Ces concentrations sont faibles par rapport à celles rapportées dans la littérature. Selon Vidal *et al.* (2004), il n'est pas rare de mesurer des teneurs en oxygène dissous proches de 4 mg/L pour certaines chaînes de mise en bouteilles ayant des cadences très élevées (supérieures à 8000 bouteilles/h). De plus, les teneurs en **3SH** et en **A3SH** des trois modalités sont assez élevées et la teneur en glutathion (7 mg/L) est assez importante. La **4MSP** n'a pas été détectée dans ce vin.

Cinq mois après la mise en bouteilles (**Figure 66, A**), une diminution homogène des teneurs en **3SH** et en son acétate (**A3SH**) est observée dans les trois modalités. Ce résultat peut s'interpréter par la dégradation des thiols volatils au cours du vieillissement vraisemblablement à cause de la teneur en oxygène introduite dans le vin

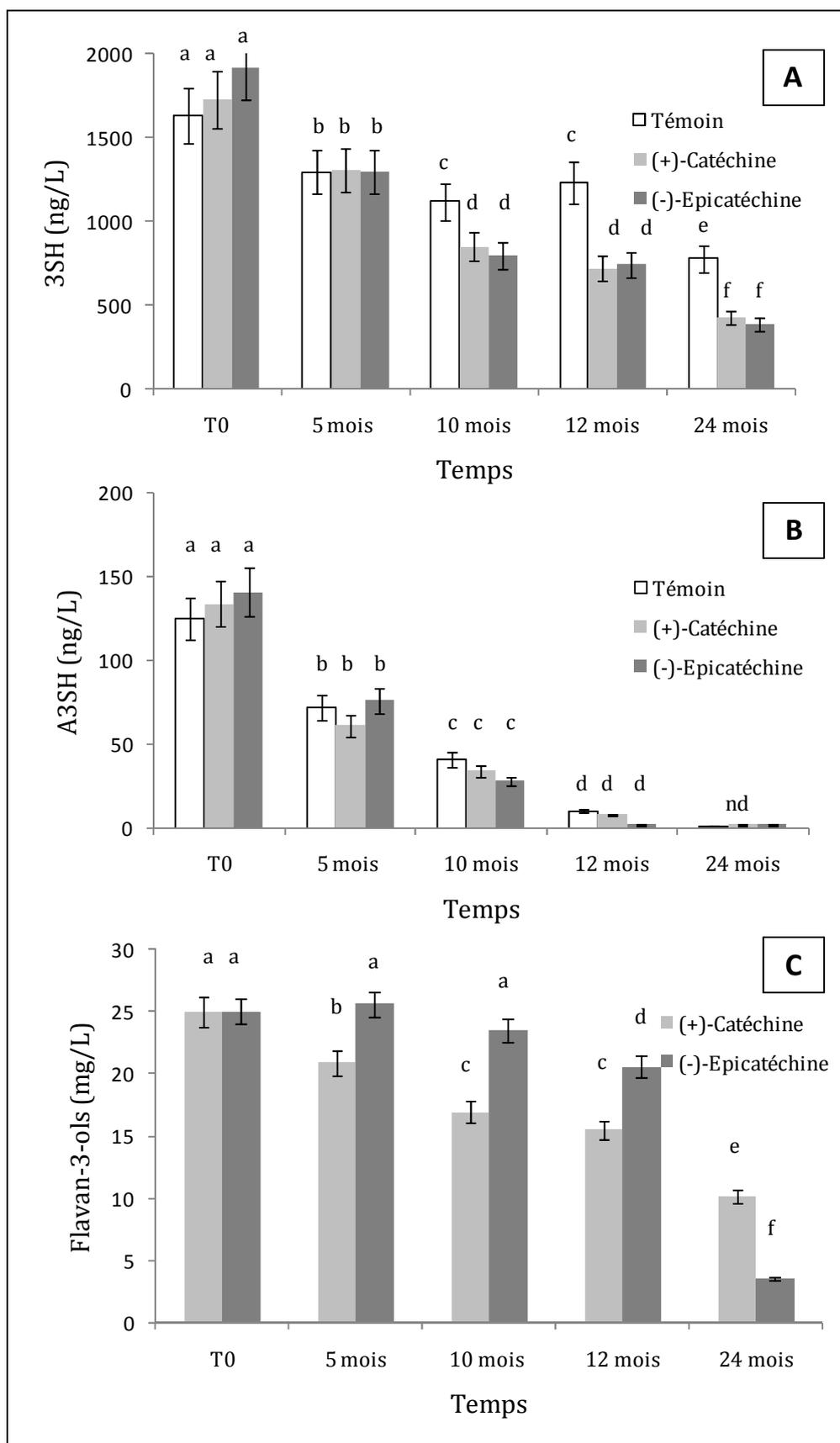


Figure 66. Evolution des teneurs en **(A) 3SH**, **(B) en A3SH** et **(C) en (+)-catéchine** et **(-)-épicatéchine** d'un vin de Sauvignon blanc au cours de 24 mois de vieillissement en bouteilles, conservé à 16°C. nd : non détecté

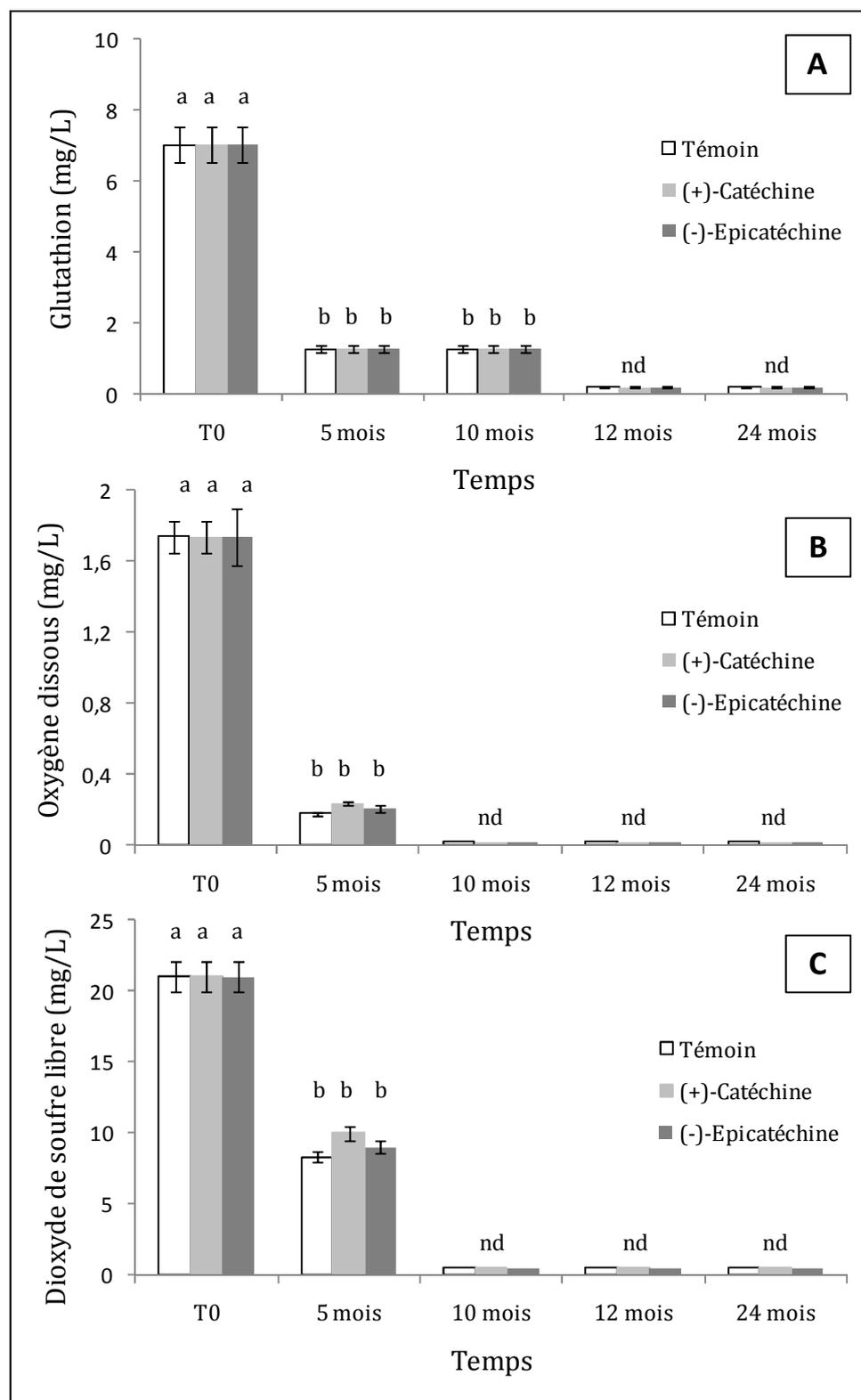


Figure 67. Evolution des teneurs en **(A)** glutathion, **(B)** oxygène dissous et **(C)** dioxyde de soufre libre d'un vin de Sauvignon blanc supplémenté en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine au cours de 24 mois de vieillissement en bouteilles, conservé à 16°C. nd : non détecté

au cours de la mise en bouteilles, comme indiqué par Lopes *et al.* (2009) et non à la présence des flavan-3-ols. Une légère diminution (de l'ordre de 16 %) est observée sur la concentration en (+)-catéchine (**Figure 66, C**). Contrairement à ce que nous pouvions imaginer, la dégradation de la (-)-épicatéchine est beaucoup plus lente que celle de la (+)-catéchine après cinq mois de conservation en bouteilles. A ce stade de conservation, le glutathion, l'oxygène dissous et le dioxyde de soufre libre sont presque intégralement consommés (**Figure 67**). A la lumière de ces résultats, nous concluons qu'au cours des premiers mois de la conservation des vins blancs en bouteilles, les concentrations en **3SH** et en **A3SH** diminuent de manière régulière et indépendante de la présence des flavan-3-ols.

L'effet direct de l'addition de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine sur la perte de **3SH** dans les vins au cours du vieillissement en bouteilles est beaucoup plus marqué après 10 mois de conservation (**Figure 66, A**). Par conséquent, une fois que le glutathion est totalement consommé dans le vin, l'oxydation chimique des flavan-3-ols semble s'accroître. La diminution de la teneur en **3SH** dans le vin supplémenté en (+)-catéchine est similaire à celle observée dans le cas de la (-)-épicatéchine. Malgré la forte réactivité de la (-)-épicatéchine avec le **3SH** comme démontrée en solution modèle, il apparaît que, dans le vin blanc, les différences de réactivité de ces deux composés phénoliques avec le **3SH** s'estompent. A ce stade de l'étude, la teneur en **A3SH** apparaît fortement atténuée dans toutes les modalités (**Figure 66, B**). Néanmoins, cette diminution peut être attribuée plus à son hydrolyse qu'à la présence des flavan-3-ols.

Après 24 mois de conservation en bouteilles, le phénomène de diminution des concentrations en **3SH** en présence de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine est bien établi (**Figure 66, A**). La présence des flavan-3-ols provoque une diminution importante de l'ordre de 45 %, de la concentration en **3SH** des vins par rapport à la modalité témoin. Cette diminution est accompagnée d'une baisse conséquente des concentrations des deux monomères des flavan-3-ols (**Figure 66, C**). A ce stade de l'étude, les teneurs en (-)-épicatéchine sont inférieures d'un facteur 2,5 à celles de la (+)-catéchine. Ce résultat semble indiquer une accélération de l'oxydation de la (-)-épicatéchine après 10 mois de conservation en bouteilles. En revanche, la (+)-catéchine diminue régulièrement au cours du temps.

Tableau 13. Caractéristiques analytiques des vins blancs supplémentés ou non en flavan-3-ols (Analyse effectuée immédiatement après la mise en bouteilles)

Paramètres évalués	Modalités		
	Témoin ^a	(+)-Catéchine ^a	(-)-Epicatéchine ^a
TAV %	11,9	11,9	11,9
pH	3,3	3,3	3,3
Acidité Totale	3,7	3,7	3,7
Acidité Volatile	0,2	0,2	0,2
SO ₂ libre (mg/L)	24,0	24,0	24,0
SO ₂ total (mg/L)	97,0	95,0	94,0
Oxygène dissous (mg/L)	2,3	2,3	2,3
Glutathion (mg/L)	4,0	4,0	4,0
(+)-Catéchine (mg/L)	7,3	32,3	5,2
(-)-Epicatéchine (mg/L)	5,2	5,2	30,2
3SH (ng/L)	2301 ± 74	2301 ± 74	2301 ± 74
A3SH (ng/L)	278 ± 14	278 ± 14	278 ± 14
4MSP (ng/L)	nd	nd	nd

^a Valeurs moyennes sur trois bouteilles ; nd : non détecté

Tableau 14. Teneurs en glutathion, en oxygène dissous et en dioxyde de soufre libre d'un vin de Sauvignon blanc supplémenté en flavan-3-ols, et obturé par un bouchon synthétique, après 12 mois de vieillissement en bouteilles (conservation à 20°C)

Paramètres évalués	Modalités		
	Témoin ^a	(+)-Catéchine ^a	(-)-Epicatéchine ^a
3SH (ng/L)	1836 ± 28	934 ± 78	963 ± 12
A3SH (ng/L)	nd	nd	nd
(+)-Catéchine (mg/L)	6,3 ± 0,7	18,9 ± 1,3	5,7 ± 0,8
(-)-Epicatéchine (mg/L)	5,2 ± 0,8	5,4 ± 0,6	20,0 ± 1,2
Glutathion (mg/L)	nd	nd	nd
Oxygène dissous (mg/L)	trace	trace	trace
SO ₂ libre (mg/L)	15	13,5	13
SO ₂ total (mg/L)	56,0	56,0	56,0

^a Valeurs moyennes sur trois bouteilles ; nd : non détecté

6.2.1.1 Impact de l'obturateur

Cette expérimentation est répétée en 2009 sur un vin de Sauvignon blanc (millésime 2008) provenant du même domaine. Le vin est mis en bouteilles dans les conditions décrites plus haut en ajoutant respectivement 25 mg/L de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine. Les bouteilles ont été obturées par un bouchon synthétique (Nomacorc light) ayant, selon le constructeur, une perméabilité importante à l'oxygène de l'ordre de 0,044 mL d'oxygène par jour par bouchon/bouteille. Les bouteilles ont été stockées dans une chambre thermostatée à 20° pendant 12 mois.

Dans la suite de notre expérimentation, lorsque nous parlerons de perméabilité à l'oxygène de l'obturateur, nous considérerons le transfert au travers de l'obturateur et au niveau de l'interface verre/obturateur.

Les résultats des dosages effectués sur les vins analysés immédiatement après la mise en bouteilles sont rassemblés dans le **Tableau 13**.

Nous avons démontré dans le paragraphe précédent que la présence des flavan-3-ols aux concentrations retrouvées dans les vins blancs pouvait conduire à une perte conséquente de la teneur en **3SH**, de l'ordre de 50 %, dans une période courte de la conservation du vin en bouteilles obturées par une capsule à vis peu perméable à l'oxygène.

La répétition de l'expérience de supplémentation des vins avec 25 mg/L de (+)-catéchine ou (-)-épicatéchine au moment de la mise en bouteilles, avec un obturateur plus perméable à l'oxygène, valide l'influence néfaste de la présence des flavan-3-ols sur la perte des thiols variétaux dans un espace de temps court de 12 mois de conservation en bouteilles (**Tableau 14**). De plus, nous avons pu démontrer que l'utilisation d'un obturateur perméable à l'oxygène peut accélérer ce mécanisme. En effet, le bouchage des vins avec un obturateur synthétique représentant une grande perméabilité à l'oxygène renforce la perte de **3SH** en présence de la (+)-catéchine ou la (-)-épicatéchine de l'ordre de 10 % par comparaison avec la modalité obturée par capsule à vis. Nous constatons, l'hydrolyse complète d'**A3SH** après 12 mois de conservation en bouteilles.

6.2.2 DISCUSSION

La présence de flavan-3-ols dans le vin blanc induit une accélération de la perte des teneurs en **3SH** après 10 mois de conservation en bouteilles. Les propriétés stabilisantes du glutathion vis-à-vis de la conservation des thiols volatils sont vraisemblablement la cause de cette diminution retardée. Les conditions de cette étude ont privilégié le choix d'un obturateur peu perméable à l'oxygène. Lorsque l'obturateur a une plus grande perméabilité à l'oxygène, la diminution des teneurs en thiols volatils est plus importante.

L'incidence du type d'obturateur sur l'évolution des thiols volatils variétaux a déjà été mentionnée dans la littérature (Brajkovich *et al.*, 2005; Herbst *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2009) et le niveau de diminution de la concentration en **3SH** est conforme à ce qui a été décrit dans la littérature. Cependant, la composition du vin en certains flavan-3-ols, en lien avec le type d'obturateur, est un second paramètre clé affectant l'évolution du marqueur de la typicité variétale des vins de Sauvignon dans les premières années de sa conservation en bouteilles.

Ces résultats sont, en outre, cohérents avec le mécanisme réactionnel des flavan-3-ols oxydés avec les thiols volatils qui a été démontré dans le chapitre 4. L'oxygène dissous dans le vin au travers de l'obturateur peut provoquer la formation de quinones de la catéchine ou de la (-)-épicatéchine qui réagissent avec les thiols. Dans les vins liquoreux de pourriture noble, dont le contenu en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine est toujours plus faible que celui déterminé dans les vins blancs secs des mêmes cépages (§ 5.4), la présence significative de thiols volatils, dont le **3SH**, après plusieurs années de bouteilles (Sarrazin *et al.*, 2007b) est aussi cohérente avec le mécanisme décrit au chapitre 4, la carence de flavan-3-ols, limitant de fait les réactions d'addition de Michaël sur leurs quinones.

6.3 IMPACT DES FLAVAN-3-OLS SUR LA PERCEPTION SENSORIELLE DES VINS DE SAUVIGNON

6.3.1 ANALYSE SENSORIELLE DES VINS SUPPLEMENTES EN FLAVAN-3-OLS AU COURS DU VIEILLISSEMENT EN BOUTEILLES

Pour chercher à répondre complètement à notre questionnement de départ concernant les mécanismes réactionnels impliqués dans la perte des thiols volatils au cours du vieillissement, des corrélations entre les données analytiques et les analyses sensorielles des vins supplémentés en flavan-3-ols ont aussi été recherchées.

Ainsi, constatant un effet accélérateur des flavan-3-ols sur la perte de thiols volatils après 10 mois de conservation, les vins du millésime 2007, supplémentés en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, qui ont été étudiés au paragraphe précédent ont été soumis à analyse sensorielle après 10 mois, 12 mois et 24 mois de conservation.

La dégustation se déroule dans une salle de dégustation climatisée (19°C), composée de cabines individuelles. Le jury est composé de 12 dégustateurs, entraînés sur les nuances aromatiques des vins de Sauvignon et habitués aux séances de dégustations analytiques. Le jury reste inchangé tout au long de l'expérimentation.

Afin d'évaluer l'impact organoleptique de l'addition des flavan-3-ols à la mise en bouteilles, nous avons réalisé une dégustation triangulaire. Il est demandé au jury de retrouver parmi trois verres, le seul verre différent et de préciser la différence perçue. Chaque séance de dégustation est composée de deux tests triangulaires pour les deux modalités supplémentées en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine. Le **Tableau 15** rassemble les résultats des dégustations effectuées à 10 mois, à 12 mois et à 24 mois de conservation en bouteilles par un même jury de dégustateurs.

Tableau 15. Résultats de tests triangulaires réalisés sur des vins supplémentés en flavan-3-ols (25 mg/L) à la mise en bouteilles, conservés à 16°C pendant 24 mois

Modalités	10 mois	12 mois	24 mois
(+)-Catéchine	Ns	Ns	Ns
(-)-Epicatéchine	Ns	Ns	Ns

Ns : non significatif

Les analyses sensorielles ne présentent pas différence significative au seuil de $p \leq 0,05$ sur la modification de la typicité des vins de Sauvignon supplémentés en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine. Pourtant, préalablement, une perte conséquente de la teneur en **3SH** (de l'ordre de 40 % entre la modalité témoin et les modalités supplémentées en flavan-3-ols) a été clairement démontrée après 24 mois de conservation en bouteilles. Cette diminution ne semble pas suffisante, à ce stade, pour entraîner une modification au niveau sensoriel. Il est possible que le coefficient de Stevens de **3SH** n'induisse pas une augmentation significative d'intensité odorante perçue dans la gamme de concentrations considérées (Stevens, 1957). Pour cette raison, il nous est apparu important de préciser l'impact direct de la présence de certains flavan-3-ols sur la perception de la typicité variétale.

6.3.2 INCIDENCE DE LA PRESENCE DE CERTAINS FLAVAN-3-OLS SUR LA MODIFICATION DE LA PERCEPTION SENSORIELLE DE VINS DE SAUVIGNON BLANC

La corrélation entre la diminution des concentrations en thiols volatils (liée à leur réactivité avec les flavan-3-ols) et la modification de la perception de la typicité variétale des vins semble loin d'être établie. Cependant, la réalité sensorielle relève une complexité et une difficulté au niveau de l'entraînement des juges mais aussi au niveau de l'existence d'éventuelles interactions entre la matrice et l'« arôme » du vin. Ces interactions moléculaires sont actuellement mal connues.

Dans le but d'évaluer l'impact sensoriel de la présence des flavan-3-ols sur la typicité aromatique des vins de Sauvignon blanc, trois vins de différentes provenances supplémentés en concentrations croissantes en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine ont été soumis à une analyse orthonasale monodirectionnelle au travers de tests discriminatifs avec un jury de 63 personnes. Dans le cadre de cette étude, nous avons étudié l'impact de la présence de flavan-3-ols à des niveaux de concentration croissants sur la modification de la typicité des vins de Sauvignon appréciée dans le cadre d'un test triangulaire comme décrit précédemment. Pour chaque molécule polyphénolique, cinq tests triangulaires directionnels sont réalisés avec des concentrations croissantes de 50 mg/L à 400 mg/L de chaque substance étudiée (Boidron *et al.*, 1988). Pour cette étude, nous avons déterminé l'impact de l'ajout des flavan-3-ols dans deux vins du Sauvignon

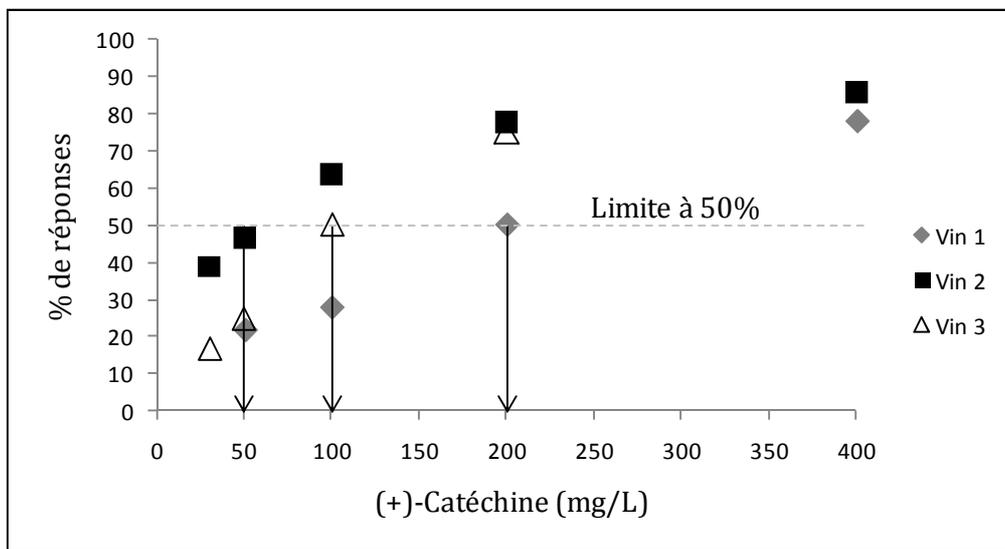


Figure 68. Incidence de teneur en (+)-catéchine sur la perception sensorielle des thiols volatils dans trois vins de Sauvignon blanc (2009)

blanc de la région de Bordeaux (Graves et Entre Deux Mers) ainsi que dans un vin de Nouvelle Zélande (Marlborough). Les échantillons de vins étaient tous du millésime 2008 (analyse réalisée en mai 2010).

L'analyse sensorielle des vins supplémentés en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine a révélé que la présence de la (-)-épicatéchine n'a aucun impact sur la modification de la perception sensorielle des trois vins de Sauvignon blanc. Cependant, la présence de la (+)-catéchine induit une modification sensorielle pour les trois vins étudiés (**Figure 68**). Cette modification sensorielle varie selon la matrice. En effet, pour les trois vins étudiés, nous obtenons trois différents seuils de perception d'une modification sensorielle après l'addition de la (+)-catéchine. La concentration de la (+)-catéchine au dessous de laquelle 50 % des dégustateurs ne font plus la différence avec le témoin non supplémenté est de 50 mg/L pour le vin 2, de 100 mg/L pour le vin 3 et de 200 mg/L pour le vin 1. Ainsi, la présence de la (+)-catéchine à une concentration comprise entre 50 mg/L et 200 mg/L peut induire une modification de la perception sensorielle. Cette gamme de concentration se situe à la limite supérieure de celles retrouvées dans les vins blancs (§ 5.4) de Sauvignon de la région de Bordeaux ainsi que d'autres appellations (**Tableau 3**, § 1.3.2.2). Il nous est donc difficile de conclure que la présence des flavan-3-ols induit directement une modification sensorielle de la typicité variétale des vins de Sauvignon blanc.

6.3.3 DISCUSSION

Aujourd'hui, encore très peu d'études concernent l'impact sensoriel des polyphénols sur l'arôme des vins. Le phénomène de suppression et d'accentuation de l'intensité olfactive des composés volatils corrélée à la présence des composés phénoliques, dans l'eau (Aronson & Ebeler, 2004), reste impossible à reproduire dans la matrice vin. La complexité et la richesse des fractions non-volatiles du vin en lien avec les phénomènes de synergie et d'antagonisme entre les différents composés volatils rendent très difficile l'étude des interactions entre les composés non volatils et volatils. De plus, la démonstration du fait que l'éthanol masque la perception de certains composés volatils rend l'utilisation d'une solution modèle proche du vin inappropriée à l'étude de ce type d'interactions moléculaires (Escudero *et al.*, 2007).

Ferreira *et al.* (2007) pour s'affranchir de la complexité de la matrice a proposé pour l'étude de ces interactions moléculaires, l'utilisation d'une matrice expérimentale constituée d'un vin neutre dilué au demi. Cette pratique adaptée par Lund *et al.* (2009), met en évidence la suppression de l'intensité du **3SH** en présence de la (+)-catéchine (10 mg/L) ou de la quercétine (10 mg/L) et l'accentuation de l'odeur quand l'acide caféique est ajouté dans le vin dilué au demi. Néanmoins, cette méthode inclut l'artefact de la dilution de la matrice et ne semble donc pas être représentative de la réalité.

Notre étude sensorielle, réalisée avec un panel de dégustateurs entraînés, ne met pas en évidence d'effet significatif de la (+)-catéchine, aux concentrations habituellement retrouvées dans les vins de Sauvignon, sur la modification de leur typicité.

6.4 CONCLUSION

Sur un nombre conséquent d'échantillons de vins de différents crus du bordelais, sur 18 millésimes consécutifs, nous avons établi, pour la première fois, des corrélations entre des paramètres physicochimiques ayant des propriétés antioxydantes et prooxydantes et la typicité variétale des vins de Sauvignon blanc. Le contenu des vins en **3SH**, **4MSP**, **A3SH** et en glutathion peut être considéré comme un facteur prédictif de la qualité variétale des vins de Sauvignon blanc. De plus, l'**E3SP** et l'**E2SP** sont des marqueurs de l'évolution des vins. En revanche, la somme des monomères des flavan-3-ols n'est pas corrélée à la typicité et à la teneur en **3SH**.

A la lumière de ces résultats, nous avons cherché à évaluer l'incidence de la présence des flavan-3-ols sur la diminution des thiols volatils au cours du vieillissement des vins de Sauvignon blanc. Nous avons démontré que certains flavan-3-ols (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, supplémentés à un niveau de concentration tel que retrouvé dans les vins blancs (25 mg/L), jouent un rôle clé dans l'évolution de leur composition aromatique. En effet, ils accélèrent la diminution de la teneur en **3SH** après une courte période de conservation en bouteilles (10 mois). Enfin, nous mettons en évidence que les mécanismes réactionnels des flavan-3-ols avec les thiols volatils sont présents en conditions d'oxydation chimique et jouent un rôle important sur la perte de l'arôme variétal.

Paradoxalement, la perte conséquente de teneurs en **3SH** (40 %) provoquée par la présence des flavan-3-ols n'est pas suffisante pour avoir une conséquence sensorielle mesurable après 24 mois lorsque le vin est conservé avec un obturateur peu perméable à l'oxygène. Par ailleurs, nous avons démontré, par analyse sensorielle de vins supplémentés en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, que la présence des flavan-3-ols n'induit pas directement une modification sensorielle de la typicité variétale des vins de Sauvignon blanc.

Considérant le vin comme un système dynamique qui évolue au cours du temps aux conditions d'oxydation chimique, la mise en place des mécanismes chimiques impliquant les flavan-3-ols sur l'évolution de l'arôme du vin, semble très vraisemblable.

Les flavan-3-ols sont donc impliqués dans la perte des thiols volatils au cours du vieillissement des vins. En revanche, leurs conséquences sur le profil sensoriel restent encore à préciser au cours du vieillissement. Des études complémentaires devront être réalisées pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes chimiques de l'évolution de l'arôme du vin au cours du vieillissement, et en particulier par l'intermédiaire des agents d'oxydation tels que les flavan-3-ols.

7

Influence de la présence des flavan-3-ols sur la genèse des composés volatils marqueurs du vieillissement oxydatif des vins blancs

Nous avons démontré, dans le chapitre précédent que dans les conditions du vieillissement en bouteilles, les flavan-3-ols ont un impact important sur la perte des thiols volatils. L'oxydation chimique du vin, supposant une évolution de son arôme global, est généralement associée à la formation de composés carbonylés (Wildenradt & Singleton, 1974; Escudero *et al.*, 2000a; Escudero *et al.*, 2000b; Lavigne Cruège *et al.*, 2003; Silva Ferreira *et al.*, 2003a; Bueno *et al.*, 2010; Loscos *et al.*, 2010).

Les principaux composés carbonylés assignés comme marqueurs du vieillissement oxydatif des vins blancs secs sont le phénylacétaldéhyde et le méthional. Ces aldéhydes sont connus sous le nom des aldéhydes de Strecker lorsqu'ils sont formés à partir de la dégradation des acides aminés avec des composés dicarboxylés (Yaylayan, 2003). En règle générale, tous les composés dicarboxylés constituent des substrats potentiels pour cette réaction. En effet, les composés phénoliques lors de leur oxydation en *o*-quinones peuvent être impliqués dans les réactions de formation des composés volatils par l'intermédiaire de la réaction de Strecker (chapitre 1, **Figure 21**) (Mathew & Parpia, 1971; Rizzi, 2006). S'inspirant des travaux de Rizzi (2006) sur la formation des aldéhydes de Strecker (phénylacétaldéhyde, méthional) résultant de la réaction des acides aminés (L-phénylalanine et L-méthionine) avec les composés phénoliques oxydés [(+)-catéchine, (-)-épicatéchine, acide caféique] en solution modèle, nous avons imaginé

que l'oxydation chimique des composés phénoliques puisse interférer dans la voie de formation des aldéhydes de Strecker dans les vins blancs.

Par ailleurs, l'identification de la réaction d'aldolisation entre l'acétaldéhyde et l'acide α -cétobutyrique comme une des voies possibles de la formation du sotolon (3-hydroxy-4,5-diméthyl-2-(5H)-furanone) dans le vin, nous a permis de formuler l'hypothèse que l'oxydation des composés phénoliques *via* la production de l'acétaldéhyde (chapitre 1, **Figure 20**) pourrait intervenir dans la voie de formation du sotolon. Le sotolon est un hétérocycle volatil possédant une intense odeur de curry et de noix dont la contribution à l'arôme de vieillissement défectueux des vins blancs secs est aujourd'hui clairement établie (Escudero *et al.*, 2000a; Lavigne Cruège *et al.*, 2003; Silva Ferreira *et al.*, 2003a). Son seuil de perception dans un vin blanc sec est de 8 $\mu\text{g/L}$ pour le mélange racémique et présente selon les formes énantiomères des valeurs différentes (Lavigne *et al.*, 2008; Pons *et al.*, 2008).

Dans ce chapitre, à partir de résultats rapportés dans la littérature, nous avons étudié la contribution des flavan-3-ols à la genèse des composés volatils marqueurs du vieillissement défectueux des vins blancs tels que le sotolon, le phénylacétaldéhyde et le méthional.

Tableau 16. Concentrations en sotolon, en phénylacétaldéhyde, en méthional, en (+)-catéchine, en (-)-épicatéchine dans des vins de Sauvignon blanc de trois crus du Bordelais issus de divers millésimes

Millésime	Variables				
	Sotolon ^a	Phénylacétaldéhyde ^a	Méthional ^a	(+)-Catéchine ^c	(-)-Epicatéchine ^c
<i>Cru du Médoc</i>					
2009	1,6 ± 0,7 ^l	1,1 ± 0,5	traces	5,0 ± 0,0	3,9 ± 0,0
2008	1,5 ± 0,4	1,5 ± 1,1	0,2 ± 0,0	3,8 ± 0,2	2,7 ± 0,0
2007	2,4 ± 1,2	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	4,9 ± 0,0	4,5 ± 0,1
2006	1,8 ± 0,7	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,1	4,4 ± 0,2	3,5 ± 0,0
2005	0,7 ± 0,3	traces	3,0 ± 1,1	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,9
2004	traces	traces	1,2 ± 2,1	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,0
2003	1,3 ± 1,2	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,2	6,9 ± 3,7	3,0 ± 1,0
2002	6,7 ± 0,5	2,6 ± 1,2	1,1 ± 0,3	13,3 ± 1,3	5,0 ± 0,2
2001	11,4 ± 4,2	6,6 ± 2,1	1,2 ± 1,4	15,4 ± 0,5	1,8 ± 0,0
2000	8,3 ± 2,2	8,0 ± 4,1	3,6 ± 0,2	12,7 ± 1,2	2,1 ± 0,2
1999	7,9 ± 1,7	3,9 ± 1,0	8,0 ± 0,5	13,2 ± 3,4	1,8 ± 0,1
1998	17,7 ± 5,2	7,4 ± 3,4	16,1 ± 4,7	18,8 ± 0,5	1,6 ± 0,0
1997	7,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2	9,1 ± 1,6	8,0 ± 0,6	2,0 ± 0,0
<i>Pessac Léognan, Cru I</i>					
2008	1,4 ± 0,4	4,2 ± 1,4	2,2 ± 1,3	28,2 ± 0,2	15,0 ± 0,4
2007	0,8 ± 0,7	12,3 ± 2,8	15,8 ± 3,8	16,4 ± 0,1	7,5 ± 3,1
2006	2,5 ± 0,4	18,8 ± 2,9	2,5 ± 2,7	16,3 ± 5,5	6,4 ± 1,1
2005	2,1 ± 1,0	34,5 ± 10,2	3,4 ± 2,6	2,6 ± 3,1	0,7 ± 0,0
2004	2,4 ± 0,3	6,0 ± 2,4	7,0 ± 0,4	6,1 ± 0,1	3,1 ± 0,5
2003	7,2 ± 2,3	5,3 ± 0,6	4,9 ± 1,6	4,4 ± 1,4	9,5 ± 0,4
2002	4,4 ± 2,2	7,4 ± 3,4	6,1 ± 2,1	6,7 ± 0,3	3,2 ± 0,2
2001	6,7 ± 0,1	11,9 ± 2,2	3,7 ± 1,0	4,2 ± 0,6	7,8 ± 0,4
1998	6,6 ± 1,2	10,2 ± 1,3	7,3 ± 1,3	4,0 ± 1,2	9,9 ± 0,7
1997	7,3 ± 3,6	10,4 ± 0,9	6,3 ± 1,2	3,0 ± 0,3	10,3 ± 6,3
1996	4,3 ± 1,1	30,4 ± 14,1	92,2 ± 15,4	2,6 ± 1,6	11,6 ± 0,8
1995	2,1 ± 0,3	22,2 ± 2,3	38,0 ± 13,1	1,0 ± 1,9	7,2 ± 1,1
1994	6,7 ± 0,6	14,7 ± 6,4	20,5 ± 8,2	1,8 ± 0,9	9,1 ± 0,6
<i>Pessac Léognan, Cru II</i>					
2007	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0	traces	traces	traces
2006	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,0	traces	traces	1,3 ± 0,0
2003	0,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	traces	traces	1,4 ± 0,0
2002	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	traces	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,0
2001	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1	traces	1,1 ± 0,5	1,4 ± 0,0
2000	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,5	traces	0,9 ± 0,7	1,4 ± 0,0
1999	0,8 ± 0,1	2,5 ± 1,2	traces	0,9 ± 0,3	0,5 ± 0,1
1998	0,6 ± 0,3	1,5 ± 0,2	traces	0,9 ± 0,6	1,1 ± 0,2

Concentration moyenne exprimée en : ^a (µg/L), ^c (mg/L) ; ^b Ecart type évalué sur trois bouteilles

7.1 CORRELATION ENTRE LA PRESENCE DE FLAVAN-3-OLS ET LA TENEUR EN MARQUEURS DU VIEILLISSEMENT OXYDATIF DES VINS BLANCS

7.1.1 ETUDE DESCRIPTIVE

Dans le but d'évaluer l'incidence des flavan-3-ols sur la genèse de composés marqueurs du vieillissement défectueux des vins blancs au cours de leur vieillissement en bouteilles, nous avons dosé dans différents vins blancs, les teneurs en sotolon, en phénylacétaldéhyde, en méthional ainsi qu'en monomères (+)-catéchine et (-)-épicatéchine. Cette étude a été menée sur une série d'échantillons de vins de millésimes consécutifs (de 2009 à 1992) pour trois crus du Bordelais (Pessac Léognan I et II, Médoc). La sélection de trois crus était basée sur la différence d'aptitude de chacun au vieillissement, établie de manière empirique. Les vins blancs du Médoc ont été utilisés car ils présentent une typicité aromatique plus faible que celles des deux crus de Pessac Léognan, le cru I ayant déjà été analysé au chapitre 6. Les données analytiques sont rassemblées dans le **Tableau 16**. Pour la représentation graphique de notre étude descriptive, la somme de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine est considérée comme une variable unique (Flavan-3-ols).

Afin d'apprécier l'émergence de tendances complémentaires dans l'analyse quantitative, nous avons réalisé une Analyse en Composantes Principales (ACP). L'ACP est une projection permettant de comparer des individus sur la base de leur différence d'aptitude au vieillissement pour plusieurs variables. Dans le cadre de ce traitement statistique, les individus sont représentés par les vins et les variables par les composés dosés ainsi que l'âge des vins. De plus, pour chaque composé, nous avons déterminé le coefficient de corrélation (Kendall-Pearson) entre les teneurs quantifiées dans les vins et les teneurs en flavan-3-ols mais aussi la corrélation entre l'âge du vin.

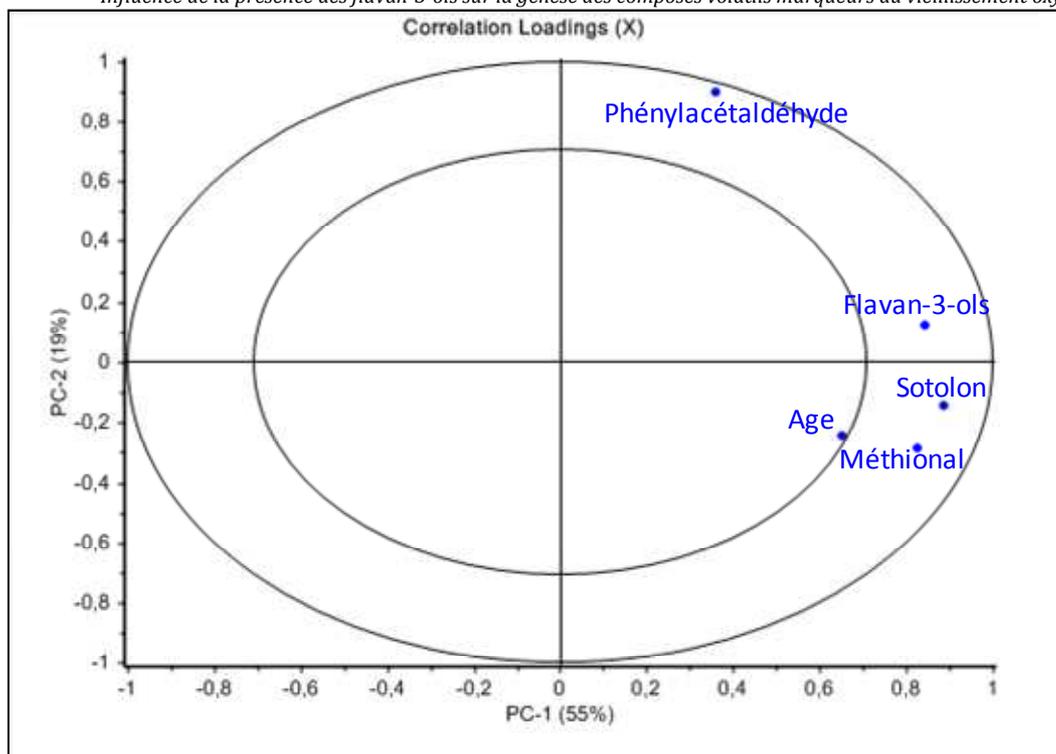


Figure 69. Analyse en Composantes Principales (ACP) des variables des vins dans l'espace défini par les deux premières composantes principales

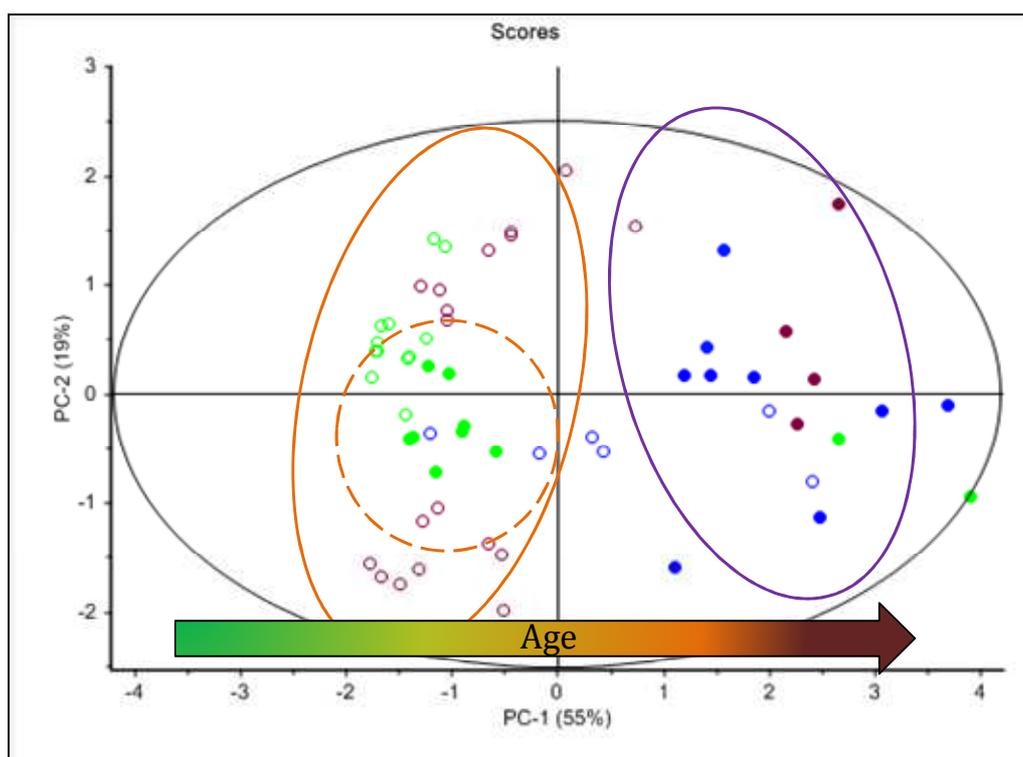


Figure 70. Projection des vins de Sauvignon blanc de 18 millésimes consécutifs issus de trois crus différents (Pessac Léognan I en bleu, Pessac Léognan II en vert, Médoc en rouge) sur les deux premières dimensions. Classification chronologique. Les millésimes les plus âgés (plus de 10 ans) sont indiqués en couleur et les plus récents (moins de 10 ans) en blanc

Comme le montre la **Figure 69**, le traitement statistique permet d'obtenir un plan formé par les axes F1 et F2 qui explique 74 % de la variance totale. L'axe 1 représente à lui seul 55 % de l'inertie totale et l'axe 2, 19 %. D'après la **Figure 69**, nous pouvons observer que la somme des monomères des flavan-3-ols est positionnée du côté positif du premier axe. Les teneurs en composés volatils et l'âge des vins blancs sont projetés le long de l'axe 1. Du côté positif du premier axe, nous trouvons la totalité des variables. En effet, pour de nombreux échantillons de vins, les teneurs en sotolon ($r = 0,578, p < 0,01$), méthional ($r = 0,209, p < 0,05$) sont corrélées positivement à la présence des flavan-3-ols. Ces résultats viennent donc appuyer l'hypothèse de la contribution des flavan-3-ols à la genèse de ces composés carbonylés. D'autre part, les concentrations en méthional ($r = 0,440, p < 0,01$) et surtout en sotolon ($r = 0,517, p < 0,01$) sont corrélées avec l'âge des vins. En revanche, le phénylacétaldéhyde ne présente aucune corrélation significative avec la somme des monomères des flavan-3-ols ainsi que l'âge des vins.

La projection des vins de trois crus sur les deux premiers axes (**Figure 70**) fait ressortir nettement deux groupes d'individus en discriminant les vins selon leur âge. Le groupement des échantillons est effectué en appliquant le seuil critique d'âge à 10 ans pour obtenir une discrimination nette entre les vins des trois crus. Le premier groupe de vins est entouré en orange et correspond aux vins conservés moins de 10 ans en bouteilles. Le second, indiqué en violet, représente les vins les plus âgés, conservés plus de 10 ans en bouteilles. Par conséquent, ce modèle d'étude regroupe la totalité des vins jeunes du côté gauche de la première composante principale en les caractérisant de manière anti-corrélée avec le sotolon et le méthional, les composés marqueurs du vieillissement, synonymes du caractère oxydé.

La cartographie des vins plus âgés (plus de 10 ans) permet une discrimination partielle en fonction du cru d'origine. En effet, la **Figure 70** met en évidence que les vins du cru II de Pessac Léognan (entourés par des pointillés orange) semblent présenter une meilleure aptitude au vieillissement oxydatif, en regard de la concentration des marqueurs associés et se trouvent dans une situation différente de celle des vins des autres crus (entourés en violet) dispersés dans la partie droite de la première composante principale. Les données qui sont rassemblées dans le **Tableau 16** permettent de mettre en évidence que les vins du cru II de Pessac Léognan présentent

Tableau 17. Caractéristiques analytiques des vins blancs étudiés

Paramètres évalués	Vins	
	Vin EDM	Vin PL
TAV %	12,4	12,9
pH	3,3	3,2
Acidité Totale (g/L H ₂ SO ₄)	4,1	4,2
Acidité Volatile (g/L H ₂ SO ₄)	0,2	0,2
Acide ascorbique (mg/L)	50	-
SO ₂ total (mg/L)	76	70
SO ₂ libre (mg/L)	26	31
Oxygène dissous (mg/L)	4	4
(+)-Catéchine (mg/L)	1,2	traces

TAV % : titre alcoométrique volumique

les plus faibles teneurs en sotolon (inférieures à 1 µg/L) et en méthional (traces) ainsi qu'en flavan-3-ols (inférieurs à 3 mg/L) parmi les vins de trois crus analysés. Par conséquent, il semble que la présence des flavan-3-ols influence directement la formation du sotolon, et du méthional dans les vins blancs au cours de leur conservation en bouteilles.

7.1.2 DISCUSSION

Cette étude descriptive étaye notre hypothèse de départ d'un lien entre la concentration en flavan-3-ols et la formation du sotolon, du phénylacétaldéhyde et du méthional, marqueurs de l'évolution oxydative des vins blancs secs. Il semble que l'origine du vin, exprimée par sa composition en flavan-3-ols, peut être considérée comme un facteur prédictif de son potentiel de garde. Dans l'ensemble, ces résultats nous conduisent à formuler l'hypothèse selon laquelle, les flavan-3-ols peuvent influencer la cinétique de formation des composés marqueurs du vieillissement oxydatif des vins blancs. Seul le phénylacétaldéhyde semble moins caractéristique des vins blancs de Sauvignon prématurément vieillis (Bueno *et al.*, 2010).

7.2 INCIDENCE DES FLAVAN-3-OLS SUR LA GENÈSE DES COMPOSÉS MARQUEURS DU VIEILLISSEMENT DÉFECTUEUX DES VINS BLANCS SECS

7.2.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Afin d'étudier l'impact de la (+)-catéchine sur la formation du sotolon et du phénylacétaldéhyde dans le vin blanc au cours de son vieillissement, nous avons réalisé l'expérience suivante : 250 mL d'un vin blanc sec de l'appellation Entre Deux Mers (EDM), millésime 2009 additionnés ou non de 50 mg/L de (+)-catéchine. Les caractéristiques analytiques du vin blanc sont présentées dans le **Tableau 17**. Les différentes modalités sont préparées en duplicata. La concentration en oxygène dissous est ajustée pour tous les échantillons à 4 mg/L, à l'aide d'un réacteur Batch selon le protocole décrit au paragraphe 3.1. Puis les volumes sont répartis dans des flacons de 150 mL, fermés hermétiquement (bouchon en silicone), dont l'espace de tête est balayé par l'azote. Les différentes modalités sont conservées dans une étuve thermostatée à 37°C.

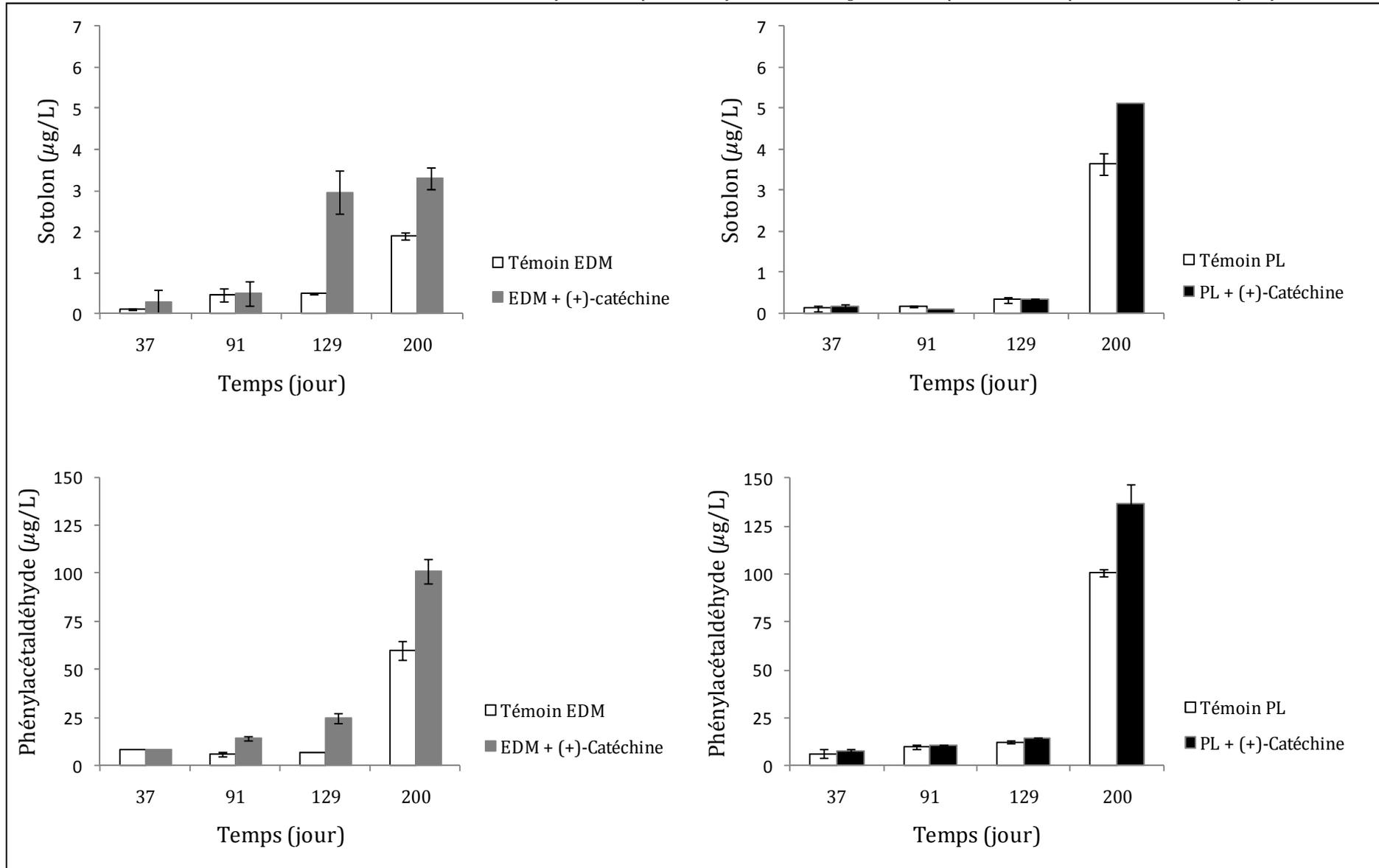


Figure 71. Incidence de la présence de la (+)-catéchine (50 mg/L) sur la formation du sotolon et du phénylacétaldéhyde dans deux vins blancs secs (EDM, PL) conservés à 37°C

Tenant compte de la présence de l'acide ascorbique dans le vin de l'Entre Deux Mers, l'expérimentation est répétée avec un autre vin de Sauvignon blanc (PL) (Pessac Léognan, 2009) dépourvu d'acide ascorbique.

7.3 RESULTATS

Les résultats du dosage du sotolon et du phénylacétaldéhyde dans les vins blancs supplémentés en (+)-catéchine (50 mg/L) sont rapportés en **Figure 71**. L'effet de la (+)-catéchine sur la genèse de ces composés volatils en conditions d'oxydation accélérée (à 37°C) est clairement démontré. Cependant, son impact reste dépendant du type de vin.

Le vin de la modalité EDM contenant 50 mg/L d'acide ascorbique, présente une moins bonne aptitude au vieillissement que le vin de la modalité PL privé d'acide ascorbique. En effet, après 129 jours de conservation à 37°C, une différence significative de l'ordre de 85 % sur la teneur en sotolon est observée dans le vin EDM tandis que dans le vin PL le mécanisme est encore absent (**Figure 71**). Par contre, au delà de 200 jours d'incubation, un effet net de la (+)-catéchine sur la formation du sotolon (augmentation de l'ordre de 33 %) dans le vin PL est établi dans les mêmes conditions expérimentales. L'absence d'acide ascorbique dans le vin PL un des potentiels précurseurs du sotolon, (Pons *et al.*, 2010) contribue vraisemblablement à limiter l'effet de la (+)-catéchine dans la formation du sotolon dans ce vin. En l'état actuel de nos connaissances, le mécanisme de la formation du sotolon dans le vin ayant un pH voisin de 3,3 et conservé à 40°C, est assez lent et présente un rendement relativement faible (de l'ordre de 11 µg/L) après six mois de conservation (Pons, 2006). En effet, dans nos conditions expérimentales, même si les teneurs formées en sotolon restent assez faibles le rôle de la (+)-catéchine dans sa formation est établi.

Nous avons également étudié, l'incidence de la (+)-catéchine sur la formation du phénylacétaldéhyde dans les deux vins blancs. D'après la **Figure 71**, la formation de cet aldéhyde est accentuée par la présence de la (+)-catéchine en conditions d'oxydation accélérée (37°C). Après 91 jours dans l'étuve, le vin EDM supplémenté en (+)-catéchine contient 1,5 fois plus de phénylacétaldéhyde que le témoin non supplémenté. Cette différence est maintenue jusqu'à la fin de l'expérimentation (200 jours). Il faut attendre 200 jours de conservation pour constater des différences significatives (de l'ordre de 25

%) dans le cas du vin PL. Les concentrations retrouvées sont similaires à celles déterminées dans le vin EDM. Cette étude mérite d'être complétée par la cinétique de formation du méthional dans les mêmes conditions expérimentales.

Ainsi, il apparaît donc que l'oxydation de la (+)-catéchine favorise la formation du sotolon et du phénylacétaldéhyde dans les vins blancs conservés en conditions de vieillissement accéléré selon le mécanisme réactionnel présenté précédemment (chapitre 1, § 1.4.3.5). Des études supplémentaires doivent être réalisées afin d'approfondir les paramètres physicochimiques associés à la matrice qui semble gouverner la vitesse des réactions de formation de ces composés carbonylés.

7.4 CONCLUSION

L'analyse des vins blancs de trois crus de Bordeaux sur une série importante de millésimes a permis de mettre en évidence l'impact de la teneur en flavan-3-ols, dans les vins blancs secs sur l'évolution de la formation de marqueurs de leur vieillissement oxydatif. Ainsi, le traitement statistique de l'ensemble des résultats de dosage par ACP a permis d'établir une corrélation positive et significative entre les teneurs en flavan-3-ols des vins et celles en sotolon et en méthional.

Les expériences réalisées dans ce chapitre apportent des éléments nouveaux pour la compréhension des mécanismes de formation du sotolon et des aldéhydes de Strecker associés au phénomène de vieillissement oxydatif dans les vins blancs secs au cours du vieillissement en bouteilles.

En lien avec la démonstration du rôle des flavan-3-ols démontrée au chapitre précédent vis à vis de la perte d'un composé contribuant à l'arôme variétal des vins de Sauvignon, le **3SH**, nous mettons en évidence que ces composés ont une influence sur la formation de marqueurs de l'évolution oxydative de leur arôme. Les paramètres physicochimiques impliqués dans le processus chimique du mécanisme de la formation de ces composés restent cependant à préciser.

TROISIEME PARTIE

Rôle des flavan-3-ols et de l'oxydation au cours de la
vinification sur la composante aromatique des vins

8

Incidence de la présence des flavan-3-ols sur l'évolution des thiols volatils au cours de la vinification

Au cours de ce travail, nous nous sommes également attachés à illustrer l'incidence des flavanols dans le jus de raisin sur l'évolution de la teneur en thiols volatils au cours de la vinification.

Dans ce but, nous avons souhaité en exploitant la méthode de dosage des flavan-3-ols dans le moût, concrétiser les acquisitions empiriques se rapportant à la pauvreté aromatique des vins issus des moûts de dernières pressées. Les cinétiques d'extraction des flavanols, de P-S-Cys-3SH et du glutathion au cours du pressurage des raisins issus de différents crus et pour trois millésimes consécutifs, ont ainsi été étudiées. Enfin, l'évolution des thiols volatils dans les vins au cours de l'élevage en barriques a été également considérée.

Dans un second temps, un moût avec un potentiel aromatique élevé (équivalent à son contenu en P-S-Cys-3SH), a été supplémenté en (+)-catéchine. Les suivis des cinétiques de l'oxydation de la (+)-catéchine en présence d'un extrait de polyphénol oxydase de raisin, de la dégradation du P-S-Cys-3SH et de l'évolution du glutathion au cours de la fermentation alcoolique ont été étudiés. Des corrélations entre la teneur de ces composés et celle des thiols volatils dans le vin fini ont ensuite été recherchées.

8.1 ETUDE DES RELATIONS ENTRE LE CONTENU DES MOUTS EN FLAVAN-3-OLS, GLUTATHION ET PRECURSEUR D'AROME ET LES TENEURS EN THIOLS VOLATILS DES VINS

Considérant l'importance des thiols volatils dans la composante organoleptique des vins blancs secs de Sauvignon et l'absence d'étude complète concernant les effets de différents facteurs physicochimiques ayant des propriétés antioxydantes (glutathion) ou prooxydantes (flavan-3-ols) sur la composition des vins, nous avons estimé opportun :

- de réaliser une étude rationnelle au cours de la vinification concernant l'évolution de paramètres tels que la teneur en flavan-3-ols, en P-S-Cys-3SH, en glutathion dans les moûts de raisins et la concentration des thiols volatils dans les vins
- de déterminer s'il existait pour différents crus et selon le millésime, une corrélation entre ces différents composés.

8.1.1 OBSERVATIONS PRELIMINAIRES

8.1.1.1 Problématique

Au début du cycle de pressurage sont extraits les composants issus de la pulpe puis progressivement ceux des assises cellulaires de la pellicule. Cette dernière opération s'effectue à des pressions plus élevées (1,6 à 2,0 bar). Les jus obtenus au cours de cette phase sont généralement plus riches en P-S-Cys-3SH (Peyrot des Gachons, 2000; Patel *et al.*, 2010) et en proanthocyanidines (constituants des pépins et de la pellicule) et moins riches en acides phénols (Patel *et al.*, 2010). Ils sont très sensibles à l'oxydation, sont plus jaunes que les premiers jus et présentent un pH toujours plus élevé et donc une acidité totale (AT) plus basse à cause de leur plus grande richesse en potassium. Ils représentent environ 15 à 20 % du volume total extrait au cours d'un pressurage. Ils donnent toujours des vins moins aromatiques, plus amers et avec une teinte évoluée (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998, 2004). Leur séparation peut s'opérer, au cours du pressurage, suivant un critère de volume, de couleur, de pH, ou encore de conductivité électrique.

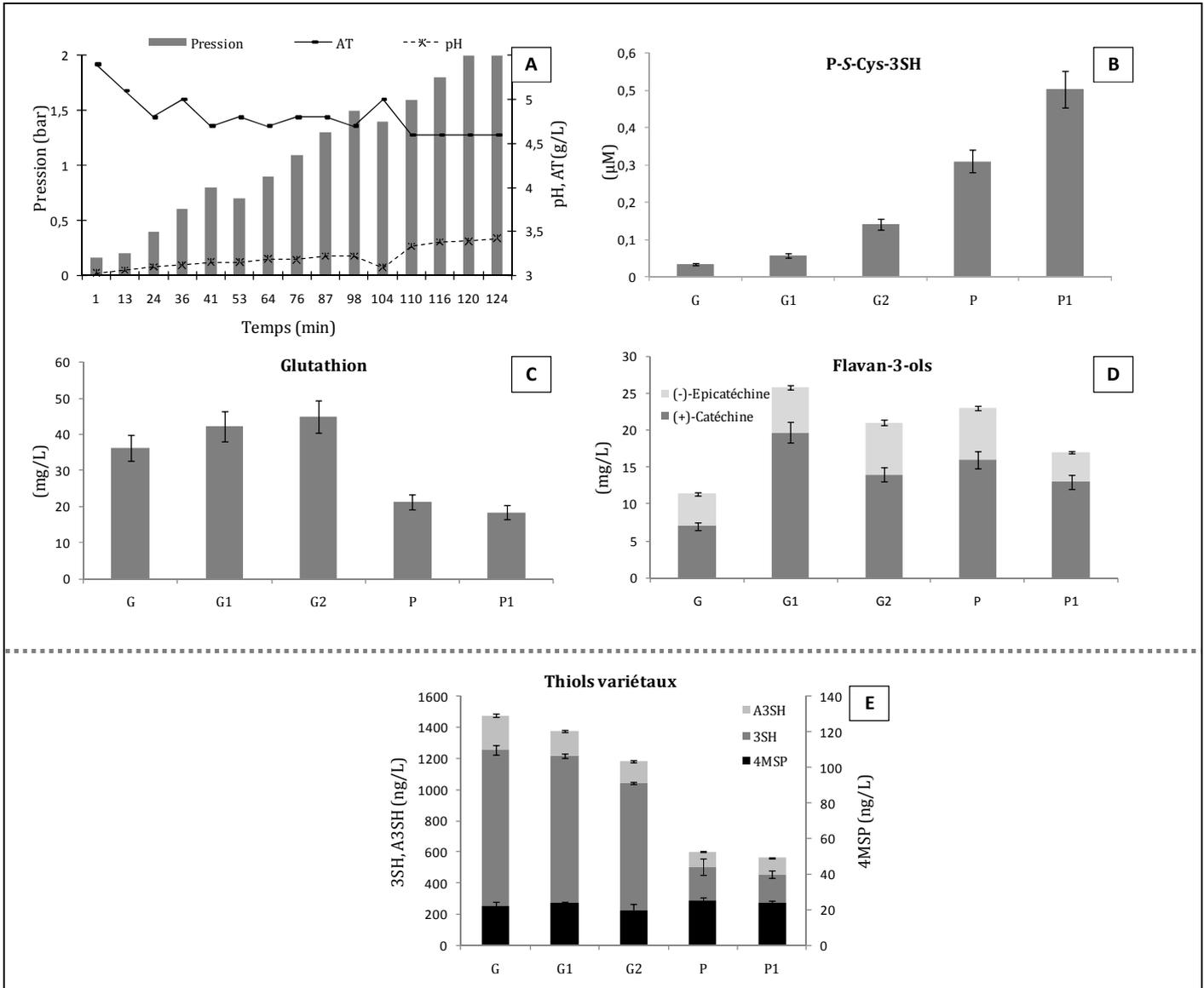


Figure 72. Evolution **(A)** du pH, de l'AT ainsi que des teneurs en **(B)** P-S-Cys-3SH, **(C)** glutathion, **(D)** flavan-3-ols des moûts au cours du pressurage des raisins. **(E)** Teneurs en 3SH, A3SH et 4MSP des vins issus des moûts obtenus à différents stades du pressurage

8.1.1.2 Protocole expérimental

Afin d'évaluer les modifications des composants du moût susceptibles d'impacter sur les teneurs en thiols volatils des vins, comme les flavan-3-ols, le P-S-Cys-3SH et le glutathion, le suivi de leur concentration a été réalisé au cours du pressurage des raisins à l'échelle industrielle. Cette expérimentation porte sur les jus issus d'un pressurage de raisins de Sauvignon blanc (Graves, 2007). La vendange a été récoltée manuellement et acheminée au chai dans des bennes. Elle a été éraflée et légèrement foulée. Les moûts sont prélevés directement à la sortie du pressoir à six différents stades d'extraction des raisins. Ainsi, les fractions obtenues sont : (G) moût d'égouttage, (G1) moût extrait à 0,6 bar, (G3) moût extrait à 1,2 bar, (P) moût extrait à 1,5 bar et (P1) moût extrait à 2 bar.

Les moûts sulfités (50 mg/L) sont ensuite emmenés au laboratoire afin de subir les différentes étapes préfermentaires puis microvinifiés.

8.1.1.3 Résultats

Le suivi du pressurage des raisins à l'échelle industrielle confirme que l'extraction du fruit induit des modifications non négligeables sur la composition des moûts (**Figure 72**). En règle générale, les constituants des parties solides de la baie tels que le P-S-Cys-3SH et les flavan-3-ols sont extraits au fur et à mesure de l'avancement du pressurage (**Figure 72, B et D**). De la même manière, la teneur en glutathion dans les moûts augmente linéairement jusqu'au milieu de la pressée. Ensuite, elle diminue significativement dans les moûts de fin de pressée (**Figure 72, C**). Ce phénomène suggère un degré d'oxydation dans les moûts de fin de pressée supérieur à celui du début de pressurage. Par ailleurs, les moûts de fin de pressée (P et P1), caractérisés par des valeurs de pH plus élevées et d'acidité totale plus faibles ont des teneurs plus élevées en P-S-Cys-3SH et en flavan-3-ols par rapport aux moûts obtenus en début de pressurage (G, G1 et G2) (**Figure 72, A**).

Après la fermentation alcoolique, la composition en thiols volatils variétaux des vins est caractéristique du niveau d'extraction des moûts. Les vins issus des moûts de presse, malgré un potentiel aromatique plus important que celui des moûts de goutte, donnent des vins aux teneurs en **3SH** et en **A3SH** nettement plus faibles que ceux issus des moûts de début de pressurage (goutte) (**Figure 72, E**). Par ailleurs, la composition en **4MSP** des vins ne varie pas en fonction du degré d'extraction des moûts (**Figure 72, E**).

L'étude préliminaire du pressurage des raisins démontre qu'il est possible de classer qualitativement les moûts en fonction du degré d'extraction. En effet, les moûts d'égouttage (G) et de début de pressurage (G1 et G2) ont une composition propice à la production des vins présentant une plus grande typicité variétale que ceux des moûts de fin de pressée (P et P1).

8.1.2 ETUDE EXHAUSTIVE SUR DES MOÛTS ET DES VINS BLANCS, DE DIVERSES ORIGINES ET MILLESIMES

8.1.2.1 Origine des moûts et des vins

Les moûts sont issus de raisins de Sauvignon blanc récoltés à maturité dans trois régions du Bordelais (Graves, Pessac Léognan et Entre Deux Mers) et lors de trois millésimes consécutifs (2007, 2008 et 2009). Les moûts sont prélevés directement à la sortie du pressoir selon le degré d'extraction des jus. Ainsi trois fractions sont considérées :

- Moût d'égouttage (Goutte)
- Moût de milieu de pressée à 1-1,2 bar (Goutte 1)
- Moût à la fin de pressée à 2 bar (Presse)

Le choix des trois fractions de moût a été effectué en fonction de leur bonne représentativité indiquée par l'étude préliminaire.

Les moûts sont alors ramenés au laboratoire afin d'être clarifiés puis microvinifiés.

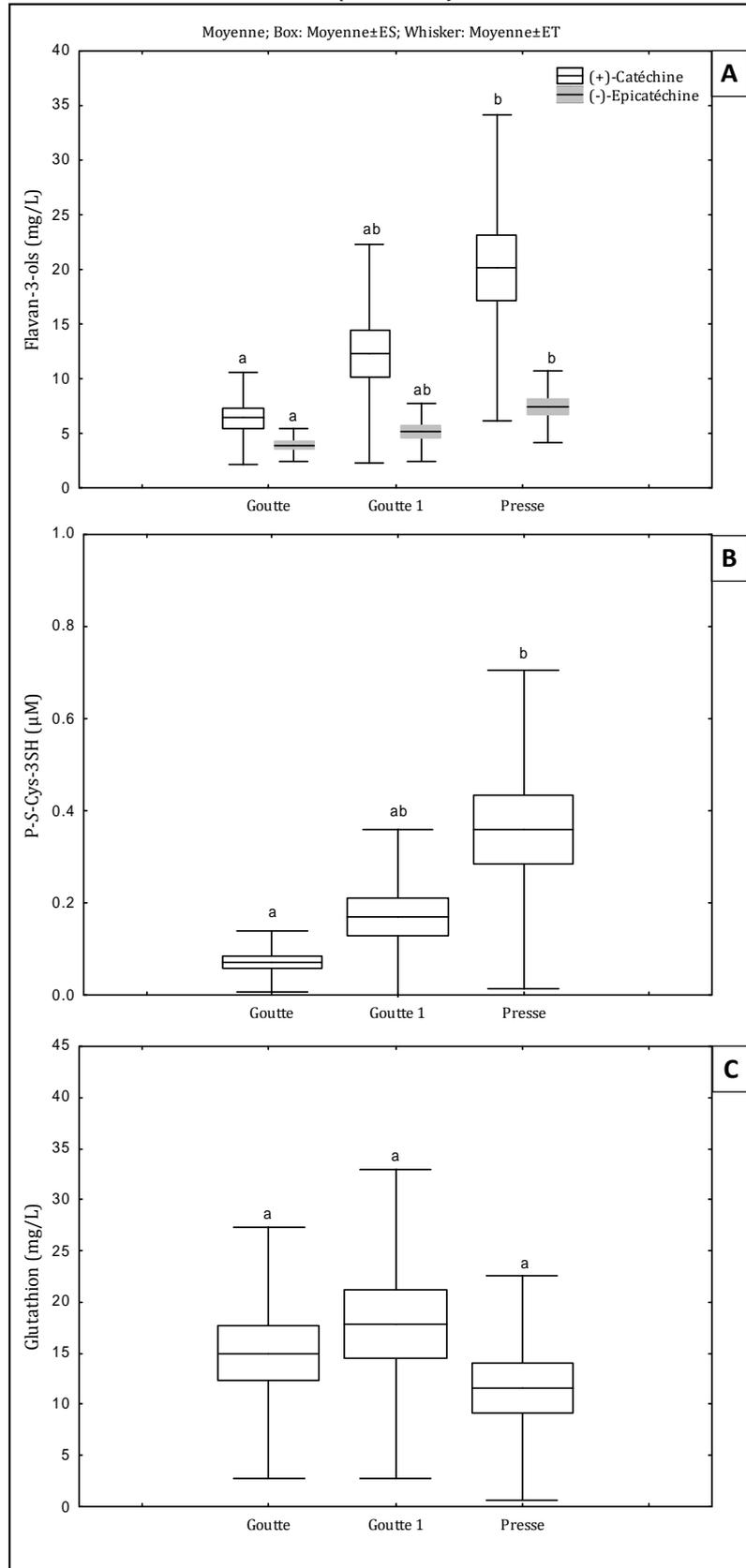


Figure 73. Suivi des concentrations en **(A)** (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, **(B)** P-S-Cys-3SH et **(C)** glutathion dans les moûts au cours du pressurage des raisins de Sauvignon blanc. Goutte : moût d'égouttage ; Goutte 1 : moût extrait à 1-1,2 bar ; Presse : moût extrait à 2 bar. Les valeurs désignées en lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (ANOVA, $p \leq 0,05$) des 63 échantillons issus des différentes appellations et millésimes (2007-2008-2009)

8.1.2.2 Evolution des teneurs en flavan-3-ols, P-S-Cys-3SH et glutathion au cours du pressurage des raisins blancs. Impact sur le contenu en thiols volatils des vins

8.1.2.2.1 Etude de la composition des moûts au cours du pressurage des raisins

Les concentrations en monomères de flavan-3-ols augmentent globalement au cours du pressurage des raisins (**Figure 73, A**). Cette augmentation est beaucoup plus nette pour la (+)-catéchine que la (-)-épicatéchine. En effet, les moûts de Sauvignon blanc de Bordeaux sont beaucoup plus riches en (+)-catéchine qu'en (-)-épicatéchine par rapport à ceux d'autres cépages blancs (Fuleki & Ricardo da Silva, 2003). La concentration des moûts en (+)-catéchine fluctuent au cours du pressurage entre 1 et 10 mg/L pour les moûts d'égouttage (Goutte), de 5-20 mg/L pour les moûts du milieu de pressée (Goutte 1) et de 8-33 mg/L pour les moûts de fin de pressée (Presse). La fourchette de concentrations de la (-)-épicatéchine au cours du pressurage est beaucoup plus étroite que celle de la (+)-catéchine. Elle varie entre 2 à 10 mg/L selon le stade d'avancement du cycle du pressurage. Ainsi, les moûts de presse sont significativement plus concentrés en (+)-catéchine et en (-)-épicatéchine que ceux de goutte (Goutte et Goutte 1).

Les teneurs en P-S-Cys-3SH augmentent dans les moûts de façon nette et linéaire au cours du pressurage (**Figure 73, B**). Ce résultat est en conformité avec les premiers travaux de Peyrot des Gachons (2000) sur les raisins de Sauvignon blanc de Bordeaux et a été confirmé par une étude récente de Patel *et al.* (2010) sur les moûts de Sauvignon blanc de Nouvelle Zélande. Au cours du cycle de pressurage, la concentration en P-S-Cys-3SH augmente en moyenne d'un facteur 2 dans les moûts extraits à 1-1,2 bar et d'un facteur 5 dans le moût de la fin de pressée (2 bar). Il est établi que plus de 50% des P-S-Cys-3SH sont localisés dans la pellicule des raisins (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002a). Or, plus le cycle du pressurage progresse plus il concerne les zones proches de la pellicule. Il n'est donc pas surprenant de trouver des teneurs croissantes en P-S-Cys-3SH dans les moûts au fur et à mesure de l'avancement du pressurage.

Bien que le glutathion soit un constituant des assises cellulaires de la pellicule (Pons, communication personnelle), il apparaît que les teneurs en glutathion sont plus faibles dans les moûts de presse (5-15 mg/L) que dans les moûts de goutte (15-35 mg/L) (**Figure 73, C**). Ce résultat peut être expliqué par l'exposition à l'oxygène des

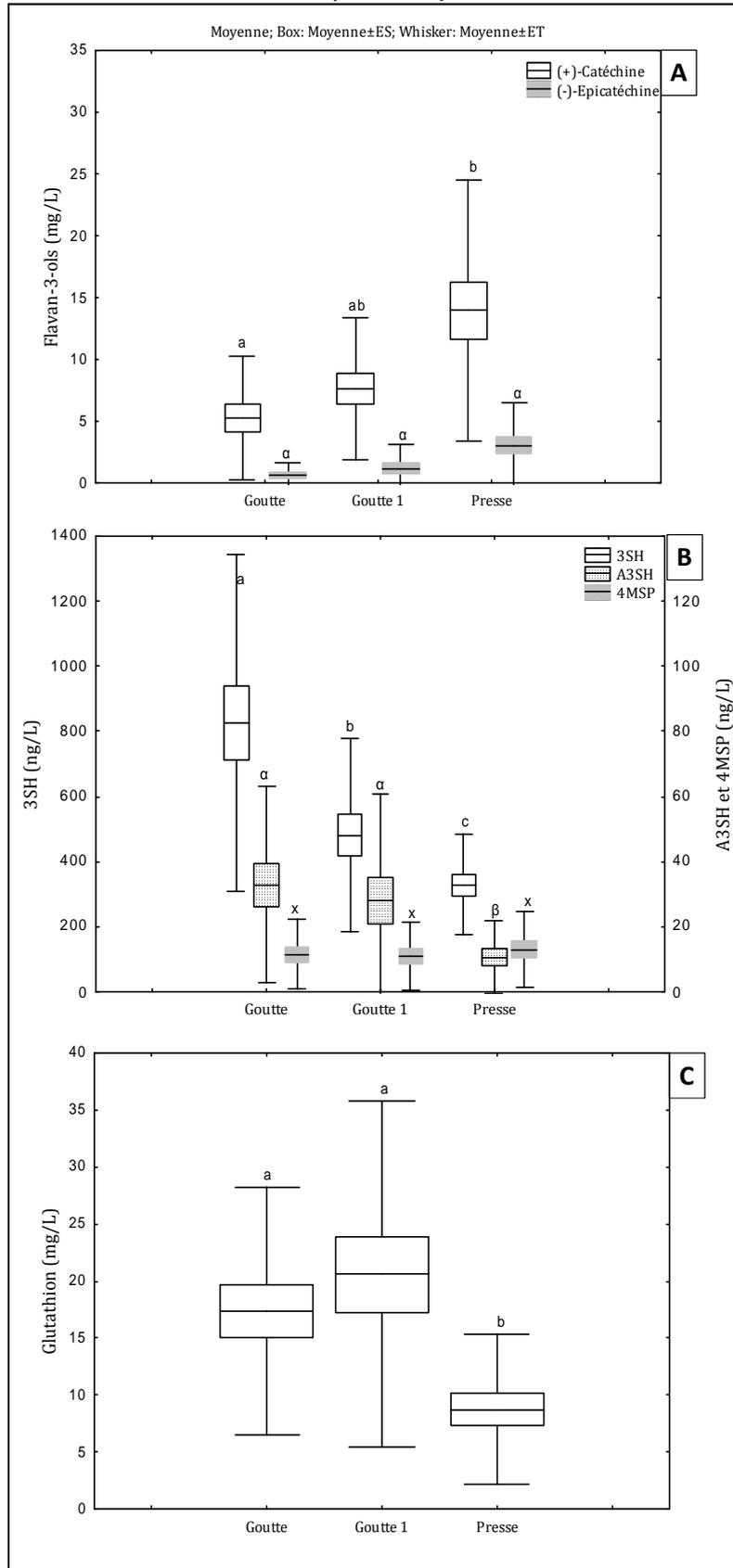


Figure 74. Suivi des concentrations en **(A)** (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, **(B)** 3SH, A3SH, 4MSP et **(C)** glutathion dans les vins issus des moûts obtenus à différents stades du pressurage. Goutte : vin issu de moût d'égouttage ; Goutte 1 : vin issu de moût extrait à 1-1,2 bar ; Presse : vin issu de moût extrait à 2 bar. Les valeurs désignées en lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (ANOVA, $p \leq 0,05$) des 63 échantillons issus des différents crus et millésimes.

moûts au cours du pressurage, provoquant ainsi une perte (de l'ordre de 10 mg/L) en glutathion des moûts de presse.

8.1.2.2.2 Etude des vins élaborés à partir des moûts issus de différentes pressées

A la fin de la fermentation alcoolique, les concentrations en flavan-3-ols dans les vins (**Figure 74, A**) sont moins importantes que celles des moûts correspondants (**Figure 73, A**). De plus, nous observons une corrélation entre le contenu des vins en (+)-catéchine et le degré d'extraction du moût. Les teneurs en (+)-catéchine sont distribuées dans chaque modalité proportionnellement à ce qui a été observé dans les moûts (§ 8.1.2.2.1) (**Figure 74, A**). Ainsi, les moûts de presse riches en (+)-catéchine donnent également des vins riches en ce composé. Cependant, alors que les concentrations entre (+)-catéchine ne sont pas significativement différentes entre les moûts et vins de goutte (G), un écart de 30% est observé entre la teneur en (+)-catéchine dans les moûts de fin de pressée (P) et les vins. Celles-ci évoluent en moyenne de 20 mg/L dans les moûts de fin de pressée à 14 mg/L dans les vins (**Figure 73, A; Figure 74, A**). Concernant, la (-)-épicatéchine, bien que présente en moindre concentration dans les moûts, elle possède une réactivité plus importante encore que la (+)-catéchine. Ainsi, le pourcentage de diminution entre les moûts et les vins est d'au moins 60% quel que soit le type de vin (G, G1, P).

Les concentrations en **3SH**, **A3SH** et **4MSP** dans les vins finis sont présentées dans la **Figure 74, B**. L'ensemble des moûts conduisent à des vins présentant une large gamme de concentrations en **3SH**, **A3SH** et **4MSP** mais qui reste dans la fourchette de concentrations habituelles pour les vins de Sauvignon blanc de Bordeaux (Darriet *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 1998b). Comme nous avons observé précédemment, les vins issus des moûts de presse, présentant un potentiel aromatique en moyenne 5 fois plus important que celui des moûts d'égouttage, donnent des vins aux teneurs en **3SH** et en **A3SH** 2,5 fois plus faibles que celles de gouttes (**Figure 74, B**). Le paradoxe d'absence de corrélation entre le potentiel aromatique des moûts de presse et les teneurs en **3SH** des vins correspondants pourrait être dû à la réactivité de ce composé avec les flavan-3-ols des moûts au cours de la fermentation. Comme observé au cours de l'étude préliminaire, nous confirmons que le taux de **4MSP** n'est pas influencé par le niveau d'extraction. Quelles que soient leurs origines, les vins présentent une valeur moyenne de 11 ng/L. En

Tableau 18. Comparaison de l'effet du cru et du millésime sur les teneurs en flavan-3-ols, en P-S-Cys-3SH et en glutathion des moûts et les teneurs en flavan-3-ols, en **3SH**, en **A3SH** et en glutathion des vins

Matrice	Variables	Effet cru		Effet millésime	
		F	Significativité ^a	F	Significativité
Moût	Flavan-3-ols	11,8	***	4,7	*
	P-S-Cys-3SH	17,0	***	5,9	*
	Glutathion	12,7	***	32,8	***
Vin	Flavan-3-ols	26,9	***	-	ns
	3SH	6,0	*	5,0	*
	A3SH	10,7	***	47,8	***
	Glutathion	3,4	*	26,7	***

^a Significativité fixée au seuil de $p \leq 0,05$ (*) et 0,001 (***) pour les analyses de variance ; ns : non significatif ; Flavan-3-ols : somme des concentrations de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine

conséquence, il n'y pas de corrélation entre le contenu en **4MSP** des vins et le niveau d'extraction du moût. La répartition uniforme des P-S-Cys-4MSP entre les différentes parties de la baie (pulpe et pellicule) (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002a) ainsi que la stabilité de ce thiol tertiaire vis-à-vis à l'oxydation (Nikolantonaki *et al.*, 2010) pourraient expliquer sa stabilité dans les vins de différentes pressées.

L'observation de la **Figure 74, C** indique qu'il existe une relation entre les teneurs en glutathion des vins et le niveau d'extraction des moûts correspondants. Les moûts de goutte, riches en glutathion, conservent leurs concentrations en fin de fermentation alcoolique. Au contraire, les vins issus des moûts de fin de pressée perdent la moitié de la teneur en glutathion présent avant fermentation alcoolique (**Figure 73, C et Figure 74, C**).

8.1.2.3 Effet du millésime et du cru sur la composition des moûts et des vins

Dans le but de préciser les facteurs intervenant sur la conservation des thiols volatils des vins blancs de Bordeaux, une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été réalisée sur les variables des différents dosages. Cette analyse est complétée par une analyse ANOVA à deux facteurs. Les facteurs étudiés ont été le millésime (facteur 1) (2007, 2008 et 2009) et le cru (facteur 2) (Graves, Pessac Léognan et Entre Deux Mers), dans le but de préciser le poids de chaque facteur sur les variances significatives de chaque variable. L'analyse multifactorielle est effectuée seulement dans les cas des variables représentant une variance significative pour chaque facteur. Les résultats de cette analyse ANOVA à deux facteurs sont résumés au **Tableau 18**. Pour cette étude, la composition en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine des moûts et des vins sera présentée comme la somme de deux monomères des flavan-3-ols.

D'après les résultats d'ANOVA (**Tableau 18**), le facteur cru influence plus significativement que le facteur millésime la composition phénolique des moûts et des vins ainsi que celle en P-S-Cys-3SH. L'impact du cru est clairement démontré dans le cas des vins où l'effet millésime est dominé par l'effet du cru pour la variable **3SH**. Par contre, les analyses statistiques ont relevé que le niveau d'acétylation du **3SH** est plus fortement impacté par le millésime que le cru. Ce résultat nous apparaît logique puisque le niveau d'acétylation du **3SH** est plus dépendant des paramètres fermentaires que variétaux. Enfin, d'après notre étude de variance, le contenu en glutathion des moûts et

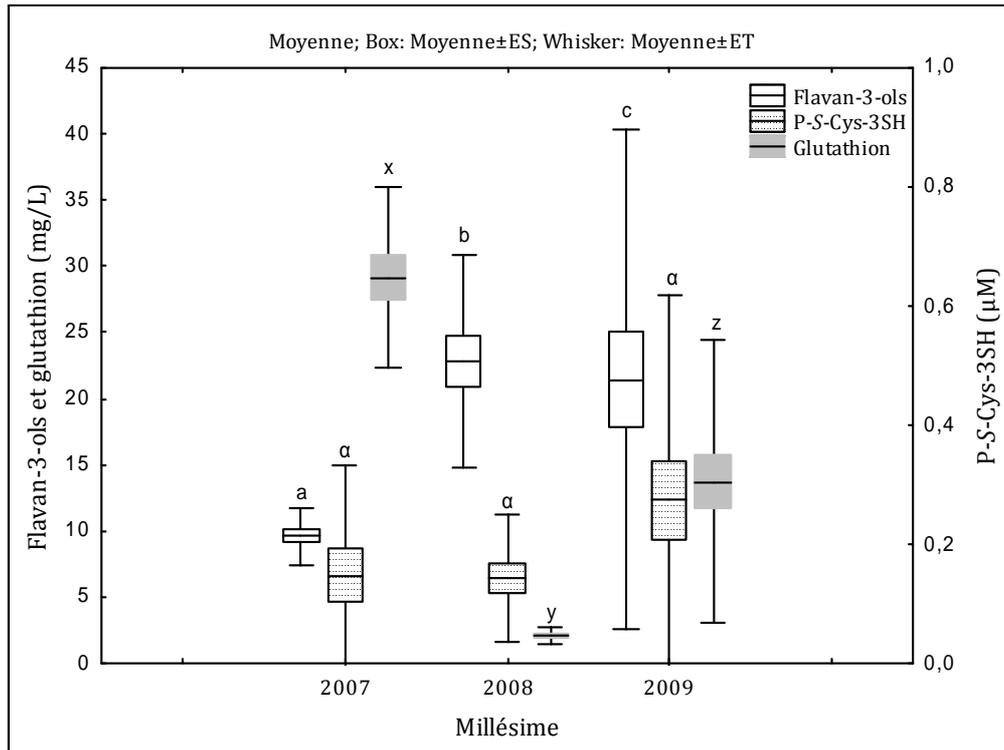


Figure 75. Effet du millésime sur les concentrations en flavan-3-ols, P-S-Cys-3SH et glutathione des moûts de Sauvignon blanc de la région de Bordeaux. Les valeurs désignées en lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (ANOVA, $p \leq 0,05$) des 18 échantillons pour les millésimes 2007 et 2008 et de 27 échantillons pour le millésime 2009. Un alphabet différent est utilisé pour chaque variable

des vins est plus fortement influencé par l'effet millésime que par l'effet du cru, révélant que sa maîtrise tant au niveau de la vigne qu'au niveau de la vinification reste encore à ce jour mal connue.

8.1.2.3.1 Effet du millésime sur la composition des moûts

La réussite des vins blancs secs de Sauvignon nécessite des raisins sains, sucrés, fruités, suffisamment acides et à pellicules peu tanniques (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998, 2004). Cet équilibre s'obtient aisément sur les terroirs appropriés, si l'été est tempéré, sans chaleur ni sécheresse excessive après la véraison. Naturellement, par leur mois d'août frais, 2007[‡], et 2008 furent de bons millésimes de vins blancs secs de Bordeaux tandis que 2009, avec un été plus chaud, fut généralement moins propice à l'acidité et la puissance aromatique du Sauvignon. 2007 a été une année fraîche et humide de mai à août, empêchant l'installation d'un stress hydrique et par conséquent l'accumulation des composés phénoliques (Choné *et al.*, 2006) et des P-S-Cys-3SH dans le raisin (Peyrot des Gachons *et al.*, 2005). Les conditions climatiques printanières du millésime 2008 sont restées fraîches et humides, retardant ainsi la floraison d'une quinzaine de jours par rapport à 2007. Le millésime 2008 a apporté des conditions de maturité plus fraîches mais très favorables à la préservation des arômes. Le millésime 2009 est caractérisé par un très bel été plutôt chaud mais non caniculaire avec une fraîcheur nocturne, qui a permis à la contrainte hydrique de s'installer progressivement.

Pour les trois millésimes étudiés (2007, 2008 et 2009), nous observons que le facteur millésime modifie significativement la composition des moûts blancs en flavan-3-ols et en glutathion mais dans une moindre mesure pour leur composition en P-S-Cys-3SH (**Figure 75**). Le millésime 2009, le plus chaud parmi les trois étudiés, peut se caractériser par des teneurs en flavan-3-ols plus élevées que celles retrouvées en 2008 et 2007. De plus, la grande variabilité observée sur la teneur en flavanols en 2009 (de 5 à 40 mg/L contre 15-30 mg/L pour 2008 et de 7 à 12 mg/L pour 2007) semble indiquer que la contrainte hydrique de la vigne (ex. sol, conduite du vignoble) a été plus importante au cours de ce millésime.

Les teneurs moyennes en glutathion des moûts varient significativement parmi les trois millésimes étudiés (**Figure 75**). En considérant uniquement des conditions

[‡]: <http://www.bordeauxraisins.fr>

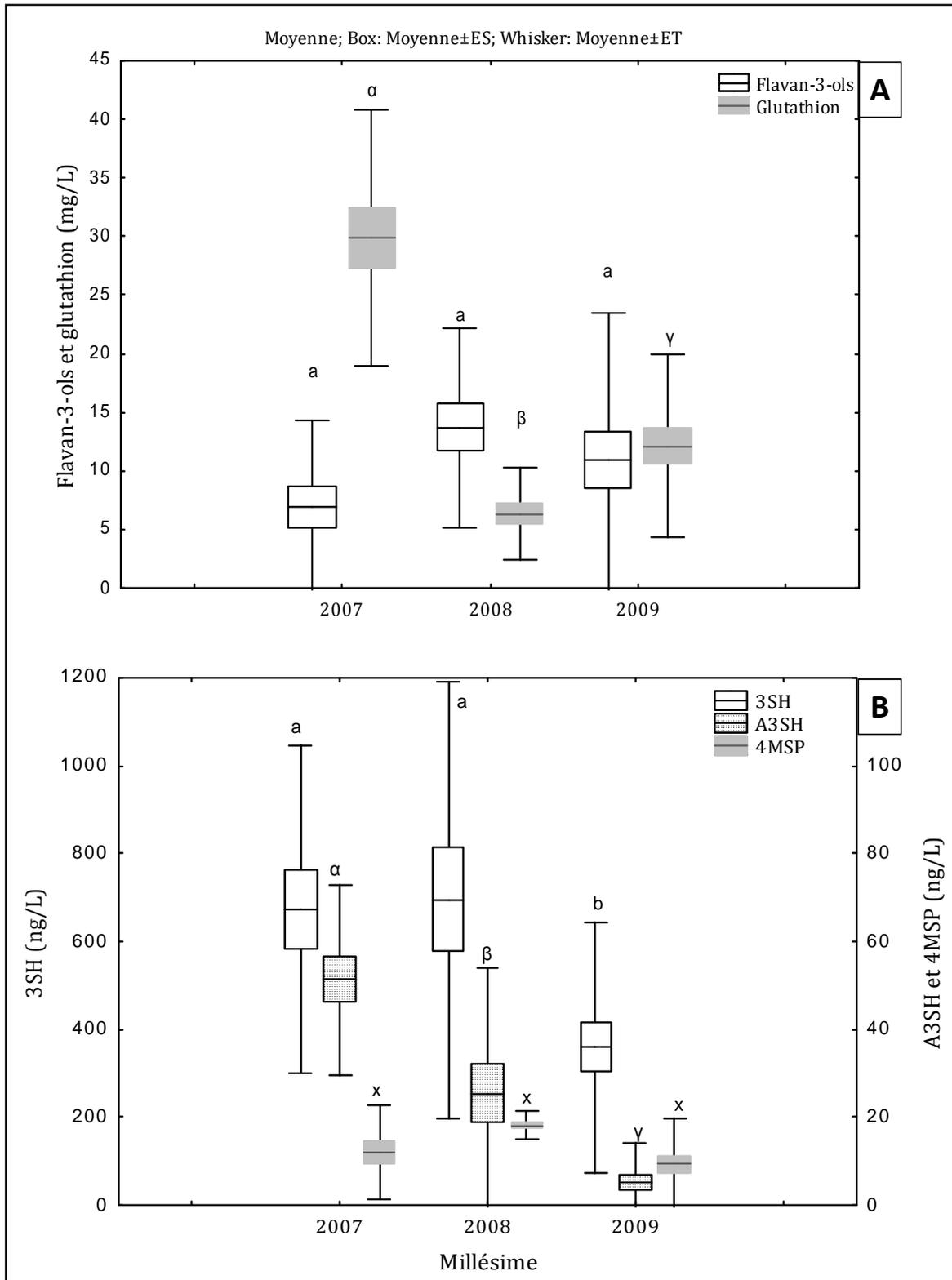


Figure 76. Effet du millésime sur les concentrations en **(A)** flavan-3-ols, glutathione et **(B)** 3SH, A3SH, 4MSP des vins du Sauvignon blanc de Bordeaux. Les valeurs désignées en lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (ANOVA, $p \leq 0,05$) de 18 échantillons pour 2007, 2008 et de 27 échantillons pour 2009. Un alphabet différent est utilisé pour chaque variable

climatiques proches, les quantités moyennes en glutathion pour les millésimes 2007 et 2008 s'avèrent très éloignées. Les quantités moyennes sont maximales dans les moûts en 2007 (28 mg/L) et très faibles en 2008 (4 mg/L). Ces fortes différences sont vraisemblablement liées aux conditions propres à chaque millésime (Cheynier *et al.*, 1989d; Choné *et al.*, 2006).

Par ailleurs, contrairement à ce qu'on pouvait imaginer, aucun effet significatif du millésime (au seuil de 5 %) n'est observé sur les teneurs en P-S-Cys-3SH des différents moûts (**Tableau 18**). Nous constatons seulement une tendance vers l'augmentation des concentrations en P-S-Cys-3SH en 2009 par rapport à 2007 et 2008. Les facteurs terroir qui favorisent la synthèse de ces composés (ex. alimentation azotée de la vigne, sol) semblent être prédominants par rapport au facteur millésime (Peyrot des Gachons *et al.*, 2005; Choné *et al.*, 2006).

8.1.2.3.2 Effet du millésime sur la composition des vins

Les différences constatées plus haut, liées à l'effet du millésime sur la composition des moûts, sont significativement reflétées dans les vins correspondants après fermentation alcoolique. La **Figure 76** rassemble la somme des monomères des flavan-3-ols [(+)-catéchine, (-)-épicatéchine], le glutathion et les thiols volatils variétaux des vins jeunes. Les moûts contenant de fortes teneurs en flavan-3-ols (2009) produisent des vins avec un contenu en **3SH** significativement moins important pour des concentrations équivalentes en P-S-Cys-3SH. En effet, la présence d'une corrélation entre le taux des flavan-3-ols du moût et la perte du **3SH** semble claire. Par contre, ce n'est pas le cas pour la **4MSP**. La réactivité modérée de ce thiol volatil avec les flavan-3-ols oxydés en conditions réelles de vinification semble par conséquent se confirmer. Par ailleurs, nous mettons en évidence que le millésime a un effet significatif sur les teneurs en glutathion des vins. Cet effet est similaire à celui noté dans le cas des moûts. En effet, les vins du millésime 2007 contiennent des teneurs en glutathion plus importantes que ceux des autres millésimes. Ces résultats confirment que le facteur millésime conduit à des variations non négligeables sur la composition des vins.

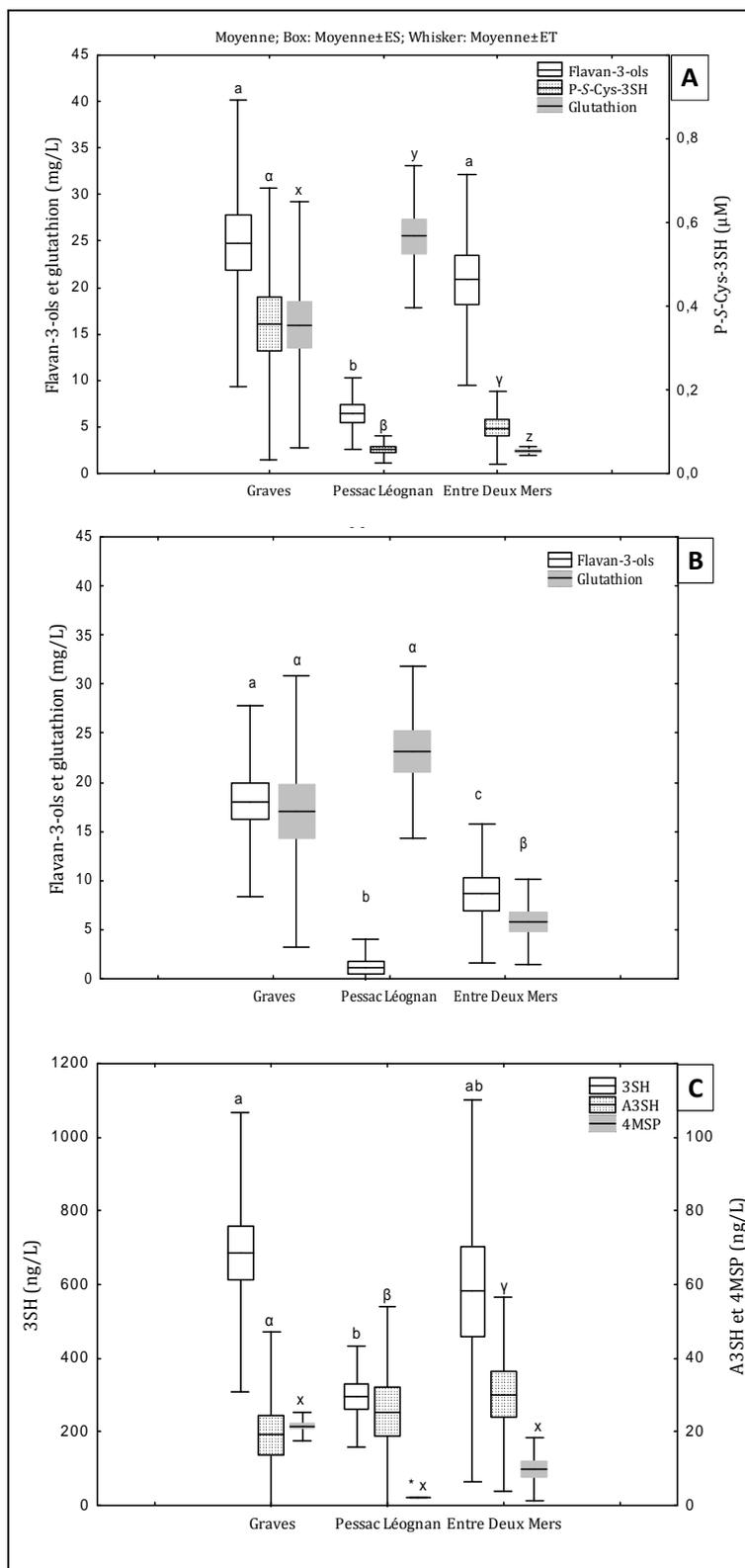


Figure 77. Effet du cru sur la concentration **(A)** en flavan-3-ols, en P-S-Cys-3SH, en glutathion des moûts et **(B)** en flavan-3-ols, en glutathion et en **(C)** 3SH, A3SH, 4MSP des vins de Sauvignon blanc. Les valeurs désignées en lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes des moyennes (ANOVA, $p \leq 0,05$) des 18 échantillons provenant de Pessac Léognan et d'Entre Deux Mes et 27 échantillons de Graves. Un alphabet différent est utilisé pour chaque variable

8.1.2.3.3 Effet du cru sur la composition des moûts

L'effet du cru viticole influence significativement la composition des moûts pour les trois variables étudiées : les monomères des flavan-3-ols, le P-S-Cys-3SH et le glutathion. D'après la **Figure 77, A**, les moûts provenant des Graves et des Entre Deux Mers, pour les trois millésimes étudiés, contiennent en moyenne 25 et 20 mg/L de flavan-3-ols, concentrations significativement supérieures à celles dosées dans les moûts du cru de Pessac Léognan (7 mg/L). De manière similaire, le contenu en P-S-Cys-3SH des moûts peut être considéré comme un facteur discriminant du cru. En effet, la richesse des moûts de Graves en P-S-Cys-3SH est 7,5 et 4 fois supérieure à celles des moûts originaires de Pessac Léognan et d'Entre Deux Mers. Concernant le glutathion, des variations significatives entre les trois crus du Bordelais révèlent que l'origine des moûts, après le millésime, peut être considérée comme un facteur supplémentaire impactant leur composition en glutathion.

8.1.2.3.4 Effet du cru sur la composition des vins

Parmi les paramètres étudiés dans le cas des vins, l'analyse statistique révèle un effet dominant du cru sur le contenu en flavan-3-ols. L'effet est similaire à celui observé dans le cas des moûts. D'après la **Figure 77, B**, nous pouvons considérer une hiérarchisation des crus selon les teneurs en flavan-3-ols des vins. Ces teneurs varient de 1 mg/L à 27 mg/L pour les trois millésimes étudiés (2007, 2008 et 2009). Ainsi il apparaît que les vins du cru de Graves contiennent plus de flavan-3-ols que ceux du cru de l'Entre Deux Mers et que ceux du cru de Pessac Léognan.

En revanche, la différence de composition des vins jeunes, en glutathion, même si elle est dominée par l'effet millésime, est bien présente (**Figure 77, B**). En effet, les teneurs en glutathion des vins des Graves et de Pessac Léognan se trouvent proportionnellement élevées (18-25 mg/L) et significativement différentes de celles des vins d'Entre Deux Mers (8 mg/L).

Par ailleurs, les teneurs en **3SH** des vins issus des trois crus du Bordelais fluctuent entre 450 et 1300 ng/L. Les vins provenant du cru de Graves présentent les teneurs les plus élevées en **3SH** tandis que les plus faibles sont retrouvées dans les vins du cru de Pessac Léognan (**Figure 77, C**). De plus, la dominance du facteur cru ($F = 6,0$) sur le facteur millésime ($F = 5,0$) (**Tableau 18**) concernant le contenu des vins en **3SH**

révèle l'importance de la conservation des thiols volatils pour préserver le caractère distinctif des vins blancs secs de Bordeaux.

Cependant, le niveau d'acétylation du **3SH** varie selon la région entre 1 et 12 % pour les trois millésimes étudiés. En revanche, cette variation, comme dominée par l'effet millésime (**Tableau 18**), ne peut pas être considérée comme un paramètre discriminant des différentes appellations. Enfin, nous observons une absence de variance sur la teneur en **4MSP** des vins issus de différentes pressées pour les vins des crus de Graves et d'Entre Deux Mers, contenant entre 12 et 22 ng/L pour ce thiol volatil.

8.1.3 DISCUSSION

Les expérimentations que nous avons menées concernant le suivi du pressurage des raisins de Sauvignon blanc mettent en évidence des modifications non négligeables sur le contenu des moûts en flavan-3-ols, glutathion et P-S-Cys-3SH. Il apparaît que les teneurs en flavan-3-ols et en P-S-Cys-3SH augmentent tandis que les teneurs en glutathion diminuent globalement au cours du pressurage.

Les modifications observées au niveau de la composition des moûts se retrouvent également dans les vins après la fermentation alcoolique. En effet, nous observons une corrélation entre le contenu des vins en flavan-3-ols et la pression d'obtention du jus de raisin. Les moûts de presse riches en flavan-3-ols donnent des vins avec un contenu plus important de ces composés. De plus, les vins issus des moûts de presse, donnent des vins contenant des teneurs en **3SH** et **A3SH** plus faibles que celles de goutte. Il y a ainsi une proportionnalité inverse entre le contenu en flavan-3-ols dans les moûts et la teneur en **3SH** dans les vins. Le taux du **4MSP** ne semble pas être influencé par le niveau d'extraction des moûts. De la même manière, dans les vins de presse, les teneurs en glutathion sont plus faibles ce qui les fait considérer comme peu propices à l'obtention de vins de garde.

Les deux paramètres, 'cru' et 'millésime', ont été étudiés simultanément. Il apparaît que le facteur cru influence plus significativement que le facteur millésime la composition phénolique des moûts et des vins ainsi que celle en P-S-Cys-3SH et en **3SH**. En revanche, le contenu en glutathion des moûts et des vins est plus fortement influencé par l'effet millésime que par l'effet cru, révélant que sa maîtrise tant au niveau de la vigne qu'au niveau de la vinification reste à ce jour mal connue.

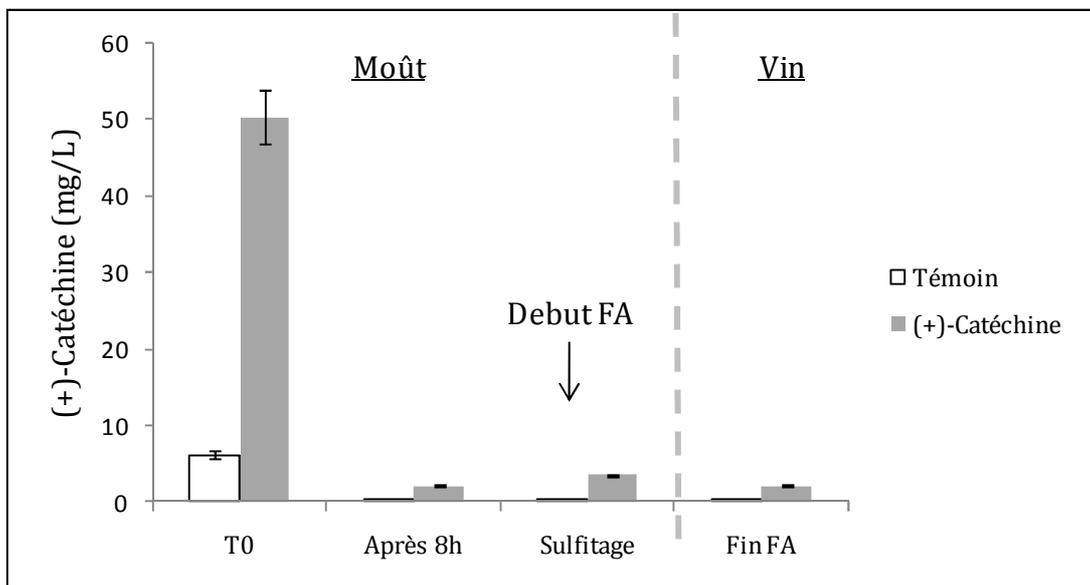


Figure 78. Suivi de la teneur en (+)-catéchine des moûts au cours des opérations pré-fermentaires et dans les vins à la fin de la fermentation alcoolique (FA)

8.2 IMPACT DE LA (+)-CATECHINE DES MOÛTS SUR LA TENEUR EN 3-SULFANYLHEXANOL DES VINS

8.2.1 ETUDE EN CONDITIONS INDUSTRIELLES

8.2.1.1 Protocole expérimental

Afin d'étudier l'incidence de la richesse des moûts en (+)-catéchine sur la composition en **3SH** des vins, une expérimentation de supplémentation des moûts en (+)-catéchine, élaborée à l'échelle industrielle, a été envisagée. Cette expérimentation porte sur les jus issus d'un pressurage de raisins de Sauvignon blanc (Entre Deux Mers, 2010). La vendange a été récoltée mécaniquement et acheminée au chai dans des bennes où elle a été sulfitée à 40 mg/L, puis éraflée et foulée légèrement. Les jus de raisins sont prélevés directement à la sortie du pressoir.

Deux aliquots de moût ont été préparés. Le premier est utilisé comme modalité témoin (T) et le second est supplémenté en (+)-catéchine (50 mg/L) (C). La modalité supplémentée en (+)-catéchine avant fermentation est incubée à 16°C jusqu'à la consommation totale du substrat. La cinétique d'oxydation de la (+)-catéchine a été suivie à travers la diminution de la concentration de la forme orthodiphénol. La modalité non supplémentée a été conservée en atmosphère inerte à 9°C. Après la consommation totale de la (+)-catéchine initialement ajoutée, la teneur en dioxyde de soufre libre a été ajustée à 20 mg/L pour les deux modalités. Les échantillons ont ensuite été ensemencés directement par la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* X5. La fermentation alcoolique s'est déroulée à 20°C en conditions contrôlées. Les fermentations ont été effectuées en triplicat.

8.2.1.2 Résultats

La supplémentation en (+)-catéchine (50 mg/L) des moûts élaborés à l'échelle industrielle établit son impact sur la perte en **3SH** des vins jeunes. Nous montrons que le sulfitage des moûts, en concentration représentative des pratiques œnologiques (40 mg/L), permettant normalement de bloquer l'activité polyphénoloxydase (Sayavedra-Soto & Montgomery, 1986) avant la fermentation alcoolique, semble inefficace pour inhiber l'oxydation de la (+)-catéchine (**Figure 78**). Nous observons qu'au cours des

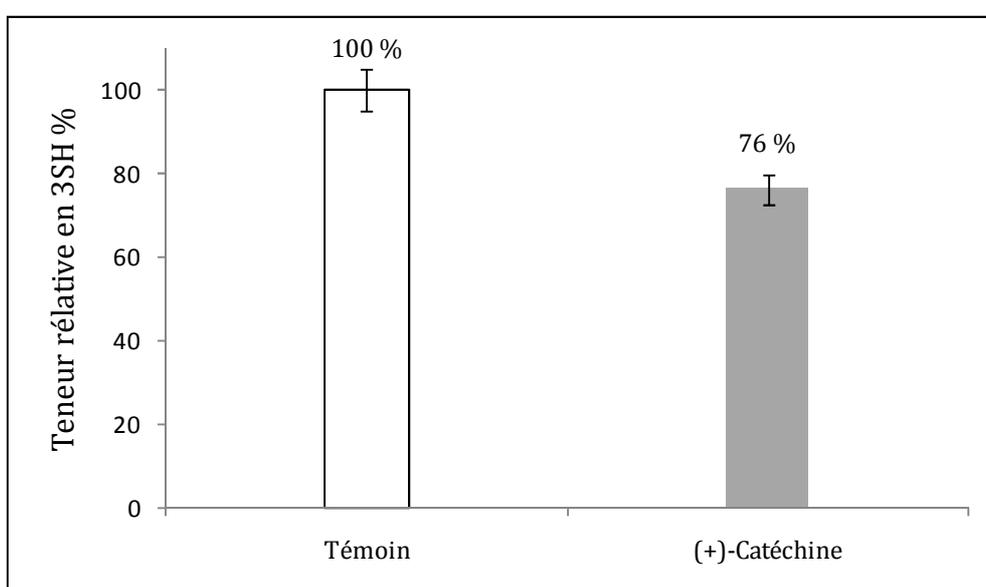


Figure 79. Teneur relative en **3SH**. 100 % correspondant à la modalité Témoin non supplémentée en (+)-catéchine (50 mg/L)

opérations pré fermentaires (débouillage) le mécanisme d'oxydation de la (+)-catéchine continue. En effet, la consommation totale du substrat au delà de 8 h d'incubation à 16°C (**Figure 78**).

Après la fermentation alcoolique, nous mettons en évidence que les vins issus des moûts supplémentés en (+)-catéchine contiennent 28 % de moins de **3SH** en comparaison avec la modalité non supplémentée (**Figure 79**). Cette diminution n'est pas proportionnelle au taux de consommation de la (+)-catéchine avant fermentation.

8.2.2 ETUDE EN CONDITIONS CONTROLEES

8.2.2.1 Protocole Expérimental

Les travaux ont été menés au laboratoire sur un moût limpide de Sauvignon blanc (Graves, 2008) conservé à -20°C et présentant une concentration en de dioxyde de soufre libre de 20 mg/L. Après addition de 50 mg/L de (+)-catéchine, un extrait brut de PPO (5 g/L) a été ajouté dans le moût puis les échantillons ont été incubés dans une étuve thermostatée à 20°C sous agitation (200 rpm).

4 modalités sont considérées :

- Moût témoin : modalité (T)
- Moût supplémenté en (+)-catéchine (50 mg/L) : modalité (C)
- Moût avec l'extrait brut de PPO (5 g/L) : modalité (T PPO)
- Moût supplémenté en (+)-catéchine (50 mg/L) et l'extrait brut de PPO (5 g/L) : modalité (C PPO)

La cinétique d'oxydation de la (+)-catéchine a été suivie par la diminution de la concentration de la forme orthodiphénol et de la formation de sa forme *o*-quinonique par CLHP-SM (Méthode 15). Après diminution de 30% de la concentration de (+)-catéchine, les échantillons ont étéensemencés directement par la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* X5. L'activité de la polyphénoloxydase n'a pas été stoppée dans nos conditions par l'ajout de dioxyde de soufre. La fermentation alcoolique s'est déroulée à 20°C en conditions contrôlées.

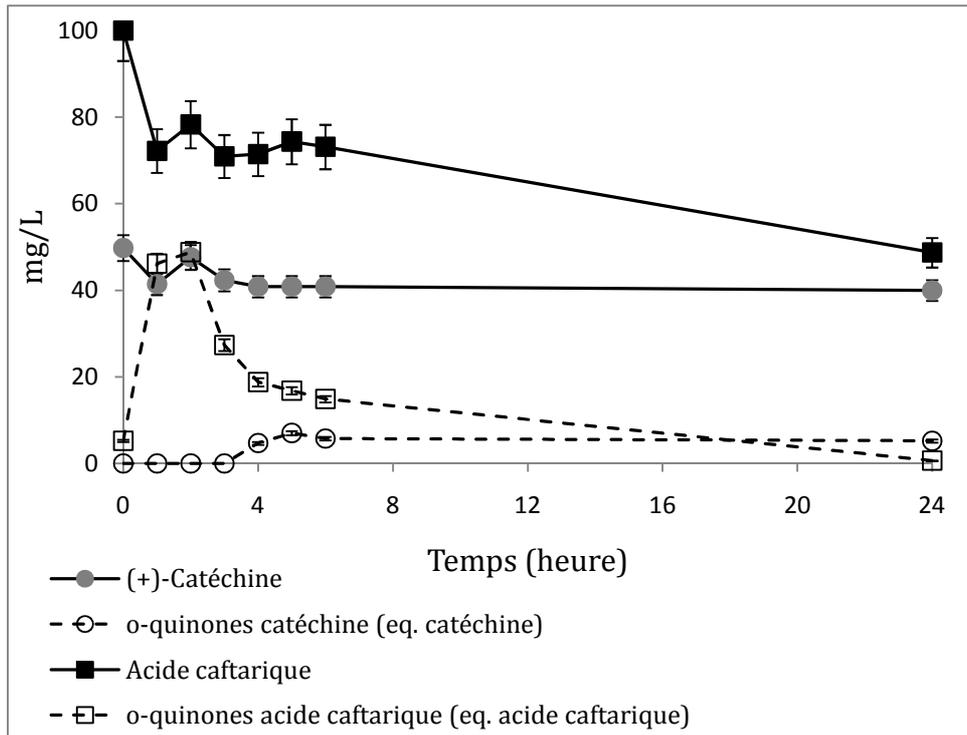


Figure 80. Cinétique d'oxydation de la (+)-catéchine et de l'acide caftarique en présence de polyphénoloxydase (PPO) au cours des 24 premières heures après ensemencement avec des levures *Saccharomyces cerevisiae* (début de fermentation alcoolique 24h après ensemencement)

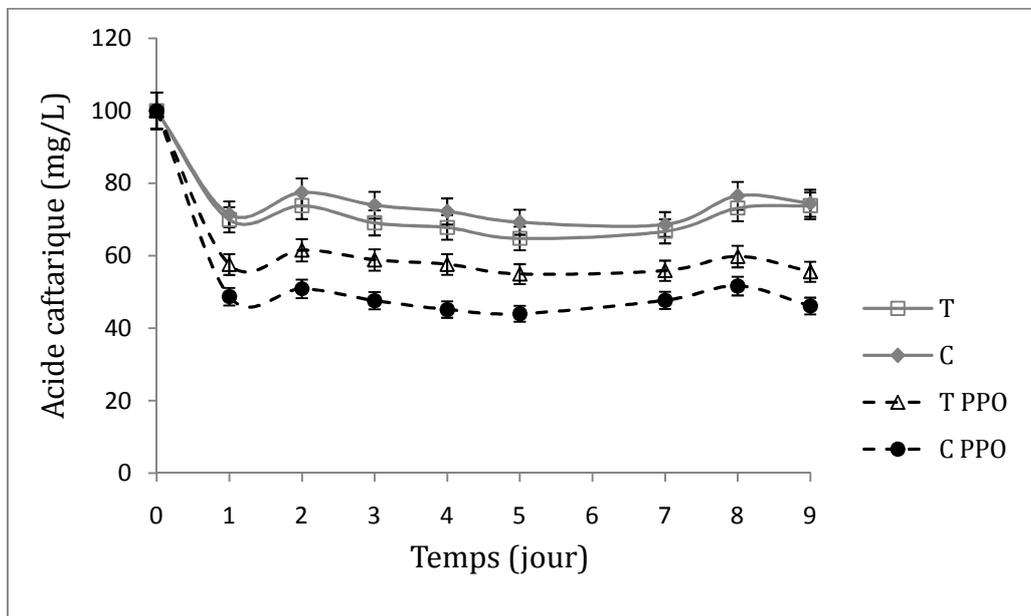


Figure 81. Cinétique d'évolution de l'acide caftarique dans un moût blanc au cours de la fermentation alcoolique, en présence ou non de la (+)-catéchine (C) et d'extrait brut de la polyphénoloxydase (PPO)

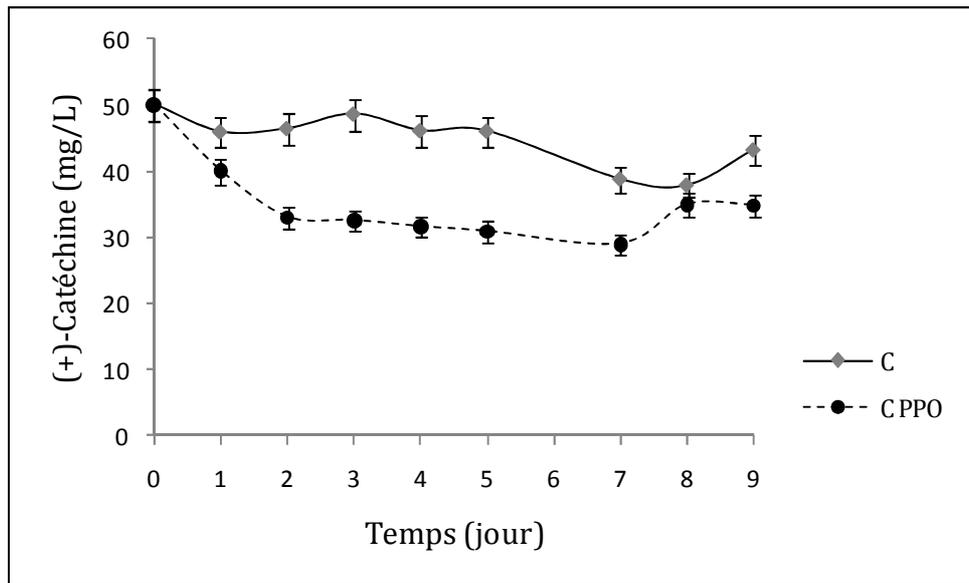


Figure 82. Cinétique d'évolution de la (+)-catéchine (C) dans un moût au cours de la fermentation alcoolique en présence ou non d'extrait de polyphénoloxydase (PPO)

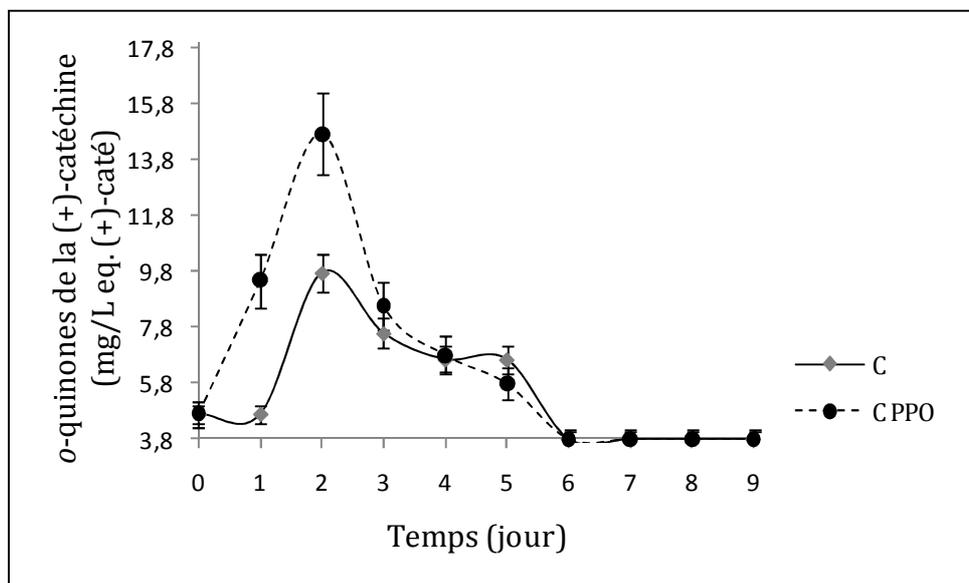


Figure 83. Cinétique de la formation des formes oxydées de la (+)-catéchine (*o*-quinone) (C) dans un moût blanc au cours de la fermentation alcoolique en présence ou non d'extrait de polyphénoloxydase (PPO) (début de fermentation alcoolique après 24 h d'ensemencement par la levure *Saccharomyces cerevisiae*)

Au cours de la fermentation alcoolique, nous avons mesuré les teneurs de la forme *o*-quinonique de la (+)-catéchine ainsi que les concentrations en P-S-Cys-3SH, en glutathion et en sa forme conjuguée à l'acide caftarique (**GRP**).

Au terme de la fermentation alcoolique (9 jours), les vins qui contiennent moins de 5 g/L de sucres résiduels ont été sulfités (30 mg/L de dioxyde de soufre libre) et placés à 12°C avant d'être analysés.

8.2.2.2 Résultats

Parmi les facteurs susceptibles d'être influencés par la présence de la (+)-catéchine dans le moût en fermentation, nous avons choisi d'étudier l'oxydation de l'acide caftarique, l'évolution du 2-S-glutathionylcaféoyltartrique (**GRP**) et du glutathion.

8.2.2.2.1 Oxydation de la (+)-catéchine et de l'acide caftarique

Dès les premières heures après ensemencement avec des levures *Saccharomyces cerevisiae*, plus de la moitié de l'acide caftarique est oxydé alors que les *o*-quinones de la (+)-catéchine sont à peine produites (**Figure 80**). Vraisemblablement, la production massive des *o*-quinones de l'acide caftarique par la PPO peut favoriser l'oxydation de la (+)-catéchine par les mécanismes d'oxydoréduction couplée. Après 24 heures, la réaction d'oxydation de l'acide caftarique semble atteindre son équilibre et la concentration de ce composé reste stable jusqu'à la fin de la fermentation (**Figure 81**). Les formes oxydées ne sont d'ailleurs plus détectées après un jour de fermentation.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'oxydation de la (+)-catéchine, en tant que substrat secondaire de la PPO, semble plutôt provoquée par oxydation couplée que par oxydation directe (Cheynier *et al.*, 1989a). De plus, son oxydation dans le moût au cours de la fermentation (**Figure 82**) est linéairement corrélée avec la formation des *o*-quinones de la (+)-catéchine (**Figure 83**). Ainsi, une production maximale des *o*-quinones de la (+)-catéchine est obtenue deux jours après l'ensemencement levurien (**Figure 83**). Par ailleurs, dans les premiers jours de la fermentation, les *o*-quinones de (+)-catéchine sont détectées contrairement à celles de l'acide caftarique, et peuvent vraisemblablement constituer des pièges pour les thiols volatils biotransformés par la levure à partir de leurs formes précurseurs (Tominaga *et al.*, 1998c). D'ailleurs, le suivi cinétique des *o*-quinones montre qu'elles peuvent aussi être formées sans oxydation enzymatique préalable, en présence d'extrait de PPO.

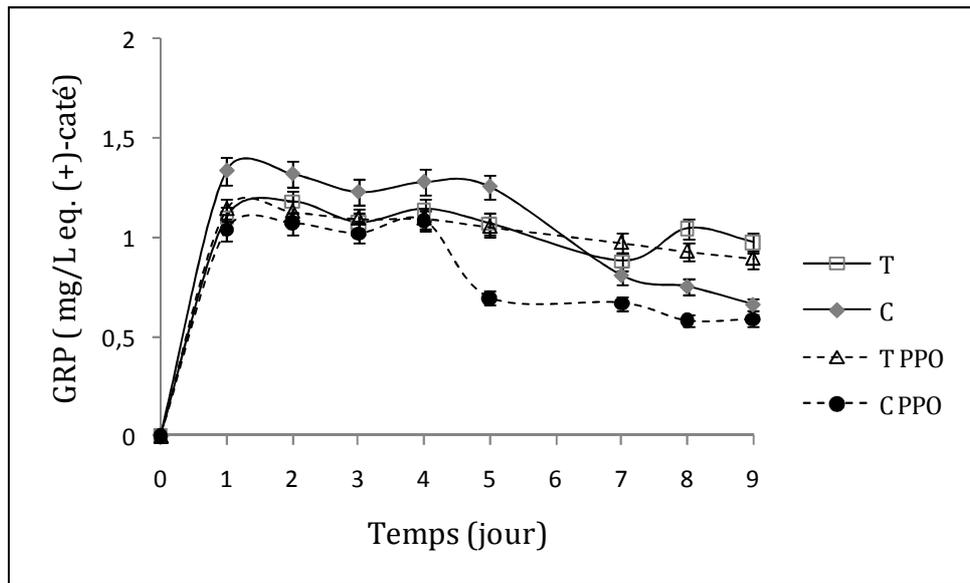


Figure 84. Cinétique d'évolution du 2-S-glutathionylcaféoyltartrique (GRP) dans un moût de blanc au cours de la fermentation alcoolique, en présence ou non de (+)-catéchine (C) et d'extrait de polyphénoloxydase (PPO)

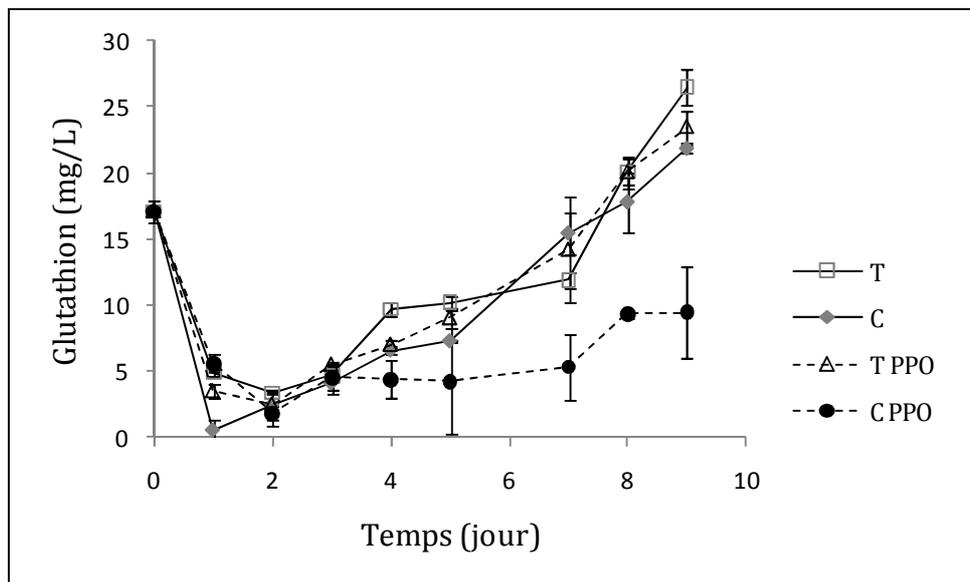


Figure 85. Cinétique d'évolution des concentrations en glutathion au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de blanc en présence ou non de la (+)-catéchine et d'extrait de PPO

8.2.2.2.2 Glutathion et 2-S-glutathionylcaféoyltartrique (GRP)

Le **GRP** se forme rapidement dès le début de la fermentation alcoolique et d'une façon homogène pour toutes les modalités étudiées (**Figure 84**). La présence d'extrait de PPO ne provoque aucune augmentation significative de la concentration en **GRP** bien que celle-ci puisse induire une plus forte oxydation de l'acide caftarique. D'après Cheynier *et al.* (1990a), dans le moût et pour des concentrations équimolaires du glutathion et de l'acide caftarique, la consommation de ce dernier n'est pas linéairement corrélée avec la production du **GRP**. Ceci suggère que d'autres composés présents dans la matrice peuvent piéger les *o*-quinones d'acide caftarique de la même manière que le glutathion (ex. peptides, protéines). La cinétique d'évolution du **GRP** au cours de la fermentation alcoolique (**Figure 84**) nous a permis de confirmer les premières observations réalisées par Cheynier & Van Hulst (1988) selon lesquelles, le **GRP** n'est pas un substrat direct de la PPO mais il pourrait s'oxyder en participant aux réactions d'oxydation couplée. En effet, la présence de la (+)-catéchine accélère la dégradation du **GRP**. La présence de la PPO induit une dégradation plus précoce du **GRP** mais cet effet est estompé à la fin de la fermentation alcoolique (**Figure 84**).

Au cours de la fermentation alcoolique, la teneur en glutathion du moût évolue de façon similaire pour toutes les modalités étudiées (**Figure 85**). Le profil cinétique de consommation et de relibération du glutathion par la levure au cours de la fermentation alcoolique est similaire à celui observé par Okuda & Yokotsuka (1999). En début de fermentation, il apparaît que le glutathion disparu soit consommé par les levures lors de leur phase de croissance exponentielle (Elskens *et al.*, 1991). Vraisemblablement lors de l'autolyse des levures en fin de fermentation alcoolique, il pourrait être libéré dans le vin (Park *et al.*, 2000). Cependant, nous constatons que l'oxydation prononcée de la (+)-catéchine dans la modalité supplémentée en PPO (**Figure 82**) conduit à une diminution de la concentration en glutathion du moût et dans le vin fini (**Figure 85**). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'addition du glutathion sur les *o*-quinones de la (+)-catéchine semble très vraisemblable.

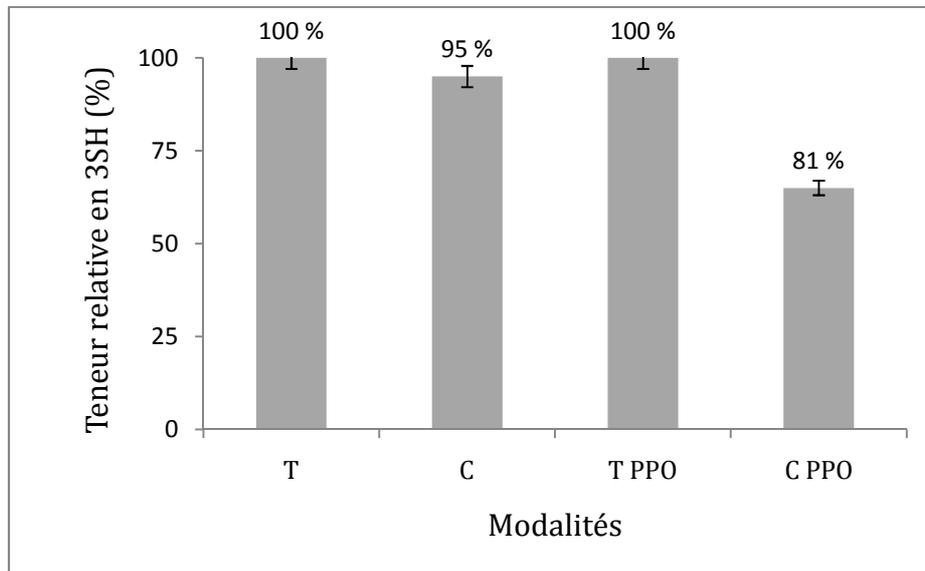


Figure 86. Teneurs relatives en **3SH** dans les vins issus des modalités (T) Témoin, (C) supplémentées en (+)-catéchine, (TPPO) supplémentées en extrait de PPO et (CPPO) supplémentées en extrait de PPO et en (+)-catéchine. 100 % correspond à la modalité témoin (T)

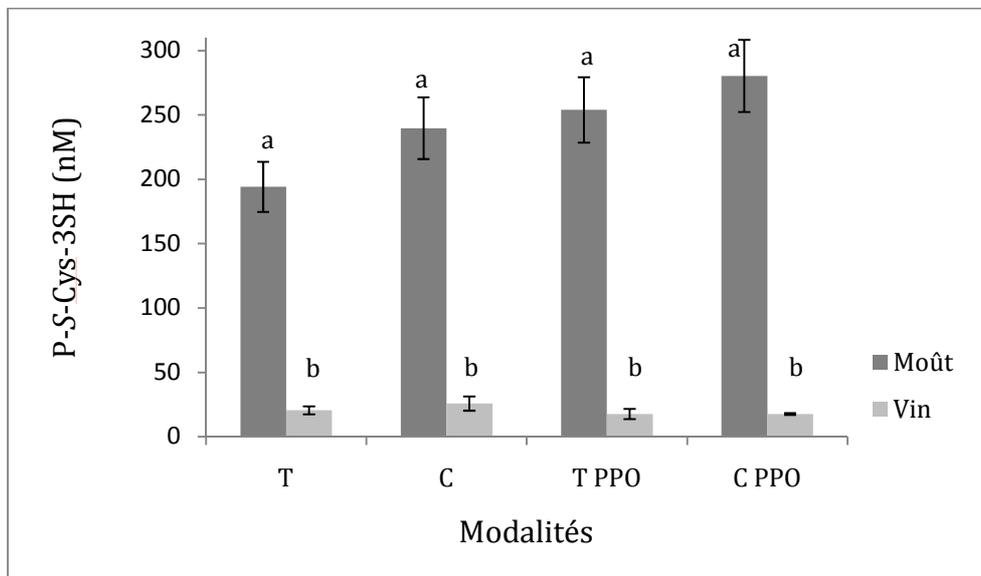


Figure 87. Incidence de la présence de la (+)-catéchine (C) sur la consommation des P-S-Cys-3SH par la levure en présence ou non d'extrait de PPO

8.2.2.2.3 Présence de (+)-catéchine au cours de la fermentation alcoolique et teneurs en thiols volatils du vin

Le dosage du **3SH** a été effectué sur les vins issus des quatre modalités d'étude. Nous constatons que la supplémentation du moût par 50 mg/L de (+)-catéchine en conditions d'oxydation enzymatique (avec PPO) provoque une perte en **3SH** (de l'ordre de 19 %) dans le vin (**Figure 86**). Cette perte aromatique est corrélée avec l'oxydation de la (+)-catéchine. Comme nous l'avons présenté précédemment, la production des *o*-quinones de la (+)-catéchine est maximale au deuxième jour après ensemencement levurien (proche de 15 mg/L eq. caté) (**Figure 83**). Comme les thiols volatils sont libérés au cours des premiers jours de la fermentation alcoolique (Tominaga *et al.*, 1998c), la présence de ces *o*-quinones de (+)-catéchine au moment de leur libération peut expliquer la moindre teneur en **3SH** des vins par rapport à ceux de la modalité témoin. En outre, l'étude du pourcentage de transformation et d'utilisation des précurseurs cystéinylés au cours de la fermentation alcoolique pour les différentes modalités ne met pas en évidence d'incidence de la présence de (+)-catéchine oxydée sur le taux de biotransformation du P-S-Cys-3SH (**Figure 87**). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, il est pertinent de considérer que la perte du **3SH** résulte bien du mécanisme général impliquant les phénomènes d'oxydation décrits au chapitre 4 concernant la réaction d'addition de Michaël du **3SH** sur la quinone de (+)-catéchine.

8.2.3 DISCUSSION

Les expériences réalisées en conditions de vinification apportent des éléments nouveaux pour la compréhension de la perte des thiols volatils associée à la présence de flavan-3-ols dans les moûts de raisins blancs.

Empiriquement, on associe aux vins blancs issus des moûts de fin de pressée, une pauvreté aromatique et une évolution rapide des arômes variétaux. Nous montrons effectivement que la présence des monomères de flavan-3-ols dans le moût participe à la perte de typicité variétale des vins de Sauvignon blanc. Nous mettons en évidence que ce phénomène peut être associé, au moins en partie à la réactivité des thiols volatils avec les formes oxydées de flavanols présentes dans le moût en fermentation. Il n'est pas exclu que les polyphénols oxydés puissent aussi limiter l'excrétion des thiols volatils dans le milieu fermentaire mais il ne s'agit à priori pas d'une limitation des capacités de

biotransformation des précurseurs *S*-conjugués de la cystéine par la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Nous montrons, d'autre part, que la présence de la (+)-catéchine lors de la fermentation alcoolique peut également conduire à une diminution significative des teneurs en glutathion dans le vin fini. La (+)-catéchine influence donc aussi indirectement les teneurs en thiols volatils du vin *via* la consommation du glutathion.

8.3 CONCLUSION

L'étude de l'évolution des facteurs clés tels que les flavan-3-ols, le P-S-Cys-3SH et le glutathion au cours de la vinification, a mis en évidence des modifications non négligeables susceptibles d'influencer les teneurs en thiols volatils des vins. Les expérimentations réalisées au cours du pressurage de raisins blancs ont démontré que les concentrations en flavan-3-ols et en P-S-Cys-3SH augmentent linéairement au cours du pressurage. De plus, il est apparu que les moûts de Sauvignon issus des trois crus du Bordelais étudiés sont beaucoup plus riches en flavan-3-ols que ceux d'autres cépages blancs (chapitre 1, **Tableau 3**). En revanche, les teneurs en glutathion sont systématiquement beaucoup plus faibles dans les moûts de presse que dans les moûts de goutte.

De plus, les modifications observées au niveau de la composition des moûts se retrouvent également dans les vins après la fermentation alcoolique. En effet, nous observons une corrélation entre le contenu des vins en flavan-3-ols et le niveau d'extraction du moût. Ce phénomène est beaucoup moins marqué dans le cas de la (-)-épicatéchine, flavan-3-ol minoritairement présent dans les moûts, que pour la (+)-catéchine.

L'ensemble des moûts issus de différents crus du bordelais conduisent à des vins avec une large gamme de concentrations en thiols variétaux. On a constaté que les moûts de presse contiennent systématiquement plus de précurseurs *S*-conjugués de la cystéine. Tominaga *et al.* (1998c) ont démontré que les teneurs en thiols volatils dans les vins peuvent être directement corrélées aux teneurs en précurseurs du raisin. Ainsi, nous devrions retrouver des teneurs en **3SH** plus importantes dans les vins de presse que dans les vins de goutte. Or, les vins issus des moûts de presse contiennent 2,5 fois moins de **3SH** et de l'**A3SH** que les vins de goutte. Cependant nous n'avons pas observé le

même comportement de la **4MSP**. En effet, ces teneurs ne sont pas modifiées par le niveau d'extraction des moûts. Nous avons également mis en évidence que les vins de presse, présentant une pauvreté aromatique, contiennent systématiquement de faibles teneurs de glutathion. Dans cette partie, nous expliquons un phénomène connu par tous les vinificateurs par une approche scientifique et analytique : l'élaboration des vins issus des moûts de presse est moins propice à l'obtention des vins de garde.

Dans cette partie, nous avons montré que la composition des moûts en Flavan-3-ols et en P-S-Cys-3SH est essentiellement associée au cru tandis que le glutathion est dominé par le millésime. Il en est de même dans les vins.

En outre, cette étude révèle une influence directe des flavan-3-ols, et plus précisément de la (+)-catéchine, sur la diminution des teneurs en thiols volatils et en glutathion des vins blancs. En effet, d'après notre étude menée en conditions réelles de vinification, nous constatons que la présence de la (+)-catéchine au cours des premiers stades de vinification modifie l'équilibre réactionnel global de certains composés clés du moût ayant des propriétés antioxydantes (ex. glutathion) ou prooxydantes (ex. composés phénoliques) qui sont susceptibles d'impacter sur le contenu en thiols volatils. En effet, pour la première fois, nous avons mis en évidence que les formes oxydées de la (+)-catéchine (potentiels pièges pour les thiols volatils contrairement à celles de l'acide caftarique) sont présentes dans les moûts durant les premiers jours de la fermentation alcoolique. Par conséquent, à ce stade de la fermentation, les *o*-quinones, non réduites par le dioxyde de soufre, peuvent réagir par addition sur les thiols volatils ainsi que sur le glutathion, phénomène à l'origine des teneurs faibles en ces composés dans les vins de presse. En effet, nous constatons que la supplémentation du moût en (+)-catéchine (50 mg/L) en conditions d'oxydation enzymatique provoque une diminution des teneurs en **3SH** du vin (de l'ordre de 19 %) pour 1/3 de la concentration en (+)-catéchine consommée. Bien que la réactivité de la (+)-catéchine oxydée avec les thiols volatils semble évidente au cours de la fermentation alcoolique, et en particulier sans ajout de dioxyde de soufre, elle ne permet pas d'expliquer l'écart systématique de la teneur en **3SH** (de l'ordre de 50%) observé entre les vins de goutte et ceux de fin de pressée. D'autres composants des jus de fin de pressée impactent vraisemblablement sur le niveau de teneur en thiol au cours de la fermentation alcoolique.

9

Influence du degré d'oxydation des moûts sur leur teneur en flavan-3-ols et la composition aromatique des vins

Il est souvent dit que « l'oxygène est l'ennemi du vin blanc ». En effet, à l'exception de certains vins spéciaux, de type rancio, les vins blancs sont obtenus à l'abri plus au moins complet de l'oxygène, ou tout au moins en limitant les phénomènes oxydatifs au cours de leur vinification et de leur élevage. Ces précautions sont dictées par le souci de protéger les arômes fruités du vin jeune et d'éviter son brunissement ; elles visent aussi, pour les vins de garde, à favoriser le développement du bouquet de réduction au cours du vieillissement en bouteilles.

Au cours de la phase préfermentaire, l'oxygène favorise plusieurs réactions chimiques et enzymatiques qui peuvent modifier le profil aromatique du vin par la production d'alcools et d'aldéhydes C6 responsables des nuances herbacées (Cordonnier & Bayonove, 1981; Dubourdieu & Lavigne, 1990) mais aussi, par la dégradation des thiols volatils variétaux (Dubourdieu & Lavigne, 1990). La quantité d'oxygène dissous peut également influencer sur le métabolisme levurien mais son effet est encore assez mal compris (Alexandre & Charpentier, 1998). En effet, la disponibilité réduite d'oxygène dissous dans le moût peut favoriser la production d'arômes fermentaires tels que les acides gras et les esters (Suomalainen & Lehtonen, 1979; Nykanen, 1986; Moio *et al.*, 2004). En revanche, certaines études ont démontré que l'hyperoxydation des moûts avant la fermentation alcoolique induit une augmentation des arômes fermentaires dans les vins issus du cépage Chardonnay, Parellada et Muscat (Artajona *et al.*, 1990).

Une nouvelle pratique œnologique, le pressurage sous gaz neutre (azote) des raisins a récemment été mis à disposition des vinificateurs. Le pressurage sous gaz neutre permet d'éliminer les phénomènes d'oxydation et nous a donné l'opportunité d'étudier, en conditions réelles de vinification, les conséquences de l'oxydation des moûts au cours du pressurage sur leur composition et celle des vins correspondants. Dans ce but, les cinétiques d'extraction des flavan-3-ols, du P-S-Cys-3SH et du glutathion, en conditions d'inertage ou non, au cours du pressurage des raisins ont été étudiées. Nous nous sommes également intéressés à l'évolution des thiols volatils dans les vins aux cours de l'élevage en barriques. Enfin, nous avons cherché à évaluer l'incidence du degré d'oxydation des moûts sur la composante aromatique du vin.

9.1 OXYDATION DES MOÛTS. INCIDENCE SUR LEUR COMPOSITION ET LES TENEURS EN THIOLS VOLATILS DES VINS

9.1.1 PRINCIPE DU PRESSURAGE SOUS GAZ NEUTRE

Le pressurage sous gaz neutre est un système de pressurage pneumatique qui permet d'effectuer le pressurage sous azote, c'est-à-dire entièrement à l'abri de l'air atmosphérique. Le principe de cette technique est basé sur le fait que la cuve et la maie du pressoir sont raccordées à une réserve souple en PVC remplie d'azote. Le volume de cette réserve est le même que celui du pressoir. Ainsi, lors du pressurage, l'azote contenu dans la cuve est chassé vers cette réserve souple. Lors des rebêchages, il est réaspiré dans la cuve du pressoir. De ce fait, l'azote circule entre le pressoir et la réserve en passant par la maie en circuit fermé.

9.1.2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Cette expérimentation porte sur les jus issus d'un pressurage de raisins de Sauvignon blanc (Entre Deux Mers, 2009). La vendange a été ramassée mécaniquement et acheminée au chai dans des bennes où elle a été sulfitée à 40 mg/L. Elle a été éraflée et foulée légèrement. 2 lots de 40 HL de raisins sont versés au cours d'une même matinée par la portière principale dans le pressoir équipé d'un système d'inertage et dans un pressoir pneumatique identique conventionnel. Les deux pressoirs ont été inertés au préalable avec de la « neige » carbonique. Après fermeture étanche du

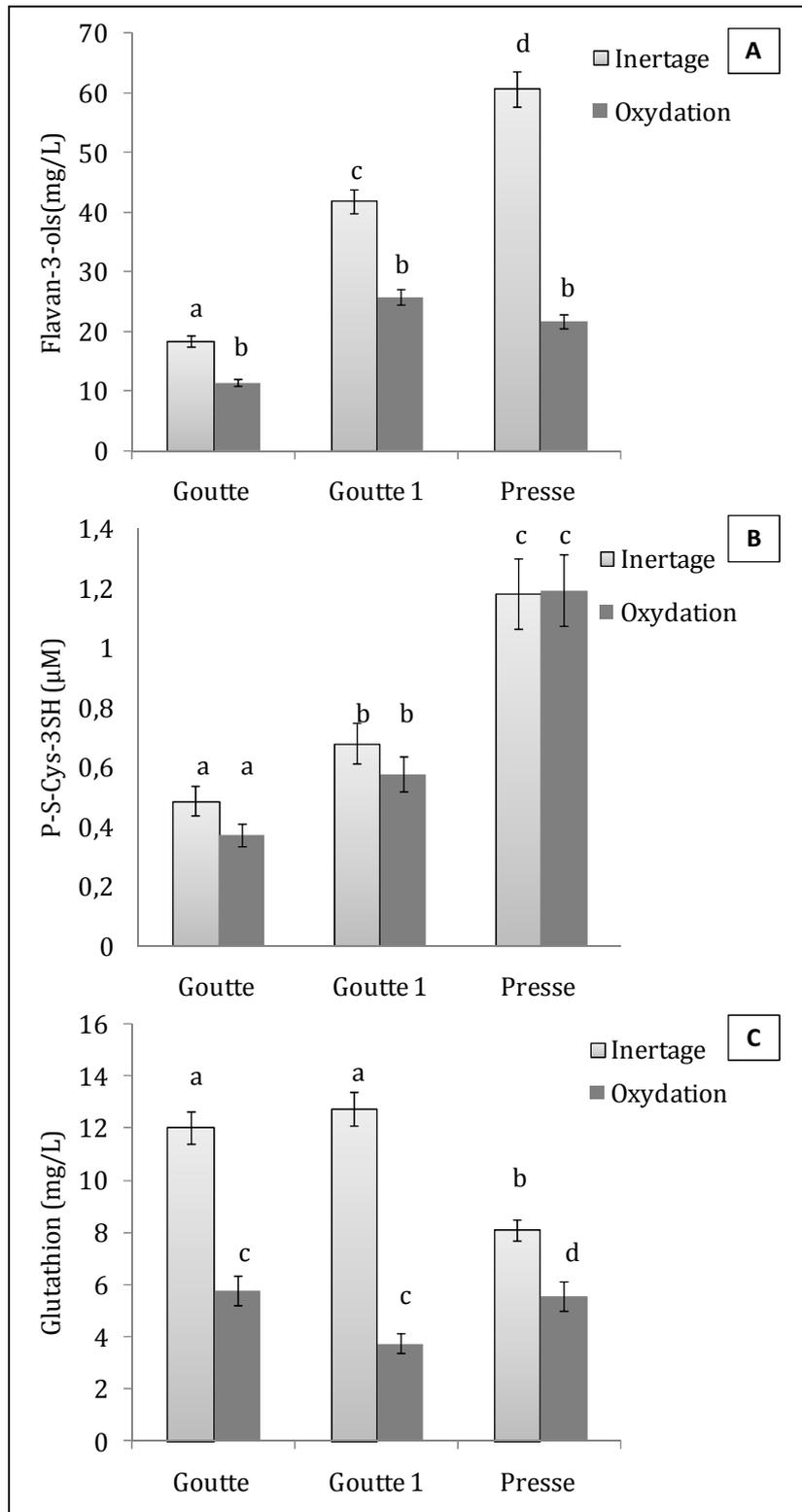


Figure 88. Suivi de teneurs en **(A)** flavan-3-ols, **(B)** en P-S-Cys-3SH et **(C)** en glutathion des moûts au cours du pressurage des raisins en conditions d'inertage et d'oxydation

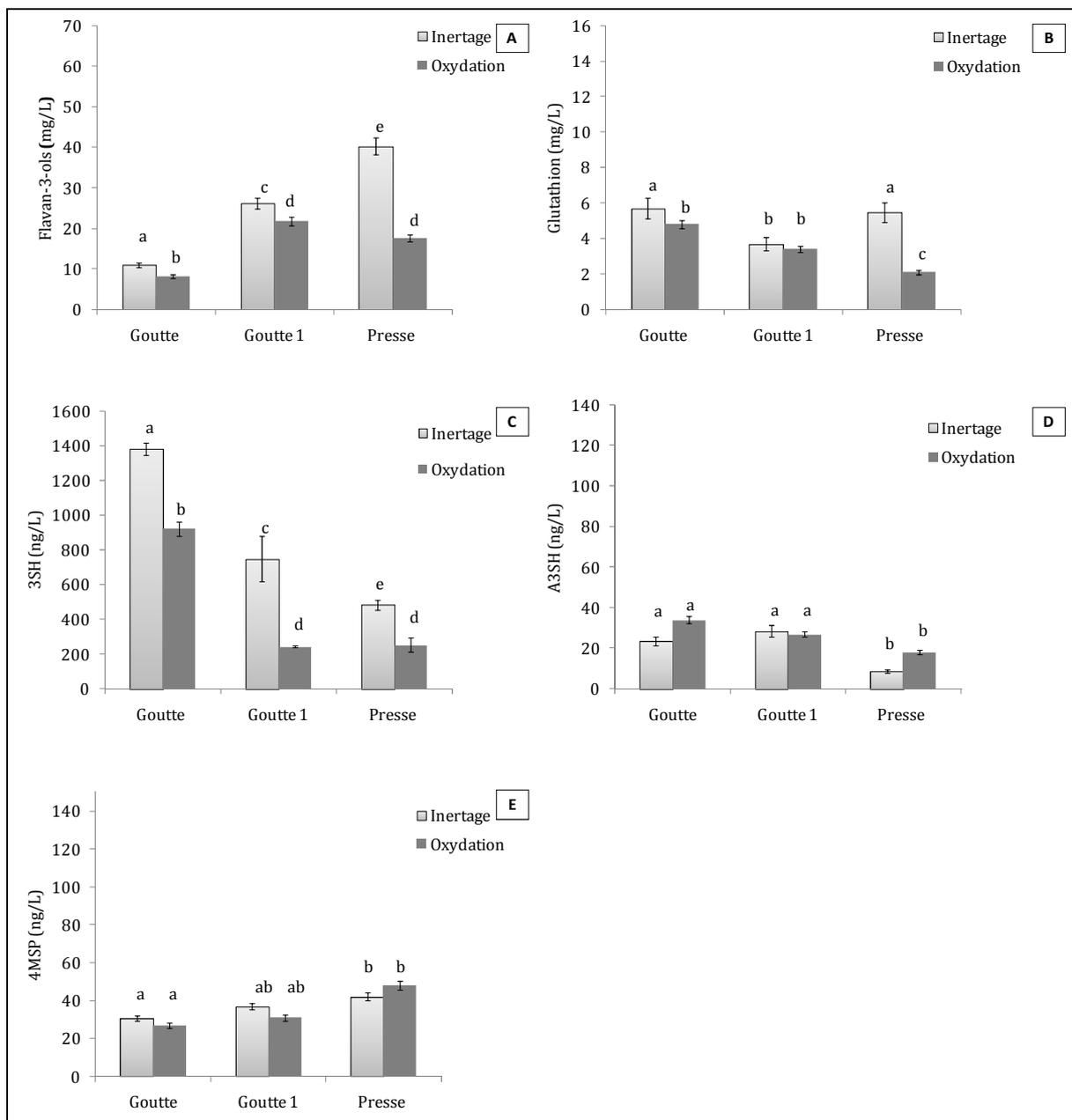


Figure 89. Composition en (A) flavan-3-ols, (B) glutathion, (C) 3SH, (D) A3SH et (E) 4MSP des vins élaborés à partir des moûts des différentes pressées en conditions d'inertage et d'oxydation

pressoir, la vendange a été pressée selon le même programme comprenant 5 rebêchages pendant une durée d'environ 120 minutes. Les jus s'écoulent par gravité avec le pressoir conventionnel dans une cuve souterraine où ils sont sulfités (40 mg/L). Avec le pressoir sous gaz, placé sous atmosphère d'azote, les jus sont pompés automatiquement, en fonction du volume collecté dans la maie par une pompe autoamorçante à turbine néoprène (7,5 m³/h). Les jus de fin de pressée sont placés dans d'autres cuves. Ils correspondent à 10 à 15 % du volume total de jus. Les jus de goutte (G, G1) et les jus de presse (P) présentent les mêmes définitions que celles définies au Chapitre 8.

9.1.3 RESULTATS

La maîtrise du degré d'oxydation des moûts est indispensable à l'élaboration des vins de qualité. Le développement et l'investissement de pressoirs pneumatiques sous gaz inerte dans plusieurs domaines de la région de Bordeaux nous a donné la possibilité d'étudier l'incidence du degré d'oxydation des moûts sur leur composition et celle des vins correspondants.

Notre étude montre qu'il existe des variations non négligeables sur les teneurs en flavan-3-ols, P-S-Cys-3SH et glutathion des moûts au cours du pressurage des raisins. En conditions d'inertage (**Figure 88, A et C**), les formes réduites des composés facilement oxydables tels que les flavan-3-ols et le glutathion sont bien conservées. En effet, leurs teneurs augmentent dans les moûts au cours du pressurage. La concentration en flavan-3-ols dans le moût de goutte de la modalité inertée est environ 2 fois supérieure à celle déterminée dans le moût de la modalité non inertée. Un facteur 3 est observé sur les concentrations dans les moûts de presse. De plus, en conditions d'inertage, les teneurs en glutathion se maintiennent mieux dans les moûts de goutte et de presse. En revanche, le degré d'oxydation des moûts n'a aucune influence sur les teneurs en P-S-Cys-3SH (**Figure 88, B**).

Les modifications observées au niveau de la composition des moûts se retrouvent également dans les vins après la fermentation alcoolique. En effet, le vin de goutte issu des moûts inertés contient 40 % et 10 % de plus de flavan-3-ols et de glutathion que la modalité oxydée, et ceci proportionnellement au niveau d'extraction (**Figure 89, A et B**). En revanche, il apparaît que la protection contre l'oxydation des moûts induit un gain

important en **3SH** dans le vin obtenu à partir des jus de goutte (G) (**Figure 89, C**). L'effet est moins significatif dans les vins de presse élaborés en conditions d'inertage (G1, P).

En fait, la comparaison des teneurs en flavan-3-ols, en particulier pour ceux obtenus sous gaz neutre, met en évidence une différence significative entre leurs teneurs dans le moût et le vin. Cette différence peut être attribuée à des phénomènes d'oxydation, conduisant à la formation de quinones au cours de la vinification voir à l'adsorption des flavan-3-ols par la levure (Mazauric & Salmon, 2006) selon des modalités influençant son métabolisme par exemple, l'excrétion des thiols après leur libération à partir de formes précurseurs. Les résultats présentés ci-dessus concernant le millésime 2009, ont déjà été observés dans le cadre d'observations menées les années précédentes (2007, 2008). Ainsi, d'après nos résultats expérimentaux, des écarts très significatifs peuvent être observés dans la teneur en **3SH** des vins issus de jus de goutte (G) obtenus sous gaz inerte par rapport à ceux qui ne le sont pas, ce qui est conforme à des travaux passés (Tominaga, 1998). Mais, il n'existe pas de différence importante dans la teneur en **3SH** des vins issus de moûts de fin de pressée (P) qu'ils aient été obtenus ou non sous atmosphère inerte.

9.2 EFFET DE L'OXYDATION SUR L'EVOLUTION DE LA TENEUR EN THIOLS VOLATILS AU COURS DE L'ELEVAGE DES VINS

Selon Tominaga (1998), les teneurs en thiols volatils des vins de Sauvignon blanc sont maximales avant la fin de la fermentation alcoolique et tendent à diminuer par la suite. Une légère augmentation peut être observée dans les premiers jours de l'élevage sur lies. De plus, selon le même auteur, au cours de l'élevage en barriques, ces teneurs sont stables si et seulement si l'élevage est soigneux. En effet, l'arôme variétal des vins de Sauvignon est protégé au cours de l'élevage sur lies, vraisemblablement en raison du pouvoir réducteur des lies.

Tominaga (1998) a été le premier à observer que les opérations préfermentaires (pressurage, macération, débourbage) pouvaient influencer fortement les teneurs en thiols volatils des vins. Par le suivi de l'évolution, au cours de l'élevage sur lies, des teneurs en thiols volatils dans des vins issus des différentes pressées (goutte, presse et assemblage de 85 % de goutte et de 15 % de presse), il a conclu qu'indépendamment de

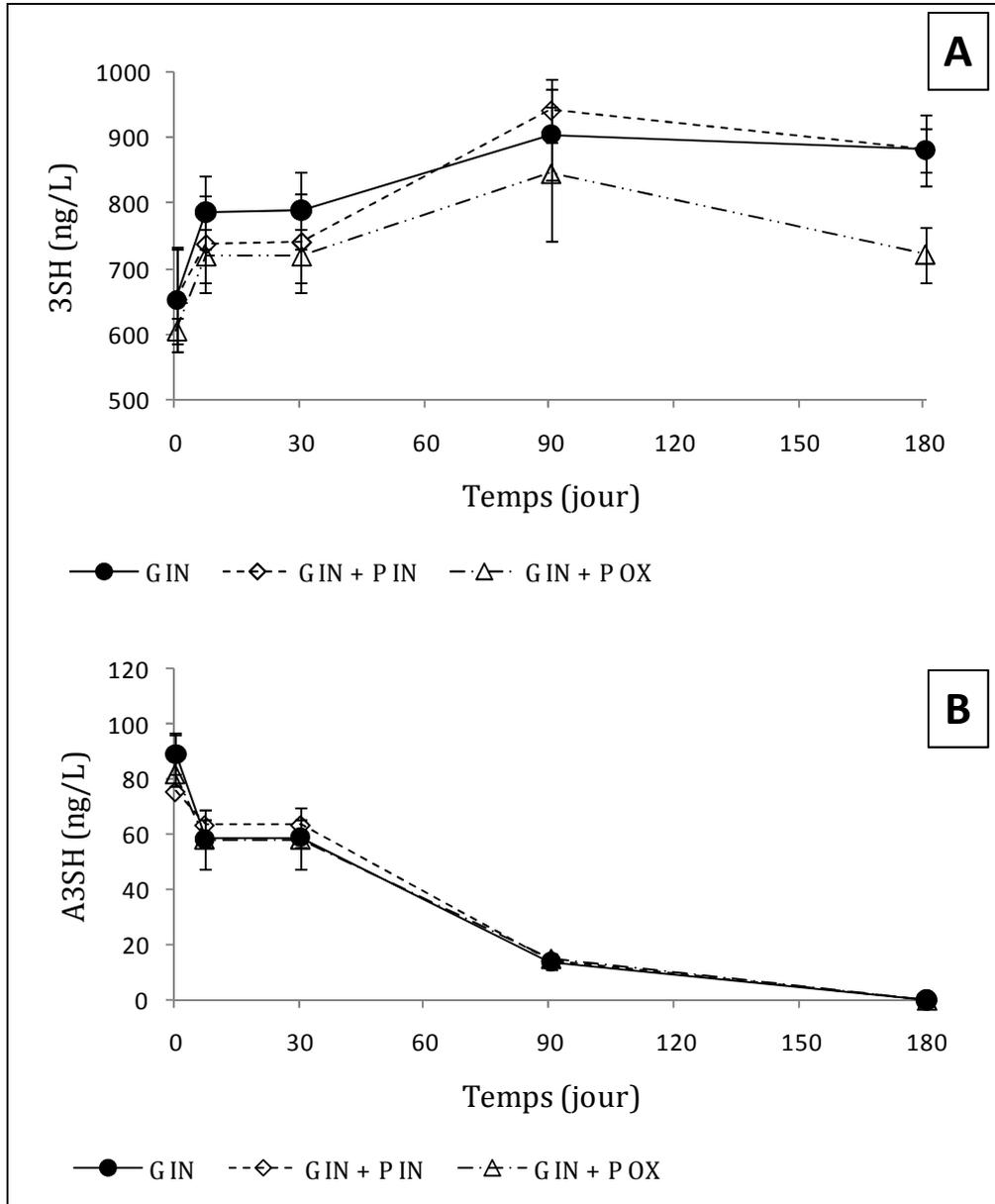


Figure 90. Evolution de la teneur en **(A) 3SH** et en **(B) A3SH** au cours de l'élevage sur lies totales de vins de Sauvignon blanc vinifiés à partir de moûts d'égouttage obtenus sous condition d'inertage et assemblés avant la fermentation alcoolique avec 15 % de moût de presse élaborés en conditions d'inertage (PIN) ou d'oxydation (POX)

leur teneur dans les vins jeunes, ces composés volatils demeurent stables au cours de l'élevage sur lies. Ainsi, les vins jeunes obtenus à partir de jus d'égouttage et possédant des concentrations élevées en thiols volatils les conserveront jusqu'à la fin de l'élevage.

Nous avons vu, au paragraphe précédent, qu'en conditions réelles de vinification, la protection contre l'oxydation des moûts peut induire un gain significatif en **3SH** dans les vins de goutte. Ce gain est observé dans une moindre mesure pour les vins de presse. En sachant que les teneurs en flavan-3-ols sont plus élevées dans les vins élaborés à l'abri de l'oxygène que dans ceux élaborés en conditions d'oxydation, nous avons étudié l'impact du degré d'oxydation des moûts de presse sur l'évolution des thiols volatils au cours de l'élevage sur lies. L'oxydation des moûts de presse et leur assemblage avec les moûts de goutte est une pratique œnologique fortement conseillée pour la production des vins avec un meilleur potentiel de garde.

Dans le cadre de cette étude nous nous sommes placés en conditions réelles de vinification. En effet, les assemblages des moûts de goutte avec ceux de presse, d'un degré d'oxydation variable, ont été effectués selon le protocole présenté précédemment.

Les modalités considérées sont :

- Goutte inertée (G IN)
- Goutte inertée et presse inertée (15 %) (G IN + P IN)
- Goutte inertée et presse oxydée (15 %) (G IN + P OX)

L'essai est effectué dans un château de Pessac Léognan en 2007. La fermentation est réalisée en barriques "d'un vin" par zymaflore X5. Nous avons suivi l'évolution des teneurs en thiols volatils dès la fin de la fermentation alcoolique jusqu'au 6^{ème} mois d'élevage sur lies. Celles-ci sont remises en suspension chaque semaine pendant le premier mois et deux fois par mois pour les mois qui suivent, par la technique du « bâtonnage ».

D'après la **Figure 90, A**, la cinétique d'évolution du **3SH** au cours des premiers jours qui suivent la fin de la fermentation alcoolique est similaire à celle décrite par Tominaga (1998). Cependant, dans notre cas, la concentration en **3SH** des vins de goutte est légèrement supérieure à celle de l'assemblage (85 : 15, v/v) (IN et OX). En effet,

durant les six mois d'élevage sur lies, avec un bâtonnage intensif et régulier, nous obtenons une stabilisation des thiols volatils dans les trois modalités expérimentales. Dans notre étude, le mode d'élaboration des presses n'a aucun impact significatif sur les teneurs en **3SH** des vins issus d'assemblage. Les teneurs en **A3SH** diminuent d'une façon régulière et homogène au cours de l'élevage en barriques (**Figure 90, B**). L'**A3SH** s'hydrolyse rapidement en libérant son alcool, de sorte que sa contribution olfactive dans les vins après six mois d'élevage est très limitée. Le **4MSP** n'est pas détecté dans les vins des différentes modalités expérimentales.

9.3 OXYDATION DES MOÛTS ET PROFIL SENSORIEL DES VINS

Dans l'étude présentée précédemment, nous avons démontré que la maîtrise de l'apport d'oxygène au cours du pressurage des raisins issus du cépage Sauvignon blanc, influence directement la stabilisation des thiols volatils dans les vins et ceci selon le degré d'extraction des moûts. En effet, l'élaboration des moûts en condition d'inertage conduit à un gain de la concentration en **3SH** seulement dans les vins issus des moûts de goutte. La protection contre l'oxydation des moûts de presse n'a aucun effet significatif sur la stabilisation des teneurs en thiols volatils des vins. Cependant à la dégustation, les vins de presse élaborés à l'abri de l'oxygène apparaissent beaucoup plus fins et frais que ceux élaborés en condition d'oxydation.

Dans le but de mieux comprendre l'incidence du degré d'oxydation des jus sur la préservation de la complexité aromatique des vins de presse, une approche sensorielle a été envisagée dans le cadre d'une étude appliquée au laboratoire pour mettre en évidence des fractions de composés volatils d'intérêt à partir d'extrait brut de composés de l'arôme des vins. Cette démarche proposée par Ferreira *et al.* (1999) et adaptée par Pineau *et al.* (2009) consiste à fractionner par CLHP des extraits bruts de vins blancs et à soumettre les fractions obtenues à un jury pour qu'il puisse les décrire olfactivement. Ensuite, selon une démarche conventionnelle, les fractions les plus pertinentes d'un point de vue olfactif sont ré-extraites en vue d'analyses par chromatographie gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG-O).

9.3.1 VINS ANALYSES

Quatre vins de Sauvignon blanc (2009) élaborés ou non en condition d'inertage selon le protocole expérimental décrit précédemment et provenant de trois châteaux de la région de Bordeaux (Graves, Pessac-Léognan et Entre Deux Mers) ont été extraits et analysés par CLHP préparative. Ces vins issus des moûts de première pressée (goutte) et de fin de pressée (presse) (**Tableau 19**) possèdent des styles aromatiques divers. Il semble donc intéressant de comparer leurs profils par CLHP préparative pour tenter de caractériser leur différence.

Tableau 19. Origine et mode d'élaboration des vins jeunes (2009) analysés par CLHP préparative

Modalités	Appellation	Pressée	Conditions d'élaboration
G1 in	Graves	Goutte	inertage
G1 ox			oxydation
P1 in		Presse	inertage
P1 ox			oxydation
G2 in	Pessac-Léognan	Goutte	inertage
G2 ox			oxydation
P2 in		Presse	inertage
P2 ox			oxydation
G3 in	Entre Deux Mers	Goutte	inertage
P3 ox			oxydation

9.3.2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Nous avons utilisé la technique de fractionnement par CLHP proposée par Ferreira *et al.* (1999) et adaptée par Pineau *et al.* (2009). L'extrait organique du vin est analysé par chromatographie en phase inverse, à l'aide d'un gradient linéaire eau éthanol, sur une colonne apolaire de type C-18. Les conditions chromatographiques sont détaillées au paragraphe 2.1.2. 50 fractions par échantillon de vin de 1 mL sont collectées et évaluées sensoriellement par olfaction directe par un panel de dégustateurs. Parmi les fractions désignées comme différentes, après analyse comparative selon le mode d'élaboration des vins, certaines considérées comme marquantes ont été ré-extraites par le dichlorométhane pour être analysées par CPG-O.

Tableau 20. Description aromatique des fractions obtenues par CLHP préparative à partir d'extraits de vins de différentes pressées, élaborés ou non en condition d'inertage. L'intensité aromatique est évaluée sur une échelle de 0 à 10, du moins au plus intense, indiquée en parenthèse

Fraction (min)	Modalités			
	Goutte		Presse	
	<i>Inertée (G1 in)</i>	<i>Oxydée (G1 ox)</i>	<i>Inertée (P1 in)</i>	<i>Oxydée (P1 ox)</i>
1	-	-	-	-
2	-	-	-	floral
3	-	-	-	-
4	-	-	-	carton
5	-	-	-	terpénique
6	floral	-	lacté	compote de pomme
7	-	-	léger épicé	clou de girofle
8	-	-	-	floral
9	-	-	-	-
10	pain grillé	pain grillé	pain, café grillé	marc de café
11	-	-	céleri	oignons confits
12	-	acides gras	acides gras	acides gras, sueur
13	citron vert	acétate d'éthyle	-	solvant
14	vanille, caramel	caramel	caramel	caramel
15	viande grillée	caramel, sueur	-	amylique
16	amylique	amylique	amylique	amylique
17	amylique	amylique	amylique	amylique
18	rose fanée	rose	rose	rose
19	rose fraîche	rose fraîche	rose	rose
20	végétale, poivré	-	-	rose fanée
21	-	solvant	-	floral
22	-	-	-	sauce soja
23	solvant	buis (5)	thiols, irritant (5)	irritant, thiols (7)
24	buis (5)	buis (6)	haricots blancs, thiols (8)	irritant, herbacé (9)
25	phénol	phénol	clou de girofle	épicé, acides gras
26	amylique	esters	-	végétale
27	clou de girofle	clou de girofle	phénol	savon
28	floral	rose	floral	coton mouillé
29	solvant	banane	banane	banane
30	banane	banane	banane	banane
31	fruité, terpénique	fruits confits	buis	pomme, poire
32	frais, végétale	verniss	floral	terpénique
33	-	floral	floral	terpénique
34	-	floral	floral	poire
35	-	feuilles de tomate	floral	plastique
36	-	lourd	-	esters
37	esters	-	esters	savon, esters
38	esters	savon, esters	esters	esters
39	grillé	-	-	-
40-50	éthanol	éthanol	éthanol	éthanol

- : non détecté

9.3.3 ETUDE DESCRIPTIVE DES FRACTIONS AROMATIQUES

Le fractionnement par CLHP préparative des extraits organiques des vins, nous a permis de décrire les caractéristiques aromatiques de chaque fraction par olfaction directe. Les bonnes conditions analytiques (système CLHP inerte) nous ont permis d'avoir des fractions de qualité similaire et répétable. Il apparait que, pour les deux groupes de vins (goutte et presse), l'ensemble des fractions présentent une bonne homogénéité du profil sensoriel. En effet, les conditions d'élaboration des vins modifient uniquement l'intensité olfactive de chaque fraction. Les résultats d'olfaction sont présentés dans le **Tableau 20**.

Par une étude comparative entre les fractions issues des vins de goutte et de presse, menée avec quatre dégustateurs experts il a été possible d'isoler deux fractions (le F23 et F24) présentant des odeurs désagréables et lourdes caractéristiques des vins de presse. Ces fractions ne sont pas retrouvées dans les vins de goutte.

Dans le but de caractériser les composés constituant l'odeur désagréable des vins de presse, les fractions F23 et F24 ont été assemblées et ré-extraites au dichlorométhane pour analyse CPG-O.

L'analyse CPG-O de l'extrait F₂₃₋₂₄ présente 17 zones odorantes (ZO) sur une colonne BP20, parmi lesquelles seulement une (ZO1) rappelle l'odeur désagréable initialement perçue (**Tableau 21**). La ZO1 est détectée dans tous les extraits organiques des vins de presse et présente une plus forte intensité dans l'ensemble des presses élaborées en conditions d'oxydation. La présence de la ZO1 a été confirmée sur une colonne polaire (BP20) et apolaire (BPX5). La ZO1 possède un indice de rétention linéaire (IRL) de 1411 et de 847 sur une colonne BP20 et BPX5 en correspondance.

Tableau 21. Aromagramme sur colonne polaire BP20 d'extrait organique des fractions F₂₃₋₂₄ purifiées par CLHP préparative. L'intensité aromatique est évaluée sur une échelle de 0 à 10, du moins au plus intense, indiquée entre parenthèse

TR (min)	IRL	Descripteur de l'odeur	
8,8	1119	sulfure (1)	
12,2	1219	buis vert (3)	
13,2	1244	épicé	
14,4	1275	végétale, buis (1)	
15,9	1310	champignon de paris	
16,6	1327	viandé	
18,0	1360	végétale (4)	
19,2	1383	buis, pipi de chat (6)	
20,5	1411	irritant, tubercule de fritillaire, haricots blancs (7)	ZO1
27,7	1569	grillé	
29,8	1630	laine mouillée	
30,9	1666	chou	
31,8	1695	fromage (2)	
33,6	1742	grillé (1)	
34,2	1757	buis, complexe (3)	
38,9	1881	fruité	
40,5	1925	épicé	

9.4 CARACTERISATION D'UN THIOL VOLATIL MALODORANT, L'ETHYL-2-SULFANYL ACETATE, NOUVEAU MARQUEUR ASSOCIE A L'OXYDATION DES MOUTS

9.4.1 IDENTIFICATION DE L'ETHYL-2-SULFANYL ACETATE

L'analyse directe de l'extrait F₂₃₋₂₄ par CPG-SM (Méthode 1) sur une colonne BP20 n' a pas permis d'associer directement la ZO1 à un pic chromatographique. Ce résultat peut être fortement lié à la forte dilution de l'extrait organique lors du fractionnement par CLHP préparative. Par conséquent, nous nous sommes orientés vers la recherche de la ZO1 dans l'extrait brut du vin. Le descripteur aromatique de la ZO1 nous a permis de formuler l'hypothèse qu'il s'agissait d'un composé possédant une fonction thiol. Par conséquent, le traitement d'extrait organique au *p*-hydroxymercuribenzoate de sodium (*p*-HMB) a été réalisé selon le protocole décrit au paragraphe 2.1.1.4.1.

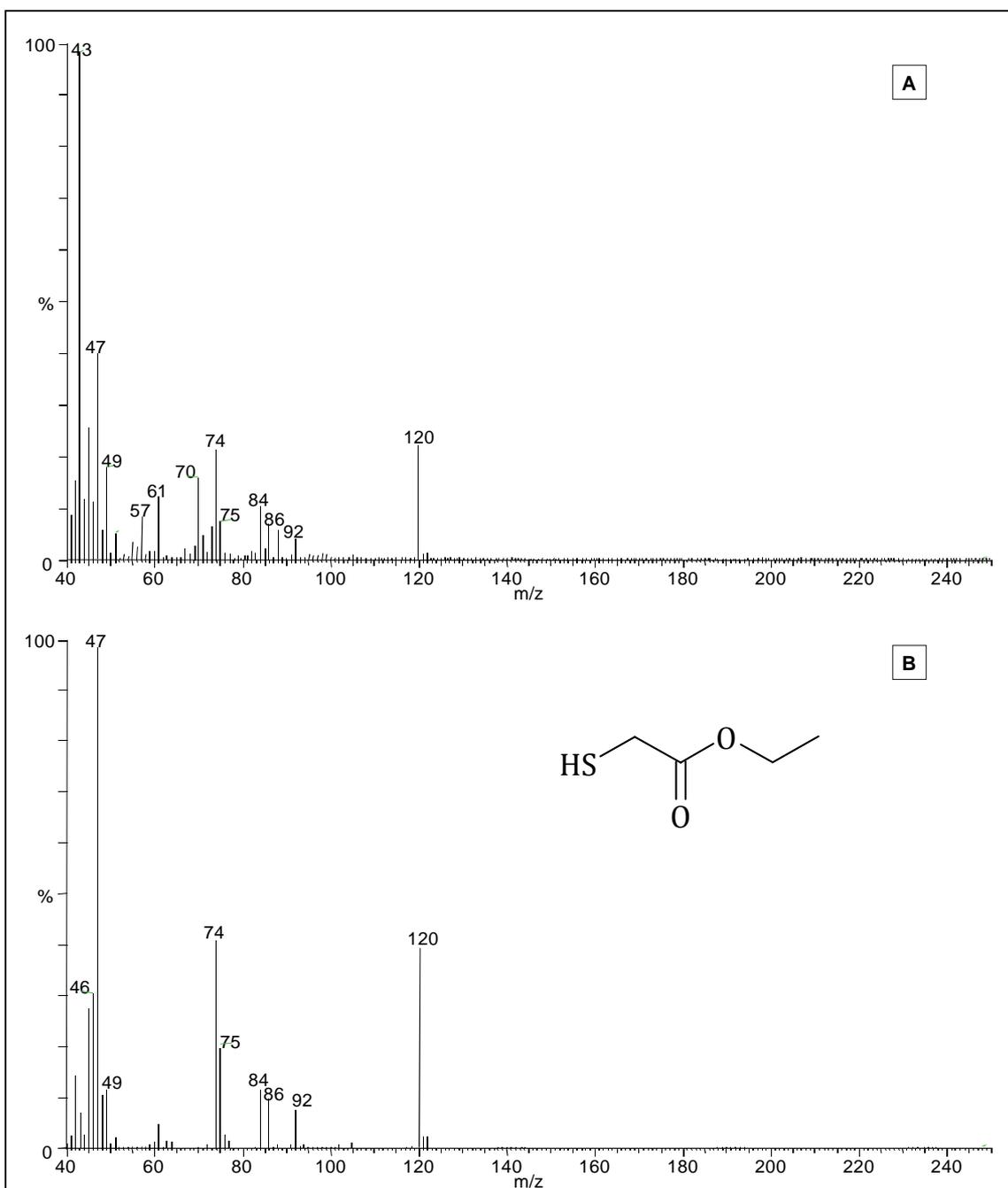


Figure 91. Spectres de masse en mode EI sur une gamme des masses de 50 à 450 uma **(A)** du composé correspondant à la Z01 et **(B)** de l'E2SA de synthèse

L'extraction sélective des thiols volatils à partir de 500 mL de vin a confirmé la nature chimique supposée du composé présent dans la Z01, c'est-à-dire, possédant un groupement thiol. En effet, le traitement au *p*-HMB n'a pas modifié la perception de la Z01 au cours de l'analyse par GPG-O.

Par la suite, l'analyse de l'extrait organique traité au *p*-HMB par CPG-O-SM a permis de mettre en évidence un pic chromatographique associé à la Z01. Il s'agit de l'éthyl-2-sulfanyl acétate (**E2SA**). Son identification a été réalisée sur la base de son indice linéaire de rétention sur deux colonnes capillaires (BP20 et BPX5) et de son spectre de fragmentation en impact électronique (EI, 70 eV) (**Figure 91**). Son identification a été rapportée dans les emballages pharmaceutiques (Sides *et al.*, 2001). Ce composé a été cité par Darriet (2002) dans les vins de Sauvignon blanc. L'**E2SA** n'a pas été détecté dans le jus de raisin, il est donc formé au cours de la fermentation alcoolique.

9.4.2 DETERMINATION DU SEUIL DE PERCEPTION OLFACTIVE DE L'ÉTHYL-2-SULFANYL ACÉTATE

Des tests sensoriels ont été réalisés avec un panel de dégustateurs de la Faculté d'œnologie afin de déterminer le seuil de perception olfactive de l'**E2SA**.

Le seuil de perception du composé est déterminé selon le protocole décrit précédemment (§ 2.6.1). L'**E2SA** est ajouté en quantités croissantes, soit de 50 ng/L à 400 ng/L afin d'obtenir cinq concentrations différentes. Les résultats de l'analyse sensorielle sont résumés dans le **Tableau 22**. L'**E2SA**, dont l'odeur rappelle la moutarde, le chanvre et le tubercule de Fritillaire, possède un seuil de perception olfactive assez faible de l'ordre de 70 ng/L dans l'eau, de 200 ng/L en solution modèle et situé entre 200-400 ng/L selon le vin blanc.

Tableau 22. Seuils de perception olfactive de l'éthyl-2-sulfanyl acétate dans l'eau, en solution modèle et dans le vin blanc

Pureté	Descripteur olfactif	Eau	Solution modèle	Vin blanc sec
> 98%	moutarde, le tubercule de Fritillaire <i>Fritillaria meleagris</i>	70 ng/L	200 ng/L	200 à 400 ng/L

Tableau 23. Paramètres de la courbe de calibration d'éthyl-2-sulfanyl acétate. Répétabilité de la méthode de dosage

CV%	Taux de récupération	Courbe de calibration	R²	Gamme de linéarité	Limite de quantification
7 %	78 %	$y = 0,0014 x + 0,04$	0,995	11-2000 ng/L	11 ng/L

9.4.3 VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE DE L'ETHYL-2-SULFANYL ACETATE DANS LES VINS

9.4.3.1 Conditions analytiques

L'**E2SA** est quantifié par CPG-SM de la même manière que les autres composés soufrés déjà identifiés dans le vin. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne BP20 et la détection est effectuée par spectrométrie de masse sur les ions caractéristiques de la molécule (mode SIM). L'ion sélectionné pour la quantification de l'**E2SA** correspond à l'ion moléculaire : $m/z = 120$.

9.4.3.2 Gamme étalon

Afin de doser ce nouveau thiol volatil, nous avons repris la méthode de quantification décrite par Tominaga & Dubourdieu (2006) et nous avons vérifié qu'elle permettait son dosage. Des gammes étalons ont été préparées en supplémentant 50 mL de vin blanc à cinq concentrations croissantes d'**E2SA** allant de 50 à 2000 ng/L. Pour chaque concentration, le thiol volatil est extrait selon la méthode précédemment décrite. Le vin utilisé est un vin blanc d'AOC Muscadet. Il est préalablement additionné de glutathion (1 mM) afin de protéger les thiols volatils de l'oxydation.

Une courbe standard est construite sur la base d'une corrélation linéaire entre les concentrations et le rapport de la hauteur du pic d'intérêt sur celle de l'étalon interne. L'ensemble des résultats est présenté dans le **Tableau 23**. Le coefficient de détermination R^2 est supérieur à 0,99. Ce résultat vérifie donc l'hypothèse de la linéarité de la réponse et de la concentration en **E2SA**.

9.4.3.3 Répétabilité, limite de quantification et taux de récupération

La répétabilité est déterminée à partir d'une série de cinq extractions. Le coefficient de variation du dosage, indiqué dans le **Tableau 23**, est toujours inférieur à 10 % ce qui est satisfaisant. Le **Tableau 23** précise, en outre, la limite de quantification du composé qui correspond à la concentration minimale générant un signal dix fois supérieur au bruit de fond. Enfin, le taux de récupération de l'**E2SA** est déterminé selon la méthode décrite par Tominaga *et al.* (2000b), est supérieur à 78 % quelle que soit la quantité de thiol ajoutée.

Tableau 24. Dosage de l'éthyl-2-sulfanyl acétate (ng/L) dans des vins blancs secs et rosés jeunes de différentes appellations

	Appellation	Millésime	Cépage	E2SA
<i>Seuil de perception olfactive</i>				200-400
<i>Vins blancs</i>	Graves	2009	Sauvignon blanc	225
	Graves	2008	Sauvignon blanc	759
	Pessac Léognan	2009	Sauvignon blanc	245
	Pessac Léognan	2008	Sauvignon blanc	364
	Entre Deux Mers	2009	Sauvignon blanc	797
	Entre Deux Mers	2009	Sauvignon blanc	670
	Médoc	2008	Sauvignon blanc	247
	Médoc	2009	Sauvignon blanc	329
	Nouvelle Zélande	2008	Sauvignon blanc	262
	Alsace	2007	Riesling	1317
	Wachau	2008	Riesling	548
	Rheingau	2008	Riesling	214
	<i>Vins rosés</i>	Graves	2009	Merlot
Bandol		2009	Mourvèdre, Grenache, Cinsault	1105
Bandol		2009	Mourvèdre, Grenache, Cinsault	933
Bandol		2009	Mourvèdre, Grenache, Cinsault	1019
Côtes de Provence		2009	Grenache, Cinsault, Syrah	782

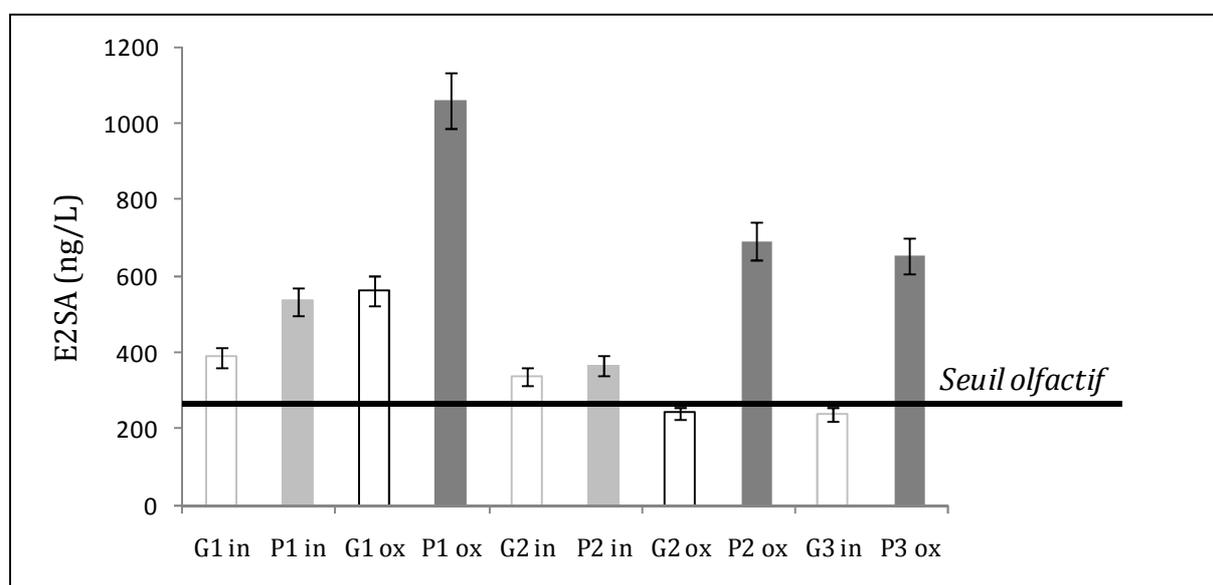


Figure 92. Incidence du degré d'oxydation des moûts sur les teneurs en E2SA des vins jeunes des différentes appellations

L'ensemble de ces résultats valide donc la méthode de quantification existante pour le dosage de l'**E2SA**. En conséquence, il est maintenant possible de doser l'**E2SA** dans les vins blancs et rosés et ainsi de déterminer son impact sur l'arôme total.

9.4.4 CONTRIBUTION DE L'ETHYL-2-SULFANYL ACETATE DANS LES VINS BLANCS ET ROSES

Afin d'évaluer la contribution de l'**E2SA** à l'arôme des vins blancs, nous l'avons dosé dans des vins issus de différentes appellations, cépages, et millésimes (**Tableau 24**).

Huit vins blancs des millésimes 2008 et 2009 de la région bordelaise ont été dosés selon la méthode précédemment validée. Les concentrations moyennes des teneurs en **E2SA** des vins de Sauvignon blanc jeunes, varient de 225 à 759 ng/L. Les vins issus de la région d'Entre Deux Mers ont les concentrations les plus élevées. L'**E2SA** est aussi retrouvé dans les vins issus du cépage Riesling. La fourchette de concentration en **E2SA** retrouvés dans ces vins est très large. Les concentrations fluctuent entre 262 et 1597 ng/L selon l'appellation d'origine des vins. Par ailleurs, les teneurs en **E2SA** dans les vins rosés jeunes sont en moyenne bien supérieures à celles retrouvées dans l'ensemble des vins blancs secs.

Cette analyse est complétée par le dosage de ce composé dans les vins rosés, en tenant compte de l'éventuelle incidence organoleptique des nuances olfactives désagréables de cette molécule sur la fraîcheur et le fruité caractéristique de ces vins. L'ensemble des résultats est présenté dans le (**Tableau 24**).

Les concentrations en **E2SA** retrouvées dans les vins blancs et rosés sont largement supérieures à son seuil de perception olfactive. Par conséquent, la présence d'**E2SA** dans les vins blancs peut modifier la perception de l'arôme global de ces vins.

9.4.5 INCIDENCE DU DEGRE D'OXYDATION DES MOÛTS SUR LE CONTENU EN ETHYL-2-SULFANYL ACETATE DES VINS

Afin d'étudier l'incidence des conditions d'élaboration des vins (inertage ou non) sur le contenu en **E2SA** des vins jeunes, le dosage de ce composé est effectué dans les vins préalablement évalués sensoriellement par CLHP préparative (**Tableau 19**).

Il apparaît que les teneurs en **E2SA** sont toujours significativement plus élevées dans les vins de presse (**Figure 92**), indépendamment de l'appellation d'origine. Ceci est

d'autant plus vrai dans les vins issus de moûts de presses oxydés. Quoi qu'il en soit, ces résultats analytiques sont en accord avec ceux obtenus par l'analyse descriptive. En revanche, le degré d'oxydation des moûts de goutte n'a aucun impact significatif sur la formation d'**E2SA** dans le vin correspondant. Il est possible que le mode d'élaboration mais aussi la composition des vins de presse créent des conditions plus propices à sa formation que les vins de goutte. Des études complémentaires devront être réalisées pour approfondir nos connaissances sur la genèse de ce composé.

9.5 MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION DE L'AROME DES VINS JEUNES SELON LE DEGRE D'OXYDATION DES MOUTS

Nous avons vu précédemment que la maîtrise de l'apport d'oxygène au cours de l'élaboration des vins de Sauvignon n'a pas d'effet significatif sur la stabilisation des thiols volatils dans les vins de presse. Nous avons également démontré que le mode d'élaboration des vins peut modifier l'intensité aromatique de certaines fractions, favorisant ainsi la formation des composés impactant l'équilibre sensoriel. Ces modifications sensorielles sont particulièrement notables dans les vins de presse. Ainsi, l'absence de typicité aromatique des vins de presse ne peut pas être associée uniquement à une perte en thiols volatils. Il était donc nécessaire de mettre en place une approche plus globale de la composition aromatique des vins.

Sachant que les conditions d'élaboration des vins contribuent fortement à la composition en arômes fermentaires (esters) et en composés en C6, nous avons quantifié ces composés dans les vins élaborés ou non en conditions d'inertage (**Tableau 19**). Ainsi, nous avons dosé les composés alcools à six atomes de carbone (alcools en C6 tels *cis*-3-hexénol, *trans*-3-hexénol, hexanol), les esters éthyliques des acides gras (**EEAG**) (butanoate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, heptanoate d'éthyle, octanoate d'éthyle, lévulinate d'éthyle, 3-hydroxybutanoate d'éthyle) et certains acétates d'alcools supérieurs (**EAS**) (l'acétate de phényléthyle et acétate d'isoamyle).

Nous notons des comportements distincts parmi les vins issus des moûts de goutte (G) et ceux issus des moûts de presse (P). En effet, le mode d'élaboration (inertage ou non) des vins issus des moûts de goutte n'a aucun impact sur la

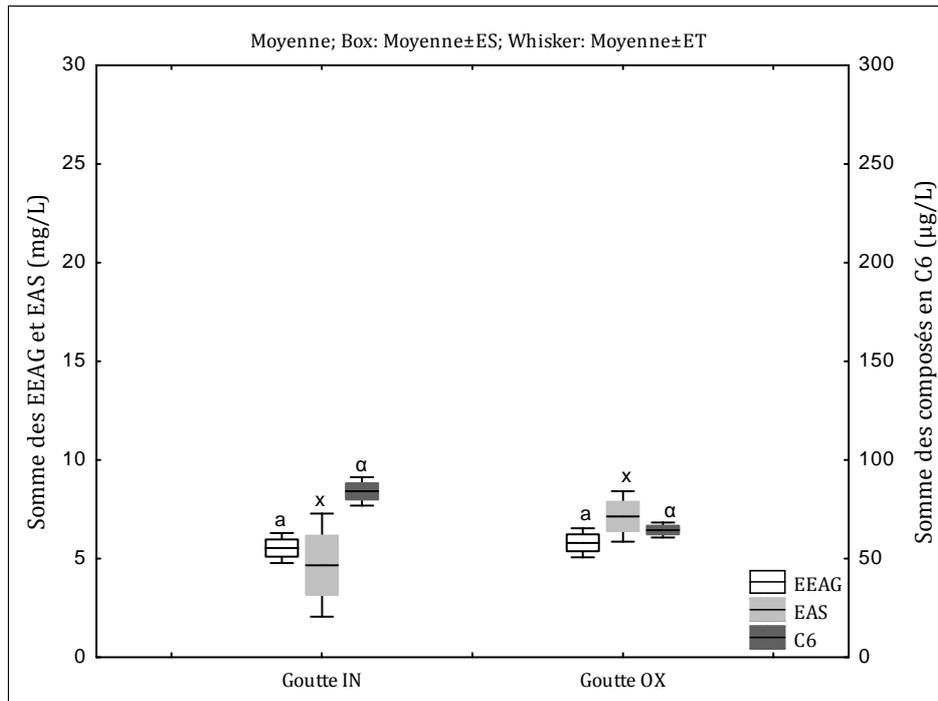


Figure 93. Incidence du degré d'oxydation [(inertage (IN) ou non (OX)] des moûts de goutte sur la composition en composés C6, en esters éthyliques des acides gras (**EEAG**) et en esters des alcools supérieurs (**EAS**) des vins jeunes des différentes appellations

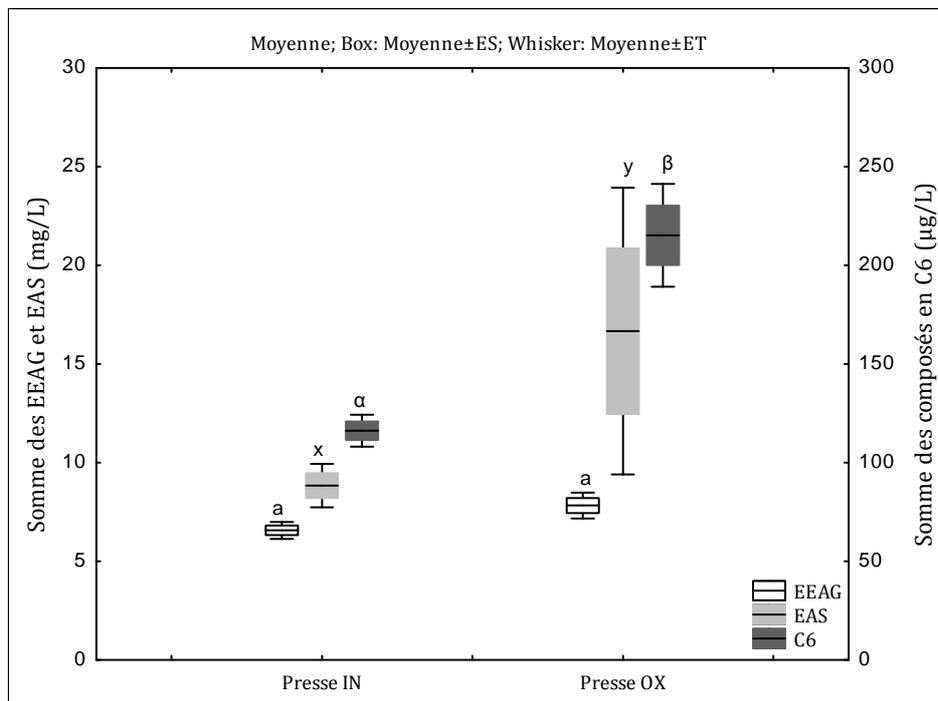


Figure 94. Incidence du degré d'oxydation [(inertage (IN) ou non (OX)] des moûts de presse sur la composition en composés C6, en esters éthyliques des acides gras (**EEAG**) et en esters des alcools supérieurs (**EAS**) des vins jeunes des différentes appellations

composition en alcools en C6 et en esters fermentaires (**EEAG** et **EAS**) (**Figure 93**). Par contre, la maîtrise de l'apport d'oxygène dans les moûts de presse impacte significativement sur la composition en arômes fermentaires et en composés C6 des vins correspondants (**Figure 94**). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'élaboration des vins de presse en condition d'oxydation favorise, en moyenne d'un facteur 2, la formation des composés en C6 et des esters des alcools supérieurs qui contribuent respectivement aux nuances végétales et florales. Par ailleurs, les concentrations des esters éthyliques d'acides gras ne sont pas modifiées par le mode d'élaboration des vins ou par le niveau d'extraction des moûts. Ainsi, ces résultats, valident la contribution du mode d'obtention des jus sur la composition aromatique des vins jeunes.

9.6 DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude de l'élaboration des moûts à l'abri de l'oxygène a mis en évidence de variations importantes dans les teneurs en flavan-3-ols et en glutathion. En revanche, le degré d'oxydation des moûts n'a pas d'influence sur les teneurs en P-S-Cys-3SH. Les variances mesurées au niveau de la composition des moûts se retrouvent également dans les vins après fermentation alcoolique. En effet, les vins issus des moûts de goutte et presse inertés (protégés d'oxydation) contiennent plus de flavan-3-ols (40 %) que les modalités oxydées. De plus, les conditions d'inertage semblent favoriser la conservation de la teneur en glutathion dans les vins. Ce phénomène est beaucoup plus marqué dans les vins de presse (P) qui contiennent 50 % de plus de glutathion que leurs analogues de la modalité oxydée.

Par ailleurs, la protection des moûts contre l'oxydation au cours du pressurage (modalité inertée), induit un gain en **3SH** principalement dans les vins de provenance de moûts d'égouttage. Cet effet étant moindre dans les vins issus de moûts de fin de pressée. La plus faible teneur en **3SH** dans les vins de fin de pressée (P), s'accompagne d'une diminution importante de la concentration en (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, entre le moût et le vin. Diverses hypothèses sont considérées pour expliquer ces écarts (formation de quinones en cours de vinification, adsorption des flavan-3-ols conduisant à modifier le métabolisme levurien ou l'excrétion des thiols).

Par ailleurs, le degré d'oxydation des moûts de presse au cours de leur élaboration n'a aucun impact analytique sur les teneurs en **3SH** des vins assemblés avec

la goutte obtenue par pressurage sous gaz neutre. Cependant, le suivi des teneurs en thiols volatils dans les vins élaborés en conditions d'inertage met en évidence que ces conditions sont favorables à la stabilisation d'arômes variétaux au cours des six premiers mois d'élevage sur lies.

La perception d'une odeur complexe, comme le vin, résulte de la présence des nombreuses molécules et de leurs interactions par le biais de synergie et/ou d'antagonisme (Marshall *et al.*, 2006). Cependant, les interactions entre molécules odorantes, ainsi que les mécanismes impliqués dans leur reconnaissance par le bulbe olfactif sont encore très mal connus (Shepherd, 2006).

L'application de la méthode de fractionnement par CLHP nous a permis de discriminer les vins provenant des moûts de la première pressée et ceux de la fin de pressée selon leur composition aromatique. En effet, nous avons identifié l'**E2SA**, un thiol volatil malodorant, rappelant l'odeur de la moutarde, du chanvre et du tubercule de Fritillaire (*Fritillaria meleagris*). Ce composé, disposant d'un seuil de perception olfactive relativement bas (200 à 400 ng/L selon les vins) peut modifier la perception de l'arôme global. Pour tous les dégustateurs interrogés, le seuil de préférence correspond au seuil de perception de ce composé.

Nous montrons par ailleurs que les teneurs en **E2SA** dosées dans les vins blancs et rosés jeunes varient en fonction du cépage et de l'origine. Cette teneur est aussi influencée par les conditions d'obtention des jus de raisins. Ainsi, les vins issus des moûts de fin de pressée, élaborés en condition d'oxydation, contiennent des teneurs plus élevées en ce composé par rapport à ceux élaborés à partir de jus d'égouttage, ou de pressurage sous atmosphère inertée.

Cette étude nous a donc permis de progresser dans la connaissance de certains aspects liés à la moindre composition des vins de presse en thiols volatils de l'arôme variétal (**4SMP**, **3SH**, **A3SH**). Mais paradoxalement, il apparaît que la composition des moûts de presse crée des conditions propices à la formation de composés volatils, qui peuvent contribuer à modifier l'arôme des vins.

Conclusion générale

La contribution des thiols volatils à l'arôme du vin est connue depuis une vingtaine d'années grâce aux travaux préliminaires de Darriet (1993) et Tominaga (1998). Ces travaux ont contribué, entre autres, à l'interprétation des pertes de typicité aromatique observées dans les vins élaborés en conditions d'oxydation et au cours de l'élevage et de la conservation en bouteilles. Il est bien établi que l'instabilité de l'arôme variétal du Sauvignon blanc est due à la nature chimique des thiols volatils. Ces composés aromatiques clés possédant un groupement sulfhydryle dans leur structure sont inévitablement sensibles à l'oxydation. La dégradation oxydative des thiols semble être liée à leur réactivité avec les composés phénoliques oxydés.

Dans ce manuscrit, nous avons participé à l'avancement des connaissances sur les mécanismes qui peuvent expliquer l'évolution des thiols volatils, de leur genèse au cours de la vinification, à leur conservation dans le vin en bouteilles. En particulier, nous avons évalué les conséquences directes ou indirectes de l'oxydation des polyphénols sur les teneurs de ces composés et la perception des caractères organoleptiques. Les principaux résultats acquis sont les suivants :

1. Les études menées en solution modèle, de composition proche du vin, nous ont permis d'établir une réactivité différente de thiols volatils très odorants de l'arôme des vins selon leur nature chimique, vis à vis des formes oxydées des flavan-3-ols. Nous montrons également que le 2-furanméthanethiol (thiol primaire) est beaucoup plus réactif que le 3-sulfanylhéxanol (thiol secondaire) et la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (thiol tertiaire) avec la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine. Ce classement de la réactivité nucléophile est principalement attribué à l'effet stérique qui diminue du thiol primaire au thiol tertiaire. Au travers de cette étude, nous mettons également en évidence que la (-)-épicatéchine est plus réactive que la (+)-catéchine en milieu acide et en conditions d'oxydation chimique (Fe^{3+} , oxygène). Sa forte oxydabilité, clairement démontrée, peut

également induire une perte de l'efficacité du dioxyde de soufre vis-à-vis de la stabilité des thiols volatils.

2. D'un point de vue mécanistique, nous montrons que la réaction d'addition des thiols volatils sur les formes oxydées des composés phénoliques, selon le principe de la réaction de Michaël, est à l'origine de la dégradation de l'arôme variétal. La synthèse et la caractérisation des adduits entre les principaux composés phénoliques des moûts et des vins blancs, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine ainsi que l'acide caftarique avec un thiol volatil clé, le 3-sulfanylhéxanol, a permis de démontrer une sélectivité des sites d'addition du thiol de référence pour chaque composé phénolique oxydé. Il apparaît clairement que la formation des adduits est peu dépendante de la concentration du substrat polyphénolique mais directement liée au type. Nous soulignons par ailleurs que la présence des métaux et plus particulièrement du fer (Fe^{2+}) favorise la production des adduits. Au contraire, le dioxyde de soufre limite leur formation. Ainsi, nous démontrons que ce phénomène est présent dans des conditions œnologiques et peut donc participer à la perte des thiols volatils au cours de la vinification et de la conservation des vins.

Ainsi, la compréhension de ces mécanismes fondamentaux nous a permis de décliner nos travaux à l'étude de l'influence de la présence des flavan-3-ols au cours de la vinification et de l'élevage des vins sur ces composants de l'arôme des vins blancs.

3. Nous démontrons ainsi l'impact de (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine sur la diminution de la teneur en 3-sulfanylhéxan-1-ol, thiol volatil de l'arôme variétal des vins blancs à partir d'une période courte de conservation en bouteilles (10 à 12 mois). Nous mettons aussi clairement en évidence les effets cumulatifs des flavan-3-ols et du type d'obturateur sur l'évolution des composés de l'arôme variétal au cours de la conservation des vins. Plus l'obturateur est perméable à l'oxygène, plus la dégradation de thiols volatils, en présence de flavan-3-ols, dans les vins blancs secs est importante.

Le rôle des flavan-3-ols sur la formation de composés volatils marqueurs du vieillissement oxydatif des vins a également été abordé. Ainsi, la présence des flavan-3-ols dans le vin au cours de leur conservation est bien corrélée statistiquement avec la production des composés volatils clés marqueurs du vieillissement aromatique défectueux dans les vins blancs secs de différents crus de la région bordelaise. A partir d'une expérimentation effectuée au laboratoire, nous avons étudié l'influence de l'ajout

de (+)-catéchine sur l'évolution oxydative des vins blancs secs. Nous montrons que la présence de (+)-catéchine, en conditions d'oxydation accélérée, amplifie la formation du sotolon et du phénylacétaldéhyde dans les vins blancs. Les paramètres physicochimiques impliqués dans la formation de ces composés restent cependant à préciser.

4. Nous avons ensuite cherché à approfondir les connaissances concernant l'impact des flavan-3-ols au cours de la vinification sur les composés thiols volatils et d'autres composés associés au potentiel qualitatif des moûts et vins de Sauvignon blanc. En nous basant sur une étude exhaustive de la composition de moûts et de vins de différents crus, selon les modalités d'extraction des jus, nos résultats établissent que les vins élaborés à partir de jus de fin de pressée, contenant des teneurs plus faibles en 3-sulfanylhexas-1-ol que les vins obtenus à partir de moûts d'égouttage, ont des concentrations toujours plus élevées en (+)-catéchine et (-)-épicatechine, qui constituent des pièges potentiels pour les thiols volatils odoriférants. Par ailleurs, les corrélations statistiques concernant les échantillons prélevés au cours de trois millésimes soulignent que la composition en flavan-3-ols des moûts et des vins, ainsi que celle des précurseurs cystéinylés et en 3-sulfanylhexas-1-ol, est essentiellement associée au cru d'origine. Ainsi, nous confirmons que la grande réputation des vins blancs de Bordeaux est directement liée à la maîtrise des pratiques vitivinicoles et du respect du « Terroir ». En revanche, le contenu en glutathion des moûts et des vins est plus fortement influencé par le millésime que par le cru.

Par ailleurs, nous démontrons que la supplémentation d'un moût en (+)-catéchine, en conditions d'oxydation enzymatique, induit la formation d'*o*-quinones de catéchine qui provoquent une diminution des teneurs en 3-sulfanylhexas-1-ol dans le vin. Ce mécanisme de réaction des flavanols oxydés avec les thiols volatils présents au cours de la fermentation alcoolique, explique en partie l'écart observé entre la teneur en 3-sulfanylhexas-1-ol dans les vins de goutte et les vins de fin de pressée.

5. Du point de vue des pratiques œnologiques, nous rapportons que les vins issus des moûts obtenus sous atmosphère d'azote (modalités inertées) contiennent plus de flavan-3-ols et de glutathion que les vins obtenus selon des modalités traditionnelles avec une oxydation croissante au cours du pressurage. La protection contre l'oxydation des moûts induit aussi un gain significatif en 3-sulfanylhexas-1-ol des vins mais

principalement dans ceux issus de moûts d'égouttage. En effet, nous n'avons pas observé d'effet nettement significatif sur le contenu en 3-sulfanylhexanol dans les vins de presse élaborés en conditions d'inertage. Cependant, paradoxalement, les vins de presse, en partie ceux obtenus à partir de moûts oxydés, présentent des teneurs plus élevées en un autre thiol, l'éthyl-2-sulfanyl acétate, composé malodorant nouvellement caractérisé dans les vins. Ainsi, les modalités de pressurage des raisins sous gaz neutre contribuant à limiter l'oxydation des jus, permettent de conserver le contenu en thiols des vins de Sauvignon et le risque de voir leurs teneurs chuter plus rapidement au cours du vieillissement au cours du vieillissement en bouteilles à cause d'une concentration plus importante en flavan-3-ols. D'un autre côté, le pressurage traditionnel contribue à limiter la teneur en flavan-3-ols mais aussi celle en thiols caractéristiques de l'arôme variétal. Ceci favorise une composition différente des vins qui a sans doute un impact sensoriel. Dans tous les cas, ces travaux soulignent l'importance du dosage des flavan-3-ols dans les raisins et vins blancs.

Enfin, les résultats obtenus dans ce travail ouvrent la voie à de nouveaux projets de recherches.

Il est nécessaire de poursuivre l'étude du comportement de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine dans les conditions d'oxydation du vin pour clarifier les mécanismes qui impactent sur le système dynamique « polyphénols-oxygène-fer-dioxyde de soufre » et qui, par conséquent, jouent un rôle déterminant sur la stabilité des thiols volatils dans le vin. Les réactions du dioxyde de soufre avec les composés phénoliques et l'oxygène doivent être approfondies. Une étude par modélisation moléculaire du système d'addition « composé phénolique - thiol volatil » pourrait contribuer à expliquer la sélectivité du site d'addition. L'étude de la réactivité de ces composants de l'arôme avec d'autres types de polyphénols du vin blanc serait pertinente.

Les résultats concernant l'incidence d'un flavan-3-ol tel que la (+)-catéchine supplémentée dans les jus de raisins sur la composante thiol de l'arôme des vins de Sauvignon, nous incite à caractériser d'autres composés extraits en fin de pressurage qui impactent sur ces composés volatils odoriférants.

Enfin, de tels types de travaux pourraient être conduits avec une approche similaire pour comprendre les paramètres physico-chimiques de l'évolution des composants thiols dans le vin rouge ou rosé au cours de leur vieillissement.

Bibliographie

A

Adams, D. O. & Liyanage, C. (1993). Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening. *Am J Enol Vitic* 44, 333-338.

Adams, R. L., Mottram, D. S., Parker, J. K. & Brown, H. M. (2001). Flavor-protein binding: Disulfide interchange reactions between ovalbumin and volatile disulfides. *J Agric Food Chem* 49, 4333-4336.

Alexandre, H. & Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J Ind Microb Biotech* 20, 20-27.

Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. Y. & Oleszek, W. (1995). Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *J Agric Food Chem* 43, 1132-1137.

Aronson, J. & Ebeler, S. E. (2004). Effect of polyphenol compounds on the headspace volatility of flavors. *Am J Enol Vitic* 55, 13-21.

Artajona, J., Bobet, R., Marco, J., Sabat, F. & Torres, M. A. (1990). Expérience d'hyperoxygénation au penedes. *Rev Fr OEnol* 124, 65-67.

B

Bajaj, K. L., De Bethencourt, C. A. D., Junquera, B. & Gonzalez-San Jose, M. L. (1997). In vitro enzymic oxidation of apple phenols. *J Food Sci Technol* 34, 296-302

Bamforth, C. W. & Anness, B. J. (1981). The role of dimethyl sulphoxide reductase in the formation of dimethyl sulphide during fermentation. *J Inst Brew* 87, 30-34.

Bely, M., Masneuf-Pomarede, I. & Dubourdieu, D. (2005). Influence of physiological state of inoculum on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J Int Sci Vigne Vin* 39, 191-197.

Benitez, P., Castro, R., Antonio Sanchez, P. J. & Barroso, C. G. (2002). Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning. *Food Res Inter* 35, 785-791.

Berg, H. W. & Akiyoshi, M. (1956). Some factors involved in browning of white wines. *Am J Enol Vitic* 7, 1-7.

Betes-Saura, C., Andres-Lacueva, C. & Lamuela-Raventos, R. M. (1996). Phenolics in white free run juices and wines from Penedes by high-performance liquid chromatography: Changes during vinification. *J Agric Food Chem* 44, 3040-3046.

Biau, S. (1996). Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Blanchard, L. (1999). Characterisation of the sulfur volatile fraction in Cabernet Sauvignon and merlot wines . Study of its evolution during aging. *Australian Society of viticulture and enology oak symposium*, Adelaide, 6-10.

Blanchard, L., Bouchilloux, P., Darriet, P., Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (1999). Caractérisation de la fraction volatile de nature soufrée dans les vins de Cabernet et de Merlot. Etude de son évolution au cours de l'élevage en barrique. *VI symposium international d'œnologie de Bordeaux Coordinateur Lonvaud ATEC & DOC*, 501-505.

Blanchard, L. (2000). Recherche sur la contribution de certains thiols volatils à l'arôme des vins rouges. Etude de leur genèse et de leur stabilité. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Blanchard, L., Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (2001). Formation of furfurylthiol exhibiting a strong coffee aroma during oak barrel fermentation from furfural released by toasted staves. *J Agric Food Chem* 49, 4833-4835.

Blanchard, L., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (2004). Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *Am J Enol Vitic* 55, 115-120.

Blank, I., Pascual, E. C., Devaud, S., Fay, L. B., Stadler, R. H., Yeretjian, C. & Goodman, B. A. (2002). Degradation of the coffee flavor compound furfuryl mercaptan in model Fenton-type reaction systems. *J Agric Food Chem* 50, 2356-2364.

Blouin, J. (1966). Contribution à l'étude de des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et dans les vins *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Boidron, J. N., Chatonnet, P. & Pons, M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Conn Vigne Vin* 22, 275-294.

Boots, A. W., Kubben, N., Haenen, G. R. M. M. & Bast, A. (2003). Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: Implication for quercetin supplementation. *Biochem Biophys Res Comm* 308, 560-565.

Bouchilloux, P., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (1998a). Identification of a very odoriferous thiol, 2 methyl-3-furanthiol, in wines. *Vitis* 37, 177-180.

Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruege, V. & Dubourdieu, D. (1998b). Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *J Agric Food Chem* 46, 3095-3099.

Bouchilloux, P., Darriet, P., Dubourdiou, D., Henry, R., Reichert, S. & Mosandl, A. (2000). Stereodifferentiation of 3-mercapto-2-methylpropanol in wine. *Eur Food Res Technol* 210, 349-352.

Boukharta, M. (1988). Study of *Vitis vinifera* flavonoids: structures of the procyanidins of grape seeds, canes and leaves. *Thèse de Doctorat*. Institut National Polytechnique de Lorraine.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. & Kunkee, R. E. (1996). *The role of sulfur dioxide in wine*. New York: Chapman & Hall

Boulton, R. B. (2003). A radical view of oxidative reactions in wine. *IX Congreso latinoamericano de viticultura y enología* P.Pszczólkowski (Ed.). Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, 107-123.

Bourzeix, M., Weyland, D. & Heredia, N. (1986). Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull O I V* 59, 1171-1254.

Brajkovich, M., Tibbits, N., Peron, G., Lund, C. M., Dykes, S. I., Kilmartin, P. A. & Nicolau, L. (2005). Effect of screwcap and cork closures on SO₂ levels and aromas in a Sauvignon Blanc wine. *J Agric Food Chem* 53, 10006-10011.

Bueno, M., Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines. *Food Res Int* 43, 1423-1428.

C

Cacho, J., Castells, J. E., Esteban, A., Laguna, B. & Sagrista, N. (1995). Iron, copper, and manganese influence on wine oxidation. *Am J Enol Vitic* 46, 380-384.

Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A. & Cacho, J. (2005). Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *J Agric Food Chem* 53, 5682-5690.

Cantos, E., Espin, J. C. & Tomas-Barberan, F. A. (2002). Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J Agric Food Chem* 50, 5691-5696.

Capone, D. L., Sefton, M. A., Hayasaka, Y. & Jeffery, D. W. (2010). Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS: Resolution and quantitation of diastereomers of 3-S-cysteinylhexan-1-ol and 3-S-glutathionylhexan-1-ol. *J Agric Food Chem* 58, 1390-1395.

Carando, S., Teissedre, P. L. & Cabanis, J. C. (1999a). HPLC coupled with fluorescence detection for the determination of procyanidins in white wines. *Chromatographia* 50.

Carando, S., Teissedre, P. L., Pascual-Martinez, L. & Cabanis, J. C. (1999b). Levels of flavan-3-ols in french wines. *J Agric Food Chem* 47, 4161-4166.

Cavallini, D., De Marco, C., Dupre, S. & Rotilio, G. (1969). The copper catalyded oxidation of cysteine to cystine. *Archs Biochem Biophys* 130, 354.

Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V. & Douillard, R. (2003). Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot noir vintages. *J Agric Food Chem* 51, 3179-3184.

Charles-Bernard, M., Kraehenbuehl, K., Rytz, A. & Roberts, D. D. (2005). Interactions between volatile and nonvolatile coffee components. 1. Screening of nonvolatile components. *J Agric Food Chem* 53, 4417-4425.

Chatonnet, P. (1995). Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J. & Garcia-Carmona, F. (1996). Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Agric Food Chem* 44, 984-988.

Cheynier, V. & Rigaud, J. (1986). HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am J Enol Vitic* 37, 248-252.

Cheynier, V., Owe, C. & Rigaud, J. (1988). Oxidation of grape juices phenolic compounds in model solutions. *J Food Sci* 53, 1729-1732.

Cheynier, V., Basire, N. & Rigaud, J. (1989a). Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J Agric Food Chem* 37, 1069-1071.

Cheynier, V., Rigaud, J. & Moutounet, M. (1989b). High-performance liquid chromatographic determination of the free *o*-quinones of trans-caffeoyltartaric acid, 2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid and catechin in grape must. *J Chrom A* 472, 428-432.

Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J. M., Barillère, J. M. & Moutounet, M. (1989c). Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *Am J Enol Vitic* 40, 36-42.

Cheynier, V., Souquet, J. M. & Moutounet, M. (1989d). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am J Enol Vitic* 40, 320-324.

Cheynier, V., Rigaud, J. & Moutounet, M. (1990a). Oxidation kinetics of trans-caffeoyltartrate and its glutathione derivatives in grape musts. *Phytochem* 29, 1751-1753.

Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J. M., Duprat, F. & Moutounet, M. (1990b). Must browning in relation to the behavior of phenolic compounds during oxidation. *Am J Enol Vitic* 41, 346-349.

Cheyrier, V. & Ricardo da Silva, J. M. (1991). Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 39, 1047-1049.

Cheyrier, V. & Moutounet, M. (1992). Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 40, 2038-2044.

Cheyrier, V., Masson, G., Rigaud, J. & Moutounet, M. (1993). Estimation of must oxidation during pressing in champagne. *Am J Enol Vitic* 44, 393-399.

Cheyrier, V. F., Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M. J. & Wylde, R. (1986). Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J Agric Food Chem* 34, 217-221.

Cheyrier, V. F. & Van Hulst, M. W. J. (1988). Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *J Agric Food Chem* 36, 10-15.

Chira, K. (2009). Structures moléculaires et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet sauvignon, Merlot) du bordelais *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Choné, X., Lavigne-Cruege, V., Tominaga, T., Van Leewen, C., Castagnede, 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. *J Int Sci Vigne Vin* 40, 1-6.

Cilliers, J. J. L. & Singleton, V. L. (1990). Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. *J Agric Food Chem* 38, 1789-1796.

Cordonnier, R. & Bayonove, C. (1981). Etude de la phase préfermentaire de la vinification:extraction et formation de certains composés de l'arôme;cas des terpénols, des aldéhydes et des alcools en C6. *Conn Vigne Vin* 15, 269-286.

Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J. & Ferreira, V. (2004). Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *J Agric Food Chem* 52, 1653-1660.

Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma. *J Agric Food Chem* 55, 876-881.

D

Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed Intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *Am J Enol Vitic* 54, 73-85.

Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *Am J Enol Vitic* 58, 53-60.

- Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T. & Whelan, J. (2008).** Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *Am J Enol Vitic* 59, 128-136.
- Danilewicz, J. C. & Wallbridge, P. J. (2010).** Further studies on the mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfite in wine. *Am J Enol Vitic* 61, 166-175.
- Darriet, P. (1993).** L'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N. & Dubourdiou, D. (1995).** Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flav Frag J* 10, 385-392.
- Darriet, P., Bouchilloux, P., Poupot, C., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Sauris, P., Medina, B. & Dubourdiou, D. (2001a).** Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon and Merlot wines. *Vitis* 40, 93-99.
- Darriet, P., Poupot, C., Armand, J. M., Dubourdiou, D., Clerjeau, M., Glories, Y., Bordeu, E., Pszczolkowski, P. & Bugaret, Y. (2001b).** Incidence of vine sprayings with downy mildew fungicides, without parasitic fungi, on Cabernet sauvignon grapes and wines composition. *J Int Sci Vigne Vin* 35, 23-29.
- Darriet, P. (2002).** Caractérisation des composés volatils associés à la vigne et au vin. Applications technologiques. *Habilitation à Diriger des Recherches*. Université de Bordeaux 2.
- de Freitas, A. P. V. (1995).** Recherche sur les tanins condensés: Application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines oligomères du raisin et du vin. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.
- de Freitas, V. A. P., Glories, Y. & Laguerre, M. (1998).** Incidence of molecular structure in oxidation of grape seed procyanidins. *J Agric Food Chem* 46, 376-382.
- de Freitas, V. A. P. & Glories, Y. (1999).** Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *J Sci Food Agric* 79, 1601-1606.
- de Mora, S. J., Eschenbruch, R., Knowles, S. J. & Spedding, D. J. (1986).** The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast. *Food Microb* 3, 27-32.
- Dopico-Garcia, M. S., Valentao, P., Guerra, L., Andrade, P. B. & Seabra, R. M. (2007).** Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Anal Chim Acta* 583, 15-22.
- Dubourdiou, D., Ollivier, C. & Boidron, J. N. (1986).** Incidence des opérations préfermentaires sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins blancs secs. *Conn Vigne Vin* 20, 53-76.

Dubourdiou, D. & Lavigne, V. (1990). Incidence de l'hydroxygénation sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins blancs secs du bordelais. *Rev Fr Oenol* 124, 58-61.

Dubourdiou, D. & Tominaga, T. (2009). *Polyfunctional thiol compounds*. New York: In M. V. Moreno-Arribas et M. C. Polo.

E

Elias, R. J., Laurie, V. F., Ebeler, S. E., Wong, J. W. & Waterhouse, A. L. (2008). Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection. *Anal Chim Acta* 626, 104-110.

Elias, R. J., Andersen, M. L., Skibsted, L. H. & Waterhouse, A. L. (2009a). Key factors affecting radical formation in wine studied by spin trapping and EPR spectroscopy. *Am J Enol Vitic* 60, 471-476.

Elias, R. J., Andersen, M. L., Skibsted, L. H. & Waterhouse, A. L. (2009b). Identification of free radical intermediates in oxidized wine using electron paramagnetic resonance spin trapping. *J Agric Food Chem* 57, 4359-4365.

Elias, R. J. & Waterhouse, A. L. (2010). Controlling the Fenton reaction in wine. *J Agric Food Chem* 58, 1699-1707.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.

Elskens, M. T., Jaspers, C. J. & Penninckx, M. J. (1991). Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 137, 637-644.

Es-Safi, N. E., Le Guerneve, C., Cheynier, V. & Moutounet, M. (2000). New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods. *J Agric Food Chem* 48, 4233-4240.

Escribano-Bailon, T., Gutierrez-Fernandez, Y., Rivas-Gonzalo, J. C. & Santos-Buelga, C. (1992). Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety tinta del pais grape seeds. *J Agric Food Chem* 40, 1794-1799.

Escudero, A., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000a). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: A gas chromatography-olfactometric study. *Eur Food Res Tech* 211, 105-110.

Escudero, A., Hernandez-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000b). Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *J Agric Food Chem* 48, 4268-4272.

Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem* 77, 325-331.

Escudero, A., Gogorza, B., Melus, M. A., Ortin, N., Cacho, J. & Ferreira, V. (2004). Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *J Agric Food Chem* 52, 3516-3524.

Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J Agric Food Chem* 55, 4501-4510.

F

Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M. & Jeffery, D. W. (2009). First Identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon blanc juice. *J Agric Food Chem* 57, 991-995.

Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., Pena, C., Escudero, A., Serrano, F. & Cacho, J. (1995). Prediction of oxidative browning in white wines as a function of their chemical composition. *J Agric Food Chem* 43, 2813-2817.

Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., Escudero, A. & Cacho, J. (1998). Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines. *J Agric Food Chem* 46, 4937-4944.

Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., Pena, C., Escudero, A. & Cacho, J. (1999). Effects of maceration time and pectolytic enzymes added during maceration on the phenolic composition of must. *Food Sci Tech Inter* 5, 319-325.

Fernandez, M. T., Mira, M. L., Florencio, M. H. & Jennings, K. R. (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem* 92, 105-111.

Ferreira, A. C. S., Rodrigues, P., Hogg, T. & Guedes de Pinho, P. (2002). Influence of some technological parameters on the formation of dimethyl sulfide, 2-mercaptoethanol, methionol, and dimethyl sulfone in port wines. *J Agric Food Chem* 51, 727-732.

Ferreira, V., Hernandez-Orte, P., Escudero, A., Lopez, R. & Cacho, J. (1999). Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *J Chrom A* 864, 77-88.

Ferreira, V., Escudero, A., Campo, E. & Cacho, J. (2007). The chemical foundations of wine aroma - A role game aiming at wine quality, personality and varietal expression. *Proceedings of the 13th Australian Wine Industry Technical Conference*, 142.

Flanzy, C. (1998). *Oenologie, fondements scientifiques et technologiques* Paris: Lavoisier Tec et Doc.

Fretz, C. B., Kanel, S., Luisier, J. L. & Amado, R. (2005a). Analysis of volatile components of Petite Arvine wine. *Eur Food Res Technol* 221, 504-510.

Fretz, C. B., Luisier, J. L., Tominaga, T. & Amado, R. (2005b). 3-Mercaptohexanol : An aroma impact compound of Petite Arvine wine. *Am J Enol Vitic* 56, 407-410.

Frezier, V. & Dubourdieu, D. (1992). Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am J Enol Vitic* 43, 375-380.

Friedman, M. (1996). Food Browning and Its Prevention: An Overview *J Agric Food Chem* 44, 631-653.

Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V. & Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochem* 47, 1401-1407.

Fuleki, T. & Ricardo da Silva, J. M. (1997). Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *J Agric Food Chem* 45, 1156-1160.

Fuleki, T. & Ricardo da Silva, J. M. (2003). Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *J Agric Food Chem* 51, 640-646.

G

Gagné, S., Saucier, C. & Geny, L. (2006). Composition and cellular localization of tannins in Cabernet sauvignon skins during growth. *J Agric Food Chem* 54, 9465-9471.

Galvin, C. (1993). Etude de certaines réactions de dégradation des anthocyanes et de leur conservation avec les flavanols; conséquence sur la couleur des vins. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Gény, L., Saucier, C., Bracco, S., Daviaud, F. & Glories, Y. (2003). Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *J Agric Food Chem* 51, 8051-8054.

Glories, Y. (1984). Couleur des vins rouges, les équilibres des anthocyanes et des tanins *Conn Vigne Vin*.

Golan-Goldhirsh, A. & Whitaker, J. R. (1984). Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 32, 1003-1009.

Goldberg, D. M., Karumanchiri, A., Soleas, G. J. & Tsang, E. (1999). Concentrations of selected polyphenols in white commercial wines. *Am J Enol Vitic* 50, 185-193.

Grant, C. M., MacIver, F. H. & Dawes, I. W. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Gen* 29, 511-515.

Green, M. J. & Hill, H. A. O. (1984). Chemistry of oxygen. *Methods Enzymol* 105, 3-22.

Gunata, Y. Z., Sapis, J. C. & Moutounet, M. (1987). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochem* 26, 1573-1575.

Guth, H., Hofmann, T., Schieberle, P. & Grosch, W. (1995). Model reactions on the stability of disulfides in heated foods. *J Agric Food Chem* 43, 2199-2203.

Guth, H. (1997). Quantification and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J Agric Food Chem* 45, 3027-3032.

Guyot, S., Cheynier, V., Souquet, J.-M. & Moutounet, M. (1995). Influence of pH on the Enzymic Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. *J Agric Food Chem* 43, 2458-2462.

H

Harper, R. (1982). *Techniques of analysis of flavours. Sensory methods. In Food Flavours. Part A.* Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier.

Haslam, E. (1974). Polyphenol-protein Interaction. *Biochem J*, 1974.

Haslam, E. (1981). The association of proteins with polyphenols. *J Chem Soc Chem Comm*, 309-311.

Hatzidimitriou, E., Bouchilloux, P., Darriet, P., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Poupot, C., Medina, B. & Dubourdieu, D. (1996). Incidence of a vine protection using a commercial formula of Bordeaux mixture on the Sauvignon grapes maturity and the wines varietal aroma: (Results of a 3-year study). *J Int Sci Vigne Vin* 30, 133-150.

Herbst, M., Nicolau, L. & Kilmartin, P. (2008). Aroma stability in Sauvignon blanc wines. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 6, 66-72.

Hernanz, D., Recamales, A. F., Gonzalez-Miret, M. L., Gomez-Miguez, M. J., Vicario, I. M. & Heredia, F. J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *J Food Eng* 80, 327-335.

Hofmann, T., Schieberle, P. & Grosch, W. (1996). Model studies on the oxidative stability of odor-active thiols occurring in food flavors. *J Agric Food Chem* 44, 251-255.

Hrazdina, G. (1970). Oxidation of the anthocyanidin-3,5-diglucosides with H₂O₂: The structure of malvone. *Phytochem* 9, 1646-1652.

Hynes, M. & O Coinceanainn, M. (2001). The kinetics and mechanisms of the reaction of iron (III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *J In Biochem* 85, 131-142.

I

Ibern-Gomez, M., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R. M., Buxaderas, S., Singleton, V. L. & de la Torre-Boronat, M. C. (2000). Browning of cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *Am J Enol Vitic* 51, 29-36.

Irwin, A. J., Barker, R. L. & Pipasts, P. (1991). The role of copper, oxygen, and polyphenols in beer flavor instability
J Am Soc Brew Chem 49, 140-149.

J

Jacques, D., Haslam, E., Bedford, G. R. & Greatbanks, D. (1974). Plant proanthocyanidins. Part II. Proanthocyanidin-A2 and its derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 2663-2671.

Janovitz-Klapp, A., Richard, F. & Nicolas, J. (1989). Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochem* 28, 2903-2907.

Jaworski, A. W. & Lee, C. Y. (1987). Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J Agric Food Chem* 35, 257-259.

Jeffery, D. W., Parker, M. & Smith, P. A. (2008). Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Aus J Grape Wine Res* 14, 153-161.

Jocelyn, P. C. (1972). The occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulfides. Biochemistry of the SH group; EDS. *Academic press: London UK*.

Joutei, K. A., Glories, Y. & Mercier, M. (1994). Localization of tannins in grape berry skins. *Vitis* 33, 133-138.

K

Kallithraka, S., Salacha, M. I. & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem* 113, 500-505.

Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem* 52, 4360-4367.

Kidron, M., Harel, E. & Mayer, A. M. (1978). Catechol oxidase activity in grapes and wine. *Am J Enol Vitic* 29, 30-35.

Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S. & Konno, T. (2010). Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *Am J Enol Vitic* 61, 176-185.

Kotseridis, Y. & Baumes, R. (2000). Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *J Agric Food Chem* 48, 400-406.

Kovats, E. (1958). Gas chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. I. Retentions indices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helv Chim Acta* 41, 1951-1932.

Kumar, C., Sharma, R. & Bachhawat, A. K. (2003). Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of γ -glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS* 219, 187-194.

L

Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M. & Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J Agric Food Chem* 47, 2719-2723.

Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J. C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J. M., Gasc, F., Cros, G. & Teissedre, P. L. (2002). Levels of stilbene oligomers and astilbin in french varietal wines and in grapes during noble rot development. *J Agric Food Chem* 50, 2046-2052.

Landrault, N., Poucheret, P., Azay, J., Krosniak, M., Gasc, F., Jenin, C., Cros, G. & Teissedre, P. L. (2003). Effect of a polyphenols-enriched chardonnay white wine in diabetic rats. *J Agric Food Chem* 51, 311-318.

Laurie, V. F. & Waterhouse, A. L. (2006). Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine. Potential effects on wine color. *J Agric Food Chem* 54, 4668-4673.

Lavigne Cruège, V., Pons, A., Chone, X. & Dubourdiou, D. (2003). Rôle du glutathion sur l'évolution aromatique des vins blancs secs. *7^e Symposium international d'Oenologie, Bordeaux*

Lavigne, V., Boidron, J. N. & Dubourdiou, D. (1993). Dosage des composés soufrés volatils légers dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *J Int Sci Vigne Vin* 27, 1-12.

Lavigne, V. (1996). Recherches sur les composés volatils formés par la levure au cours de la vinification et de l'élevage des vins blancs secs. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Lavigne, V. & Dubourdiou, D. (1996). Demonstration and interpretation of the yeast lee ability to adsorb certain volatile thiols contained in wine. *J Int Sci Vigne Vin* 30, 201-206.

Lavigne, V., Henry, R. & Dubourdiou, D. (1998). Identification et dosage de composés soufrés intervenant dans l'arôme 'grillé' des vins. *Sci Aliments* 18, 175-191.

Lavigne, V., Pons, A. & Dubourdiou, D. (2007). Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *J Chrom A* 1139, 130-135.

Lavigne, V., Pons, A., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (2008). Changes in the sotolon content of dry white wines during barrel and bottle aging. *J Agric food Chem* 56, 2688-2693.

Lea, A. G. H., Bridle, P., Timberlake, C. F. & Singleton, V. L. (1979). The Procyanidins of White Grapes and Wines. *Am J Enol Vitic* 30, 289-300.

Liu, S. Q. & Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Inter J Food Sc Tech* 35, 49-61.

Lopes, P., Silva, M. A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., Darriet, P., Teissedre, P. L. & Dubourdieu, D. (2009). Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory properties of a Sauvignon blanc wine during bottle storage. *J Agric Food Chem* 57, 10261-10270.

Loscos, N., Hernandez-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chem* 120, 205-216.

Lund, C. M., Nicolau, L., Gardner, R. C. & Kilmartin, P. A. (2009). Effect of polyphenols on the perception of key aroma compounds from Sauvignon Blanc wine. *Aust J Grape Wine Res* 15, 18-26.

M

Maga, J. A. (1976). The role of sulfur compounds in food flavor. Part III: thiols. *Crit Rev Food Sci Nutr* 7, 147-192.

Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C. T. & Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon blanc must. *J Agric Food Chem* 55, 10281-10288.

Makhotkina, O. & Kilmartin, P. A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *J Electroanal Chem* 633, 165-174.

Makris, D. P. & Rossiter, J. T. (2000). Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *J Agric Food Chem* 48, 3830-3838.

March, J. (1992). *Advanced organic chemistry. Réactions, mécanismes and structure.* New York: John Wiley & Sons.

Marchand, S., de Revel, G. & Bertrand, A. (2000). Approaches to wine aroma: Release of aroma compounds from reactions between cysteine and carbonyl compounds in wine. *J Agric Food Chem* 48, 4890-4895.

Marques, L., Fleuriet, A. & Macheix, J. J. (1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol and Biochem* 33, 193-200.

Marshall, K., Laing, D. G., Jinks, A. L. & Hutchinson, I. (2006). The capacity of humans to identify components in complex odor-taste mixtures. *Chem Senses* 31, 539-545.

Masa, A. & Vilanova, M. (2008). Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albarín blanco (*Vitis vinifera* L.). *Food Chem* 107, 273-281.

Mathew, A. G. & Parpia, H. A. B. (1971). Food browning as a polyphenol reaction *Adv Food Res* 19, 75-135.

Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A., Pollet, B., Lapiere, C., Herve du Penhoat, C. L. M., Rolando, C. & Donnelly, D. M. X. (1997). Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *J Agric Food Chem* 45, 1195-1201.

Mayer, A. M. & Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem* 18, 193-215.

Mazauric, J.-P. & Salmon, J.-M. (2006). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast lees. *J Agric Food Chem* 54, 3876-3881.

McManus, J. P., Davis, K. G., Gaffney, S., Lilley, T. H. & Haslam, E. (1985). Polyphenols interactions. Part 1. Introduction; Some observation on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *J Chem Soc, Perkin trans II* 1429-1438.

Mestres, M., Busto, O. & Guasch, J. (1997). Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static headspace technique with flame photometric detection. *J Chrom A* 773, 261-269.

Mestres, M., Busto, O. & Guasch, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J Chrom A* 881, 569-581.

Miller, D. M., Buettner, G. R. & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of 'autoxidation' reactions. *Free Rad Biol Med* 8, 95-108.

Millet, V. & Lonvaud, A. (1999). Incidence du dioxyde de soufre sur les microorganismes pendant l'élevage du vin. *J Sci Tech Tonnellerie* 5, 123-136.

Moio, L., Ugliano, M., Genovese, A., Gambuti, A., Pessina, R. & Piombino, P. (2004). Effect of Antioxidant Protection of Must on Volatile Compounds and Aroma Shelf Life of Falanghina (*Vitis vinifera* L.) Wine. *J Agric Food Chem* 52, 891-897.

Montereau, M. (1969). Contribution à l'étude d'évolution de la matière colorante des vins rouges. *Thèse de Doctorat*. Université de Toulouse.

Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., Guedes de Pinho, P., Hogg, T. & Vasconcelos, I. (2002). Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Anal Chim Acta* 458, 157-167.

Moridani, M. Y., Scobie, H., Salehi, P. & O'Brien, P. J. (2001). Catechin metabolism: Glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome P450. *Chem Res Toxicol* 14, 841-848.

Mozetic, B., Tomazic, I., Skvarc, A. & Trebse, P. (2006). Determination of polyphenols in white grape berries cv. Rebula. *Acta Chim Slov* 53, 58-64.

Munch, P., Hofmann, T. & Schieberle, P. (1997). Comparison of key odorants generated by thermal treatment of commercial and self-prepared yeast extracts: Influence of the amino acid composition on odorant formation. *J Agric Food Chem* 45, 1338-1344.

Murat, M. L., Tominaga, T., Saucier, C., Glories, Y. & Dubourdieu, D. (2003). Effect of anthocyanins on stability of a key odorous compound, 3-mercaptohexan-1-ol, in Bordeaux rose wines. *Am J Enol Vitic* 54, 135-138.

Murata, M., Tsurutani, M., Tomita, M., Homma, S. & Kaneko, K. (1995). Relationship between apple ripening and browning: Changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 43, 1115-1121.

N

Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre, P. L. & Darriet, P. (2010). Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Anal Chim Acta* 660, 102-109.

Nunez-Delicado, E., Serrano-Megias, M., Perez-Lopez, A. J. & Lopez-Nicolas, J. M. (2005). Polyphenol oxidase from dominga table grape. *J Agric Food Chem* 53, 6087-6093.

Nykanen, L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am J Enol Vitic* 37, 84-96.

O

Okuda, T., Pue, A. G., Fujiyama, K. & Yokotsuka, K. (1999). Purification and characterization of polyphenol oxidase from muscat Bailey A grape Juice. *Am J Enol Vitic* 50, 137-143.

Okuda, T. & Yokotsuka, K. (1999). Levels of glutathione and activities of related enzymes during ripening of Koshu and Cabernet sauvignon grapes and during winemaking. *Am J Enol Vitic* 50, 264-270.

Oleszek, W., Lee, C. Y. & Price, K. R. (1989). Apple phenolics and their contribution to enzymatic browning reactions. *Acta Soc Bot Pol* 58, 273-283.

Oszmianski, J. & Lee, C. Y. (1990). Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *J Agric Food Chem* 38, 1202-1204.

Oszmianski, J., Cheynier, V. & Moutounet, M. (1996). Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *J Agric Food Chem* 44, 1712-1715.

Park, S. K., Boulton, R. B. & Noble, A. C. (2000). Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. *Am J Enol Vitic* 51, 91-97.

Pascal, I. & Tarbell, D. S. (1975). The Kinetics of the oxidation of a mercaptan to the corresponding disulfide by aqueous hydrogen peroxide. *J A Chem Sci* 79, 6015.

Patel, P., Herbst-Johnstone, M., Lee, S. A., Gardner, R. C., Weaver, R., Nicolau, L. & Kilmartin, P. A. (2010). Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants, and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments. *J Agric Food Chem* 58, 7280-7288.

Penninckx, M. J. & Elskens, M. T. (1993). Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Adv Microb Phys* 34, 239-301.

Peyrot des Gachons, C. (2000). Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Thèse de Doctorat*. Université Bordeaux 2.

Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (2000). Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *J Agric Food Chem* 48, 3387-3391.

Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (2002a). Localization of S-cysteine conjugates in the berry: Effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc must. *Am J Enol Vitic* 53, 144-146.

Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (2002b). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J Agric Food Chem* 50, 4076-4079.

Peyrot des Gachons, C. P., Van Leeuwen, C., Tominaga, T., Soyer, J. P., Gaudillère, J. P. & Dubourdieu, D. (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. *J Sci Food Agric* 85, 73-85.

Pineau, B. (2007). Contribution à l'étude de l'arôme fruité spécifique des vins rouges de *Vitis vinifera* L. cv. Merlot noir et Cabernet sauvignon. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C. & Dubourdieu, D. (2009). Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific "Red-" and "Black-berry" Aromas in Red Wines. *J Agric Food Chem* 57, 3702-3708.

Pons, A. (2006). Recherches sur l'arôme de vieillissement prématuré des vins. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Pons, A., Lavigne, V., Landais, Y., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (2008). Distribution and Organoleptic Impact of Sotolon Enantiomers in Dry White Wines. *J Agric Food Chem* 56, 1606-1610.

Pons, A., Lavigne, V. r., Landais, Y., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (2010). Identification of a sotolon pathway in dry white wines. *J Agric Food Chem* 58, 7273-7279.

Pontallier, P. (1981). Recherches sur les conditions d'élevage des vins rouges. Rôle des phénomènes oxydatifs. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Powell, H. K. J. & Taylor, M. C. (1982). Interactions of iron(II) and iron(III) with gallic acid and its homologues: a potentiometric and spectrophotometric study. *Austr J Chem* 35, 739-756.

Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Kanellaki, M. & Komaitis, M. (2005). High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Contr* 16, 319-323.

Q

Quideau, S., Feldman, K. S. & Appel, H. M. (1995). Chemistry of gallotannin-derived o-quinones: Reactivity toward nucleophiles. *J Org Chem* 60, 4982-4983.

Quideau, S., Jourdes, M., Lefeuvre, D., Montaudon, D., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P. & Pourquier, P. (2005). The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chem Europ J* 11, 6503-6513.

R

Ramey, D., Bertrand, A., Ough, C. S., Singleton, V. L. & Sanders, E. (1986). Effects of skin contact temperature on chardonnay must and wine composition. *Am J Enol Vitic* 37, 99-106.

Rapp, A., Guntert, M. & Almy, J. (1985). Identification and significance of several sulfur-containing compounds in wine. *Am J Enol Vitic* 36, 219-221.

Rauhut, D., Kürbel, H., Dittrich, H. H. & Grossman, M. (1996). Properties and differences of commercial yeast strains with respect to their formation of sulfur compounds. *Vitic Enol Sci* 51, 187-192.

Ribéreau-Gayon, J. (1933). Contribution à l'étude des oxydations et des réductions dans les vins. Application à l'étude du vieillissement et des casses. *Delmas (ed), Bordeaux*.

Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. & Lonvaud, A. (1998, 2004). Traité d'œnologie. Vol.1. Microbiologie du vin Vinifications. *Dunod Paris*.

Ribéreau-Gayon, P. (1964). Les composés phénoliques du raisin et du vin. Les flavonoides et les anthocyanosides. *Ann Physiol Veg* 6, 211-242.

Ribéreau-Gayon, P. (1965). Identification d'esters des acides cinnamiques et d'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *C R Acad Sci* 341-343.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Dubourdieu, D. & Maujean, A. (1998, 2004). Traité d'œnologie. Vol.2. Chimie du vin Stabilisation et traitements. *Dunod Paris*.

Ricardo da Silva, J. M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A. & Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochem* 30, 1259-1264.

Ricardo da Silva, J. M., Cheynier, V., Samsom, A. & Bourzeix, M. (1993). Effect of pomace contact, carbonic maceration, and hyperoxidation on the procyanidin composition of Grenache blanc wines. *Am J Enol Vitic* 44, 168-172.

Rigaud, J., Cheynier, V., Souquet, J. M. & Moutounet, M. (1991). Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *J Sci Food Agric* 57, 55-63.

Rizzi, G. P. (2006). Formation of Strecker aldehydes from polyphenol derived quinones and α -amino acids in a nonenzymic model system. *J Agric Food Chem* 54, 1893-1897.

Rodriguez-Lopez, J. N., Escribano, J. & Garcia-Canovas, F. (1994). A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal Biochem* 216, 205-212.

Roland, A., Schneider, R., Guernevé, C. L., Razungles, A. & Cavelier, F. (2010a). Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chem* 121, 847-855.

Roland, A., Vialaret, J., Moniatte, M., Rigou, P., Razungles, A. & Schneider, R. (2010b). Validation of a nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *J Chrom A* 1217, 1626-1635.

Romeyer, F. M., Macheix, J. J. & Sapis, J. C. (1985). Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochem* 25, 219-221.

S

Salgues, M., Cheynier, V., Gunata, Z., Wylde, R. (1986). Oxidation of grape juice 2-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance: 2,5-di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid *J Food Sci* 51, 1191-1194.

Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. & Garcia-Carmona, F. (1989). Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol* 91, 1481-1487.

Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E. M. & Escribano-Bailón, M. T. (1995). Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chem* 53, 197-201.

Sarrazin, E., Dubourdieu, D. & Darriet, P. (2007a). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chem* 103, 536-545.

Sarrazin, E., Shinkaruk, S., Tominaga, T., Bennetau, B., Frerot, E. & Dubourdieu, D. (2007b). Odorous impact of volatile thiols on the aroma of young botrytized sweet wines: identification and quantification of new sulfanyl alcohols. *J Agric Food Chem* 55, 1437-1444.

Sarrazin, E., Shinkaruk, S., Pons, M., Thibon, C., Bennetau, B. & Darriet, P. (2010). Elucidation of the 1,3-sulfanylalcohol oxidation mechanism: An unusual identification of the disulfide of 3-sulfanylhexanol in Sauternes botrytized wines. *J Agric Food Chem*, null-null.

Saucier, C. T. & Waterhouse, A. L. (1999). Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *J Agric Food Chem* 47, 4491-4494.

Sayavedra-Soto, L. A. & Montgomery, M. W. (1986). Inhibition of Polyphenoloxidase by Sulfite. *J Food Sci* 51, 1531-1536.

Schneider, V. (1998). Must Hyperoxidation: A Review. *Am J Enol Vitic* 49, 65-73.

Schubert, M. P. (1933). The action of carbon monoxide on iron and cobalt complexes of cysteine. *J Am Chem Soc* 55, 4563-4570.

Shepherd, G. M. (2006). Smell images and the flavour system in the human brain. *Nature* 444, 316-321.

Shibamoto, T. & Russell, G. F. (1976). Study of meat volatiles associated with aroma generated in a D-glucose-hydrogen sulfide-ammonia model system. *J Agric Food Chem* 24, 843-846.

Sides, S. L., Polowy, K. B., Thornquest, A. D. & Burinsky, D. J. (2001). Identification of a pharmaceutical packaging off-odor using solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 25, 379-386.

Silva Ferreira, A. C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P. & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J Agric Food Chem* 50, 5919-5924.

Silva Ferreira, A. C., Barbe, J. C. & Bertrand, A. (2003a). 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone: A key odorant of the typical aroma of oxidative aged Port wine. *J Agric Food Chem* 51, 4356-4363.

Silva Ferreira, A. C., Oliveira, C., Hogg, T. & Guedes de Pinho, P. (2003b). Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis, and some substances responsible for aroma degradation of white wines. *J Agric Food Chem* 51, 4668-4672.

Singleton, V. L., Zaya, J. & Trousdale, E. (1980). White table wine quality and polyphenol composition as affected by must SO₂ content and pomace contact time. *Am J Enol Vitic* 31, 14-20.

Singleton, V. L. & Trousdale, E. (1983). White wine phenolics: Varietal and processing differences as shown by HPLC. *Am J Enol Vitic* 34, 27-34.

Singleton, V. L., Zaya, J., Trousdale, E. & Salgues, M. (1984). Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing *Vitis* 23, 113-120.

Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J. & Trousdale, E. (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *Am J Enol Vitic* 36, 50-56.

Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical Implications. *Am J Enol Vitic* 38, 69-77.

Steenken, S. & Neta, P. (1979). Electron transfer rates and equilibria between substituted phenoxide ions and phenoxy radicals. *J Phys Chem* 83, 1134-1137.

Stevens, S. S. (1957). On the psychophysical law. *Psych Rev* 64, 153-181.

Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J. M. & Degryse, E. (2008). New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon blanc wines: Cys-3MH and (E)-hexen-2-al are not the major precursors. *J Agric Food Chem* 56, 9230-9235.

Sun, B., Belchior, G. P., Ricardo da Silva, J. M. & Spranger, M. I. (1999). Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. *J Chrom A* 841, 115-121.

Suomalainen, H. & Lehtonen, M. (1979). The production of aroma compounds by yeast. *J Inst Brew* 85, 149-156.

T

Talcott, S. T. & Lee, J. H. (2002). Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J Agric Food Chem* 50, 3186-3192.

Tanaka, T., Mine, C., Inoue, K., Matsuda, M. & Kouno, I. (2002). Synthesis of theaflavin from epicatechin and epigallocatechin by plant homogenates and role of epicatechin quinone in the synthesis and degradation of theaflavin. *J Agric Food Chem* 50, 2142-2148.

Tang, K., Page, J. S. & Smith, R. D. (2004). Charge competition and the linear dynamic range of detection in electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr* 15, 1416-1423.

Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D. & Tominaga, T. (2008a). Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 8, 1076-1086.

Thibon, C., Shinkaruk, S., Tominaga, T., Bennetau, B. & Dubourdieu, D. (2008b). Analysis of the diastereoisomers of the cysteinylated aroma precursor of 3-sulfanylhexanol in *Vitis vinifera* grape must by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry. *J Chrom A* 1183, 150-157.

Thorngate, J. H. & Singleton, V. L. (1994). Localization of procyanidins in grape seeds. *Am J Enol Vitic* 45, 259-262.

Tominaga, T., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (1996). Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis* 35, 207-210.

Tominaga, T. (1998). Recherches sur l'arôme variétal des vins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc et sa genèse à partir des précurseurs inodores du raisin. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R. & Dubourdieu, D. (1998a). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flav Frag J* 13, 159-162.

Tominaga, T., Murat, M. L. & Dubourdieu, D. (1998b). Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J Agric Food Chem* 46, 1044-1048.

Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C. & Dubourdieu, D. (1998c). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine conjugates. *J Agric Food Chem* 46, 5215-5219.

Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Peyrot des Gachons, C. & Dubourdieu, D. (2000a). Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Am J Enol Vitic* 51, 178-181.

Tominaga, T., Blanchard, L., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (2000b). A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *J Agric Food Chem* 48, 1799-1802.

Tominaga, T., Guimbertau, G. & Dubourdieu, D. (2003a). Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L. wines. *J Agric Food Chem* 51, 1373-1376.

Tominaga, T., Guimbertau, G. & Dubourdieu, D. (2003b). Role of certain volatile thiols in the bouquet of aged champagne wines. *J Agric Food Chem* 51, 1016-1020.

Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (2006). A novel method for quantification of 2-methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties. *J Agric Food Chem* 54, 29-33.

Tsai Su, C. & Singleton, V. L. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochem* 8, 1553-1558.

U

Uchida, M. & Ono, M. (1996). Improvement for oxidative flavor stability of beer - Role of OH-radical in beer oxidation. *J Am Soc Brew Chem* 54, 198-204.

V

Vidal, J. C., Boulet, J. C. & Moutounet, M. (2004). Les apports d'oxygène au cours des traitements des vins. Bilan des observations sur site. *Rev Fr Œnol* 205, 25-33.

Vivas, N., Glories, Y., Pianet, I., Barbe, B. & Laguerre, M. (1996). A complete structural and conformational investigation of procyanidin A2 dimer. *Tetrahedron Letters* 37, 2015-2018.

Vivas, N. (1997). Recherches sur la qualité du chêne Français de tonnellerie (*Q. petraea* Liebk., *Q. robur* L.) et sur les mécanismes d'oxydoréduction des vins rouges au cours de leur élevage en barrique. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Vollhardt, P. C. & Schore, N. E. (1995). *Traité de chimie organique: De Boeck Bruxelles*.

Voyatzis, I. (1984). Recherches sur les composés phénoliques des vins blancs. Interpretation de la couleur. *Thèse de Doctorat*. Université de Bordeaux 2.

Vuorinen, H., Maatta, K. & Torronen, R. (2000). Content of the flavonols myricetin, quercetin, and kaempferol in finnish berry wines. *J Agric Food Chem* 48, 2675-2680.

W

Walker, J. R. L. (1964). Studies on the enzymic browning of apples. II. Properties of apple polyphenoloxidase. *Aust J Biol Sci* 17, 360-371.

Waterhouse, A. L. & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *Am J Enol Vitic* 57, 306-313.

Whitaker, J. R. & Lee, C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning: An overview. *Enz Brown Prev*, 2-7.

Wildenratt, H. L. & Singleton, V. L. (1974). The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Am J Enol Vitic* 25, 119-126.

Y

Yaropolov, A. I., Skorobogatko, O. V., Vartanov, S. S. & Varfolomeyev, S. D. (1994). Laccase - Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochem Biotech* 49, 257-280.

Yaylayan, V. A. (2003). Recent advances in the chemistry of Strecker degradation and amadori rearrangement: Implications to aroma and color formation. *Food Sci Tech Res* 9, 1-6.

Yokotsuka, K. & Singleton, V. L. (1997). Disappearance of anthocyanins as grape juice is prepared and oxidized with PPO and PPO substrates. *Am J Enol Vitic* 48, 13-25.

Yolka, S., Dunach, E., Loiseau, M., Lizzani-Cuvelier, L., Fellous, R., Rochard, S., Schippa, C. & George, G. (2002). γ -Sultines: A new class of flavour compounds. *Flav Fragr J* 17, 425-431.

Z

Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. & Eskin, N. A. M. (1991). Polyphenol oxidase. *Oxidative Enzymes in Foods*, 217-273.

Valorisation des travaux des recherches

Publications

Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre, P. L. & Darriet, P. (2010). Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Anal Chim Acta* 660, 102-109.

Communications

International Congress, Macrowine, 15-17 juin 2010, Turin: Présentation orale: Characterization and formation kinetic study of phenolic compounds – volatile thiols adducts by chemical and enzymatic oxidation. **Maria Nikolantonaki**, Michael Jourdes, Stéphane Quideau, Pierre-Louis Teissedre, and Philippe Darriet.

International Congress, In Vino Analytica Scientia, 2-4 juillet 2009 Angers, France: Présentation orale: Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Incidence of oxygen, iron and sulphur dioxide. **Maria Nikolantonaki**, Pierre-Louis Teissedre and Philippe Darriet.