THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par Alicia JOUIN

Évolution et caractérisation chimique des tanins couronnes du raisin au vin

Sous la direction de : Michaël JOURDES

Soutenue le 12 décembre 2019

Membres du jury :

M. De FREITAS, Victor	Professeur, Université de Porto	Président
Mme. LAMBRI, Milena	Professeure, Université du Sacré-Cœur	Rapportrice
M. GUYOT, Sylvain	Directeur de recherche INRA, Le Rheu	Rapporteur
M. TEISSEDRE, Pierre-Louis	Professeur, Université de Bordeaux	Invité
Mme. ZENG, Liming	Professeure Haute Ecole de Viticulture et Œnologie, Changins	Invitée
M. JOURDES, Michaël	Maitre de conférence, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Évolution et caractérisation chimique des tanins couronnes du raisin au vin

Résumé : Les tanins condensés sont présents dans un grand nombre de boissons et d'aliments comme le raisin, le vin, le thé, les pommes ou même le chocolat. Dans le vin, ils contribuent à de nombreuses propriétés organoleptiques qu'elles soient visuelles ou gustatives. Récemment, une nouvelle sous-famille de tanins condensés possédant un squelette cyclique avec une cavité a été découverte et nommée les tanins couronnes.

Le but de cette thèse est de déterminer la localisation des tanins couronnes dans la vigne, d'étudier leur cinétique d'évolution du raisin jusqu'au vin et de caractériser chimiquement cette nouvelle famille. Un volet de ce travail a été consacré aux pigments polymérisés ainsi qu'à la famille des tanins condensés ayant une liaison de type A.

Les tanins couronnes ont été localisés spécifiquement dans la pellicule de la baie de raisin ainsi que dans les feuilles, les rameaux et les racines de la vigne. Leur concentration dans la pellicule est influencée par le type de sol et la nature du cépage. Durant la maturation du raisin, ces tanins s'accumulent dans les pellicules de la baie de raisin. Dans le vin, ces tanins cycliques sont extraits en tout début de fermentation alcoolique, restent stables durant le reste de la vinification et durant le vieillissement en bouteille. Il a ainsi été démontré que les tanins couronnes sont résistants à l'oxydation. En parallèle, la purification du pentamère couronne a été entreprise ainsi que la synthèse multi-étape du tétramère couronne. Une étude en fragmentation a permis de différencier les tétramères couronnes et du tétramère majoritaire de type A. Cette dernière famille a été analysée sensoriellement prouvant qu'ils sont plus astringents que les tanins de type B classique.

Enfin, une étude sur l'évolution des familles de pigments polymérisés a été réalisée par dépolymérisation chimique permettant de mettre en lumière le comportement unique de chacune des familles en fonction de leur structure.

Mots clés : Vin rouge, Tanins condensés, Tanins couronnes, Tanins de type A, Vigne, Synthèse organique, UPLC-UV-ESI-QTOF.

Unité de recherche

Univ Bordeaux, ISVV, EA 4577 Œnologie, F-33140 Villenave-d'Ornon, France

INRA, ISVV, USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave-d'Ornon, France

Evolution and chemical characterisation of crown procyanidins from the vine to the wine

Resume: Condensed tannins are widely distributed in plant-derived foods and beverages like grape, red wine, tea, apples, or even chocolate. They contribute to many organoleptic properties such as color and taste. Recently, a new condensed tannin sub-family with a macrocyclic structure and with a cavity at the center has been reported, and named crown procyanidins.

The aims of this PhD work were to determine the localization of crown tannin in the vine, to study their evolution kinetics from the grape to the wine and to characterize chemically these new compounds. Another part of the thesis has focalized on polymerized pigment as well as on the tannins with an A-type linkage.

In the vine, crown procyanidins are specifically located in the grape skin as well as in the leaf, the vine branch and the vine roots. Their concentrations in the skin are impacted by the type of soil and by the grape varieties. In the grape skin, the crown tannins have been accumulated during all the ripening. These tannins are extracted at the beginning of the alcoholic fermentation and their concentrations remains stable during the rest of the winemaking process and also during the red wine aging in bottle. It has also been shown that the crown procyanidins appears to be resistant to oxidation. Moreover, at the same time, the purification of crown procyanidins pentamer has been undertaken as well as the multi-step synthesis of the crown tetramer. A comparative study of the fragmentation pathways of the crown tetramer and the non-cyclic tetramers having A-type linkages highlighted specific fragments from A-type the tannins. A sensory study on this tannin family was performed showing that tannins with A-type bonds are more astringent than tannins having only B-type bonds.

Finally, a study on the evolution of polymerized pigments in red wine was carried by chemical depolymerization, which demonstrate that every class of pigments have a unique behavior.

Keys words: Red wine, Condensed tannins, Crown tannins, A-type of tannins, Vine, Organics Synthesis, UPLC-UV-ESI-QTOF.

Unité de recherche

Univ Bordeaux, ISVV, EA 4577 Œnologie, F-33140 Villenave-d'Ornon, France

INRA, ISVV, USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave-d'Ornon, France

« Le chemin qu'on emprunte est toujours le bon chemin.

Tout aurait pu être n'importe quoi d'autre et cela aurait eu tout autant de sens »

Tenecy Williams

Remerciements

Durant ces trois années de doctorat au sein de l'ISVV, j'ai croisé la route d'un grand nombre de personnes dont certaines sont carrément devenues des amis chers à mes yeux. J'espère en débutant ces remerciements n'oublier personne mais si c'est le cas soyez assurés que vous avez toute ma reconnaissance et mon amour.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Merci M. le président, Victor de Freitas, d'avoir été présent tout au long de ma thèse, à la mi-thèse, en congrès et d'avoir accepté d'être le président de mon jury. Je vous adresse mes sincères remerciements et ma reconnaissance. Merci à mes deux rapporteurs M. Sylvain Guyot et Mme. Milena Lambri. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail ainsi que pour vos commentaires et nos discussions durant la soutenance. Par la suite, je voudrais remercier Mr. Pierre-Louis Teissedre, membre invité mais également, mon directeur de laboratoire depuis le début où je suis arrivée à l'ISVV. Merci beaucoup pour votre soutien, votre confiance et vos conseils. Merci à Mme Liming Zeng d'avoir été là depuis le début, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenue. Je t'adresse ici mes très sincèrement remerciements, ainsi que ma reconnaissance et mon admiration. Merci ! Et enfin à mon directeur de thèse, Dr. Michaël Jourdes, auquel j'ai préparé des remerciements spéciaux par la suite.

Je voudrais également remercier l'école doctorale SVS ainsi que l'Université de Bordeaux d'avoir été mes institutions durant toutes ces années. Par la suite, c'est l'ISVV qui m'a accueilli que ce soit durant le master mais également durant le doctorat. Je suis très fière de sortir de chez vous.

Ainsi, j'en viens à remercier le directeur de l'Unité, Mr. Philippe Darriet, pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de recherche Œnologie.

Je voudrais aussi remercier les différentes collaborations avec les différents laboratoires que j'ai réalisées durant mon doctorat. Parmi l'axe EGFV, je voudrais remercier Mme. Agnès Destrac de m'avoir fourni tous les échantillons de la parcelle Vitadapt et d'avoir ainsi collaboré avec nous pour nous permettre d'accentuer nos connaissances sur la famille des tanins couronnes. Dans le même axe, je voudrais remercier Mme. Sabine Guillaumie pour avoir initié une nouvelle collaboration avec nous afin d'étudier encore un peu plus les tanins couronnes. Je voudrais également remercier l'axe MIB avec qui j'ai collaboré de manière indirecte. Merci de m'avoir aidé. Merci M. Eric Fréro pour m'avoir passé un grand nombre d'échantillons en RMN. Enfin, je voudrais remercier l'équipe de M. Laurence Geny et surtout l'équipe du réseau maturité de m'avoir fourni des échantillons de raisin tout au long des trois ans.

Je n'oublie pas non plus les laboratoires du goût ou des arômes rouges et jaunes qui m'ont toujours aidée quand j'en avais besoin.

J'en viens ainsi à remercier mes collègues hors laboratoire. Merci à Pascaline, Marie C., Marie A., Philippine, Emily, Marine, Justine, Marion, Marie M., Charlotte, Audrey. Merci également à Patrick, Judith et Alexis.

Des remerciements spéciaux à ma petite Pops, Pauline. J'ai découvert une femme merveilleuse et très attachante. Merci pour tous les bons moments qu'on a passées ensemble. Je te souhaite que du bonheur et de la joie pour la suite.

Je voudrais remercier Mme. Sophie Tempère pour son aide pour toutes les analyses sensorielles que j'ai menées tout au long de ces années. Merci également à mes collègues de TP, Caroline et Natalie, pour leur bonne humeur et leurs conseils.

J'arrive ainsi à la partie de mon laboratoire qui sera toujours dans mon cœur…

A Mr. Pierre-Louis Teissedre, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'avoir conseillée, écoutée et soutenue. Je vous adresse mes sincères remerciements. A tous mes collègues, Kléopatra, Reyes, Wen, Maria, Cindy, Adeline, Zuriñe, Natalia, Ruth, Anne-Laure, Alexandra, Laura, Clément et Mathilde. Merci d'avoir toujours été là dans les bons ou les mauvais moments. J'ai beaucoup appris en votre compagnie. Vous serez toujours dans mon cœur ma famille de labo. Merci à Julien d'être venu aussi souvent et de m'avoir appris tant de chose.

A mon directeur de thèse, Michaël Jourdes, ces quelques lignes ne représenteront pas toute l'estime que j'ai pour toi. Merci pour tout. Merci pour ta confiance, pour ton soutien, pour toutes les choses que tu m'as apprises, pour tes conseils, pour ta bonne humeur. J'ai appris tellement en quelques années. Ne change rien parce que tu es un grand et bon Chef !

A mes stagiaires Etienne Pilard, Anne Laure Gancel, Antoine Dalis, Maéliss Sanchez, Thibault Robin, merci pour votre aide, pour votre bonne humeur et votre travail.

Merci à mon padawan, Gauthier Lagarde. Je te souhaite bon courage et que du bonheur pour la suite. Profite bien de ces quelques années parce qu'elles défilent beaucoup trop vite.

A ma petite Maria, te connaitre a été un vrai bonheur. J'ai adoré tous les moments passés avec toi que ça soit au labo ou dehors. Avec toutes mon amitié merci beaucoup.

A mes amis qui étaient à la base des collègues, Mathilde, Edouard, Clément, Delphine, ne plus vous voir tous les jours va être très difficile. Je me suis tellement attachée à vous. Voyez en ces quelques lignes mes plus sincères remerciements et tout mon amour. Mathilde ne change rien, reste

toi-même et fai-toi confiance. Edouard, je suis heureuse de te connaitre et surtout qu'on ait tissé ce lien d'amitié. Clément, bon courage pour la suite et ne doute pas de toi. Enfin, j'en viens à Delphine. Tu es la plus belle rencontre que j'ai réalisée au cours du doctorat. Je suis tellement heureuse qu'on ait vécues tout ça ensemble. Tu es une personne formidable, reste toi-même et ait confiance pour le futur. Tous les quatre, acceptez tout mon amour et mes très sincères remerciements. Je vous attends d'ailleurs à l'autre bout du monde.

A mes amis d'enfance qui sont ainsi restés depuis toujours à mes côtés, qui ont toujours été fiers de moi, m'ont toujours soutenue et encouragée. Merci surtout à toi Marie qui a toujours été là. Je t'exprime dans ces quelques mots mon affection sincère et profonde.

A mes amis de faculté connus au fur et à mesure des années. A toi Enrick, pour ton soutien sans faille et constant, merci. J'en viens enfin à mes deux pécores préférés, Jeremy et Dorian. Merci pour tout depuis toutes ces années. Merci pour votre écoute, votre soutien, vos sourires, vos encouragements, vos surprises, nos fous rires, nos prises de bec, nos voyages, notre complicité, nos doutes, votre amitié et votre amour en espérant que ça durera toujours. Je sais que tout se passera bien pour vous, la fin est proche. Je vous suis tellement reconnaissante pour tout. Voyez en ces quelques les signes mon affection et mon amour sans faille et pour longtemps.

Finalement, je termine ces remerciements par ma famille. Mes parents et mon frère (et Gnanka), pour être toujours là, pour m'avoir soutenue pour tous les choix que j'ai fait et m'avoir toujours épaulée pour tout. Je suis très heureuse d'avoir vécu tout ça avec vous. Merci beaucoup !! Avec tout mon amour.

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHES

PUBLICATIONS ISSUES DES TRAVAUX DE THÈSE ET AUTRES PUBLICATIONS

Articles Scientifiques

Jouin, A.; Zeng, L.; Pere, P.-M.; Teissedre, P.-L.; Jourdes, M.; Evolution of crown condensed tannin tetramer during winemaking and red wine aging. **2019**. *Biomolecules. (under review)*.

Jouin, A.; Teissedre, P.-L.; Jourdes, M.; Study of crown procyandins: Localization, quantification and characterisation in different grape varieties. **2019**. *Journal Agricultural and Food Chemistry. (under review)*.

Longo, E.; Rossetti, F.; **Jouin, A**.; Jourdes, M.; Teissedre, P.-L.; Boselli, E.; Distribution of cyclic hexameric proanthocyanidin and its tetrameric and pentameric congeners in red and white wines. **2019**. *Food Chemistry.* 299, 125125.

COMMUNICATION AUX COURS DE CONGRES INTERNATIONAUX

Présentations Orales

Jouin, A.; Teissedre, P.-L.; Jourdes, M.; Localization, evolution, and environmental effects on crown procyanidins content from vine to wine. *42nd World Congress of Vine & Wine.* Geneva, Switzerland, 15-19 July **2019**.

Jouin, A.; Riveiro Canosa, M.; Teissedre, P.-L.; Jourdes, M.; Evolution of crown procyanidins during wine making and aging in bottle. *11th symposium International d'Oenologie de Bordeaux – Vino Analytica Scientia.* Bordeaux, France, 25-28 June **2019**.

Longo, E.; Merkyte, V.; Jourdes, M.; **Jouin, A.**; Teissedre, P.-L.; Boselli, E.; Solid phase extraction applied to HPLC-HDX-HRMS/MS to unravel a whole series of unconventional proanthocyanidins from wine and other plan foods. *1st Science&Wine World Congress*. Porto, Portugal, May **2019.**

Jouin, A.; Teissedre, P.-L.; Jourdes, M.; Synthesis of crown procyanidins tetramer. *International Conference on Polyphenols 9th Tannin Conference*, Madison, USA, 16-20 July **2018**.

Présentations Affichées

Jouin, A.; Teissedre, P.-L.; Jourdes, M.; Environmental effects and localization of the concentration of crown procyanidins in vine. *11th symposium International d'Oenologie de Bordeaux – Vino Analytica Scientia.* Bordeaux, France, 25-28 June **2019**.

Jouin, A.; Teissedre, P.-L.; Jourdes, M.; Quantification of crown procyanidins in different grapes skins varieties and in their corresponding wine for two vintages. *Macrowine,* Zaragoza, Spain, 28-31 May **2018**.

Jouin, A.; Destrac, A.; Rossetti, F.; Teissedre, P.-L.; Jourdes, M.; Evaluation of crown procyanidins contents in different grape varieties and their accumulation kinetics during grape maturation. *10th In Vino Analytica Scientia Symposium,* Salamanca, Spain, 17-20 July **2017**.

Prix obtenus lors de congrès internationaux

Best Poster Prize at **In Vino Analytica Scientia 2019** for *« Environmental effects and localization of the concentration of crown procyanidins in vine »*

Table des matières

Introduction

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

I. Généralités 9

II. Les composés phénoliques 10

A. Les non-flavonoïdes 10

a. Les acides phénols 10

b. Les stilbènes 11

B. Les flavanoïdes 12

a. La famille des anthocyanes 13

b. Equilibre entre les anthocyanes et le SO_2 16

III. Les tanins : origine et propriétés 16

A. Les tanins hydrolysables et les tanins complexes 17

B. Les phlorotanins 19

C. Les tanins condensés (ou les proanthocyanidines) : du raisin au vin 20

a. Les tanins condensés du raisin 20

b. Les tanins condensés durant la vinification des vins rouges 23

IV. Étude des propriétés organoleptiques des proanthocyanidines 27

A. Amertume 27

B. Astringence 28

V. L'évolution des tanins durant la vinification et le vieillissement 31

A. La copigmentation 31

B. La polymérisation des composés phénoliques 32

a. Condensations directes des liaisons de type B 32

b. Condensations directes des liaisons de type A 36

c. Condensations indirectes par pont éthylidène entre les tanins condensés et/ou les anthocyanes 38

C. La famille des pyranoanthocyanes 40

D. Évolution des flavanoïdes dans le vin rouge 42

a. Évolution structurale des anthocyanes et des pigments polymérisés dans le vin rouge..... 42
b. Évolution structurale des tanins condensés dans les vins rouges..... 44
VI. Les tanins couronnes 45
A. Mise en lumière et caractérisation des procyanidines couronnes..... 45
B. Premières études des tanins couronnes dans les vins rouges 48
VII. La chimie de synthèse des procyanidines dans la littérature 49
A. Propriétés chimiques des liaisons interflavanes 49
B. Couplages entre des unités non-protégées 50
C. Couplages des unités protégées 52
a. La protection des phénols 52
b. Activation du carbone C4 par oxydation 53
c. Protection de la position 8 54
d. Couplage par addition nucléophile 54
e. Couplage par substitution nucléophile 55
f. Déprotection des groupements benzyles 58
D. Synthèse d'oligomère de proanthocyanidines..... 59

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

I. Généralités (solvants, réactifs, produits)..... 63
II. Extraction des tanins couronnes dans les matériaux végétaux..... 64
A. Les échantillons du raisin et des autres organes de la vigne 64
B. La méthode d'extraction des tanins couronnes..... 66
C. Autre végétal testé en dehors de la vigne 67
III. Les échantillons de vin 68
A. Les vins issus des cépages de la parcelle Vitadapt 68
B. Suivie de l'extraction de l'encuvage à l'écoulage dans le château en appellation Pauillac 68
C. Suivie de l'extraction de l'encuvage à la fin de la fermentation malolactique..... 69
D. Verticale d'un vin d'un Château en appellation Pauillac..... *69*
IV. Le protocole d'oxydation des vins..... *69*
V. Le système d'analyse UPLC-UV-ESI-QTOF..... 70

A. Les méthodes de détection et de quantification des tanins couronnes 70

B. Les méthodes de fragmentation des tanins couronnes et des tanins liés par des liaisons de type A 72

VI. Purification du pentamère couronne 72

A. Extraction en phase solide avec une cartouche SPE C18 72

B. Fractionnement sur un gel TSK HW-40-S 73

C. Purification par HPLC semi-préparative 73

VII. Analyses des pigments polymérisés 74

A. Dépolymérisation chimique par phloroglucinolyse 74

B. Les pigments polymérisés 74

VIII. Hémisynthèse des tanins de type A 75

A. Hémisynthèse et purification des tanins liés par une liaison de type A 75

B. Méthode de quantification des tanins de type A 77

C. Méthode d'interaction des tanins et des protéines par turbidimétrie 78

IX. Les analyses de spectrophotométrie et de colorimétrie 78

A. Les méthodes par spectrophotométrie 78

a. L'Indice des Polyphénols Totaux ou IPT 79

b. Le dosage des tanins totaux 79

c. Le dosage des anthocyanes totales 79

d. Les caractéristiques chromatiques du vin rouge 79

B. La colorimétrie par la méthode de CIE 80

C. Analyses des paramètres chimiques courant en utilisant le WineScan (FOSS) 81

X. Les analyses sensorielles 82

A. Les analyses sensorielles des tanins couronnes 82

B. Les analyses sensorielles des tanins ayant une liaison de type A 83

XI. Les analyses statistiques 84

XII. La synthèse du dimère B5 pour la synthèse des couronnes 84

A. Les méthodes analytiques 85

a. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 85
b. Les différentes chromatographies 85
B. Caractérisation des produits synthétisés 86

Chapitre 3 : Les tanins couronnes dans la vigne

I. Localisation et extraction des tanins couronnes dans la baie de raisin 99
A. La localisation des tanins couronnes dans la baie de raisin 99
B. La méthode d'extraction des tanins couronnes dans le matériel végétal 102
II. Quantification des tanins couronnes dans différents cépages 104
A. Comparaison de la concentration en tétramère et en pentamères couronnes en fonction des cépages 105
B. Comparaison de la concentration en tétramère couronne et en tétramères non cycliques ... 115
III. Evolution de la concentration en tanins couronnes selon différents paramètres viticoles 116
A. Cinétique d'accumulation des tanins couronnes en fonction de la maturité du raisin 117
B. Étude de la concentration en tanins couronnes en fonction du type de sol 122
C. Impact du mode de culture de la vigne sur la concentration en tanins couronnes 124
IV. Localisation des tanins couronnes dans la vigne ou dans d'autres produits riches en polyphénols 125
A. Localisation des tanins couronnes dans l'ensemble de la vigne 126
B. Localisation des tanins couronnes dans d'autres produits riches en polyphénols 129
V. Conclusions 130

Chapitre 4 : Les tanins couronnes dans le vin

I. Extraction des tanins couronnes durant la vinification 135
A. Évolution des tanins couronnes durant la fermentation alcoolique 135
a. Extraction des tanins couronnes durant la fermentation alcoolique 135
b. Impact de la méthode d'extraction durant la vinification sur la concentration en tanins couronnes 137
c. Évolution de la concentration en tanins couronnes de l'encuvage à la fin de la fermentation malolactique 140

B. Variation de la teneur en tanins couronnes dans les vins monovariétaux 142

II. Évolution des tanins couronnes durant le vieillissement des vins 146

A. L'évolution des tanins couronnes durant le vieillissement du vin en bouteille 146

B. L'oxydation des tanins couronnes 151

III. L'évolution de la couleur : étude des pigments polymérisés 153

A. L'analyse de la couleur durant le vieillissement des vins rouges 154

B. L'étude chromatographique des pigments polymérisés 157

a. Les pigments polymérisés issus d'une condensation directe de type B entre tanins et anthocyanes 159

b. Composés polymériques ayant une liaison de type A entre tanins et anthocyanes 160

c. Les pigments polymérisés possédant un pont éthylidène entre tanins et anthocyanes 162

d. Les pigments polymérisés de type pyranoanthocyanes 163

IV. Conclusions 165

Chapitre 5 : Les tanins de type A

I. Étude approfondie sur l'hémisynthèse des tanins de type A 169

A. Hémisynthèse des tanins de type A et étude en spectrométrie de masse 170

B. Optimisation de l'hémi synthèse des tanins de type A 174

II. Quantification et recherche des marqueurs spécifiques des tanins de type A 176

III. Étude comparative des tétramères de type A et des tétramères couronnes en fragmentation 180

A. Étude préliminaire de fragmentation 180

B. L'étude des fragments pour les deux tétramères : cyclique et non cyclique 182

a. La fragmentation du tétramère linéaire possédant une liaison de type A 182

b. La fragmentation du tétramère couronne 188

IV. Étude des propriétés sensorielles des tanins ayant une liaison de type A et des tanins couronnes 192

A. Analyses sensorielles in vitro et in vivo des tanins liés par une liaison de type A 193

a. Étude des interactions tanins-protéines sur les tanins de type A et de type B 193

b. Analyses sensorielles des tanins de type A en comparaison aux tanins de type B 199

B. Analyses sensorielles sur la verticale de vin de l'appellation Pauillac 200

V. Conclusions..... 203

Chapitre 6 : Purification et synthèse des tanins couronnes

I. Purification des pentamères couronnes 207

II. La synthèse du tétramère couronne..... 210

A. La stratégie de synthèse 210

B. Description de la voie de synthèse pour obtenir le dimère B5..... 213

a. Benzylation de l'épicatéchine..... 214

b. Fonctionnalisation et activation de la position 4 de l'épicatéchine benzylée avec un diol 215

c. Fonctionnalisation et activation de la position 4 de l'épicatéchine benzylée avec un phloroglucinol..... 216

d. Débenzylation de l'épicatéchine phloroglucinol benzylée..... 217

e. Couplage de deux unités en conditions douces 218

C. Formation du dimère B5 sans protection et régiosélectif 220

a. L'épicatéchine bromée en position 8 220

b. Formation de la liaison interflavane avec une unité bromée 222

D. Suite de la synthèse après la formation du dimère B5 223

III. Conclusions..... 226

Conclusions

Perspectives

Annexes

Références Bibliograhiques

Liste des figures

Figure 1 : A. Squelette général des flavonoïdes B. Squelettes des principales sous-familles de la grande famille des flavonoïdes 13
Figure 2 : Structure de différentes formes colorées des anthocyanes. AO = Base quinonique ; A^+ = Cation flavylium ; AOH = Base carabinol ; C = trans-Chalcone 15
Figure 3 : Équilibre des différentes formes d'anthocyane en fonction du pH 15
Figure 4 : Structure incolore de type ASO_3H 16
Figure 5 : Structures des principaux ellagitanins du bois de chêne 17
Figure 6 : Structures des acutissimines A et B 18
Figure 7 : Réaction entre un ellagitanin et une anthocyane aboutissant sur un tanin complexe anthocyane-ellagitanin 18
Figure 8 : Structures des principaux phlorotanins 19
Figure 9 : Distribution dans la baie de raisin des composés d'intérêt pour la qualité du vin 21
Figure 10 : Évolution des tanins de pépins et de pellicules au cours de la maturation du raisin pour l'année 1998 (A) et 1999 (B) [71] 22
Figure 11 : Schéma de l'extraction des tanins de pépins et de pellicules durant la macération [71] 25
Figure 12 : Évolution de la concentration en proanthocyanidine durant la fermentation alcoolique avec 4 et 10 jours de macération préfermentaire à froid réalisés sur du Pinot noir en Oregon [68] 26
Figure 13 : Représentation schématique du possible mécanisme d'astringence. (a) Trois stades de l'interaction entre le stimuli et une protéine (b) Simulation de l'astringence [124] 30
Figure 14 : Les liaisons interflavanes de type B des tanins condensés (C4-C8 et C4-C6) 33
Figure 15 : Dépolymérisation chimique des tanins condensés 34
Figure 16 : Structures des pigments polymérisés de type $T\text{-}A^+$et $A\text{-}A^+$ 35
Figure 17 : Structures principales des liaisons de type A (C4-C8 ; C2-O-C7 ou C2-O-C5) 36
Figure 18 : Les structures de l'anthocyane trimère confirmée par RMN [168] 38
Figure 19 : Schéma condensé des mécanismes de formation des condensations indirectes. 39
Figure 20 : Schéma des différentes familles et sous-familles de pyranoanthocyanes. 41
Figure 21 : Nouvelles structures de pigments polymérisés possédant plusieurs liaisons différentes 42
Figure 22 : Structure du tétramère couronne [19] 45
Figure 23 : Structure 3 D du tétramère couronne 46
Figure 24 : Pourcentage de cellules PC12 vivantes après traitement 48
Figure 25 : Premier couplage d'unité non protégé entre la taxifoline et la catéchine en condition acide 51

Figure 26 : Couplage d'unité non protégé entre le dérivé 4-thioéther de l'épicatéchine et la catéchine avec un acide de Lewis 52
Figure 27 : Différences de pKa entre les phénols et les alcools de la catéchine et de l'épicatéchine 53
Figure 28 : Activation de la position benzylique 4 en présence d'un alcool avec du DDQ 54
Figure 29 : Bromation de la catéchine tétrabenzylée en position 8 54
Figure 30 : Synthèse du dimère épi-4a, 8-épi par addition nucléophile 55
Figure 31 : Couplage d'unité protégée par la méthode de Tückmantel [229] 56
Figure 32 : Formation du dimère B6 par la méthode de Suzuki [234] 58
Figure 33 : Déprotection des phénols et débromation de la position 8 des dimères 59
Figure 34 : Localisation géographique des différentes parcelles du Bordelais 64
Figure 35 : Extraction des tanins couronnes dans les pellicules 67
Figure 36 : Méthode de détection et de quantification des tanins couronnes 71
Figure 37 : Méthode de détection et de quantification des tanins condensés 71
Figure 38 : Méthode de fragmentation en MS/MS pour les tanins couronnes 72
Figure 39 : Résumer de la méthode utilisée pour purifier les tanins couronnes 73
Figure 40 : Méthode d'identification et de quantification des pigments monomériques et polymériques dans les vins 75
Figure 41 : Méthode UPLC pour la détection des tanins de type A 77
Figure 42 : Méthode d'identification des tanins ayant une liaison de type A par MS-MS 77
*Figure 43 : Représentation de l'espace couleur L*a*b** 81
Figure 44 : Méthode de détection seulement en spectrométrie de masse des molécules synthétisées 86
Figure 45 : Différents extraits végétaux de la baie de raisin lyophilisés 100
Figure 46 : Chromatogramme d'un extrait de pépins 101
Figure 47 : Chromatogramme d'un extrait de rafles 101
Figure 48 : Chromatogramme d'un extrait de pellicules 102
Figure 49 : Concentration en tétramère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2016 . 106
Figure 50 : Concentration en tétramère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2017 . 107
Figure 51 : Concentration en tétramère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2018 . 108
Figure 52 : Concentration en pentamère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2016 109
Figure 53 : Concentration en pentamère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2017 110
Figure 54 : Concentration en pentamère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2018 111
Figure 55 : Concentration en tétramère couronne en fonction des cépages pour tous les millésimes 112
Figure 56 : Concentration en pentamère couronne en fonction des cépages pour tous les millésimes 114

Figure 57 : Concentration en tétramère non cyclique en fonction des cépages pour tous les millésimes 115
Figure 58 : Cinétique d'évolution du tétramère couronne en fonction des stades de maturité pour le cépage Merlot 117
Figure 59 : Cinétique d'évolution du tétramère couronne en fonction des stades de maturité pour le cépage Cabernet-Sauvignon..... 118
Figure 60 : Cinétique d'évolution des pentamères couronnes en fonction du stade de maturité pour le cépage Merlot 119
Figure 61 : Cinétique d'évolution des pentamères couronnes en fonction des stades de maturité pour le cépage Cabernet-Sauvignon..... 120
Figure 62 : Cinétique d'évolution du tétramère non cyclique en fonction du stade maturité pour le cépage Merlot 121
Figure 63 : Cinétique d'évolution du tétramère non cyclique en fonction du stade de maturité pour le cépage Cabernet-Sauvignon..... 121
Figure 64 : Concentration en tanins couronnes en fonction du type de sol étudié 124
Figure 65 : Concentration en tanins couronnes en fonction du type de culture étudiée..... 125
Figure 66 : Concentration en tétramère et pentamères couronnes dans les feuilles de vigne de différents cépages 127
Figure 67 : Chromatogramme UV et spectre de masse des tanins couronnes dans les pommes 129
Figure 68 : Évolution des concentrations en sucre et en polyphénols durant la fermentation alcoolique 137
Figure 69 : Évolution du tétramère couronne (mg.L^{-1}) durant la fermentation alcoolique 138
Figure 70 : Évolution des pentamères couronnes (mg.L^{-1}) durant la fermentation alcoolique 139
Figure 71 : Évolution des tanins couronnes durant la vinification..... 141
Figure 72 : Concentration en tétramères couronnes dans les vins monovariétaux 143
Figure 73 : Concentration en pentamères couronnes dans les vins monovariétaux..... 144
Figure 74 : Concentration en tétramères non cycliques dans les vins monovariétaux..... 146
Figure 75 : Concentration en tétramères couronnes et non-cycliques en fonction de l'âge du vin pour l'appellation Pauillac 148
Figure 76 : Concentration en tétramères couronnes et non-cycliques en fonction de l'âge du vin pour l'appellation Languedoc Montpeyroux [20] 149
Figure 77 : Concentration en pentamères couronnes et non cycliques en fonction de l'âge du vin pour l'appellation Pauillac 150
Figure 78 : Concentration en pentamères couronnes et non cycliques en fonction de l'âge du vin pour l'appellation Languedoc Montpeyroux [20] 150

Figure 79 : Évolution des tanins couronnes et non-cyclique en fonction du temps dans un vin jeune 152
Figure 80 : Évolution des tanins couronnes et non-cyclique en fonction du temps pour un vin vieux 153
Figure 81 : Représentation de l'évolution de la couleur de la gamme de vin de l'appellation Pauillac 157
Figure 82 : Évolution des pigments polymérisés de type A^+-T et T-A^+ en fonction du vieillissement du vin 160
Figure 83 : Évolution des pigments polymérisés de type A durant le vieillissement du vin rouge 161
Figure 84 : Évolution des pigments polymérisés avec un pont éthylidène en fonction du vieillissement du vin rouge 163
Figure 85 : Évolution des pigments polymérisés de type pyranoanthocyanes en fonction du vieillissement du vin rouge 164
Figure 86 : Chromatogrammes UV et de masse de la fraction oligomérique de tanins avant oxydation 171
Figure 87 : Chromatogrammes UV et de masse de la fraction oligomérique de tanins après oxydation 171
Figure 88 : Spectre de fragmentation du dimère de type A (575,1220) en MS-MS..... 172
Figure 89 : Fragments du dimère de type A en MS-MS 173
Figure 90 : Mécanisme de phloroglucinolyse pour les pigments tanins-anthocyanes liés par une liaison de type A [20] 177
Figure 91 : Les différentes hypothèses de marqueurs spécifiques des tanins liés par une liaison de type A..... 178
Figure 92 : Chromatogramme à 280 nm et de masse spécifique des marqueurs des tanins ayant des liaisons de type A 179
Figure 93 : Les différentes voies de fragmentation existantes [253]..... 181
Figure 94 : Voie de fragmentation des quinones méthines avec un dimère de type B en mode négatif [20] 182
Figure 95 : Spectre de fragmentation du tétramère non cyclique ayant une liaison de type A (masse mesurée)..... 184
Figure 96 : Fragmentation du tétramère lié par une liaison de type A en position supérieure (masse calculée)..... 186
Figure 97 : Fragmentation du tétramère lié par une liaison de type A en position centrale (masse calculée)..... 187
Figure 98 : Spectre de fragmentation du tétramère couronne (masse mesurée) 189
Figure 99 : Spectre de fragmentation du tétramère couronne (masse calculée)..... 191

Figure 100 : Cinétique d'évolution des tanins ayant des liaisons de type B-protéines avec représentation de leur comportement initial, leur comportement courant et leur vitesse d'évolution 195
Figure 101 : Cinétique d'évolution des tanins ayant une liaison de type A-protéines avec représentation de leur comportement initial, leur comportement courant et leur vitesse d'évolution 196
Figure 102 : Comportement initial et courants des tanins de type B et A en fonction du pourcentage d'éthanol 197
Figure 103 : Comportements initiaux et courants des tanins de type B et A en fonction du pH 198
Figure 104 : Différentes formes de BSA en fonction du pH [260] 198
Figure 105 : Détermination du seuil de détection des tanins de type B (à gauche) et des tanins de type A (à droite) 200
Figure 106 : Carte des individus déterminés par une analyse multi factorielle 202
Figure 107 : Cercle de corrélation entre les paramètres sensoriels et les résultats chimiques 202
Figure 108 : Chromatogrammes UV des différentes étapes de purification des pentamères couronnes. A : Chromatogramme du vin rouge de base ; B : Chromatogramme du vin après passage sur cartouche C-18 ; C : Chromatogramme du vin après passage sur colonne TSK pour le tétramère couronne ; D : Chromatogramme du vin après passage sur colonne TSK pour les pentamères couronnes. 209
Figure 109 : Chromatogrammes UV de l'HPLC semi preparative avec la vérification en UV et en masse des tanins couronnes. E : Tétramère couronne ; F : Pentamère couronne majoritaire. 210
Figure 110 : Structure et conformation du tétramère couronne 211
Figure 111 : Structure et conformation du dimère B5 212
Figure 112 : Rétro synthèse du tétramère couronne 212
Figure 113 : Benzylation de l'épicatéchine 214
Figure 114 : Activation de la position 4 avec de l'éthylène glycol 215
Figure 115 : Changement de groupement activateur avec du phloroglucinol 216
Figure 116 : Débenzylation de l'épicatéchine benzylée fonctionnalisée en position 4 par du phloroglucinol 218
Figure 117 : Couplage de l'épicatéchine activée par le phloroglucinol avec l'épicatéchine 219
Figure 118 : Chromatogramme UV et de masse exacte m/z 577,1373 de la réaction de couplage entre l'épicatéchine activée par du phloroglucinol et de l'épicatéchine seule. 219
Figure 119 : Bromation de l'épicatéchine en position 8 221
Figure 120 : Chromatogramme UV du milieu réactionnel de la bromation de l'épicatéchine 221

Figure 121 : Couplage de l'épicatéchine activée en position 4 par le phloroglucinol et de l'épicatéchine bromée en position 8 ..... *222*
Figure 122 : Dimérisation du dimère B5 ..... *224*
Figure 123 : Cyclisation du tétramère linéaire en tétramère couronne *225*
Figure 124 : Structure hypothétique du pentamère couronne majoritaire [20] *235*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les acides phénols du raisin et du vin. A : Les acides benzoïques B : Les acides cinnamiques 11

Tableau 2 : Les stilbènes du raisin et du vin 12

Tableau 3 : Les principales anthocyanes du raisin et du vin..... 14

Tableau 4 : Les principales structures des flavanols..... 20

Tableau 5 : Les oligomères de la famille des tanins couronnes observés dans le vin rouge 47

Tableau 6 : Les différentes dates de prélèvements des échantillons sur les différentes parcelles du Bordelais..... 65

Tableau 7 : Liste des cépages blancs et noirs collectés sur la parcelle Vitadapt..... 66

Tableau 8 : Les valeurs des paramètres fondamentaux du vin données par le WineScan et par le château..... 155

Tableau 9 : Les valeurs des analyses spectroscopiques et colorimétriques..... 156

Tableau 10 : Les marqueurs des pigments polymérisés identifiés dans le vin rouge 159

Tableau 11 : Les différentes masses exactes des tanins de type A et des tanins de type B 172

Tableau 12 : Différents composés et paramètres testés afin d'améliorer l'hémisynthèse des tanins de type A..... 174

Liste des Annexes

Annexe 1 : Protocole d'extraction des pellicules pour les tanins couronnes……255

Annexe 2 : Profil gustatif du vin de calage utilisé pour la dégustation verticale de vin de Pauillac……256

Annexe 3 : Profil gustatif des vins pour la dégustation verticale de vin de Pauillac……257

Annexe 4 : Feuille de dégustation pour les seuils des tanins de type A……258

Annexe 5 : Feuilles de dégustation pour les tests triangulaires des tanins de type A……..258

Annexe 6 : Evolution des tanins couronnes durant la vinification (Lafite, Merlot en 2016 et 2017)……259

Annexe 7 : Evolution des tanins couronnes durant la vinification (Thieuley, Merlot en 2016 et 2017).259

Annexe 8 : Evolution des tanins couronnes durant la vinification (Thieuley, Cabernet-Sauvignon en 2016 et 2017)……..260

Annexe 9 : Spectre de fragmentation du trimère de type A (863,1796) en MS-MS……260

Annexe 10 : Spectre de fragmentation du tétramère de type A (1151,2440) en MS-MS……261

ABREVIATIONS

Unités :

Å	Angström
°C	Degré Celcius
nm	Nanomètre
µm	Micromètre
mm	Millimètre
cm	Centimètre
µl	Microlitre
ml	Millilitre
hL	Hectolitre
L	Litre
mg	Milligramme
g	Gramme
MHz	Mega hertz
min	Minute
mM	Millimole par litre
M	Mole par litre
N	Mole H^+ par litre
m/z	Ratio masse sur charge
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
ppm	Parties par million
tr/min	Tours par minute
v	Volume
V	Voltage

Composés :

A^+	Anthocyane
βA	Peptide β-amyloïde
BSA	Bovine Serum Albumin
C4, C6, C8	Carbone 4, Carbone 6, Carbone 8
C	catéchine

EC	épicatéchine
PPO	PolyPhénol Oxidase
T	Tanin
X/XO	Xanthine/Xanthine Oxydase

Solvants et Réactifs :

CO2	Dioxyde de carbone
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EtOH	Ethanol
HCl	Acide chlorhydrique
MeOH	Méthanol
NaCl	Chlorure de Sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NBS	N-bromosuccinimide
O_2	Oxygène moléculaire
Pd(OH)2/C à 20 %	Palladium sur charbon
Phloro	Phloroglucinol
SO_2	Bisulfite/Dioxyde de soufre
TFA	Acide Trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TiCl4	Tetrachlorure de titane

Instruments et techniques :

C-18	Cartouche-18
SPE	Solide Phase Extraction
DO	Densité Optique
IC	Intensité Colorante
IPT	Indice Polyphénols Totaux
DP	Degré de Polymérisation
DPm	Degré de Polymérisation Moyen

UV	UltraViolet
DAD	Diode array detector / Détecteur à barrettes de diodes
HPLC	High-performance liquid chromatography / Chromatographie en phase liquide à haute performance
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography / Chromatographie en phase liquide à ultrahaute performance
MS	Mass Spectrometry / Spectrométrie de masse
QTOF	Quadrupole-Time of flight / Quadripôle-Temps de vol
ESI	Electrospray ionization / Ionisation par éléctrosray
RDA	Retro-Diels-Alder Fission
HRF	Heterocyclic Ring Fission
BFF	Benzofuran Forming Fission
QM	Quinone Methine Fission
H	Hydrogène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
^{1}H	RMN Spectre proton RMN
^{13}C	RMN Spectre carbone RMN
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence

Autres :

2-AFC	2 Alternative Forced Choice
3-AFC	3 Alternative Forced Choice
CS	Cabernet-Sauvignon
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
PRPs	Protéines Riches en Proline
LDL	Lipoprotéines de basse densité
OIV	Organisation Internationale des Vins
FA	Fermentation Alcoolique
FML	Fermentation malolactique
FG	Fermeture de grappe
MM	Mi-Maturité
M	Maturité ou Merlot

Introduction

'*Mieux connaitre pour mieux apprécier*' Émile Peynaud.

Cette phrase d'Émile Peynaud, tirée du livre « Le goût du vin » [1], résume parfaitement la recherche en œnologie. Dans le but d'améliorer quotidiennement le vin et de répondre aux attentes des consommateurs, la recherche permet d'améliorer ses qualités. Le vin est une matrice complexe qui peut se décomposer en une matrice volatile et une matrice non volatile, les deux regroupant un grand nombre de familles chimiques apportant chacune un impact organoleptique différent. Un grand vin rouge de garde se caractérise par un équilibre sensoriel entre toutes ces familles. Le travail et les techniques utilisés au chai influencent et subliment le vin. L'un des éléments majeurs dans la qualité d'un vin est le raisin. La qualité du raisin est l'un facteur clé dans l'élaboration des grands vins qui commence donc aux vignobles par le travail de la vigne tout au long de l'année en lien avec le sol et le climat du millésime qui influenceront la qualité finale du raisin.

De nos jours, les bénéfices qu'apporterait le vin rouge sont très controversés. En effet, de nombreuses publications font état de l'apport positif qu'apporterait la consommation raisonnée du vin rouge, mais en retour bon nombre de contre publications font état du contraire. Le French paradoxe en fait partie [2], puisque ce dernier a montré que les Français présentaient moins de décès par les maladies cardio-vasculaires que les Américains alors qu'ils possèdent, tous les deux, un régime alimentaire aussi riche en lipides. Le facteur clé de cette différence a été la consommation modérée de vin rouge, typique de la culture française. Il a ainsi été démontré qu'une consommation modérée de vin (2 à 4 verres par jours) baissée le risque de maladie cardio-vasculaire. En revanche, une consommation excessive de vin augmenterait les risques pour la santé.

Ces propriétés biologiques bénéfiques, qu'apporte le vin rouge, sont principalement liées à une classe de molécule en particulier : les polyphénols. En effet, cette famille de molécule possède un grand nombre de propriétés bénéfiques pour la santé humaine telle que des propriétés antioxydantes [3], bactéricides [4,5], des propriétés de protection contre les maladies cardio-vasculaires [6,7] ou encore des propriétés de prévention contre les maladies neurodégénératives [8,9]. Ceux-ci sont retrouvés dans un grand nombre de végétaux (fleurs, bois), mais également dans notre alimentation, car ils sont présents dans les fruits rouges, le thé, les pommes voire même le chocolat. Les boissons fermentées comme le cidre [10], la bière et le vin [11] sont également riches en polyphénols. Dans la vigne, les polyphénols sont présents dans chaque partie de la baie de raisin avec des teneurs et des compositions différentes : 46-69 % dans les pépins (tanins condensés), 22 % dans la rafle (tanins condensés), 12-50 % dans la pellicule (anthocyanes, tanins condensés et stilbènes) et 1 % dans la pulpe (acides-phénols).

Les polyphénols peuvent se diviser en deux sous-groupes principaux : les flavonoïdes dont la structure de base est un noyau flavane C6-C3-C6 et les non-flavonoïdes qui regroupent les autres polyphénols. Chacun de ces 2 groupes possède un grand nombre de composés différents avec une large diversité de structures. Parmi les flavonoïdes, les tanins condensés sont des molécules phénoliques assez volumineuses qui interagissent avec d'autres composés du milieu. Dans le vin, ils proviennent majoritairement de la pellicule ou des pépins du raisin [12]. Dans le cas des vins élevés au contact du bois de chêne, une autre famille de tanins peut être présente, se nommant les tanins hydrolysables [13]. Parmi les tanins condensés, qui sont des oligomères ou des polymères d'unité flavanol, il est possible de différencier les tanins condensés ayant uniquement des liaisons de type B (liaison C4-C6 ou C4-C8) [14] ou les tanins ayant des liaisons de type A possédant, eux, une liaison éther supplémentaire entre le carbone C2 et les hydroxyles C5 ou C7 du noyau A [15]. En effet, après leurs extractions des parties solides de la baie de raisin durant la vinification, les composés phénoliques extraits vont réagir entre eux ou avec les autres constituants du vin influençant et modifiant ainsi la couleur et les propriétés organoleptiques du vin. Les tanins sont en grande partie responsables de propriétés gustatives et sensorielles importantes comme la charpente, la rondeur et la trame tanique du vin rouge et plus précisément l'amertume et l'astringence [16].

Durant l'évolution du vin, le milieu change grâce à différents facteurs tels que l'acidité et l'oxygène. Les tanins condensés évoluent en se polymérisant avec eux-mêmes voir, avec des molécules du milieu comme les anthocyanes. Ce changement du milieu créé alors la formation de nouvelles liaisons intra- et inter- moléculaires [17]. Les nouvelles familles de molécules formées influenceront alors directement l'évolution de la couleur et des propriétés gustatives des vins. Les pigments polymérisés font partie de ces nouvelles familles de composés formées pendant l'élevage et le vieillissement des vins rouges [18]. Malgré les progrès technologiques réalisés dans l'analyse des composés phénoliques de nos jours, ces familles sont encore mal connues et de nombreuses recherches sont encore en cours.

Récemment, une nouvelle sous-classe de tanins condensés a été découverte dans le vin rouge et nommé les tanins couronnes [19]. Ce nom, peu commun, provient de la structure particulière de ces molécules qui se caractérisent par une structure cyclique avec une cavité au centre de leur structure. La structure du tétramère couronnes a été caractérisée par RMN et est composée de quatre unités d'épicatéchine liées entre elles par une alternance de liaisons (4β→6) et (4β→8) rendant ce tétramère totalement symétrique. Quelques propriétés de ces nouvelles molécules ont été étudiées durant la thèse de Liming Zeng [20]. Ces molécules, de par leurs structures, seraient résistantes à la dépolymérisation chimique en milieu acide (phloroglucinolyse), elle serait également plus polaire que les tanins non cycliques et possèderait également des propriétés neuroprotectrices [20].

Actuellement, aucune autres informations ou propriétés physicochimiques de cette nouvelle classe de tanins condensés n'a été étudiées. L'objectif de cette thèse est d'étudier cette famille des tanins couronnes pour ainsi déterminer leur localisation, leur évolution dans la vigne et le vin ainsi que quelques propriétés physicochimiques. Une méthode d'extraction, de purification et de synthèse a ainsi été développée. Enfin, en parallèle, une autre famille chimique de tanins condensés, les tanins ayant une liaison de type A, a également été étudiée.

Le **Chapitre I** synthétisera l'étude bibliographique. Elle commencera par l'étude des polyphénols de la vigne pour ensuite se focaliser sur les tanins condensés et les anthocyanes. Leurs évolutions durant le vieillissement des vins rouges seront détaillées. Ensuite, l'étude et la découverte des tanins couronnes sera décrites, pour enfin finir par les stratégies de synthèse organique des tanins condensés.

Le **Chapitre 2** présentera tout le matériel et méthode utilisés durant les trois années de doctorat. Les nouvelles méthodes d'extraction, de purification et de synthèse des tanins couronnes seront détaillées. Toutes les méthodes analytiques en UPLC-UV-ESI-QTOF seront décrites ainsi que les RMN des molécules synthétisées.

Le **Chapitre 3** portera sur les tanins couronnes dans la vigne. L'étude s'intéressera à la localisation, l'extraction et la quantification des tanins couronnes dans la vigne et en particulier dans la baie de raisin. La concentration en tanins couronnes dans différents cépages sera comparées ainsi que leurs évolutions durant la maturation de la baie.

Le **Chapitre 4** parlera de l'évolution des tanins couronnes, mais cette fois-ci, dans le vin. L'évolution s'étendra du processus de vinification, au départ, et au vieillissement en bouteille, par la suite. Une étude sur l'impact de l'oxygène sur les tanins couronnes sera également réalisée. Enfin, une étude détaillée sur l'évolution de certaines familles de pigments sera présentée.

Le **Chapitre 5** présentera une étude détaillée de la famille des tanins liés par une liaison de type A avec leurs hémisynthèses et leurs quantifications. Une étude comparative en MS-MS des tétramères ayant une liaison de type A et des tanins couronnes a été effectuées. Enfin, des analyses sensorielles ont été réalisées sur ces deux familles de molécule.

Le **Chapitre 6** portera sur la purification et la synthèse organique des tanins couronnes. La première partie se focalisera sur la purification du pentamère couronne et la deuxième partie parlera de la synthèse multi-étape développée sur le tétramère couronne.

Chapitre 1 :

Étude

Bibliographique

I. Généralités

Depuis leur découverte, la grande famille des composés phénoliques fut largement étudiée et leurs propriétés furent exploitées dans de nombreux domaines comme l'agroalimentaire ou la santé. Les composés phénoliques, ou nommés plus communément polyphénols, sont présents dans un grand nombre de végétaux sous des formes et des quantités différentes variant selon l'espèce, l'organe ou les tissus [21]. Dans notre alimentation, de nombreuses boissons fermentées telles que le cidre [10], le thé [22] ou plus particulièrement le vin [23] en possèdent de grandes quantités. Dans les grappes de raisin, différents types de composés polyphénoliques sont présents dans les différentes parties de la baie : 46-69 % dans les pépins (tanins condensés), 22 % dans la rafle (tanins condensés), 12-50 % dans la pellicule (anthocyanes, tanins condensés et stilbènes) et 1 % dans la pulpe (acides phénols) [14]. Après l'extraction des parties solides de la baie de raisin durant la vinification, les composés phénoliques extraits vont réagir entre eux ou avec d'autres constituants du vin influençant et modifiant ainsi la couleur et les propriétés organoleptiques du vin. Plus précisément, les tanins sont en grande partie responsables de propriétés gustatives importantes comme la charpente, la rondeur et la trame tannique du vin rouge ou encore l'amertume [24] et l'astringence [25] bien que de récentes études tendent à prouver que les anthocyanes auraient également un impact sur le goût du vin [26].

Les composés phénoliques possèdent également des propriétés biologiques diverses telles que des propriétés antioxydantes [27,28], mais également des propriétés bénéfiques pour la santé comme des propriétés anti-inflammatoires [4], des propriétés de protection contre les maladies cardiovasculaires [6] ou encore des propriétés de prévention contre les maladies neurodégénératives [8].

Les composés phénoliques possèdent un large éventail de structures allant des structures les plus simples en C_6 à des structures très complexes $(C_6\text{-}C_3\text{-}C_6)_n$ [29,30]. Ils peuvent se subdiviser en deux groupes : les non-flavonoïdes dont la structure de base générale est un noyau simple C6 et les flavonoïdes dont la structure de base est un noyau flavane $C_6\text{-}C_3\text{-}C_6$.

II. Les composés phénoliques

A. Les non-flavonoïdes

a. Les acides phénols

Les acides phénols sont des composés de faible masse moléculaire qui se décomposent en deux groupes distincts : les acides hydroxybenzoïques, dérivés de l'acide benzoïque, ayant une formule de base de type C_6-C_1 et les acides hydroxycinnamiques, dérivés de l'acide cinnamique, ayant une formule de base de type C_6-C_3 (**Tableau 1**). Leur concentration dans les vins rouges est de l'ordre de 100-200 mg.L^{-1} alors que dans les vins blancs elle est beaucoup plus faible atteignant les 10-20 mg.L^{-1} [14]. Dans le raisin, les acides benzoïques sont présents majoritairement sous la forme de combinaisons hétérosidiques tandis que les acides hydroxycinnamiques sont majoritairement présents sous formes estérifiées. Ils participent ainsi à la modification de la couleur des vins rouges par des mécanismes d'interaction non covalente avec les anthocyanes [31]. Brettanomyces est la seule levure capable d'effectuer la transformation des acides hydroxycinnamiques en différents types de phénols volatils de natures différentes en fonction de la structure de l'acide de départ, qui présents en quantité trop importante provoquent des odeurs désagréables. Ils possèdent également un grand nombre de propriétés diverses, dont des propriétés chimiques causant des brunissements prématurés de la couleur des moûts blancs [32].

Tableau 1 : Les acides phénols du raisin et du vin. A : Les acides benzoïques B : Les acides cinnamiques

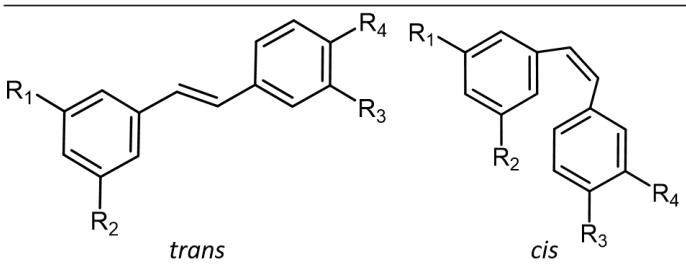
A	**Acides Benzoïques**	**R_2**	**R_3**	**R_4**	**R_5**
	Acide *p*-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
	Acide protocatéchine	H	OH	OH	H
	Acide vanillique	H	OCH_3	OH	H
	Acide gallique	H	OH	OH	OH
	Acide syringique	H	OCH_3	OH	OCH_3
	Acide salicylique	OH	H	H	H
	Acide gentisique	OH	H	H	OH

B	**Acides Cinnamiques**	**R_2**	**R_3**	**R_4**	**R_5**
	Acide *p*-coumarique	H	H	OH	H
	Acide caféique	H	OH	OH	H
	Acide férulique	H	OCH_3	OH	H
	Acide sinapique	H	OCH_3	OH	OCH_3

b. Les stilbènes

Les stilbènes, composés ayant 2 cycles benzéniques reliés par une chaîne éthane ou éthylène (C_6-C_2-C_6), sont des molécules ayant une structure particulière leur conférant une grande stabilité due à la résonnance des électrons. Ils sont présents dans les sarments de vigne, dans les feuilles de vigne, dans les raisins, dans le vin, mais également dans le bois de chêne. Les molécules les plus abondantes de cette famille sont le resvératrol, le picéïde (son dérivé glycosylé) et l'astringine [33-35] (**Tableau 2**). Il existe également des dimères et des polymères dont l'une des dernières molécules découvertes est un hexamère nommé « viniphénol A » [8]. L'isomère *trans* du resvératrol présent dans les pellicules de la baie de raisin serait produit par la vigne en réponse à une attaque du champignon *Botrytis cinerea*. Après vinification, les concentrations en resvératrol retrouvées dans les vins rouges seraient comprises entre 1-3 $mg.L^{-1}$. Les stilbènes possèdent également de nombreuses propriétés biologiques, dont certaines bénéfiques pour la santé humaine. Ils possèdent un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires [7,36], ainsi que des propriétés neuroprotectrices [9] et des activités chimiopréventives contre le cancer [37]. Récemment, de nouvelles études ont montré que les stilbènes avaient des propriétés de protection contre les fongiques (23).

Tableau 2 : Les stilbènes du raisin et du vin

Stilbènes		R_1	R_2	R_3	R_4
	Resvératrol	OH	OH	H	OH
	Picéide	O-Glc	OH	H	OH
	Astringine	O-Glc	OH	OH	OH

B. Les flavanoïdes

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette de 15 carbones de structure C_6-C_3-C_6 avec deux cycles benzéniques reliés par un hétérocycle oxygéné. Au sein de cette famille se trouve un grand nombre de sous-familles tel que les flavonols, les flavones, les flavanonols, les flavanones, les flavanols et les anthocyanidines (**Figure 1**). La classification se réalise en fonction du degré d'oxydation du cycle pyrannique C et de la substitution des carbones C_3 et C_4 de cet hétérocycle. Les flavonols sont les composés les plus répandus dans le règne végétal, plus de 6000 composés ont déjà été décrits. Ils représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation [27]. La plupart de ces sous-familles sont des pigments de couleur jaunes hormis les anthocyanidines qui eux sont des pigments de couleurs rouges/bleu.

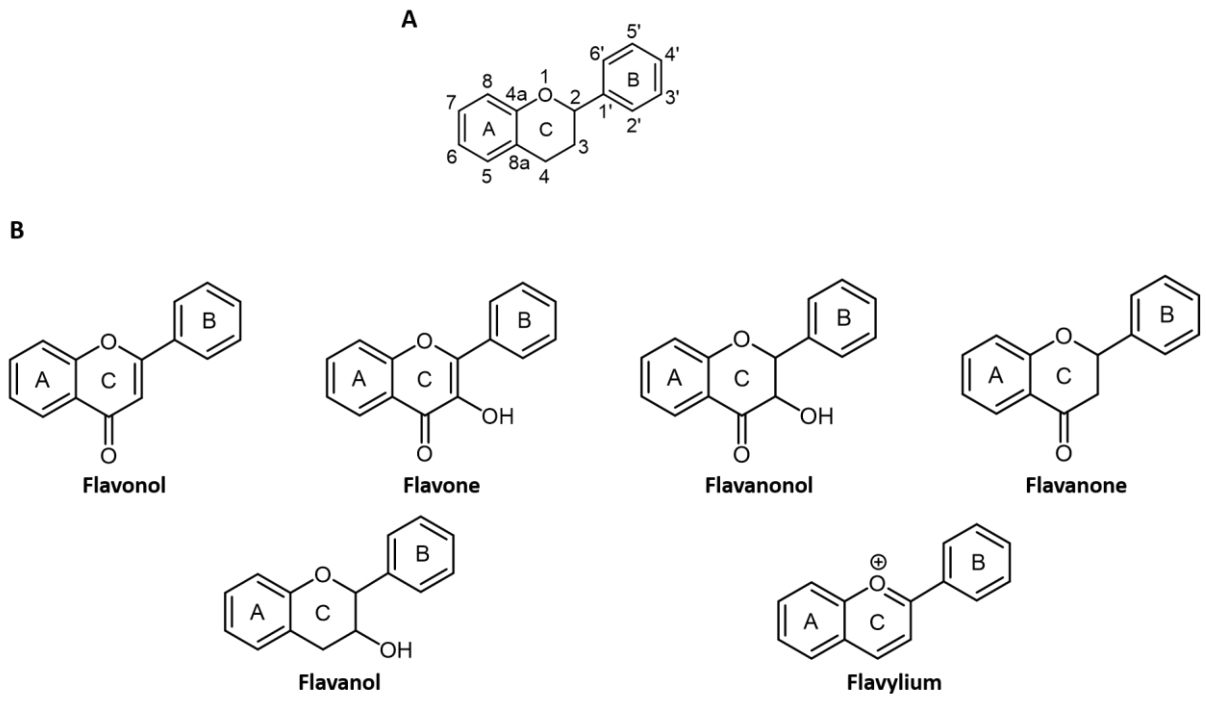


Figure 1 : A. Squelette général des flavonoïdes B. Squelettes des principales sous-familles de la grande famille des flavonoïdes

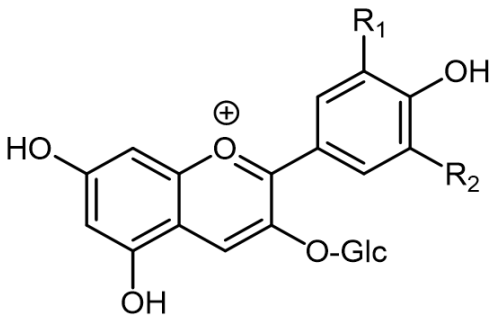
a. La famille des anthocyanes

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des raisins noirs et des vins rouges. Elles possèdent une structure de base caractérisée par un noyau « flavylium » glycosylé en position C3. Elles peuvent se différencier par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, mais également par la nature, la position et le nombre des oses liés. Sous forme hétérosidique (anthocyanines), ces molécules sont beaucoup plus stables que sous leur forme aglycone (anthocyanidines).

Elles sont présentes dans la pellicule, co-localisée avec les tanins dans les cellules hypodermiques à paroi épaisse de la pellicule des raisins noirs [38] à l'exception de certains cépages teinturiers où les anthocyanes sont présentes dans la pulpe. En fin de cycle végétatif, les feuilles possèdent une quantité importante de cette famille de pigment [14]. Les cinq anthocyanes de bases qui existent dans le genre *Vitis vinifera* sont la cyanidine-3-*O*-glucoside, la paéonidine-3-*O*-glucoside, la delphinidine-3-*O*-glucoside, la pétunidine-3-*O*-glucoside et enfin la malvidine-3-*O*-glucoside (**Tableau 3**). Leur concentration varie en fonction du cépage. La couleur du vin est l'ensemble des résultantes des anthocyanes et surtout de la malvidine-3-*O*-glucoside qui est l'anthocyane majoritaire (50-90 %) chez la plupart des cépages *Vitis vinifera*. Plusieurs autres groupes de composés sont possibles en fonction

de la nature du glucose en position 3 : glucose, glucose acétylé, glucose *p*-coumaroylé voire même glucose cafféoylé. De nouvelles anthocyanes acylées avec des acides organiques inhabituels, comme de l'acide lactique et de l'acide férulique ont également été découverts à l'état de trace dans le vin rouge [18].

Tableau 3 : Les principales anthocyanes du raisin et du vin

Anthocyanes		R_1	R_2
	Malvidine-3-*O*-glucoside	OCH_3	OCH_3
	Péonidine-3-*O*-glucoside	OCH_3	H
	Delphinidine-3-*O*-glucoside	OH	OH
	Pétunidine-3-*O*-glucoside	OCH_3	OH
	Cyanidine-3-*O*-glucoside	OH	H

Durant la vinification, ces molécules sont extraites très rapidement. Leurs concentrations évoluent au cours du vieillissement des vins, passant de 100 à 3500 mg. L^{-1} en fin de vinification à des valeurs de 0 à 50 mg. L^{-1} après quelques années [14]. En effet, les anthocyanes à l'état libre se combinent au cours du temps en s'associant avec les tanins du vin pour former une autre classe de molécule, les pigments polymérisés, qui sont responsables de la couleur des vins vieux.

La couleur des anthocyanes dépend essentiellement de leur structure chimique, mais également du milieu physico-chimique dans lequel elles évoluent. Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. Le cation flavylium A^+, de couleur rouge, est stable en milieu fortement acide et il peut se transformer en 3 composés différents lorsque le pH augmente : la base carbinol AOH incolore, la base quinonique AO de couleur bleue ou également en chalcone C de couleur jaune [39] (**Figure 2**). Au pH du vin compris entre 3,2 et 4,0, les quatre formes coexistent à des quantités différentes : 40 - 60 % pour les bases carbinols, rendant cette forme prédominante, 4 - 35 % pour les cations flavylium A^+ et 8 - 15 % pour les bases quinoniques AO (**Figure 3**). La forme chalcone *trans* est la forme prédominante à pH 4, bien que peu colorée [40].

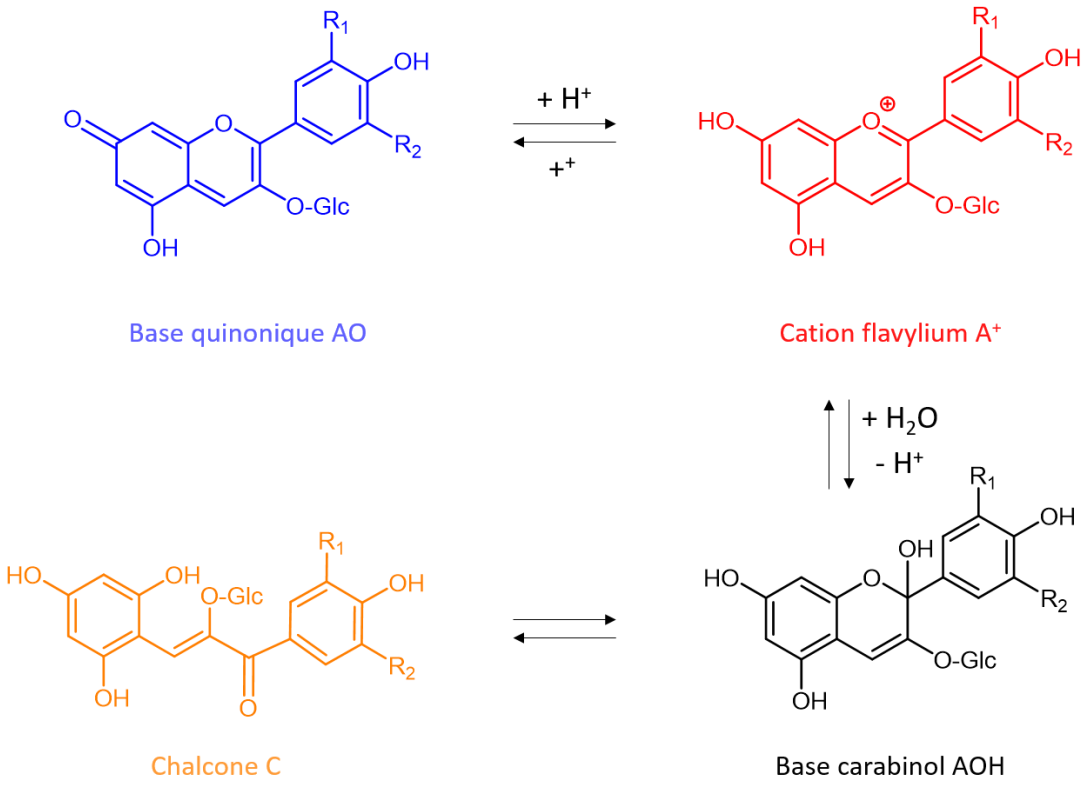


Figure 2 : Structure de différentes formes colorées des anthocyanes. AO = Base quinonique ; A^+ = Cation flavylium ; AOH = Base carabinol ; C = trans-Chalcone

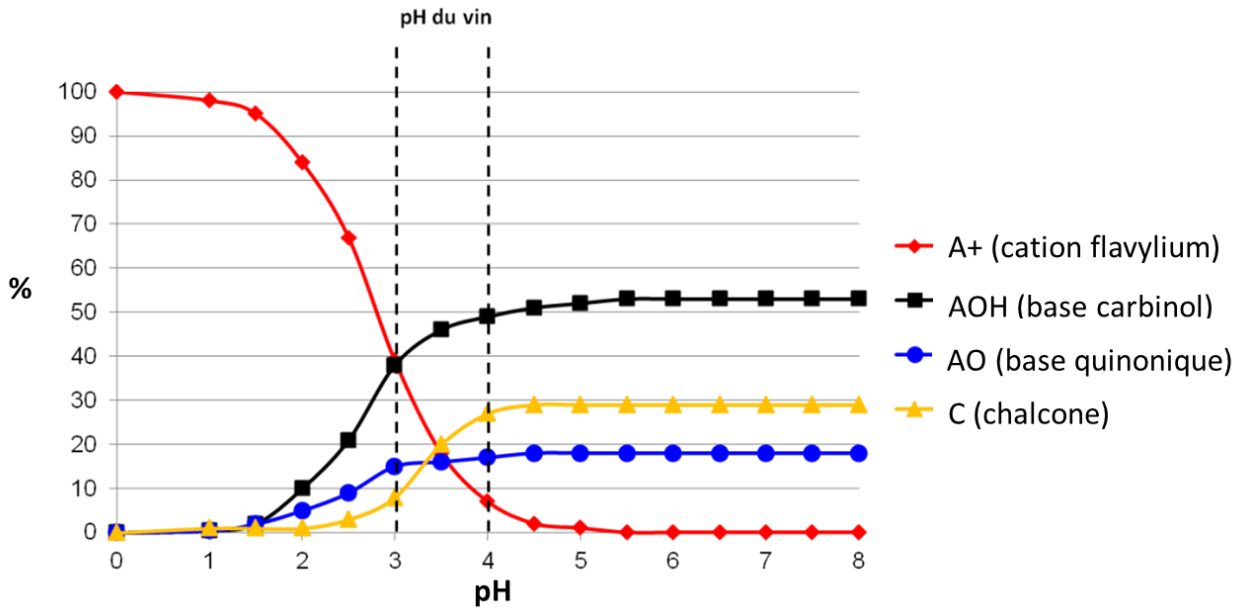


Figure 3 : Équilibre des différentes formes d'anthocyane en fonction du pH

b. Équilibre entre les anthocyanes et le SO_2

Le dioxyde de soufre modifie lui aussi la structure des anthocyanes. En solution aqueuse, le SO_2 décolore fortement les anthocyanes libres et c'est moins le cas quand les anthocyanes sont combinées ou polymérisées [16]. En effet, le SO_2 en milieu aqueux se combine aux molécules d'eau afin de produire de l'acide sulfureux selon l'équation suivante.

$$H_2O + SO_2 \rightleftharpoons HSO_3^- + H^+ \rightleftharpoons SO_3^{2^-} + 2H^+$$

L'équilibre de la solution dépend du pH, de la température et de la teneur en éthanol dans le milieu. À pH 3,5, 96,3 % de l'acide sulfureux se trouvent sous la forme d'anion hydrogénosulfite (HSO_3^-) [41]. Cet anion peut réagir avec le cation flavylium A^+ sur le carbone 4 formant ainsi un composé incolore de type ASO_3H [42] (**Figure 4**). Cette réaction aurait également pour impact d'empêcher la condensation des anthocyanes avec d'autres molécules.

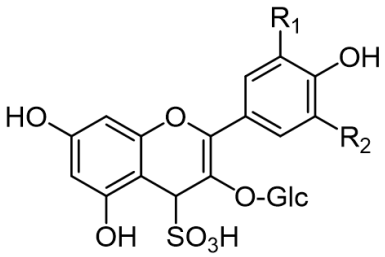


Figure 4 : Structure incolore de type ASO_3H

III. Les tanins : origine et propriétés

Étymologiquement, les « tanins » sont des substances utilisées pour le tannage des peaux. En effet, en traitant les peaux fraîches avec des extraits de végétaux ou de métaux, le collagène des peaux est alors complexé conduisant à sa précipitation rendant ainsi la peau imputrescible [43]. Au cours du temps, la recherche évoluant, les tanins ont été étudiés pour d'autres propriétés comme leur capacité à précipiter avec les protéines, travaux de Bate-Smith [44,45]. Au fur et à mesure des progrès de la chromatographie liquide, de la spectrométrie de masse et de la RMN, de nombreuses structures ont été élucidées dans de nombreuses matrices bien qu'à ce jour, toutes les structures n'ont pas été découvertes. Les tanins sont une large famille de composés polyphénoliques retrouvés dans un grand nombre de végétaux. Selon la nature des molécules élémentaires, les tanins peuvent se classer en quatre catégories : les tanins hydrolysables, les tanins complexes, les phlorotanins et les tanins condensés, lesquels font l'objet de l'essentiel de ce qui suit. Ainsi, les flavanols sont les monomères de la grande famille des tanins condensés.

A. Les tanins hydrolysables et les tanins complexes

Les tanins hydrolysables sont des molécules naturelles rencontrées dans de nombreux végétaux [13]. Ils peuvent se subdiviser en gallotanins et ellagitanins libérant, après hydrolyse acide, de l'acide gallique ou de l'acide éllagique et d'autres composés. Ces molécules sont très présentes dans le bois de chêne servant à la fabrication des douelles et ainsi des barriques. Les composés retrouvés en majorité sont la vescalagine et la castalagine tandis que l'on retrouve minoritairement la grandinine et la roburine E. Ces molécules possèdent un acide hexahydroxydiphénique et un acide nonahydroxytriphénique, estérifiés par un glucose non cyclique. L'hydrolyse partielle entraînant une perte de l'acide hexahydroxydiphénique, de la vescalagine et de la castalagine conduit à la formation de la vescaline et de la castaline. En addition à ces quatre monomères, quatre dimères sont également retrouvés dans le bois de chêne : les roburines A-F [46,47] (**Figure 5**).

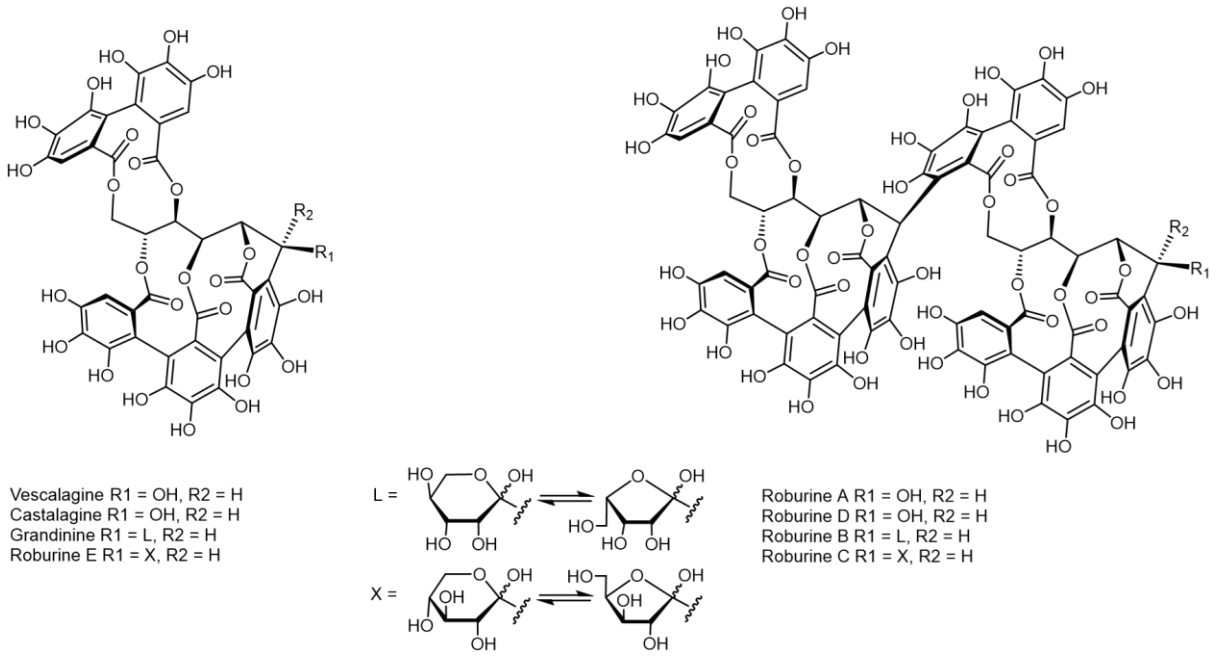


Figure 5 : Structures des principaux ellagitanins du bois de chêne

Tous ces composés étant très hydrosolubles, ils sont extraits durant l'élevage quand le vin entre en contact avec le bois par l'intermédiaire des barriques ou autres produits dérivés (planches, copeaux). Trois espèces de chênes sont généralement utilisés en tonnellerie : le chêne sessile (*Quercus petrea*), le chêne pédonculé (*Quercus robur*) et le chêne blanc d'Amérique (*Quercus alba*) [48]. L'origine du bois de chêne impactera la composition et la quantité d'ellagitanins extraits.

Le contact des deux matrices vin et bois peut également conduire à la formation des tanins complexes qui se développent dans le vin rouge durant l'élevage et le vieillissement. Cette classe de tanins est nommée ainsi, car ils proviennent du couplage entre deux autres grandes familles de tanins (les tanins condensés et les ellagitanins). Les accutissimine A et B font partie de ce type de molécule qui résulte de la condensation entre une unité flavanol et la vescalagine [49] (**Figure 6**). Une autre forme de tanin complexe a également été découverte provenant de la combinaison entre une anthocyane (la malvidine-3-*O*-glucoside) et la vescalagine [50] (**Figure 7**).

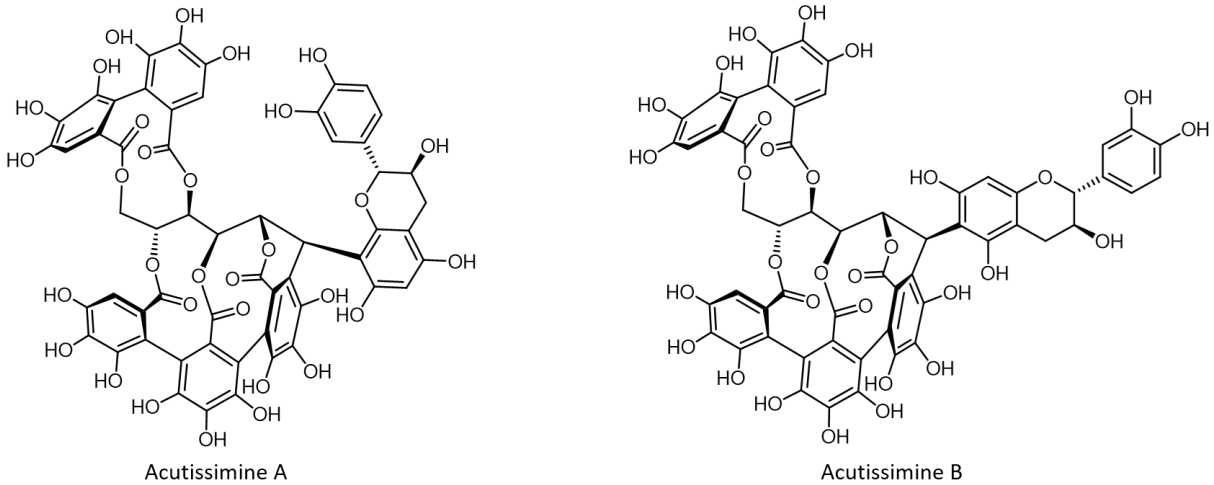


Figure 6 : Structures des acutissimines A et B

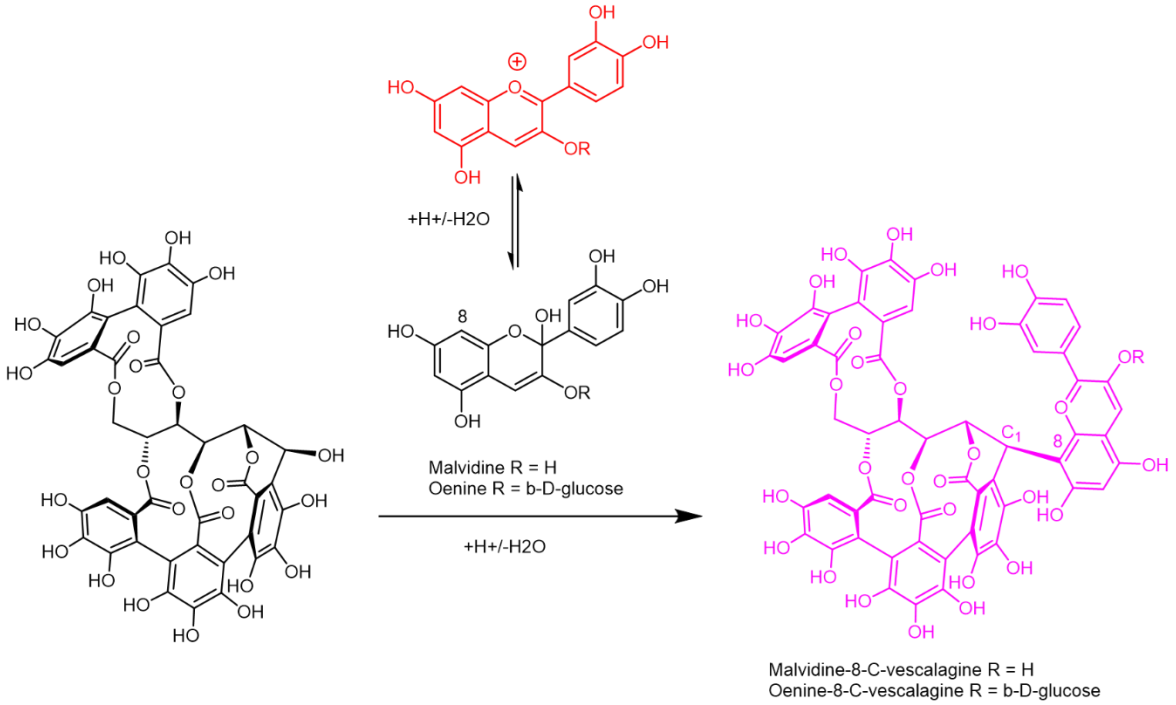


Figure 7 : Réaction entre un ellagitanin et une anthocyane aboutissant sur un tanin complexe anthocyane-ellagitanin

Les propriétés organoleptiques de ces molécules ont été peu étudiées. Une première étude avait mis en évidence les propriétés gustatives des ellagitanins avec un test de demi-langue. Bien que ce test possède des limites majeures et que la matrice utilisée soit assez éloignée de celle du vin, les résultats ont montré que la vescalagine et la castalagine sont des composés très fortement astringents et très peu amers, alors que les roburines A-D sont des composés moins astringents, mais deux fois plus amers. Enfin, les monomères glycosilés (grandinine et roburine E) sont 5 fois plus astringentes que la vescalagine et 3 fois plus amères [51,52]. Des études plus récentes ont montré que les ellagitanins sont plus doux que les tanins condensés, en partant de fractions purifiées avec les 8 ellagitanins principaux [53], mais que ceux-ci sont fortement corrélés à l'astringence et à l'amertume [54]. De plus, l'origine du bois, les procédés de transformation des barriques (en particulier la chauffe) [54] ou même les produits dérivés (copeaux) [55] modifient fortement les profils organoleptiques des vins.

B. Les phlorotanins

Les phlorotanins sont des oligomères ou polymères du phloroglucinol qui sont présents dans les plantes aquatiques, surtout dans les algues. La différenciation s'effectue sur la base de la nature des liaisons intermonomériques et des profils de substitution de ces derniers [56]. Plusieurs structures ont été élucidées jusqu'à aujourd'hui et leurs nombreuses propriétés (antioxydantes, anti-inflammatoire, antimicrobienne, neuroprotectrice…) [57] en ont fait un important objet d'étude (**Figure 8**).

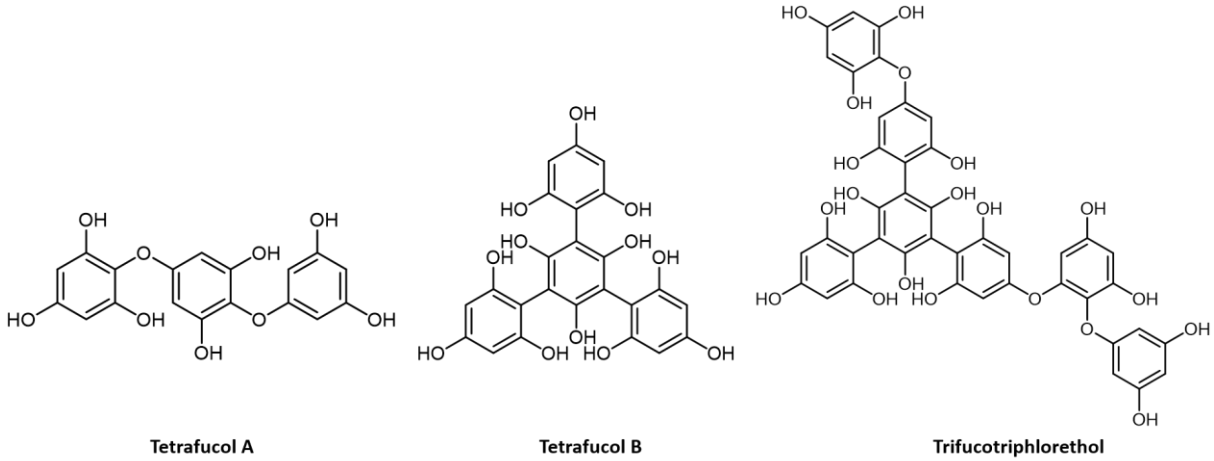


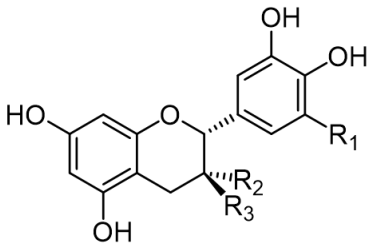
Figure 8 : Structures des principaux phlorotanins

C. *Les tanins condensés (ou les proanthocyanidines) : du raisin au vin*

a. *Les tanins condensés du raisin*

Les tanins condensés sont des polymères d'unité flavanols qui se différencient entre eux par leur degré d'hydroxylation, leurs centres asymétriques et le nombre de substituant galloylé. Les monomères ne sont donc pas des tanins dans le sens strict du terme. Les cinq principaux flavanols monomères sont la catéchine et l'épicatéchine ayant un cycle B de type catéchol, la gallocatéchine, l'épigallocatéchine, possédant un cycle B de type pyrogallol et enfin l'épicatéchine-3-*O*-gallate ayant un acide gallique estérifié sur l'hydroxyle en position C3 (**Tableau 4**). Les tanins condensés, sont nommés également proanthocyanidines, pour leur propriété à libérer des anthocyanidines en milieu acide à chaud par rupture de la liaison intermonomérique également appelé liaison interflavane [58,59]. Il existe alors deux types de proanthocyanidine : les procyanidines qui libèrent de la cyanidine et les prodelphinidines qui libèrent de la delphinidine. Dans le raisin, les tanins condensés sont eux présents dans différentes parties de la plante : les rafles [60], les pépins [61,62] et les pellicules [63,64] (**Figure 9**).

Tableau 4 : Les principales structures des flavanols

Flavan-3-ols		**R_1**	**R_2**	**R_3**
	(+)-Catéchine	H	H	OH
	(-)-Epicatéchine	H	OH	H
	(+)-Gallocatéchine	OH	H	OH
	(-)-Epigallocatéchine	OH	OH	H
	(-)-Epicatéchine-3-*O*-gallate	H	*O*-gallate	H

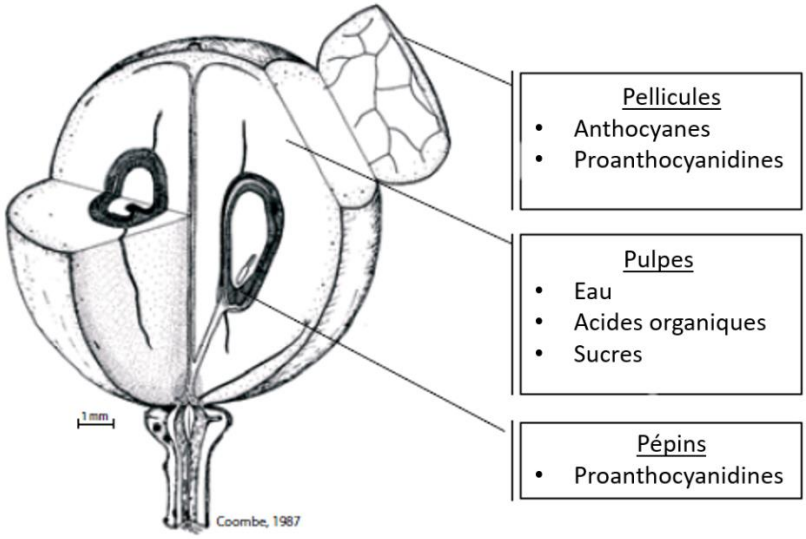


Figure 9 : Distribution dans la baie de raisin des composés d'intérêt pour la qualité du vin

1. Localisation des tanins condensés dans la baie de raisin

Les tanins condensés sont localisés dans différentes parties des tissus dans les pellicules et les pépins. Dans les pellicules, les tanins sont principalement retrouvés dans les couches hypodermiques des cellules intérieures [12]. Ils se trouvent sous forme libre dans les vacuoles qui augmentent de taille au fur et à mesure que l'on se rapproche de la surface de la pellicule. Ils peuvent aussi être liés aux polysaccharides des parois cellulaires ou liés avec les protéines constitutives de la face interne des membranes vacuolaires. Dans les pépins, les tanins sont présents dans les cellules à parois minces, dites « parenchyme » souples du pépin, entre la cuticule et le tégument dur (les couches intérieures lignifiées) [65].

2. Teneurs et structures des tanins condensés dans les baies de raisin

Dans la baie de raisin, les teneurs et les structures en tanins sont différentes entre les parties solides, surtout entre les pépins et les pellicules. Au cours de la maturation du raisin, l'évolution des tanins diffère en fonction de la localisation dans la baie. À la véraison, les concentrations en tanins situés dans les pellicules et les rafles sont déjà très importantes et ils continuent de s'accumuler pendant la maturation tandis que les tanins des pépins, eux, diminuent au cours de la maturation (**Figure 10**). La même observation a été réalisée pour les raisins blancs et noirs.

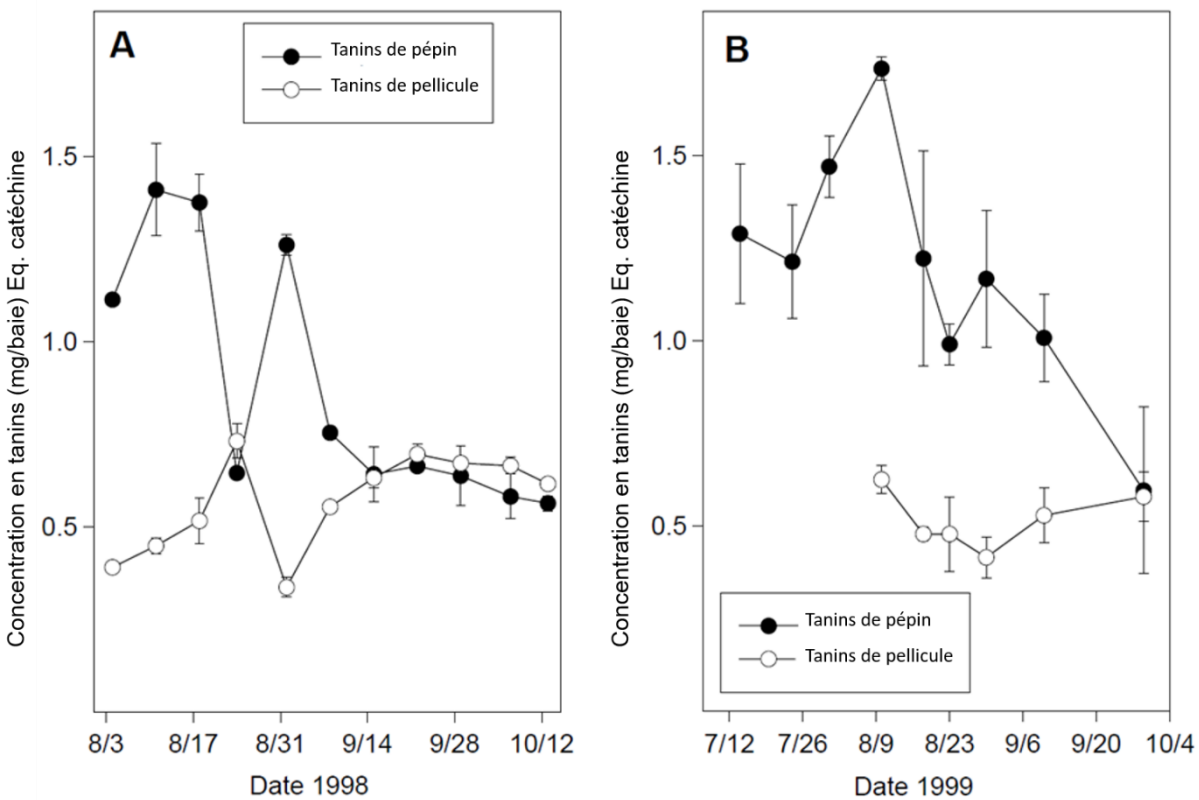


Figure 10 : Évolution des tanins de pépins et de pellicules au cours de la maturation du raisin pour l'année 1998 (A) et 1999 (B) [71]

Les structures des molécules diffèrent en fonction de leur localisation dans la baie de raisin en particulier entre les tanins de pellicules et les tanins de pépins. En effet, le degré de polymérisation (DPm) des tanins des pellicules est plus élevé que les tanins de pépins, avoisinant 30 unités dans un extrait de pellicule [61-63] et 18 unités dans une fraction d'extrait de pépins. De plus, De Freitas *et al*. [66] a montré que les structures des dimères et trimères, bien que retrouvés à de faibles concentrations, sont différentes entre les pellicules et les pépins. En effet, les extraits de pépins sont toujours plus riches en procyanidines dimères et trimères que ceux des pellicules.

La présence d'unités prodelphinidines en quantité importante, la faible présence des dérivés galloylés et le degré de polymérisation important sont les caractéristiques principales des tanins de pellicules. Les principaux tanins retrouvés sont la catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, les procyanidines oligomères étant peu galloylés [63]. Au fur et à mesure de la maturité, ces molécules deviennent de moins en moins réactives avec les protéines du fait des degrés de polymérisation élevés. En revanche dans les pépins, les sous-unités épicatéchine-3-*O*-gallates sont présentes en plus grande proportion alors qu'ils sont à l'état de trace dans les pellicules [67]. La catéchine et l'épicatéchine et de nombreux oligomères galloylés sont également retrouvés et possèdent une grande réactivité vis-à-vis des protéines. Les tanins des rafles quant à eux, ont une

réactivité voisine de celle des tanins de pépins. La différence de structure des molécules a permis d'estimer les proportions relatives des tanins de pellicule et des tanins de pépins dans les vins [68].

3. Facteurs influençant la concentration en tanins durant la maturation du raisin

Comme vu précédemment, dans la baie de raisin, les teneurs et les structures en tanins sont différentes entre les parties solides, surtout entre les pépins et les pellicules (parties solides où les tanins sont présents en plus grande concentration). Le déroulement de la maturité peut également avoir un impact sur les teneurs en tanins dans la baie. D'autres paramètres peuvent également jouer un rôle et modifier les concentrations en proanthocyanidines dans le raisin. Un des premiers facteurs est le cépage. En effet, de nombreuses publications ont traité l'impact des différents cépages sur la teneur en tanins extraits des pellicules et des pépins de raisin dans les vins. Des études ont été réalisées sur les raisins blancs (57) et sur les raisins noirs [69]. De nombreuses équipes se sont intéressées à cette problématique un peu partout dans le monde avec leurs cépages plus ou moins locaux : Italie [70], États-Unis [71], Espagne [72,73],… Les différentes études ont porté sur l'extraction des tanins de toutes les parties de la baie (pellicules et pépins) ou seulement d'une partie [74]. Santos-Buelga *et al*. 1995 a fait une comparaison de la composition en tanins de pépins de 15 variétés différentes permettant ainsi une complète cartographie du pépin.

Le millésime peut influencer les concentrations en tanins dans la baie, en effet, la vigne n'étant pas récolté tous les ans à la même période, les effets du climat et des pratiques culturales [75,76] peuvent influencer la qualité de la baie. Une étude a été réalisée dans la région bordelaise par Lorrain *et al*. [77] qui s'est intéressé à cet effet millésime sur la composition phénolique de la baie de raisin.

Un autre paramètre est le terroir, une notion qui inclue différents paramètres comme le climat, le cépage, le porte-greffe, mais également le sol [78,79]. Le sol peut avoir une influence très importante sur la concentration en composés phénoliques dans la baie de raisin. Dans la région bordelaise, un grand nombre de sols différents ont été déterminés en fonction de leur composition [80], influençant positivement ou non la teneur en certains composés de la baie.

b. Les tanins condensés durant la vinification des vins rouges

Une première partie de rappel sur la vinification en rouge sera abordée afin de détailler par la suite l'évolution des tanins condensés durant la vinification et les facteurs qui influencent leurs concentrations dans les vins.

1. Petit rappel sur la vinification des vins rouges

Chaque vinification est unique. En effet, de nombreux paramètres comme la qualité de la vendange, le terroir ou le millésime sont responsables de la qualité du raisin avant le début de la

vinification. Les grandes étapes de l'élaboration du vin rouge sont généralement similaires entre les châteaux. Après avoir récolté les baies à maturité par des méthodes manuelles ou mécaniques, le raisin sera trié, éraflé et foulé avant d'être mis en cuve et le contact jus/raisin commence alors. Ainsi débute la première fermentation, nommée fermentation alcoolique, qui transforme le sucre en alcool avec un dégagement de CO_2. C'est lors de cette fermentation que les composés d'intérêt du vin, volatils et non volatils, sont extraits. Des techniques comme le délestage, le remontage et le pigeage peuvent être utilisées pour extraire les composés non volatils d'intérêt localisés dans les parties solides de la baie de raisin. Une macération pré- ainsi que post-fermentaire pourra également être réalisée. Cette technique permet d'extraire plus abondamment les composés phénoliques des parties solides en jouant sur la température (à chaud ou à froid) et sur le temps de macération.

À la fin de la fermentation alcoolique et de la macération post-fermentaire, le vin est décuvé et pressuré afin d'entamer par la suite la deuxième fermentation, la fermentation malolactique. Cette deuxième fermentation va permettre de stabiliser et désacidifier le vin en transformant l'acide malique en acide lactique. Le vin sera alors soutiré et élevé au choix en barrique ou en cuve. Après un temps plus ou moins long d'élevage, le vin sera alors filtré et embouteillé.

2. Extraction des tanins condensés durant la vinification

L'extraction des composés phénoliques durant la vinification débute dès le foulage et la diffusion de ceux-ci se poursuit jusqu'au pressurage. En fonction de leur localisation dans la baie de raisin, les composés phénoliques sont extraits plus ou moins difficilement. Les acides hydroxycinnamiques, contenus dans la pulpe, sont des composés majeurs du moût, par exemple l'acide caftarique peut atteindre des concentrations allant jusqu'à 150 $mg.L^{-1}$ [81]. La macération pré-fermentaire permet d'extraire les composés anthocyaniques, responsables de la couleur, contenus dans la pellicule des baies de raisin. Ces anthocyanes sont extraites dès la cuvaison en phase aqueuse atteignant une concentration maximale au bout de quelques jours et par la suite leur concentration diminue due à la modification de leur structure au cours du temps (association tanin-anthocyane ou également leur dégradation). Les tanins des pellicules sont extraits comme les anthocyanes en début de cuvaison et leur diffusion se poursuit durant la fermentation et la macération post-fermentaire. Les tanins de pépins, plus difficiles d'accès, se diffusent quand la cuticule est dissoute par l'éthanol, donc en milieu de fermentation alcoolique et leur extraction se poursuit jusqu'à la fin de la macération post fermentaire (**Figure 11**).

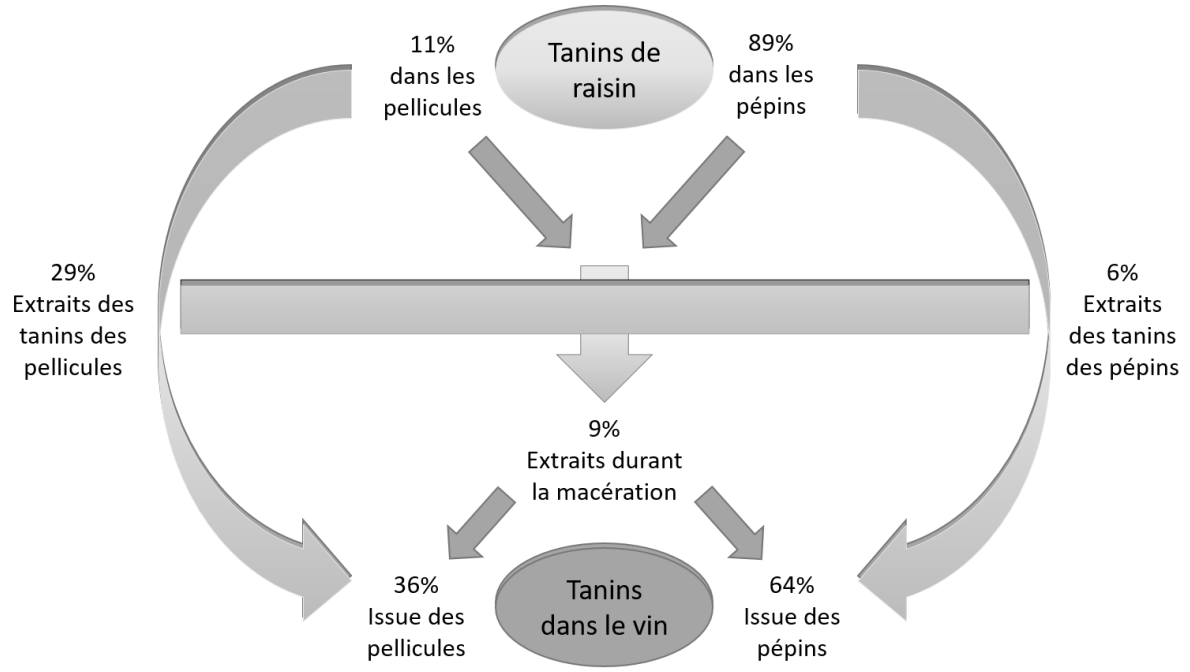


Figure 11 : Schéma de l'extraction des tanins de pépins et de pellicules durant la macération [71]

Il a été montré que les prodelphinidines se diffusaient plus rapidement que les procyanidines surtout quand celles-ci sont galloylées [82]. La concentration en tanins est liée au temps de contact de la vendange de même que le degré de polymérisation des tanins dans les moûts augmente avec le temps de macération [83]. Par ailleurs, la fin de la fermentation alcoolique et la macération post-fermentaire permettant une extraction en profondeur du matériel végétal (**Figure 12**). Les concentrations en flavanols dépendent de la concentration initialement présente dans le raisin. La teneur en tanins condensés dans les vins rouges est comprise entre 1 et 4 $g.L^{-1}$ tandis que dans les vins blancs secs, elle est comprise entre 100 et 300 $mg.L^{-1}$ [84]. Les nonamères sont les tanins les plus polymérisés retrouvés dans les vins rouges détectés en spectrométrie de masse [85]. Par ailleurs, les vins, issus de vendange non éraflée, contiennent plus de composés phénoliques [21]. De même, les feuilles de vigne peuvent également apporter des tanins [86].

Enfin, des tanins hydrolysables peuvent être apportés durant l'élevage en fût de chêne ou au contact d'autres dérivés de bois. Des « tanins œnologiques », extraits de noix de galle, d'essences de bois de chênes ou de châtaignier, ou de bois exotiques peuvent également être ajoutés durant la vinification, leurs ajouts sont jusqu'à présent très réglementés [87].

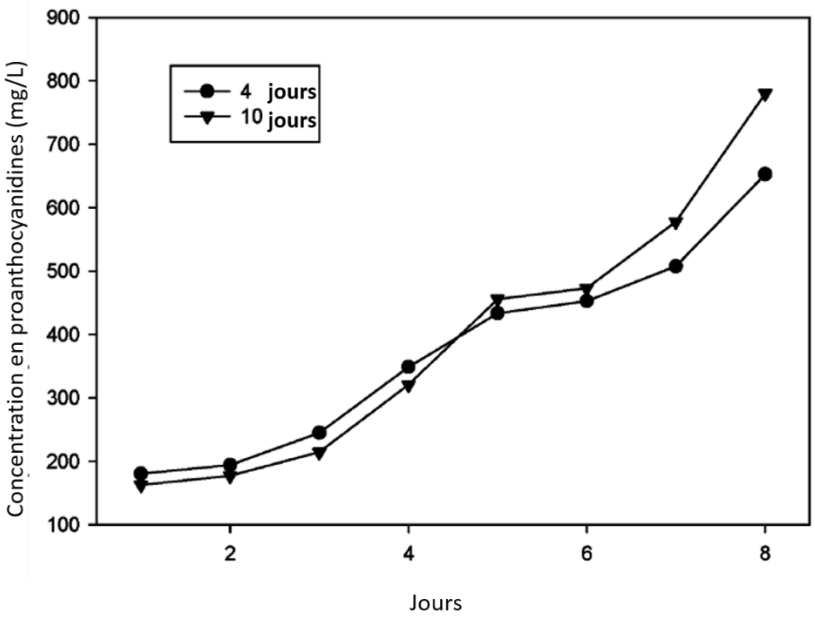


Figure 12 : Évolution de la concentration en proanthocyanidine durant la fermentation alcoolique avec 4 et 10 jours de macération préfermentaire à froid réalisés sur du Pinot noir en Oregon [68]

3. Facteurs influençant la concentration en tanins condensés durant la vinification

Les grands vins se caractérisent en partie par leur équilibre gustatif apporté en majorité par les tanins [1]. De nombreux paramètres peuvent impacter l'extraction et par conséquent la concentration finale en polyphénol dans les vins. Le premier facteur non négligeable est la qualité de la vendange. En fonction de la maturité phénolique, l'extraction des polyphénols n'en sera que plus simple en revanche si celle-ci n'est pas qualitative, le vinificateur peut utiliser différents moyens pour améliorer celle-ci. Il peut soit jouer sur les intrants qu'il peut rajouter à la vendange tels que le sulfitage, l'apport d'oxygène ou même le traitement aux enzymes extractives de la couleur ou alors jouer sur des différentes techniques aux chais. L'extraction débutant très tôt, lors de la vinification le sulfitage, le pourcentage d'éthanol ainsi que la température et l'homogénéisation du moût peuvent être des paramètres importants à prendre en compte. Le SO_2 favoriserait la dissolution des composés phénoliques dans les vins rouges. Les traitements pré-fermentaires à chaud ou à froid [88] favoriseraient l'apport d'anthocyane, donc de couleur et l'augmentation de la concentration en tanins condensés [89].

Le temps de contact et la température sont des facteurs très importants pour l'extraction de composés phénoliques et également pour la couleur des vins rouges, mais également blancs. Une étude basée sur le temps de contact des pellicules dans la vinification en blanc en contrôlant la température a montré qu'à une faible température et un temps de contact long (12, 18 ou 24 h) la couleur était correcte [90]. La température utilisée durant la macération pour la vinification des vins rouges a également été testée à différents temps de ce processus montrant ainsi que le chauffage en

fin de macération dégrade les proanthocyanidines. Pour une vinification en rouge, après une macération pelliculaire de 4 heures, les procyanidines dimères et trimères, qui sont de l'ordre de quelques $mg.L^{-1}$ sont multiplié par trois [91] alors qu'en prolongeant la macération jusqu'à 20 h, le résultat est le même. La macération carbonique sur grappe entière avec atmosphère de gaz carbonique, permet de décupler les procyanidines dimères [92]. La cryomacération et à l'inverse la thermovinification seraient également des bonnes techniques pour réaliser une extraction plus poussée [90-93]. Le remontage, le délestage, l'aspersion et le piégeage durant la vinification entraînent eux aussi l'extraction des tanins (en particulier pour les tanins de pellicule). En effet, ces méthodes, utilisées en chai, permettent de re-mélanger les parties solides dans le jus favorisant ainsi l'extraction en profondeur des polyphénols de la baie de raisin [94]. Dernièrement, de nouvelles techniques d'extraction développées permettent également d'extraire un maximum de proanthocyanidines telles que la méthode du champ électrique pulsé. Celle-ci favoriserait une extraction des proanthocyanidines [95].

IV. Étude des propriétés organoleptiques des proanthocyanidines

Les études sensorielles sont des analyses importantes à l'instar des résultats analytiques, ces études doivent être correctement réalisées et donc suivre des règles très précises et par la suite un traitement statistique très rigoureux. Ces études sont très utilisées en œnologie afin de déterminer l'apport olfactif et gustatif des molécules à la matrice complexe qu'est le vin. Nous nous intéresserons à la partie gustative des vins. Il existe actuellement 5 saveurs élémentaires : l'acide, l'amer, le salé, le sucré et l'umami. La langue possède des récepteurs pour chacune de ces saveurs. L'astringence, n'étant pas une saveur, mais une sensation tactile, joue un rôle important dans les propriétés organoleptiques des vins rouges.

A. Amertume

L'amertume est l'une des perceptions gustatives importantes dans les vins et notamment dans les vins rouges. Cette sensation gustative est par ailleurs provoquée par de nombreuses molécules présentes dans le vin (acides aminés, peptides, composés terpéniques, polyphénols…) [96]. Parmi ces molécules, les flavanols et leurs produits de condensation [97] apportent de l'amertume au vin bien que certains flavonols [98] et certains acides peuvent également y contribuer [99]. Parmi les polyphénols, les tanins de faibles poids moléculaires seraient plus amers que ceux plus polymérisés [77,100–102]. Ce résultat explique l'amélioration de la qualité sensorielle des baies de raisin durant la maturation [11].

La perception des saveurs se réalise au travers de cellules sensorielles, groupées dans de petits organes appelés « bourgeons du goût » composés eux-mêmes d'une centaine de cellules. Parmi ces cellules se trouvent les cellules gustatives qui possèdent à leurs extrémités les détecteurs gustatifs qui sont activés au sein de papilles gustatives. À la suite d'une cascade enzymatique, la libération d'un neuromédiateur sera, par la suite, à l'origine d'un signal nerveux [103,104].

La carte des saveurs de la langue est une fausse idée initiée par Deiter Hanig en 1901 [105], car il avait observé des différences de sensibilité dans certaines régions de la langue et une mauvaise interprétation, quelques années plus tard, a propagé cette information [106]. C'est en 1974 à la suite d'une remise en cause scientifique qu'il a été montré que la carte des saveurs était fausse et que les récepteurs de toutes les saveurs étaient présents sur toute la surface de la langue, bien que des différences de sensibilité existent, mais sont faibles, voire à peine perceptibles [107]. Il a été montré que les molécules amères activent 25 récepteurs de type G couplés aux protéines codant pour des gènes TAS2Rs. Pour certains tanins, il a été mis en évidence que les récepteurs des gènes correspondants étaient activés spécifiquement par certaines molécules. L'épicatéchine stimule trois récepteurs (TAS2R4, TAS2R5, TAS2R39) tandis que la pentagalloylglucose active deux récepteurs (TAS2R5 et TAS2R39). Certains polyphénols n'activent qu'un seul récepteur, c'est le cas de la malvidine-3-*O*-glucoside qui active le récepteur TAS2R7 et de la porcyanidine trimère C2 (cat-cat-cat) activant le récepteur TAS2R5 [108].

Dans les vins, l'éthanol et le pH jouent également un rôle majeur dans la perception de l'amertume et en particulier pour l'éthanol entre 11 % et 15 %. En effet, bien que la concentration et la composition en tanins soient en grande partie responsables du goût amer, d'autres facteurs physico-chimiques externes ou d'autres composés peuvent influencer cette perception comme la structure spatiale des protéines ou encore la solubilité des tanins [109]. Récemment, de nouveaux travaux démontrent que les anthocyanes auraient également un impact sur l'amertume dans les vins [26].

B. Astringence

L'astringence a souvent été confondue avec un goût, mais elle est en réalité une sensation tactile. Elle est définie comme l'ensemble des sensations de rétrécissement, de dessèchement, de rugosité des tissus buccaux et d'étirement dans les joues [110]. L'astringence est une sensation très importante dans l'équilibre et l'harmonie gustative des vins rouges. Emile Peynaud [1] a d'ailleurs indiqué que « l'harmonie, l'équilibre et l'élégance de l'astringence sont le signe des grands vins rouges ». En effet, un excès ou un manque d'astringence a un impact sur l'équilibre du vin le rendant trop dur, âpre et sec, dans un cas, ou trop plat, fade et sans intérêt, dans l'autre cas. Elle est ressentie dans l'ensemble

de la cavité buccale et non dans une partie spécifique. Différents types de composés vont contribuer à la sensation d'astringence, les tanins sont les premières molécules auxquelles nous pensons quand on parle d'astringence. Les sels de cations métalliques multivalents (en particulier les sels aluminium, zinc…), les acides organiques, les minéraux ainsi que les agents déshydratants tels que l'éthanol font également partie des composés induisant de la sensation complexe d'astringence [111,112]. Les acides phénols, les flavonols et le ratio *trans/cis* des acides aconitiques semblent apporter également leur contribution à cette sensation [113].

Comme mentionner plus tôt dans cette partie, l'astringence n'est pas un goût, de nombreuses preuves psychophysiques le démontrent à ce jour. L'astringence se ressent dans la totalité de la cavité buccale jusqu'en dessous des lèvres intérieures de la bouche [114]. À la différence de chaque goût qui s'atténue suite à des ingestions répétées [115], la sensation d'astringence, quant à elle, persiste [116]. Les autres goûts ont la capacité de suppression mutuelle que ne possède pas l'astringence [117]. Une relation de linéarité entre l'intensité de la perception d'astringence et la concentration en tanins monomères et polymères existe contrairement aux autres goûts [102].

De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes d'action de cette sensation complexe qu'est l'astringence. Pour cela, différents phénomènes sont impliqués dans cette sensation. Des interactions entre les tanins et les protéines buccales (glycoprotéines des cellules épithéliales de la muqueuse buccale ou les protéines salivaires) conduisent à la formation de complexe tanins-protéines solubles qui en grossissant forme des agrégats tanins-protéines insolubles engendrant ainsi la granularité buccale. Des liaisons hydrophobiques et hydrogènes sont impliqués dans la formation de ces complexes [118,119]. Ces complexes peuvent alors interagir directement avec le film salivaire présent dans toute la surface buccale [107] ou ces complexes peuvent également se lier directement aux protéines de l'épithélium conduisant à la diminution de la lubrification de la cavité buccale [120]. Les agrégats de tanins-protéines peuvent alors se lier directement aux tissus buccaux grâce, probablement, à des récepteurs [121,122]. La perturbation et diminution de cette couche lubrifiante provoquant ainsi des frottements dans la cavité buccale. Par la suite, une précipitation des protéines salivaires entraînera cette diminution de la lubrification, cette augmentation de friction et donc cette sécheresse généralisée dans la cavité buccale. D'autres récepteurs semblent être liés à l'astringence comme les nocicepteurs ou également les mécanorécepteurs [123]. De plus, il est probable que les tanins libres soient impliqués dans cette sensation d'astringence [124]. Quoiqu'il en soit, l'élément clé de ce mécanisme est majoritairement l'interaction tanins-protéines.

En dégustation, le descripteur « qualité des tanins » englobe la perception de cette sensation d'astringence maximale, la durée totale, le temps pour arriver à l'intensité maximale [125] ainsi que,

par extension, les sensations de sécheresse et de rugosité [110]. La perception d'astringence est impactée par différents facteurs qui peuvent provenir du milieu dans lequel elle évolue ou de la chimie des molécules. En effet, la structure des tanins [124-126], le degré de polymérisation [127], le pourcentage de galloylation [128], le pourcentage de prodelphinidine [129], ainsi que la concentration en tanins [130] ont un impact déterminant sur les complexes tanins-protéines. Les facteurs du milieu ont également un impact sur la perception d'astringence. D'après Fontoin [109], plus le pourcentage d'éthanol et le pH sont élevés en solution modèle de vin, plus la sensation d'astringence diminuerait pour les tanins oligomères dérivant des pépins de raisins. Ce phénomène serait dû à une augmentation de la viscosité de la salive limitant alors la perception d'assèchement de la cavité buccale. L'éthanol étant un récepteur de liaisons hydrogène, certains pensent que ce phénomène dépend de l'éthanol [102] et de la concentration en celui-ci [100]. Un autre facteur qui peut affecter cette sensation tactile est le pH quand celui-ci est bas les propriétés rhéologiques de la salive sont altérées, causant alors une baisse de lubrification de la salive augmentant alors l'astringence [131] (**Figure 13**). Un autre facteur qui peut influencer cette sensation, mais également tous les autres goûts et sens est l'individu qui par sa singularité aura un débit, un pH et une composition de la salive différente et donc aura une perception de l'astringence unique [132].

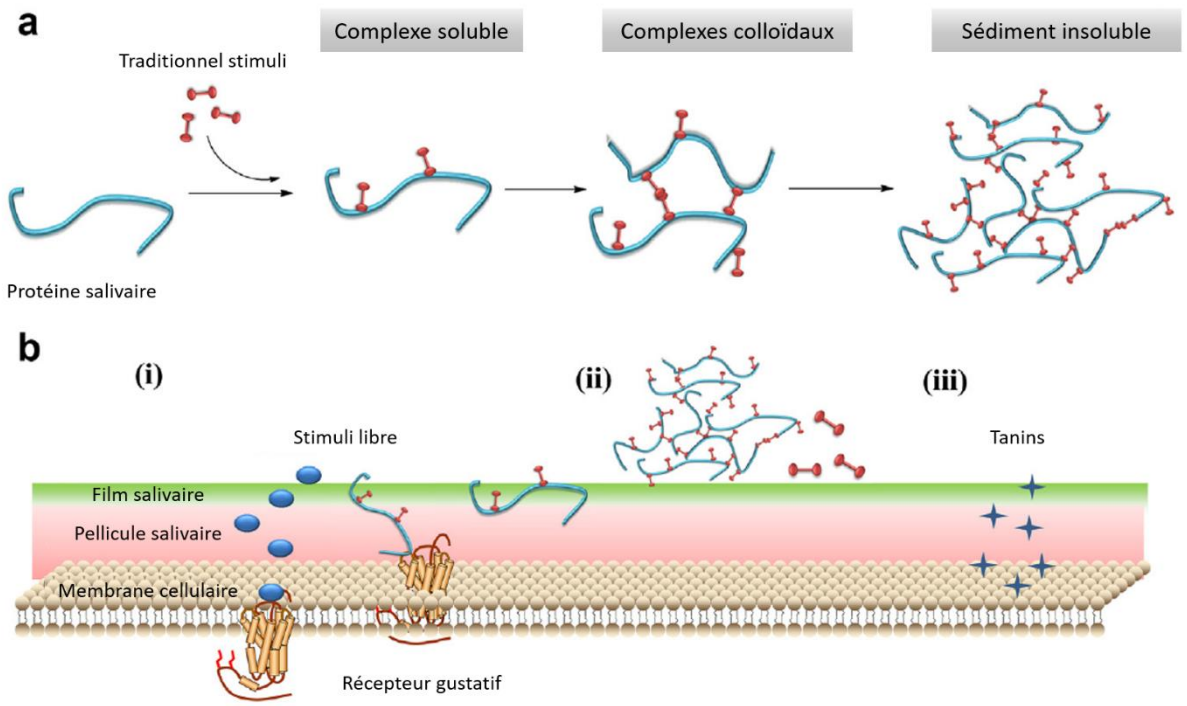


Figure 13 : Représentation schématique du possible mécanisme d'astringence. (a) Trois stades de l'interaction entre le stimuli et une protéine (b) Simulation de l'astringence [124]

V. L'évolution des tanins durant la vinification et le vieillissement

Au cours de l'élevage et du vieillissement des vins rouges, le vin évolue de manière enzymatique et chimique. Sur le plan chimique, des réactions d'oxydation ainsi que des réactions de couplage des tanins entre eux ou avec d'autres composés du vin, notamment les anthocyanes, se développent formant ainsi de nouvelles liaisons interflavanes et de nouvelles structures.

A. La copigmentation

La copigmentaion est un phénomène de complexation entre différentes formes d'anthocyanes (cation flavylium A^+ et/ou base quinonique AO), nommée copigmentation intramoléculaire ou avec d'autres composés phénoliques souvent incolores, nommée copigmentation intermoléculaire [133]. Les liaisons formées sont des liaisons non covalentes de type interactions de Van der Waals et hydrophobes. Ces liaisons de faibles énergies permettent la formation de *stacking* π-π conduisant à l'effet hyperchrome (une intensification de l'absorption) et l'effet bathochrome (déplacement de la longueur d'onde d'absorbance maximale vers les longueurs d'onde plus élevées) [134]. Ce phénomène déplace l'équilibre des anthocyanes vers les formes flavyliums A^+ et quinoniques AO, empêchant la formation de base carbinol AOH incolore.

La copigmentation dépend d'un grand nombre de facteurs. La nature, la concentration en anthocyanes ainsi que les configurations et structures des copigments influencent le phénomène de copigmentation. Les facteurs du milieu tels que le pH, la température ou la force ionique peuvent également avoir un impact sur le mécanisme de copigmentation. De nombreux composés peuvent devenir des copigments tels que les acides phénols [135], les flavonols [136] ou même les pyrimidines [137]. Ainsi, l'épicatéchine est décrite comme l'une des molécules les plus efficaces pour induire des mécanismes de copigmentation surtout en présence d'un groupement gallique [42,137]. Les anthocyanes peuvent également être des copigments par auto-association. La copigmentation est plus importante dans les vins jeunes voire dans les moûts [138]. En effet, la présence d'alcool n'est pas favorable à ce phénomène. Jusqu'à aujourd'hui, cette réaction n'était pas prise en compte dans les mesures de la couleur et dans l'analyse des pigments.

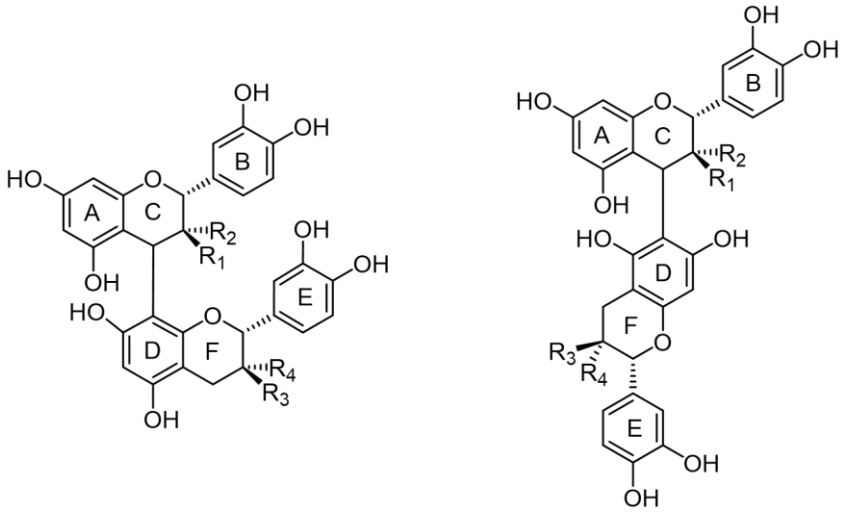
B. La polymérisation des composés phénoliques

a. Condensations directes des liaisons de type B

1. Liaisons interflavanes de type B avec les tanins condensés

Des réactions de réarrangement entre proanthocyanidines se produisent au cours de l'élevage et du vieillissement du vin. Ces changements proviennent des réactions de polymérisation/dépolymérisation des tanins condensés créant alors une diminution des monomères présents dans le vin et entraînant également des modifications des propriétés organoleptiques du vin [14]. Ces condensations possèdent différents types de mécanismes en fonction des conditions du milieu conduisant ainsi à la formation de différents types de liaisons.

Les premières liaisons interflavanes des tanins sont les liaisons carbone-carbones de type B identifiées en 1965 dans les noix de kola et le noyau d'avocat [139,140]. Ces liaisons interflavanes peuvent se former de deux façons toujours avec le carbone C4 du cycle C de l'unité supérieure et le carbone C8 ou C6 du cycle A de l'unité inférieure (**Figure 14**).



Dimères	Type de liaisons		R_1	R_2	R_3	R_4
B1	Liaison de type C4-C8	EC-4β→8-C	H	OH	OH	H
B2		EC-4β→8-EC	H	OH	H	OH
B3		C-4α→8-C	OH	H	H	OH
B4		C-4α→8-EC	OH	H	H	OH
B5	Liaison de type C4-C6	EC-4β→6-EC	H	OH	H	OH
B6		C-4α→6-C	OH	H	OH	H
B7		EC-4β→6-C	H	OH	OH	H
B8		C-4α→6-EC	OH	H	H	OH

EC : épicatéchine
C : catéchine

Figure 14 : Les liaisons interflavanes de type B des tanins condensés (C4-C8 et C4-C6)

De nombreuses études se sont intéressées à la biosynthèse des proanthocyanidines [141]. La conversion de la leucoanthocyanidine en 2,3-*trans*-flavanol [catéchine] par l'enzyme leucoanthocyanidine réductase (LAR) [142,143] et la réduction de l'anthocyanidine en épicatéchine par l'enzyme anthocyanidine résuctase (ANR) [144] a été confirmée. Jusqu'à ce jour, le processus biochimique de polymérisation des flavanols n'a pas été éclairci [145,146] bien que des hypothèses aussi bien chimiques que biochimiques tentent de l'éclaircir chacune à leur manière. Biochimiquement, des études récentes tentent de montrer que la polymérisation des tanins serait un mécanisme biochimique grâce à l'étude des gènes [147]. Une autre étude considère la formation d'un intermédiaire quinonique par l'oxydation de flavanol en *o*-quinone ou d'anthocyanidine en quinone methide par un polyphénol oxydase (PPO) [145]. Ces dérivés d'oxydation peuvent alors se réarranger en créant un carbocation en position C4 [148]. Ce carbocation intermédiaire peut alors supposément s'échapper du site actif de la réductase et subir l'attaque nucléophile des flavanols déjà créés, par les carbones C8 ou C6, afin de donner des procyanidines dimères [149]. Cette même réaction peut se

répéter avec des dimères possédant également un carbocation en position 4 pouvant former alors des oligomères et des polymères de tanins non cycliques [143].

Chimiquement parlant, il a été montré que dans les conditions du vin (pH 3,2 - 4,5) la polymérisation et dépolymérisation réversible de proanthocyanidines était possible. En milieu acide en absence d'oxygène, il peut y avoir rupture d'une liaison interflavane de type B qui va conduire à la formation de carbocations en position 4 du cycle C de l'unité supérieure. Celui-ci, étant très électrophile, va subir l'attaque nucléophile des carbones C8 ou C6 d'une autre molécule de proanthocyanidine pour conduire à la création d'une nouvelle liaison de type B sans intermédiaire entre les deux unités. Cette polymérisation est nommée polymérisation ordonnée conduisant à des liaisons de type B de type C4-C8 ou C4-C6. En fonction du nombre d'unités perdues et du nombre d'unités qui vont s'additionner durant l'attaque nucléophile, il va y avoir augmentation ou diminution du degré de polymérisation (**Figure 15**).

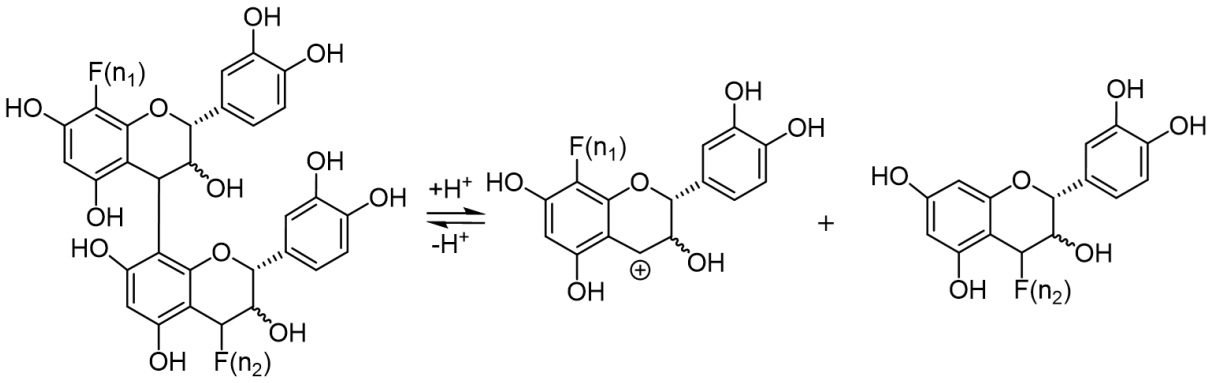


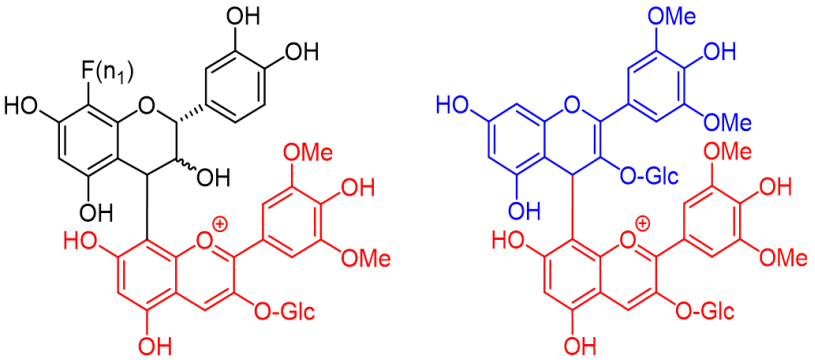
Figure 15 : Dépolymérisation chimique des tanins condensés

En parallèle, en milieu fortement oxydant, un second mécanisme d'évolution peut se développer impliquant la formation de radicaux libres qui vont conduire à la formation d'un intermédiaire quinonique au niveau du cycle B de l'unité flavanol, qui peuvent ensuite se polymériser entre eux pour conduire à la formation de liaison carbone-carbone entre les cycles B de deux molécules de tanin. Cette polymérisation est appelée polymérisation oxydative désordonnée (par rapport à une polymérisation ordonnée conduisant à la formation de liaison de type B) [150]. La polymérisation des proanthocyanidines n'est pas sans fin. En effet, plus les polymères s'agrandissent moins ils deviennent solubles et à partir d'un poids moléculaire de 7000 Da correspondant à 20 unités de flavanols dans la chaîne polymérique, les polymères précipitent [151].

2. Liaisons interflavanes de type B avec les anthocyanes

Les tanins et les anthocyanes provenant de la baie de raisin sont extraits pendant la vinification. Ils évoluent ensemble durant l'élevage des vins et durant le vieillissement en bouteille. Durant ce

processus, la disparition des anthocyanes libres a été observée avec en parallèle un maintien voire une augmentation de l'intensité colorante. En effet, des réactions de condensation des anthocyanes avec les tanins se réalisent par différents mécanismes, avec présence ou non d'oxygène, créant alors des composés différents ayant une couleur variant de l'orange au mauve. Parmi ces condensations, comme pour les tanins, des réactions directes entre les deux familles de molécules se créent formant des pigments anthocyanes — tanins [A^+-T] ou tanins - anthocyanes [T-A^+] (**Figure 16**).



Tanins-Anthocyanes (T-A^+) **Anthocyanes-Anthocyanes(A-A^+)**

Figure 16 : Structures des pigments polymérisés de type T-A^+et A-A^+

Pour la condensation anthocyanes – tanins, les anthocyanes se trouvent sous la forme de cation flavylium A^+, leur carbone C4 possédant un fort pouvoir électrophile. Ce même carbone peut alors subir une attaque nucléophile des centres C8 ou C6 d'une unité flavanol. Un flavène incolore [A-T] [152] va alors être créé, celui-ci pouvant par la suite s'oxyder conduisant à la formation des pigments polymérisés de type [A^+-T], qui par des réarrangements oxydatifs conduisent à la formation de xanthyliums [153,154] ou à la formation de polymères incolores ayant une liaison de type A [A-F (type A)] [155]. La présence d'un milieu oxydant ou la présence d'oxygènes est essentielle pour la recoloration des flavènes. Durant la vinification, les séances de remontages et d'écoulages permettent cet apport d'oxygène et ainsi la formation de ces pigments polymérisés.

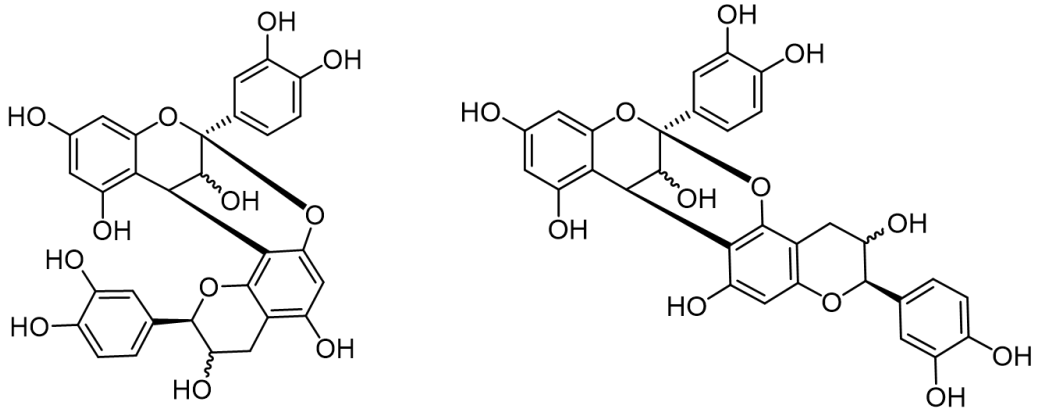
Pour la condensation tanins – anthocyanes, la protonation d'une chaîne de tanins va conduire au clivage d'une liaison interflavane et à la formation d'un carbocation sur le carbone 4 comme décrit **Figure 15**. Ce carbocation ainsi formé réagit réagissent avec les anthocyanes sous forme carbinol neutre et incolore par attaque nucléophile de leur carbone C6 et C8. Cette réaction conduit à la formation d'un pigment polymérisé de type [T-A^+] [152,156,157]. Les nombreuses études réalisées sur ces pigments ont montré que quand l'anthocyane se retrouve en bout de chaîne, la polymérisation est stoppée.

Des condensations anthocyanes-anthocyanes [A-A$^+$] existent également (**Figure 16**). Le mécanisme réactionnel est le même que pour les condensations tanins-anthocyanes [A$^+$-T] mis à part le fait que dans ce cas-là, c'est une anthocyane sous sa forme carbinol qui va réaliser l'attaque nucléophile sur une anthocyane sous sa forme A$^+$. Les premiers dimères [A-A$^+$] identifiés ont été caractérisés dans les pellicules des raisins [158]. Quelques années plus tard, c'est le trimère [A-A-A$^+$] de couleur rouge-violet qui a été identifié dans les vins rouges de Porto [159].

b. Condensations directes des liaisons de type A

1. Condensations directes des liaisons de type A des tanins condensés

Les liaisons de type A sont une combinaison de liaisons de type B C4-C8 ou C4-C6 avec une liaison éther supplémentaire entre le carbone C2 du cycle C de l'unité supérieure et l'oxygène porté par le carbone C5 ou C7 du cycle A de l'unité inférieure (**Figure 17**). Les premières molécules ayant une liaison de type A ont été identifiées à partir des baies de canneberges en 1965 [140] et par la suite dans le marronnier [160] et le kola [161].



Liaison de type A (C_4-C_8 ; C_2-*O*-C_7) Liaison de type A (C_4-C_8 ; C_2-*O*-C_5)

Figure 17 : Structures principales des liaisons de type A (C4-C8 ; C2-O-C7 ou C2-O-C5)

La transformation des liaisons de type A en liaisons de type B par oxydation et l'étude du mécanisme réactionnel ont fait l'objet de différentes études. L'une des premières publications à traiter de ce sujet est celle de Kondo *et al*. 2000 [15] qui a permis d'élucider le mécanisme réactionnel. La conversion d'une liaison de type B en liaison de type A se fait à l'aide d'un intermédiaire quinonique en utilisant une réaction d'oxydation radicalaire qui peut par exemple être réalisée avec du DPPH (1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) en milieu neutre. Cette réaction commence par une double oxydation avec une déprotonation de l'hydrogène en C2 du cycle C de l'unité supérieure et une déprotonation de l'hydroxyle supérieure du cycle B de l'unité supérieure. L'unité flavanol supérieure va alors subir un

réarrangement afin de créer une quinone. La liaison de type A se formera alors entre le carbone C2 de l'unité supérieure et l'hydroxyle C5 ou C7 de l'unité inférieure.

Quelques années plus tard, Osman *et al*. [162] ont montré que cette transformation se faisait naturellement dans les plantes, celles-ci créant elles-mêmes un oxydant enzymatique. Le mécanisme réactionnel est le même que celui démontré par Kondo *et al*. [15] en passant par un intermédiaire quinonique. Une laccase avait alors été utilisée comme oxydant naturel. Plus récemment, Chen *et al.* [163] ont étudié la conversion de procyanidines trimères de type B en procyanidines trimères de type A. Pour cela, ils ont testé différents types d'oxydants : deux oxydants chimiques (DPPH° et O2°-) et deux oxydases (PPO: Polyphénol Oxydase et XO : Xanthine Oxydase), pour pouvoir ainsi comparer les oxydants chimiques et enzymatiques. Il est notamment apparu que le DPPH était le meilleur oxydant pour convertir les liaisons de type B en liaison de type A. Dans cette même étude, ils ont également étudié l'influence de différentes conditions du milieu réactionnel : le pH et la température, ces deux facteurs influençant directement le rendement de la réaction. Au niveau de leur propriété biologique, les tanins présentant une liaison de type A possèdent des capacités antioxydantes plus élevées dans les tissus ou les systèmes lipidiques que les tanins possédant une liaison de type B alors que cela est l'opposé en milieu aqueux [164]. Il a également été montré récemment que les liaisons de type A étaient résistantes à la dépolymérisation chimique telle que la phloroglucinolyse [165]. Par ailleurs, les procyanidines trimères liées par une liaison de type A et une liaison de type B sont nommées les procyanidines de type D [14].

2. Condensations directes des liaisons de type A entre un tanin et une anthocyane et vice-versa

Les liaisons interflavanoïdes de type A peuvent également se réaliser entre une unité monomérique d'anthocyane et une unité de flavanol ou de tanin condensé. D'anciennes études montraient l'impossibilité de différencier des adduits A-T (flavène), des adduits T-A (flavène), des adduits A-T (type A) [166]. Or, avec les progrès de la spectrométrie de masse et en utilisant la stratégie de la dépolymérisation chimique [157], les liaisons de type A apparaissent comme étant résistantes à la dépolymérisation à l'inverse des liaisons de type B qui se dépolymérisent en condition acide [167].

3. Condensations directes des liaisons de type A entre deux anthocyanes

Les liaisons interflavanoïdes de type A peuvent également se créer entre deux molécules d'anthocyane. En effet, un trimère possédant une liaison de type B et une liaison de type A a été identifié dans le vin rouge [158]. Grâce à la spectrométrie de masse, un trimère d'anthocyane possédant deux liaisons de type A a été détecté dans les pellicules de raisin. Il faudra attendre 2013 pour avoir la confirmation de la structure de ce trimère après purification et analyse en RMN [159]. Cette nouvelle structure trimérique se compose alors de deux unités flavanes reliées entre elles par

une liaison de type A et reliées en suivant à une unité de malvidine-3-*O*-glucoside comme unité terminale. La molécule possède donc deux liaisons de type A toutes d'eux de forme C4-C8 et C7-*O*-C2 (**Figure 18**).

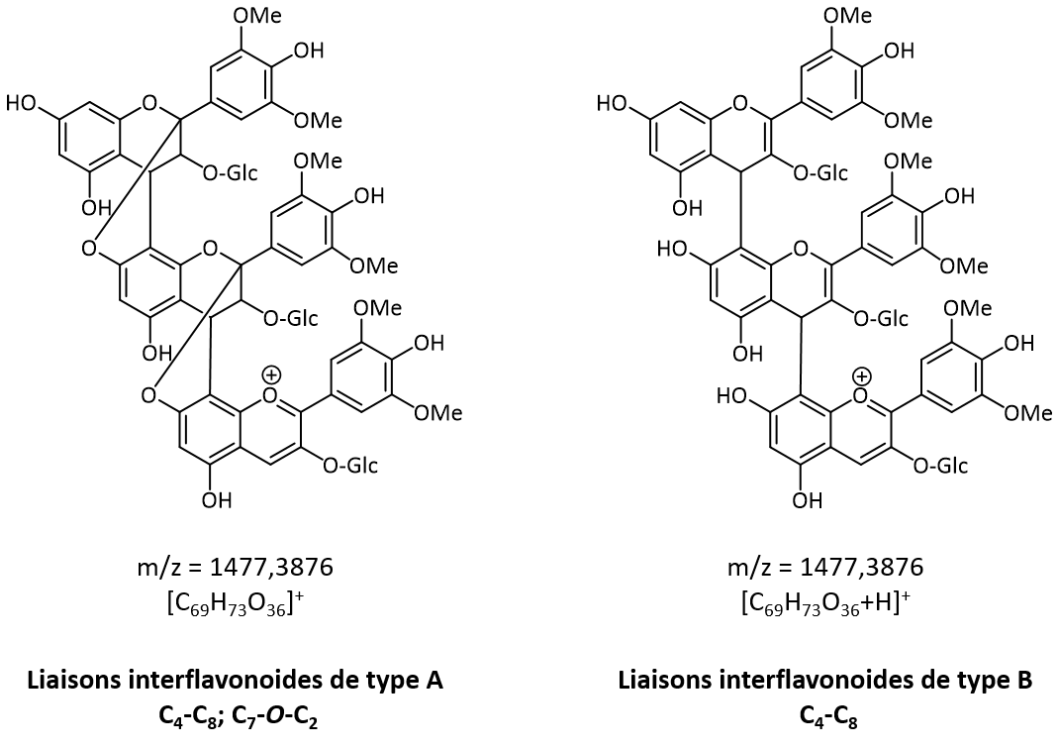


Figure 18 : Les structures de l'anthocyane trimère confirmée par RMN [168]

c. Condensations indirectes par pont éthylidène entre les tanins condensés et/ou les anthocyanes

Durant l'évolution du vin, en plus des nombreuses condensations directes vues précédemment, des condensations indirectes peuvent se produire par l'intermédiaire d'aldéhyde entre des unités de flavanol ou avec des unités d'anthocyanes [169]. Ces condensations s'effectuent par l'intermédiaire de composés naturellement présents dans le vin comme l'acétaldéhyde, l'acide glyoxalique ou encore le furfural et ses dérivés. Parmi tous ces intermédiaires, l'acétaldéhyde est le majoritaire provenant du métabolite des levures et il est généré pendant la fermentation [170,171] ou par l'oxydation de l'éthanol en éthanal [172]. En milieu acide, après protonation, l'acétaldéhyde peut former un carbocation qui subit une attaque nucléophile des carbones C8 ou C6 d'une unité flavanol. Un intermédiaire possédant un alcool benzylique sera alors formé. La déshydratation après protonation de cet alcool, formant alors un cation benzylique, peut subir à nouveau l'attaque nucléophile d'une unité flavanol. Un dimère flavanol-pont éthylidène-flavanol sera alors formé [173,174]. Ce dimère peut subir un réarrangement oxydatif pour former des structures de type xanthylium [175]. Pour l'obtention d'un dimère flavanol-pont éthylidène-anthocyane, le mécanisme réactionnel est le même qu'avec

deux unités flavanols, l'anthocyane étant alors sous sa forme hydratée AOH pour pouvoir réaliser l'attaque nucléophile [176,177]. Les produits de ces condensations ont un fort impact sur le goût, la couleur et la stabilité colloïdale des vins [178,179].

Deux unités anthocyanes peuvent également être liées par un pont éthylidène via un mécanisme réactionnel identique. Atanasova *et al.* [180] ont synthétisé et caractérisé par RMN un dimère malvidine-3-*O*-glucoside-pont éthylidène-malvidine-3-*O*-glucoside tous lié en C4-C8. Trois formes de ce dimère ont été détectées : l'ion bichargé m/z 506,141 9 contenant les deux unités d'anthocyanes en forme flavylium, l'ion monochargé m/z 1011,276 5 contenant une anthocyane sous forme flavylium et une autre sous forme quinonique et l'ion monochargé m/z 1029,287 0 ayant une anthocyane sous forme hydratée et une autre sous forme flavylium. Enfin, un trimère possédant un pont éthylidène et une liaison de type A avec une unité d'anthocyane au milieu a également été détecté [181] (**Figure 19**).

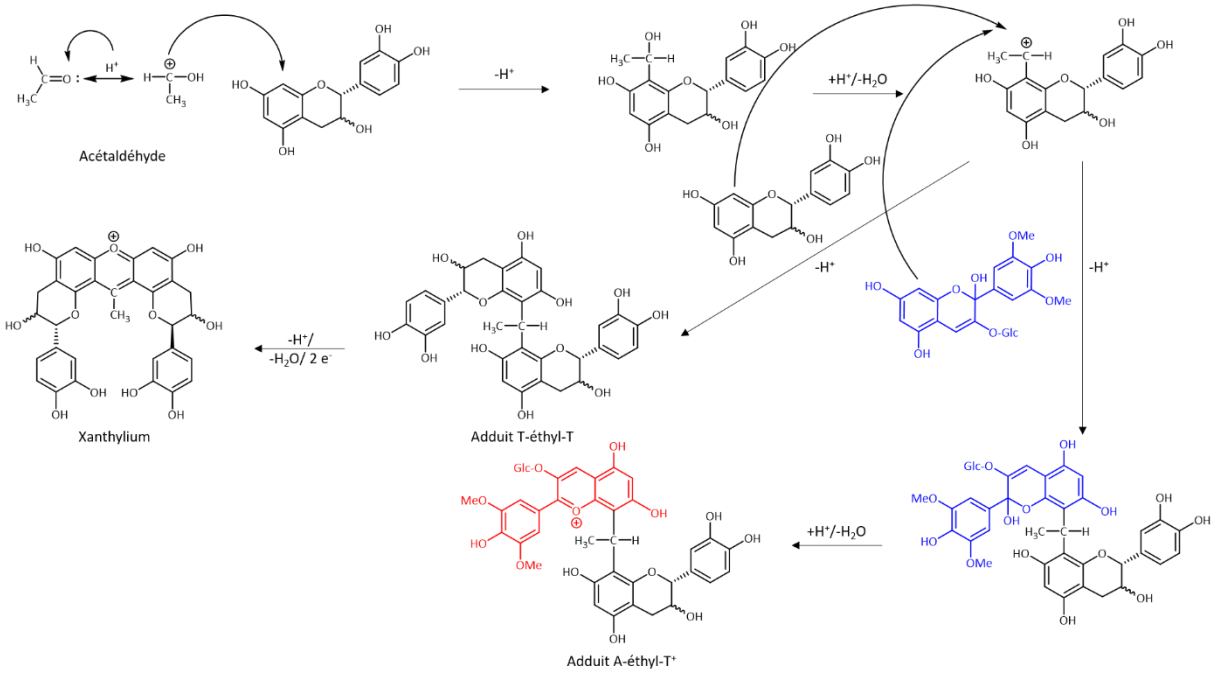


Figure 19 : Schéma condensé des mécanismes de formation des condensations indirectes.

T = Tanins ; A = Anthocyanes ; éthyle = Pont éthylidène

C. La famille des pyranoanthocyanes

La teneur en anthocyane diminue au cours de l'élevage et du vieillissement des vins. Les anthocyanes libres disparaissent peu à peu pour conduire à la formation des pigments polymérisés comme présentés ci-dessous (**Figure 20**), mais une voie d'évolution des anthocyanes libres peut conduire à la formation de pyranoanthocyanes.

Par opposition aux mécanismes de formation des pigments polymérisés impliquant les tanins et les anthocyanes qui sont principalement localisés au niveau des carbones C4 et C8 des anthocyanes, le mécanisme de formation des pyranoanthocyanes est un mécanisme de cyclo-addition faisant intervenir le carbone C4 de l'anthocyane et le groupement hydroxyle en position 5 de l'autre composé. En effet, les anthocyanes, sous la forme de cation flavylium, peuvent subir une attaque nucléophile sur leur carbone C4 par différents composés. Cette substitution nucléophile de type 2 conduira alors à la formation d'un carbocation instable comme état de transition. Ainsi, grâce à un réarrangement et une cyclisation intra-moléculaire, cette réaction permettra la formation d'un nouvel hétérocycle oxygéné, nommé cycle D, entre le groupe hydroxyle du carbone 5 du cycle A et le carbone C4 du cycle C [182].

La forte réactivité des anthocyanes en milieu aqueux conduira alors à un grand nombre de réactions des anthocyanes avec divers composés présents dans le vin rouge afin de former différentes familles de pyranoanthocyanes. Aujourd'hui, un grand nombre de familles de pyranoanthocyanes ont été découvertes et caractérisées.

Les premières familles formées proviennent directement d'une anthocyane de départ. La réaction des anthocyanes avec les métabolites de la levure tels que l'acide pyruvique, l'acétaldéhyde ou encore l'acide acétoacétique forme les pyranoanthocyanes de type vitisines. Après une succession de réactions chimiques (substitution nucléophile, perte d'une molécule d'eau et oxydation), les carboxypyranoanthocyanes ou vitisines de type A [183,184], les vitisines de type B [185] ainsi que les méthylpyranoanthocyanes [186] ont été formés. Les flavanol-pyranoanthocyanes, de couleur orangée, résultent de la cycloaddition entre une anthocyane et d'un 8-vinylflavanol. Ces derniers sont formés par le clivage d'un flavanols lié par un pont éthylidène ou d'un oligomère F-éthyl-F ou F-éthyl-A [182,187]. Enfin, les hydroxyphényl-pyranoanthocyanes, de couleur rouge orangée, proviennent de la réaction entre les acides hydroxycinnamiques ou leur produit de décarboxylation avec les anthocyanes afin de former de nouvelles formes de pyranoanthocyane nommée les pinotines [186-188].

Les familles suivantes présentées ci-dessous proviennent des familles de pyranoanthocyanes précédentes qui ont évoluées. La vitisine A est la principale molécule utilisée pour la formation de nouvelles familles. Les oxovitisines proviennent de la décarboxylation suivie de l'oxydation et enfin de

la déshydratation en position C10 de la vitisine A au départ. Elles présentent une couleur jaunâtre en milieu acide [189]. Les portisines B sont le produit de réaction entre une vitisine A et un vinyphénol [190]. Ceux-ci sont de couleur bleue et ont été découverts dans les vins de Porto. Une identification par RMN a permis d'identifier leurs structures. Toujours dans les vins de Porto, une nouvelle classe de pigments bleu turquoise a été identifiée comme étant le produit d'une vitisine A et d'une méthylpyranoanthocyane liée par pont méthylène, autrement appelé, une pyranoanthocyane dimère [168].

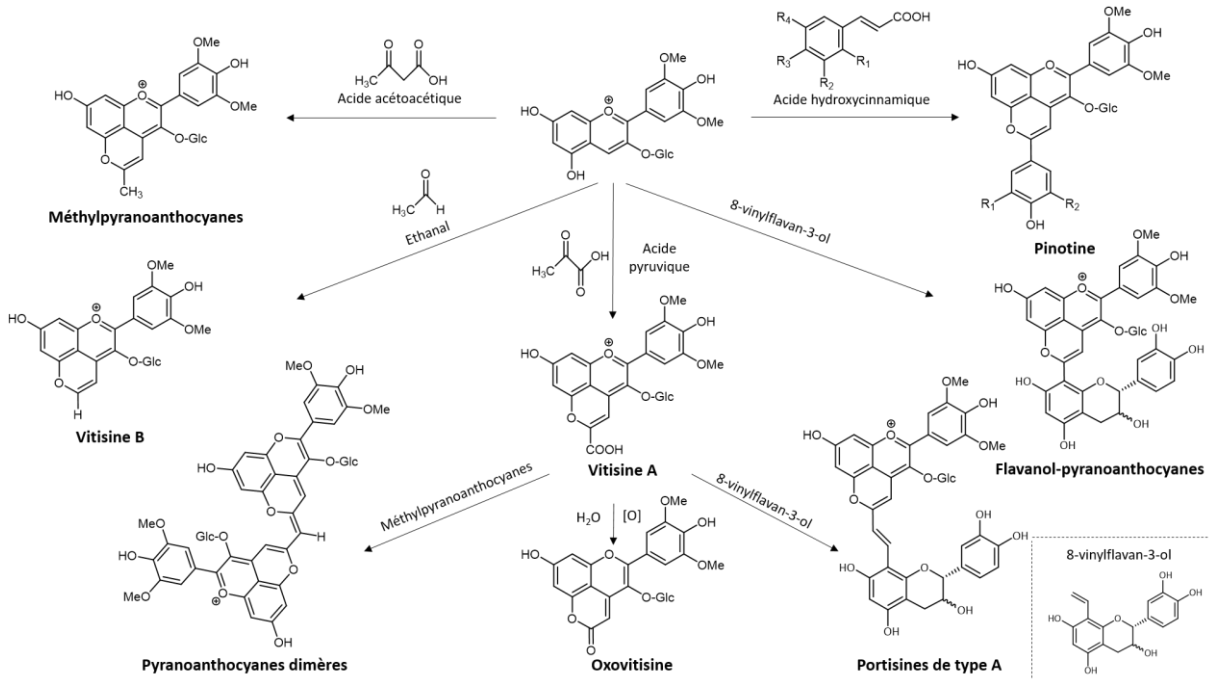


Figure 20 : Schéma des différentes familles et sous-familles de pyranoanthocyanes.

La famille des flavanol-pyranoanthocyanes fut d'abord découverte et identifiée dans des solutions modèles de vin [191]. Plus tard, des études sur le marc de Syrah en Australie ont permis de détecter d'autres molécules dans cette famille allant jusqu'au tétramère [185]. C'est une étude de Mateus *et al.* [190] qui a permis, grâce à la RMN, d'identifier six flavano-pyranoanthocynes isolées dans un vin de Porto [190-192].

Aujourd'hui, de plus en plus de sous-familles de pyranoanthocyane sont mises en lumière, mais également plusieurs structures possédant de nombreuses liaisons sont découvertes, comme par exemple une structure possédant un pont éthylidène et une liaison de type A a été identifiée [181] ou encore une unité de pyranoanthocyanes lié à un dimère de malvidine-3-*O*-glucoside [193] (**Figure 21**). Pendant l'élevage des vins rouges, il a notamment été montré que l'acidité et l'oxygène favorise la formation de ces pigments [194].

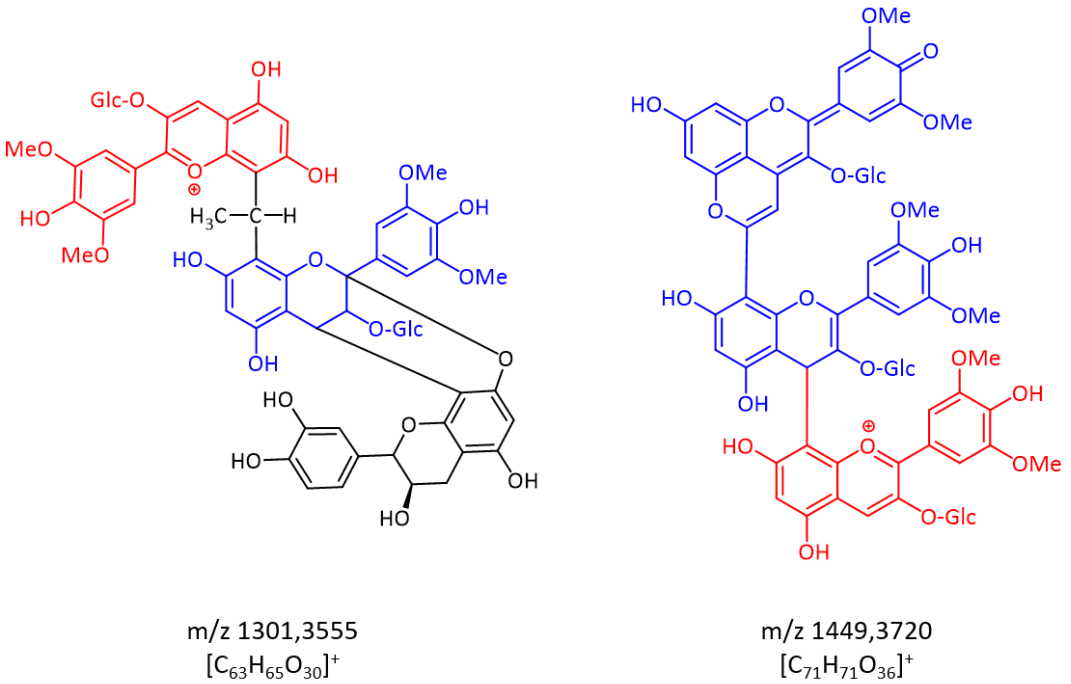


Figure 21 : Nouvelles structures de pigments polymérisés possédant plusieurs liaisons différentes

D. Évolution des flavanoïdes dans le vin rouge

a. Évolution structurale des anthocyanes et des pigments polymérisés dans le vin rouge

Au cours du vieillissement des vins rouges, une évolution de la couleur du vin est observée. Celle-ci évoluant d'un rouge-mauve en un rouge tuilé dû à la formation des composés présentés ci-dessus. En plus de l'évolution de la teinte, une diminution de l'intensité colorante est également observée. Cette diminution en fonction des conditions de vinification et d'élevage est liée à la formation des pigments polymérisés, mais également à la dégradation des anthocyanes.

Dans un premier temps, il a été montré en solution modèle, que les anthocyanes sont sensibles à la lumière, aux températures élevées ainsi qu'à la présence d'oxygène provoquant par la suite leurs dégradations au cours du temps. En effet, la température et en particulier la température de stockage est l'un des principaux facteurs responsables de la dégradation des anthocyanes [195–197]. Cette dégradation débute en premier lieu par la rupture de la chaîne *O*-glucosidique pour conduire à la formation d'anthocyanidine dont la forme chalcone va par la suite se décomposer afin de former des acides benzoïques après réarrangement en milieu acide. Les acides formés dépendent de la nature des anthocyanes de base, par exemple, la malvidine-3-*O*-glucoside formera l'acide syringique [198]. Cette transformation peut également se former à la suite de réaction d'oxydation [199].

Comme mentionné précédemment les anthocyanes étant des molécules très réactives dans les conditions du vin, elles se transforment progressivement en pigments polymérisés, structures plus stables, car plus résistantes à l'acidité [200]. La formation de ces pigments polymérisés va conduire à une modification des propriétés physicochimiques par rapport à l'anthocyane dont ils dérivent et donc à une évolution de la couleur et plus précisément une modification de leurs maximums d'absorption dans le visible. Il existe quatre effets différents qui peuvent modifier l'absorption spectrale :

- Bathochrome : Augmentation de la longueur d'onde maximale.
- Hypsochrome : Diminution de la longueur d'onde maximale.
- Hyperchrome : Augmentation de l'intensité d'absorption.
- Hypochrome : Diminution de l'intensité d'absorption.

Les pigments polymérisés, en fonction de leurs structures, ont un impact conséquent sur ces propriétés spectrales. Toutes les familles et sous-familles de pigments polymérisés vont avoir un effet différent sur l'évolution de la couleur du vin. Les produits de condensation directe et indirecte entre les anthocyanes et les tanins entraînent un effet bathochrome, apportant une teinte bleutée violette au vin. À l'inverse, les pyranoanthocyanes et leurs dérivés conduisent à une diminution de la longueur d'onde et donc un effet hypsochrome par rapport aux anthocyanes dont elles dérivent, ce qui apporte aux vins une couleur tuilée orange. Il a été montré que la deuxième génération des pyranoanthocyanes, les portisines notamment contribuent à la couleur bleue des vins (effets bathochrome). Enfin, les composés d'évolution des pigments polymérisés tels que les xanthyliums ont un apport orangé aux vins durant son vieillissement.

La découverte de nouvelles structures ainsi que le mécanisme de formation des pigments polymérisés ont fait l'objet de nombreuses études. Il est apparu que les pigments polymérisés commencent leur formation en début de vinification, dès la fermentation alcoolique. Les métabolites des levures jouent un rôle essentiel dans les réactions de condensation indirecte tanins-anthocyanes [201]. Cependant, leurs concentrations maximales apparaissent durant les premiers mois d'élevage en barrique avant de diminuer par la suite pour conduire à des composés d'oxydation. De leur côté, les produits de condensation directs tanins-anthocyanes seraient à leurs concentrations maximales pendant l'élevage en fût de chêne jusqu'à 14 mois avant de diminuer également [18].

Ces dernières années, les avancés en termes de nouvelles méthodes de purification, de nouvelles méthodes analytiques (UPLC-MS haute résolution) ainsi que par des stratégies de synthèse ou d'hémisynthèse ont conduit à enrichir la bibliothèque moléculaire du vin malgré le poids moléculaire élevé. En effet, au vu du nombre de liaisons possibles, ainsi que de la grande diversité de molécules

impliquées et des concentrations faibles présentent dans le vin, la cinétique de formation des pigments polymérisés est, à ce jour, encore mal connue.

b. Évolution structurale des tanins condensés dans les vins rouges

L'évolution des tanins au cours du vieillissement du vin est un sujet très étudié. Pour cela, l'une des techniques utilisées est la dépolymérisation chimique en milieu acide, souvent réalisée en présence de phloroglucinol (phloroglucinolyse). Cette technique de dépolymérisation en milieu acide est utilisée à la base pour évaluer le degré de polymérisation moyen (DPm) des tanins condensés [68,202,203]. C'est une approche basée sur la rupture des liaisons interflavanes des tanins en milieu acide, à chaud et en présence d'un agent nucléophile : le phloroglucinol. Elle permet alors de dépolymériser les tanins et de séparer les unités terminales libérées, sous forme d'unité flavanol, des unités d'extensions libérées, sous la forme d'une unité flavanol substituée par l'agent nucléophile en position C4. Si nous prenons l'exemple des procyanidines, les unités terminales libérées sont la catéchine, l'épicatéchine et l'épicatéchine-3-*O*-gallate. Les unités d'extensions reliées en position C4 au phloroglucinol donneront alors l'adduit catéchine-phloroglucinol, l'adduit épicatéchine-phloroglucinol et l'adduit épicatéchine galloylé phloroglucinol. Cette technique a également été utilisée pour réaliser la quantification de nombreux pigments polymérisés notamment ceux présentant une liaison de type A entre les anthocyanes et les tanins, la liaison de type A n'étant pas dépolymérisée dans les conditions de phloroglucinolyse [204]. Ce qui a permis d'identifier des marqueurs spécifiques à chaque famille de composé et ainsi de pouvoir réaliser leur quantification ainsi qu'étudier les cinétiques de formation et d'évolution [20].

Durant le vieillissement des vins, le DPm calculé par cette stratégie diminue, cependant cette observation ne montre pas forcément une diminution de la longueur des chaînes polymériques, mais plutôt une diminution de la quantité de liaisons de type B dans les tanins condensés présents dans le vin. En effet, la concentration en tanins dans le vin reste stable bien qu'en parallèle une diminution des tanins ayant des liaisons de type B est observée. La formation de nouvelles structures tanniques possédant soit des liaisons indirectes avec des ponts éthylidènes soit des liaisons oxydatives entre le cycle B ou avec d'autres molécules vont également être formé durant le vieillissement du vin.

La formation de liaisons intra- et intermoléculaires confère aux tanins non cycliques natifs des formes plus compactes et arrondies [101]. Ces changements de conformations structurelles vont également impacter les propriétés gustatives des tanins en particulier sur la sensation d'astringence. En effet, les dégustateurs décrivent une diminution d'astringence entre les vins jeunes et les vins vieux, mais aucune corrélation entre la baisse de l'astringence et la concentration en tanins solubles n'existe [205,206]. Cette baisse serait donc due aux nouvelles structures tanniques apparaissant durant le

vieillissement et à la variation de taille des tanins devant plus volumineux. Ces changements d'état rendraient moins accessibles les sites nécessaires à l'interaction tanins-protéines salivaire, et donc influenceraient l'astringence perçue.

VI. Les tanins couronnes

A. Mise en lumière et caractérisation des procyanidines couronnes

L'étude des procyanidines couronnes a débuté avec la thèse de Liming Zeng [20] à l'ISVV qui a détecté, analysé et purifié l'une de ces molécules. Au cours de l'analyse des tanins condensés de plusieurs vins rouges en UPLC-UV-ESI-QTOF, il a été observé que plusieurs composés avaient des propriétés physico-chimiques inattendues. Ces composés présentaient un temps de rétention faible et donc une polarité importante par rapport à des procyanidines de même taille, ainsi qu'une résistance partielle à la dépolymérisation chimique en milieu acide. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution, suivie d'une étude de fragmentation indiquait que ces composés étaient des oligomères de tanins condensés possédant une liaison covalente supplémentaire, soit carbone-carbone ou carbone-oxygène, et que la molécule ne possédait que des liaisons interflavanes de type B. Une purification multi-étape (C18, TSK et HPLC semi-préparative) de ces composés a donc été engagée afin de pouvoir obtenir ces molécules pures. La caractérisation structurale du tétramère en RMN 1D (^{1}H et ^{13}C) et 2D (HSQC, HMBC, ROESY) a révélé une structure macrocyclique et totalement symétrique possédant quatre unités monomériques reliées entre elles uniquement par des liaisons de type B (**Figure 22**) [19].

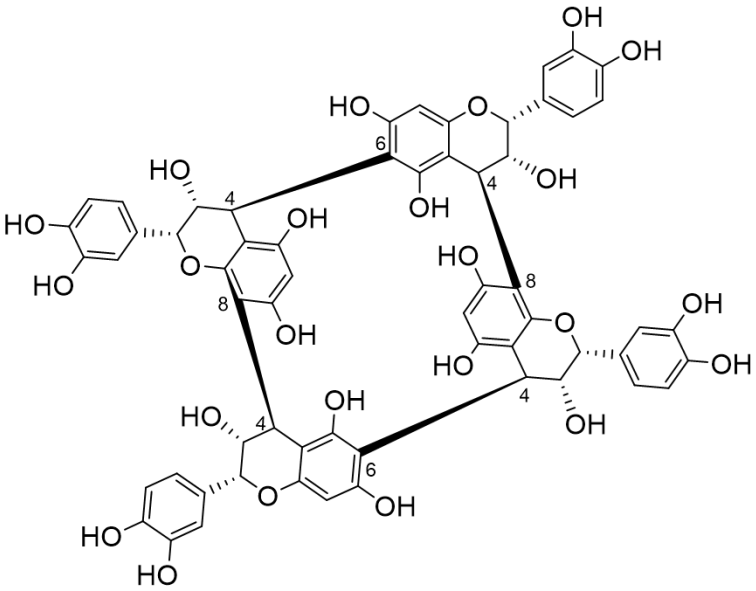


Figure 22 : Structure du tétramère couronne (Zeng et al. [19])

En effet, cette molécule est composée de quatre unités de base d'épicatéchine reliées par un enchaînement de liaisons Unité 1 — (4β→6) — Unité 2 — (4β→8) — Unité 3 — (4β→6) — Unité 4 — (4β→8) — Unité 1, conférant alors la symétrie à la molécule. À la suite de cette identification, une modélisation moléculaire a été réalisée mettant en évidence la présence d'une cavité importante (environ 5 Å) au centre de la molécule (**Figure 23**).

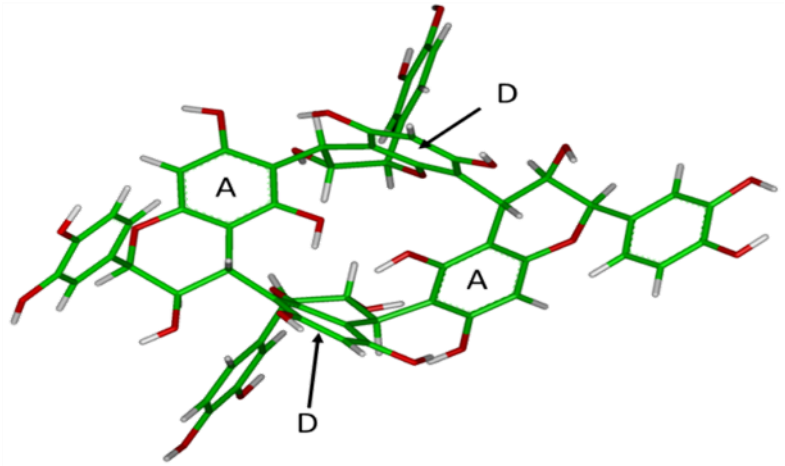


Figure 23 : Structure 3 D du tétramère couronne

Ce nouveau composé fait partie d'une nouvelle sous-famille de tanins condensés qui fut nommée les procyanidines couronnes (**Tableau 5**). À ce jour, seulement le tétramère a été caractérisé par RMN et totalement identifié. Cependant, d'autres composés ayant des propriétés chromatographiques et des profils de fragmentation proches ont été détectés en spectrométrie de masse. La présence dans les vins de pentamères et de pentamères galloylés a été proposée sur la base de la fragmentation et de la masse à haute résolution [20].

Tableau 5 : Les oligomères de la famille des tanins couronnes observés dans le vin rouge

Composé	Formule	m/z calculé ($[M+H]^+$)	m/z mesuré ($[M+H]^+$)	Diff (ppm)
Tétramère	$C_{60}H_{48}O_{24}$	1153,2608	1153,2601	-0,61
Pentamère 1	$C_{75}H_{60}O_{30}$	1441,3242	1441,3231	-0,76
Pentamère 2	$C_{75}H_{60}O_{30}$	1441,3242	1441,3214	-1,94
Pentamère 3	$C_{75}H_{58}O_{30}$	1439,3086	1439,3056	-2,08
Pentamère (1G) 1	$C_{75}H_{60}O_{31}$	1457,3191	1457,3163	-1,92
Pentamère (1G) 2	$C_{75}H_{60}O_{31}$	1457,3191	1457,3158	-2,26
Pentamère (1G) 3	$C_{75}H_{60}O_{31}$	1457,3191	1457,3140	-3,50
Pentamère (1G) 4	$C_{75}H_{60}O_{31}$	1457,3191	1457,3165	-1,78
Pentamère (1G) 5	$C_{75}H_{58}O_{31}$	1455,3035	1455,3017	-1,24

Suite à son étude structurale, il a également été montré que le tétramère couronne possède également des propriétés biologiques et notamment neuroprotectrices. Les activités antivieillissements possibles du tétramère couronne ont été évaluées en mesurant sa capacité à protéger les cellules PC12 (dérivées du phéochromocytome neural de rat) d'une toxicité induite par le peptide β-amyloïde [207]. En effet, l'agrégation du peptide β-amyloïde (βA) est considérée comme un évènement critique dans le développement de la maladie d'Alzheimer puisque son agrégation va conduire à la formation d'une plaque sénile et à la mort neuronale. Durant cette étude, il est apparu que le tétramère couronne pouvait protéger de manière significative les cellules PC12 de l'effet cytotoxique du peptide β-amyloïde (**Figure 24**). Après l'exposition au peptide β-amyloïde seule, la viabilité des cellules PC12 a été réduite à 42 ± 2 % alors qu'en présence du tétramère couronne cette viabilité augmente de manière dose-dépendante. En effet, l'ajout de 30 µM du tétramère couronne au milieu réactionnel a augmenté la viabilité des cellules PC12 de +36 % (**Figure 24**). En comparaison dans des conditions identiques, le resvératrol à 25 µM n'induit que 30 % d'augmentation [208] et qu'il faut 50 µM de cyanidine-3-*O*-glucoside pour augmenter la viabilité des cellules PC12 de seulement 10 % [209].

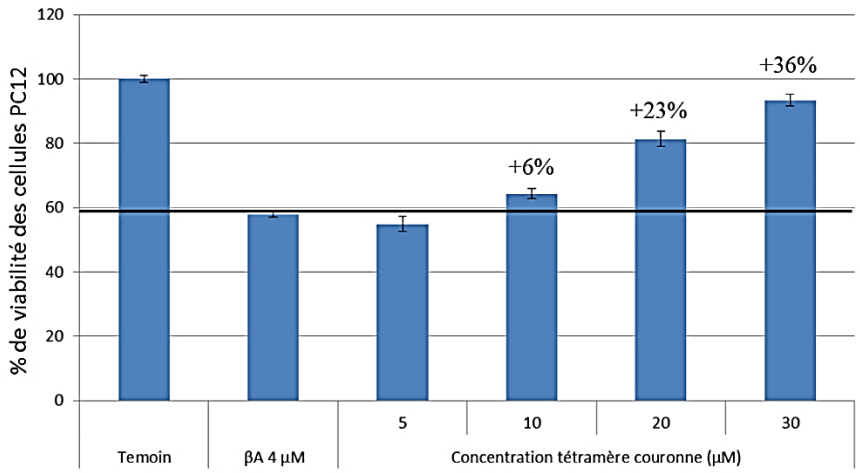


Figure 24 : Pourcentage de cellules PC12 vivantes après traitement

B. Premières études des tanins couronnes dans les vins rouges

Une étude comparative sur l'évolution de différentes familles chimiques de tanins condensés (tanins couronnes et tanins non cycliques) au cours du vieillissement du vin rouge en bouteille a été réalisée. Les échantillons utilisés étaient une série de seize vins du même domaine du Languedoc Montpeyroux âgés de 3 à 23 ans. Parmi les familles chimiques analysées, le tétramère et les pentamères couronnes ont été mesurés et par la suite, la comparaison des tanins condensés couronnes et des tanins condensés non cycliques correspondants a été réalisée. Les résultats ont montré que le tétramère couronne sont stables dans le temps contrairement au tétramère non cyclique de type B qui diminuent fortement durant le vieillissement. De plus, la richesse polyphénolique totale du vin (IPT) a été mesurée pour chaque millésime. Il apparaît que cette valeur est corrélée à la concentration en tanins couronnes bien qu'il semblerait surtout que cette corrélation est due à l'effet millésime et non à l'impact du vieillissement. Des tendances identiques ont été observées pour les pentamères couronnes. La seule différence notable est que la concentration en tétramère est supérieure à celle en pentamère.

Enfin, une analyse sensorielle de cette série du Languedoc Montpeyroux a été mise en place. Différents paramètres gustatifs ont été étudiés tels que l'intensité d'astringence, la qualité tannique, l'amertume, l'acidité et l'équilibre en bouche. Des tests statistiques ont montré une tendance entre la concentration en tétramère couronne et l'intensité d'astringence. Ces derniers résultats sont bien entendu à confirmer avec d'autres analyses sensorielles afin de pouvoir réellement conclure sur une corrélation entre les deux paramètres et non-juste une tendance.

VII. La chimie de synthèse des procyanidines dans la littérature

Depuis la découverte des procyanidines, de nombreuses équipes ont essayé de reproduire ces molécules en laboratoire par le biais d'hémisynthèse [66] ou de la synthèse organiques multi-étapes [210]. Les premières synthèses ont été obtenues par condensation de deux unités flavanols non protégée [211]. Cette méthode, malheureusement, ne permet aucun contrôle régiosélectif et stéréosélectif de la réaction. Par la suite, ces deux paramètres ont pu être contrôlés par la protection des fonctions phénols des procyanidines. La formation des procyanidines peut se faire par de nombreuses voies chimiques telles que les couplages organométalliques, les additions et les substitutions nucléophiles. La première voie étant assez contraignante dans la synthèse des tanins, nous n'aborderons que les additions et les substitutions nucléophiles dans la suite de ce paragraphe. La synthèse consiste à réaliser le couplage entre deux unités flavanes entre elles : l'une ayant un caractère électrophile au niveau du carbone benzylique C4 du cycle C et l'autre un caractère nucléophile dû aux sommets C8 et C6 du cycle A. Dans un premier temps, un rappel des propriétés chimiques de ces liaisons interflavanes sera abordé.

A. Propriétés chimiques des liaisons interflavanes

Comme vue précédemment, dans le raisin et dans le vin, il existe différents types de liaisons interflavanes de type B ou de type A. Les condensations de type B résultent de la formation de liaisons interflavanes entre les carbones C4-C6 et/ou C4-C8. Les liaisons C4-C8 sont préférentiellement formées en comparaison aux liaisons C4-C6. En effet, le carbone C8 possède une plus grande électronégativité et également un encombrement stérique plus faible et serait donc plus réactif que le centre C6 [161,212]. C'est pour cette raison que l'on retrouve plus de liaisons C4-C8 dans les procyanidines naturelles.

Les liaisons interflavanes peuvent adopter deux types de stéréochimies différentes :

- Si l'unité inférieure est en dessous du plan de l'hétérocycle C de l'unité supérieure, la stéréochimie de la liaison interflavane est α.
- Si, en revanche, l'unité inférieure est au-dessus du plan de l'hétérocycle C de l'unité supérieure, la stéréochimie de la liaison interflavane est β.

Dans les tanins condensés, la nature du monomère et sa position dans la molécule influencent la stéréochimie de la liaison entre les deux monomères. En effet, lorsqu'une catéchine est l'unité supérieure, la liaison interflavane est de type 4α, 6 ou 4α, 8 (configuration 2R, 3S, 4S). À l'inverse,

quand l'unité supérieure des procyanidines est une épicatéchine, la liaison interflavane est de type 4β, 6 ou 4β, 8 (configuration 2R, 3R, 4R).

De plus, le cycle C pyrane confère aux tanins une certaine flexibilité dans l'espace. Celui-ci peut alors adopter deux conformations différentes : la forme E avec le cycle catéchol B en position équatoriale et la forme A avec le cycle B en position axiale. La conversion entre ces deux conformations se fait rapidement, car la barrière énergétique pour le passage d'une conformation à une autre est faible, de l'ordre de 5-6 kcal.mol^{-1}. Sur les spectres RMN, une valeur moyenne de cet échange apparaît rendant la caractérisation structurale plus difficile [213]. Enfin, après couplage, une barrière énergétique de rotation se forme autour de la liaison interflavane formée due aux interactions stériques entre les substituants (unité supérieure et unité inférieure) empêchant la libre rotation [214,215].

B. Couplages entre des unités non protégées

En 1966, Geissman *et al.* [211] ont réalisé la première synthèse de procyanidines en milieu acide en utilisant une quantité stœchiométrique de flavan-3, 4-diol et de catéchine permettant la formation d'un carbocation en position C4 pouvant alors réagir avec la catéchine. Il faudra attendre quelques années avant que cette synthèse ne soit achevée par une autre équipe en utilisant une stratégie similaire [216]. Cette équipe s'est basée sur la condensation d'un flavan-3, 4-iol obtenu par réduction de la taxifoline et de la catéchine en conditions stœchiométriques pour obtenir des procyanidines dimères (B3 et B6) et des procyanidines de degré d'oligomérisation plus élevées (trimères C2 et un tétramère) (**Figure 25**). Le rendement de cette réaction était faible dû à la non-régiosélectivité de la méthode et au non-contrôle de l'oligomérisation, cette dernière résultant de l'attaque répétée de l'unité nucléophile sur les dimères ou trimères formés précédemment. Cette même réaction a ainsi été testée en utilisant un excès de catéchine (5 équivalents) et ces conditions ont apporté un meilleur rendement et une meilleure régiosélectivité, en revanche, l'oligomérisation n'étant toujours pas contrôlée. Dans ces mêmes années, un couplage en milieu basique a été développé par l'équipe de Hemingway *et al*. [217]. Dans cette stratégie, le couplage a été réalisé entre un dérivé phényl thioéther de l'épicatéchine donnant par la suite un intermédiaire méthylène quinone qui va alors réagir avec une unité de catéchine pour donner principalement les dimères B1 et B7 avec des oligomères.

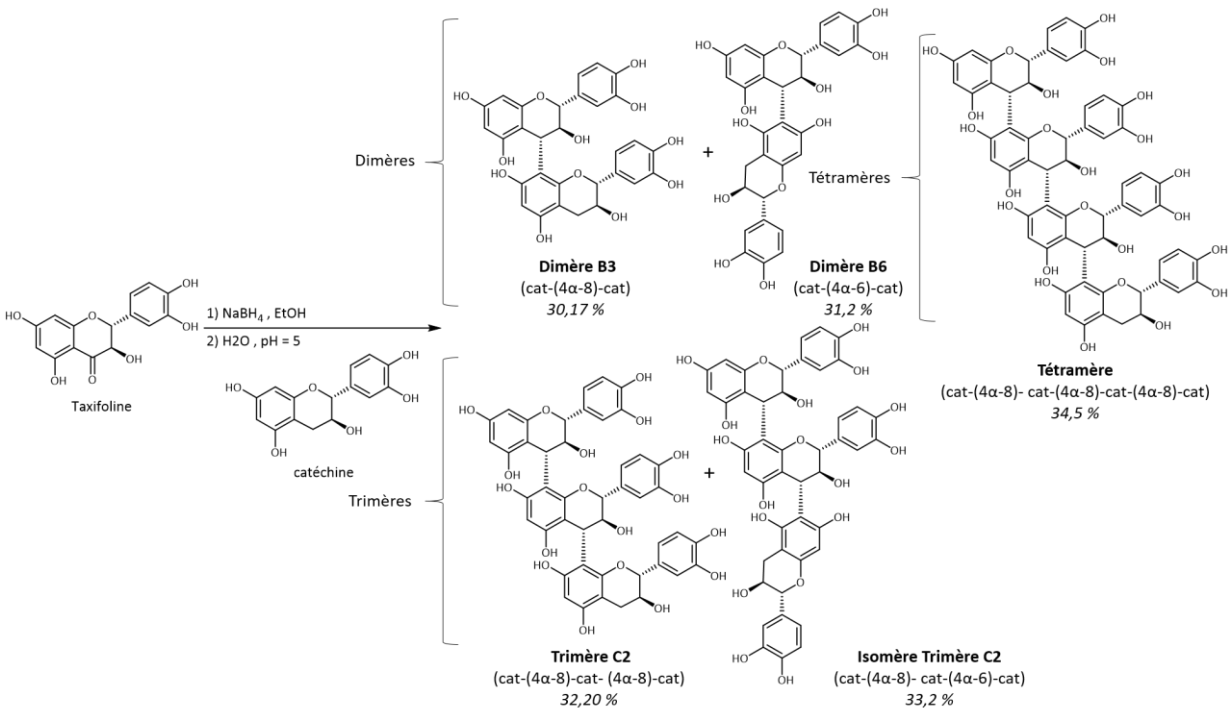


Figure 25 : Premier couplage d'unité non protégé entre la taxifoline et la catéchine en condition acide

Afin de mieux contrôler la régio- et stéréosélectivité et l'oligomérisation des procyanidines, Steynberg et son équipe [218] ont développé une condensation en milieu aprotique en utilisant des acides de Lewis. Pour cela, le couplage s'effectuait entre un dérivé 4-thioéther de l'épicatéchine, obtenu après synthèse et purification de celui-ci, et une unité flavanol. Les acides de Lewis utilisés étaient le diméthyl (méthylthio)-sulfonium tétrafluoroborate (DMSTSF) et le tétrafluoroborate d'argent ($AgBF_4$). Les produits obtenus étaient le dimère B1 et son trimère analogue. Dans ces conditions, aucun autres dimères ou produits de réaction n'ont été détectés contrairement aux produits de réaction obtenus par couplage en milieu acide. Parmi les deux acides de Lewis utilisés, l'$AgBF_4$ a permis d'augmenter le rendement du dimère B1 jusqu'à 38 % en comparaison au DMTSF qui ne conduisait qu'à un rendement de 22 % en dimère B1 (**Figure 26**). Cette nouvelle stratégie de synthèse a permis le contrôle de la stéréochimie du centre asymétrique en position C4 ainsi qu'un contrôle de la régiosélectivité et de l'oligomérisation. Néanmoins, la préparation des produits de départ à partir des produits naturels est une étape longue et onéreuse.

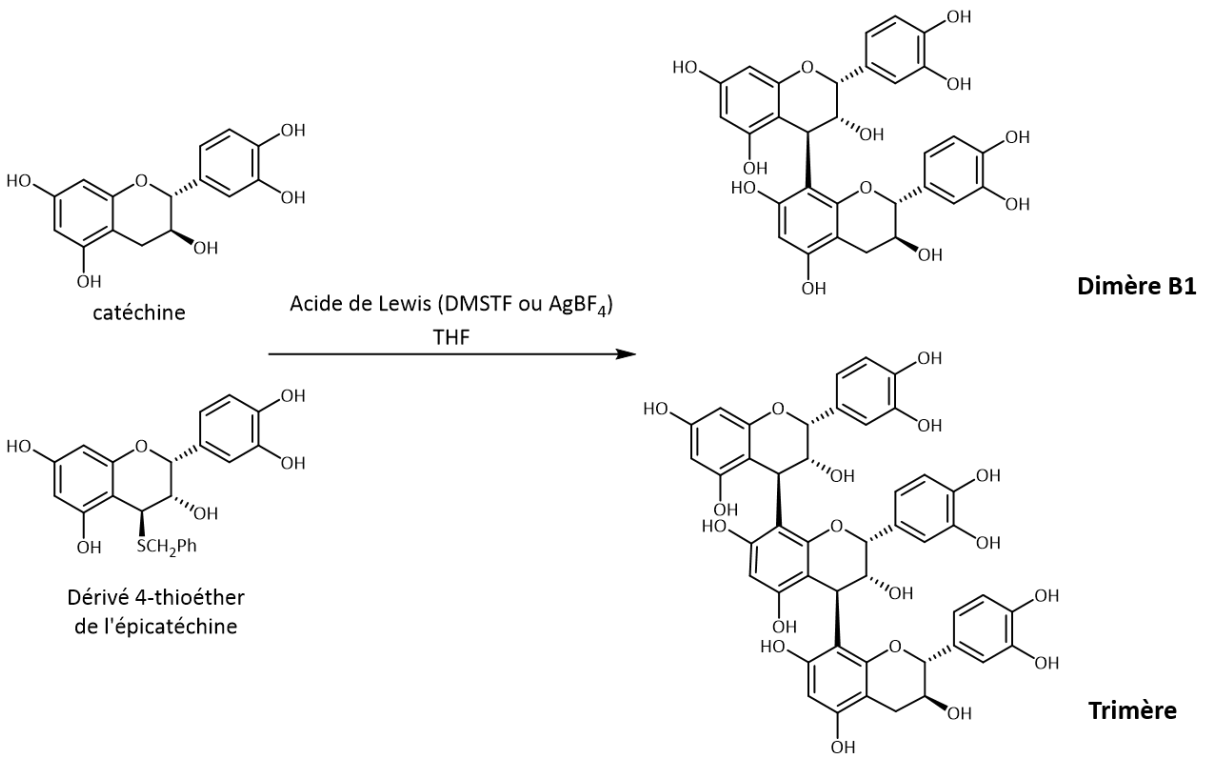


Figure 26 : Couplage d'unité non protégé entre le dérivé 4-thioéther de l'épicatéchine et la catéchine avec un acide de Lewis

Bien d'autres voies de synthèses sans protection ont été publiés jusqu'à maintenant, ces réactions de couplage sont toutefois peu efficaces en raison des faibles rendements, de la régio — et stéréosélectivité peu contrôlée et de l'oligomérisation des procyanidines. Pour remédier à ce problème, des couplages avec des unités protégées ont été développés.

C. Couplages des unités protégées

La stratégie adoptée pour le couplage d'unité protégée consiste à coupler une unité flavane préalablement protégée et activée en position C4 (unité électrophile) avec une autre unité flavane également protégée (unité nucléophile). Le couplage peut se faire alors en présence d'un acide de Lewis ou via des organométalliques. Par la suite, seules les additions et les substitutions nucléophiles en présence d'un acide de Lewis seront abordées. Après le couplage, une déprotection sera alors utilisée pour obtenir les molécules désirées.

a. La protection des phénols

Les monomères catéchines et épicatéchines sont instables en milieu acide et basique créant d'autres produits de dégradation [219,220]. En milieu acide, des réactions de polymérisation peuvent se créer alors qu'en milieu basique, une ouverture du cycle C conduit à la formation d'acide

catéchinique ou à l'énantiomère de l'épicatéchine obtenu après épimérisation de la catéchine en position 2. Il a également été montré que la liaison interflavane de ces monomères est labile en conditions acides et basiques [218]. L'utilisation de groupes protecteurs sur les fonctions phénols apporte certains avantages comme notamment l'amélioration de la régiosélectivité des couplages en position 8. La différence de pKa entre les phénols et les alcools permet une protection facile et prioritaire de ceux-ci sans protéger l'alcool en position C3 du cycle C [221] (**Figure 27**).

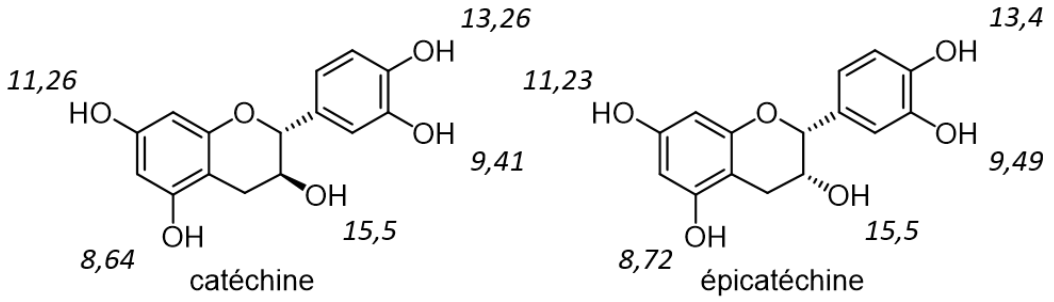


Figure 27 : Différences de pKa entre les phénols et les alcools de la catéchine et de l'épicatéchine

Dans la littérature, de nombreux groupements protecteurs existent pour la protection des fonctions phénols, tous possédants des avantages et des inconvénients. Les différentes familles utilisées sont les groupements benzyles [161], les groupements acétates [222] et les groupements méthyles [223]. Les groupements benzylés sont les plus utilisés en raison de leur stabilité et de leur facilité de déprotection en milieu neutre. Les groupements méthyles sont également utilisés pour leur faible encombrement stérique contrairement aux groupements benzyles, l'inconvénient est la déprotection des fonctions méthyles.

b. Activation du carbone C4 par oxydation

L'activation du carbone C4 permet d'accroître le caractère électrophile de ce carbone et permet aussi le contrôle stéréochimique lors du couplage des unités. Dans la littérature, un grand nombre de groupements et de méthodes d'activation ont été rapportés. Les premiers groupements utilisés pour la fonctionnalisation étaient des hétéroatomes (brome, soufre, oxygène) [66]. Par la suite, d'autres groupements ont été utilisés tels que des groupements alcools. Les réactifs ont également été testés , le meilleur étant le 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone noté DDQ [210,224]. Celui-ci attaque par la face inférieure du cycle aromatique A afin de minimiser les interactions avec le proton axial H2 et d'optimiser l'interaction « donneur-accepteur » des deux cycles aromatiques au sein du complexe à transfert de charge [225] (**Figure 28**).

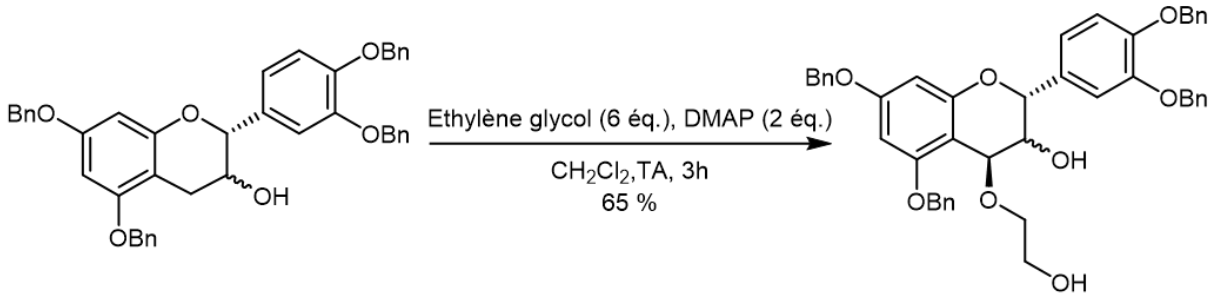


Figure 28 : Activation de la position benzylique 4 en présence d'un alcool avec du DDQ

c. Protection de la position 8

Dans la littérature, un des moyens de contrôler le niveau d'oligomérisation est de mettre en excès l'unité nucléophile lors du couplage. Néanmoins, Tarascou [210,226], durant sa thèse, a montré que le blocage de la position C8 permet de contrôler l'oligomérisation durant réaction de couplage (**Figure 29**). En effet, le blocage de la position 8 permet que les unités électrophiles, après avoir formé un dimère, ne puissent pas réagir de nouveau sur une autre unité électrophile créant ainsi des oligomères d'ordre supérieur. De plus, les différences de réactivité des carbones C6 et C8 permettent des halogénations régiosélectives sur les deux carbones en fonction des halogènes utilisés et de la nature du solvant [222,227] et ainsi d'obtenir des couplages eux aussi régiosélectifs.

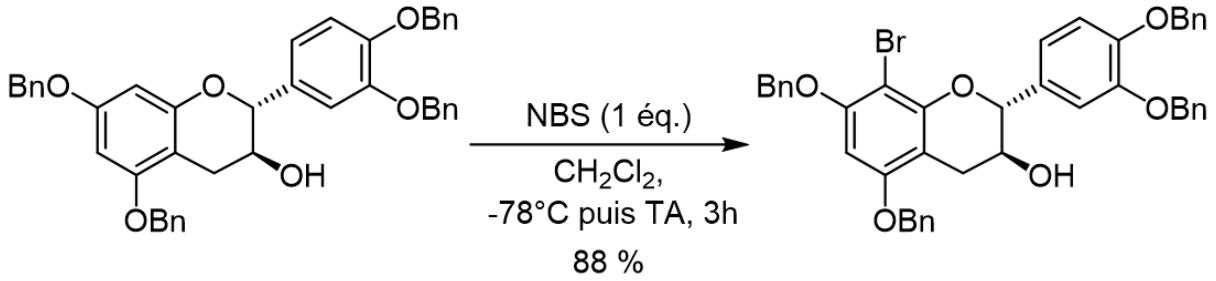


Figure 29 : Bromation de la catéchine tétrabenzylée en position 8

Parmi les groupements permettant la fonctionnalisation des carbones C8 et C6, les halogènes tels que l'iode et le brome sont les plus utilisés. L'iode fut le premier candidat choisi, mais la fragilité de la liaison C-I lors du couplage a écarté ce candidat, le brome étant alors préféré. Cette fonctionnalisation de la position 8 doit par ailleurs être réalisée avant l'activation de la position 4 afin d'augmenter le rendement global des réactions.

d. Couplage par addition nucléophile

La première addition nucléophile couplait une unité nucléophile bromée, obtenue après benzylation de l'hydroxyle en position 3 de la catéchine tétraméthylée et après bromation de la position 8, et une unité électrophile activée en position 4 étant préalablement synthétisée par méthylation des fonctions

phénols de la taxifoline [228]. Un dimère B3 totalement méthylé et acétylé sur les alcools a été obtenu avec un rendement de 20 %. Plus tard, Tückmantel *et al.* [229] a réalisé une addition nucléophile entre un flavan-4-one, obtenue par oxydation de l'épicatéchine pentabenzylée, et d'un organolithien obtenu à partir de l'épicatéchine pentabenzylée et bromée en position 8. Le produit du couplage est un dimère d'épicatéchine perbenzylé hydroxylé en position 4C (**Figure 30**). L'addition nucléophile permet le contrôle de la régiochimie et de l'oligomérisation des molécules bien que la stéréochimie ne soit toujours pas totalement contrôlée. Actuellement, c'est la substitution nucléophile qui est la stratégie la plus utilisée pour réaliser la formation des liaisons interflavanes.

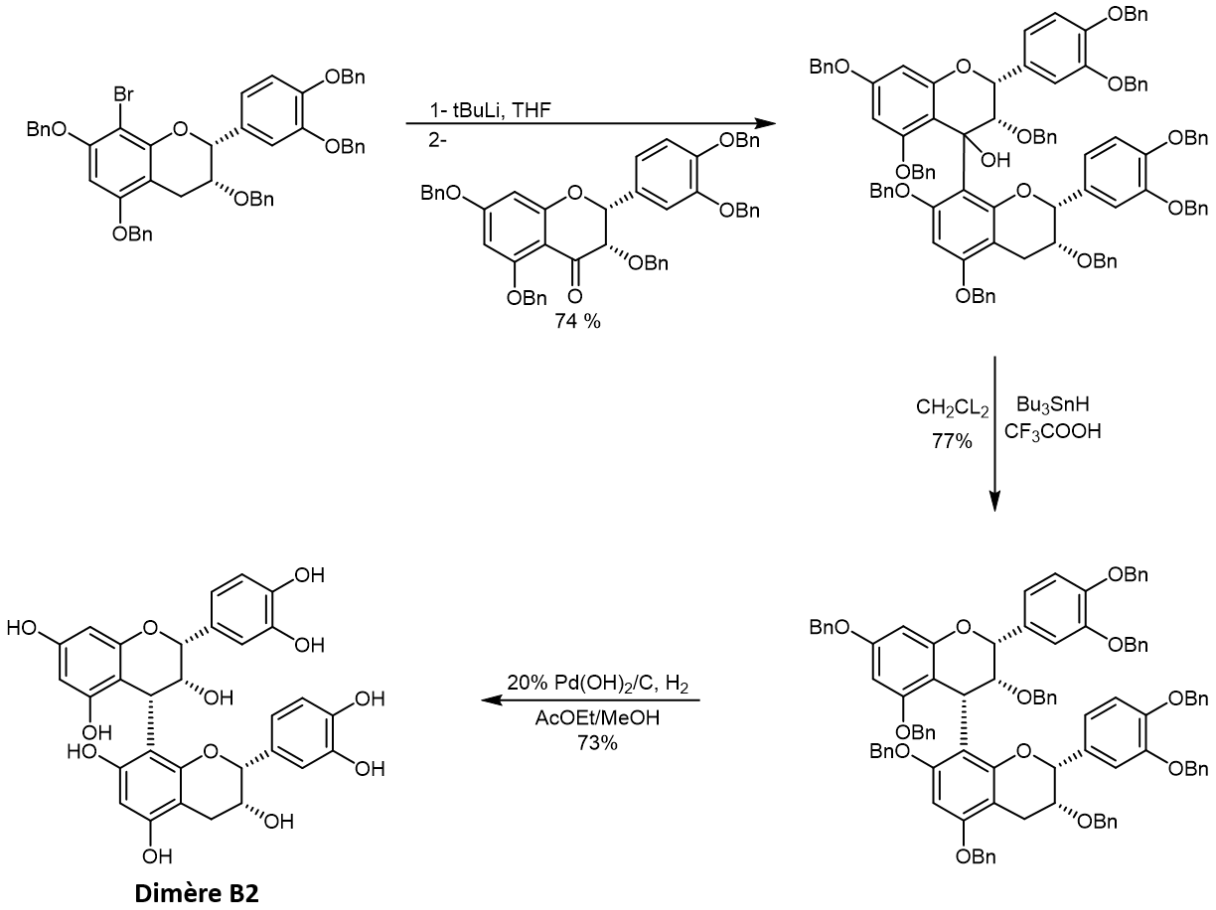


Figure 30 : Synthèse du dimère épi-4a, 8-épi par addition nucléophile

e. Couplage par substitution nucléophile

Plusieurs méthodes de couplage par substitution nucléophile ont été développées. La stratégie adoptée est toujours la même, un couplage entre une unité électrophile protégée activée en position 4 qui réagit avec une unité nucléophile protégée en présence d'un acide de Lewis ($TiCl_4$, BF_3-Et_2O). Les unités de base peuvent être des unités catéchines ou des unités épicatéchines, les premières étant plus réactives que les secondes.

La première méthodologie utilisée a été le couplage entre une catéchine tétrabenzylée activée en position 4 par une fonction hydroxyle avec 5 équivalents de catéchine tétrabenzylée, le couplage étant réalisé en présence de $TiCl_4$ comme acide de Lewis. Cette réaction conduit à un mélange de deux dimères de stéréochimie différente 4α, 8 et 4β, 8. Ce protocole permet un bon contrôle de la régiosélectivité, mais un mauvais contrôle de la stéréochimie [230]. Plus tard, l'équipe de Vercauteren [231] améliorera la stéréosélectivité de cette réaction en remplaçant la 4-hydroxycatéchine tétrabenzylée par la 4-méthoxycatéchine tétrabenzylée et en obtenant spécifiquement le dimère B3.

Il faudra attendre les travaux de Tückmantel *et al*. pour obtenir un bon stéréo contrôle en n'utilisant que des unités d'épicatéchines bien que celui-ci ne soit pas expliqué [232]. Dans son protocole de synthèse, il changea le groupement d'activation en position 4 en remplaçant l'eau ou le méthanol par de l'éthylène glycol. En effet, l'utilisation d'un alcool nucléophile plus polaire a permis de réduire les produits d'oxydation secondaires (**Figure 31**).

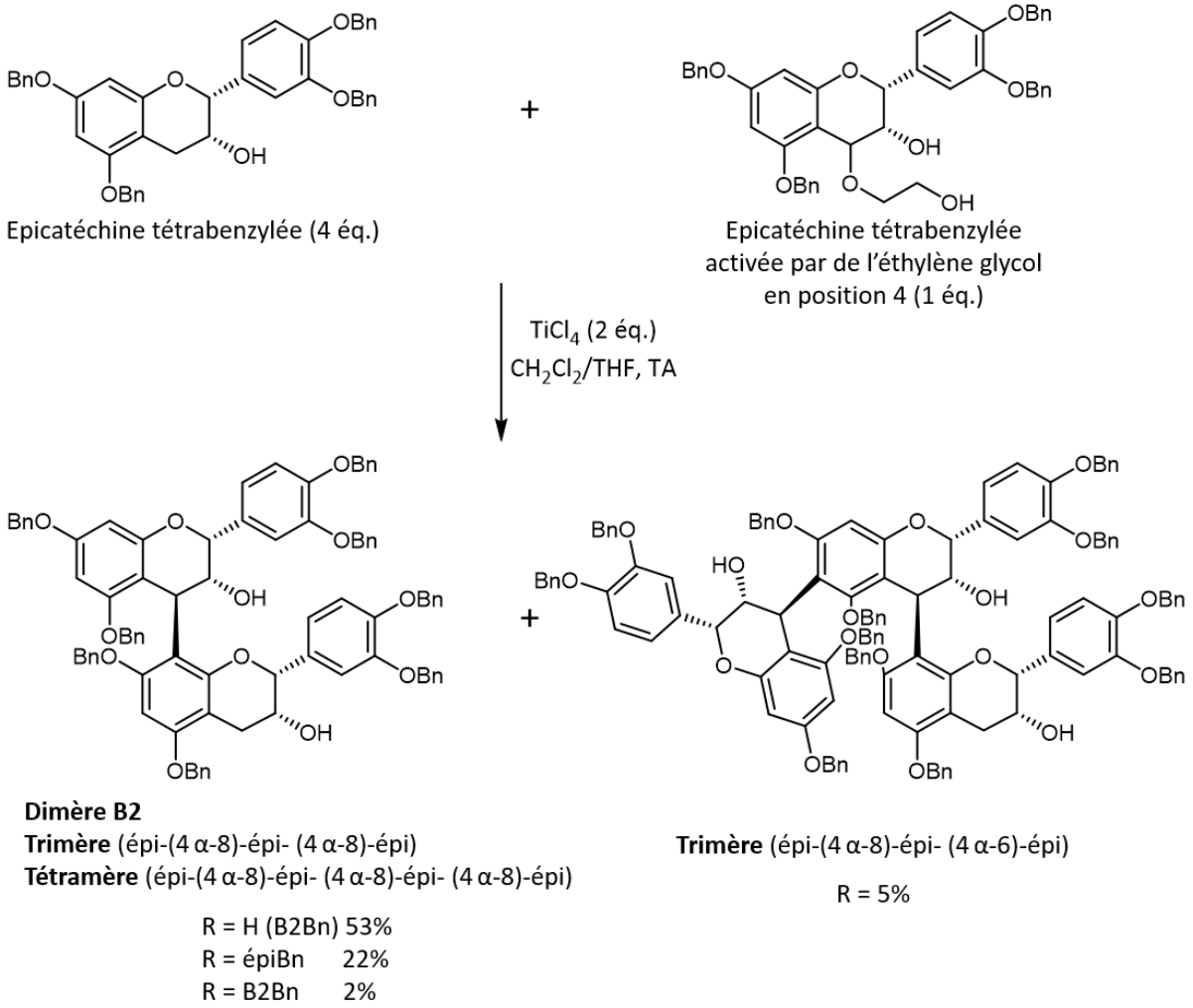


Figure 31 : Couplage d'unité protégée par la méthode de Tückmantel [229]

Plus tard, Saito *et al*. [233] développèrent une nouvelle méthode pour la synthèse des dimères. Pour cela, il changea l'acide de Lewis $TiCl_4$ par le TMSOTf et il changea également l'éthylène glycol, le groupement activateur en position 4, par le 2-éthoxyéthanol permettant d'obtenir un meilleur rendement de 97 %.

Les synthèses de dimères reliés par des liaisons C4-C6 sont plus difficiles à obtenir en raison de la plus faible nucléophilie et de l'encombrement stérique des centres C6 par rapport aux centres C8. Cependant, l'équipe de Suzuki *et al*. [234,235] a montré que cela était malgré tout possible en utilisant des unités de couplage dont les positions C8 étaient bloquées par des groupements halogènes.

À ce jour, aucune équipe n'a réussi à réaliser la synthèse spécifique du dimère B5 composé uniquement d'unité épicatéchine reliée par une liaison C4-C6 en synthèse multi-étape. De Freitas [66], dans sa thèse, a obtenu ce dimère B5 parmi un mélange de nombreux oligomères de procyanidine. En revanche, son isomère le dimère B6 a déjà été synthétisé, par Suzuki et son équipe, par substitution nucléophile entre la catéchine tétrabenzylée, avec l'hydroxyle en position 3 acétylé, et bromée en position 8 ayant été activée par du 2-éthoxyéthanol en position 4 et la catéchine tétrabenzylée, avec l'hydroxyle en position 3 acétylé et protégé en position 8 par un halogène. Dans leur synthèse, différents groupements halogènes protecteurs sur l'unité nucléophile en position 8 ont été testés : un brome, un iode et un chlore. Il a été montré que la réactivité du groupement chloré, dû à sa forte électronégativité et à sa taille plus petite que les autres halogènes, permettait d'obtenir un meilleur rendement (**Figure 32**). Saito et son équipe [236] ont récemment fait la synthèse du même dimère B6 en utilisant une voie de synthèse légèrement différente en réalisant une condensation intramoléculaire en présence d'un acide de Lewis. Le rendement final du dimère B6 synthétisé était de 65 %.

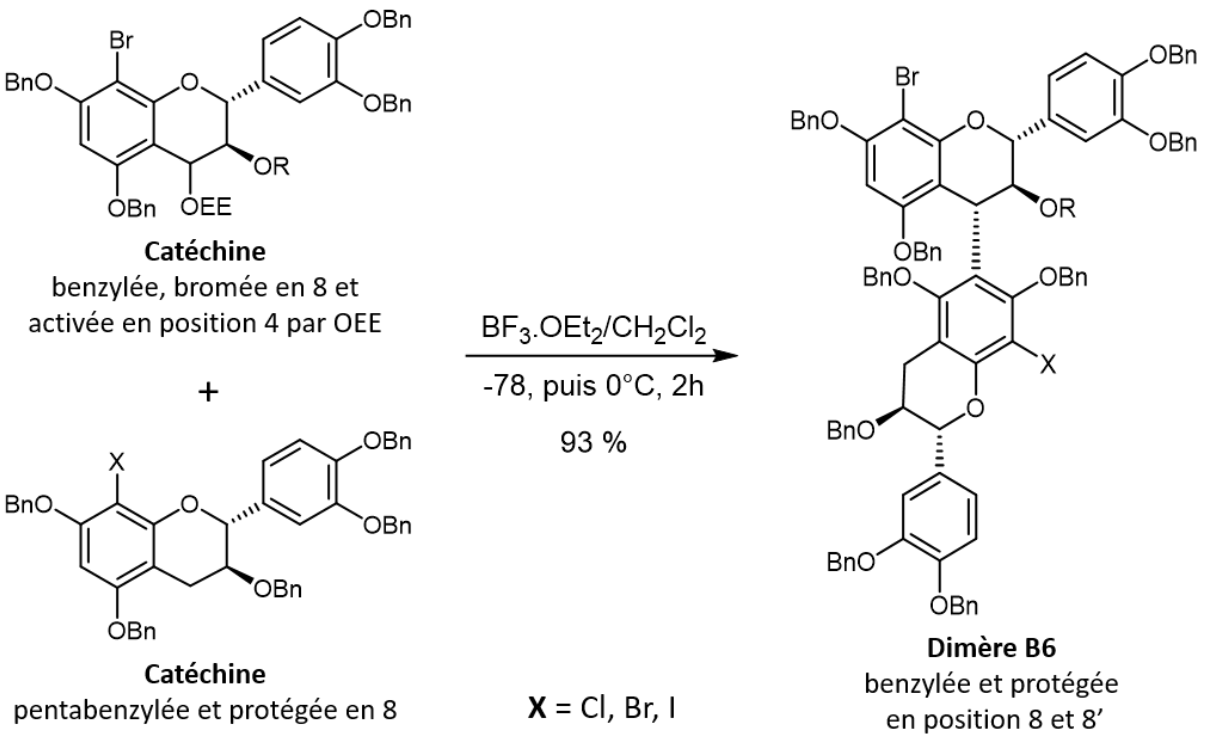


Figure 32 : Formation du dimère B6 par la méthode de Suzuki [234]

f. Déprotection des groupements benzyles

La déprotection des groupements benzyles doit se faire en condition douce afin de ne pas briser la liaison interflavane créée et de ne pas dégrader le produit formé. Les méthodes décrites dans la littérature utilisent des conditions d'hydrogénolyse catalytique afin de déprotéger les fonctions benzyles du produit fini. Différents paramètres peuvent influencer cette réaction tels que la nature du catalyseur, la source et pression d'hydrogène, celle du solvant [232,237], ou la température de la réaction. Le palladium sur charbon est l'un des premiers catalyseurs a avoir été utilisé, mais la débenzylation obtenue n'était jamais totale malgré les différentes sources d'hydrogène et de solvants utilisées. Plus tard, il a été montré que le catalyseur de Pearlman (Pd $[OH]_2$ sur charbon), permettait d'obtenir des rendements de déprotection quantitatifs. Ce catalyseur est utilisé sous atmosphère d'hydrogène (1013 HPa) pour déprotéger les procyanidines formées. Plusieurs systèmes de solvants ont alors été testés : THF/H_2O [231], THF/MeOH/H_2O [238,239] ou AcOEt/MeOH [210]. Tarascou [226] a, durant sa thèse, développé une méthode permettant la double déprotection des benzyles et du brome en utilisant le catalyseur de Pearlman sous atmosphère H_2 en présence de triéthylamine dans un mélange 1/1 (v/v) d'acétate d'éthyle et de méthanol. Cette double déprotection conduisant à des rendements de déprotection quantitatifs en une seule étape (**Figure 33**).

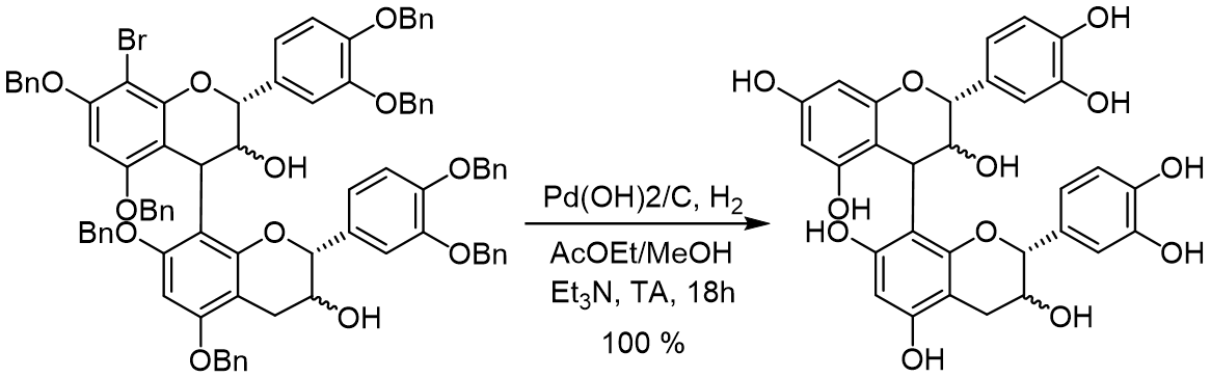


Figure 33 : Déprotection des phénols et débromation de la position 8 des dimères

D. Synthèse d'oligomère de proanthocyanidines

Des problématiques identiques à celle de la synthèse des dimères sont retrouvées pour l'obtention d'oligomères et doivent être respectées telles que la régiosélectivité, la stéréosélectivité et le degré d'oligomérisation. Dans la littérature, les premières synthèses d'oligomère de proanthocyanidine ont été décrites par l'équipe de Kawamoto faisant alors la synthèse de tanins condensés de haut degré de polymérisation en utilisant une polymérisation cationique de flavan-3, 4-carbonate [237]. La polymérisation est réalisée en présence de $BF_3.ET_2O$ dans du dichlorométhane à 0 °C pendant 10 jours. Un mélange d'oligomères, de DPm moyen de 49, a été obtenu. L'inconvénient de cette méthode est que l'étape est longue et implique une fastidieuse purification vu qu'il n'y a aucun contrôle du degré d'oligomérisation, la stéréochimie étant, elle contrôlée.

Quelques années plus tard, Kozikowski *et al.* [240] ont couplé un flavanol fonctionnalisé avec un thioéther en position 4 et un acétate en position 3 avec des oligomères d'épicatéchine, dimères, trimères voire même tétramères, précédemment synthétisés afin d'obtenir des polymères d'épicatéchine. Le seul problème est là encore le non-contrôle du degré d'oligomérisation.

Dans les années 2000, Saito *et al*. [238] proposent la synthèse stéréosélective d'un trimère en utilisant la même stratégie qu'ils utilisaient pour la synthèse de dimère [233] : ils ont couplé une catéchine ou une épicatéchine benzylée activée avec un dimère benzylé en présence de l'acide de Lewis TMSOTf. Une stratégie similaire fut utilisée par Tarascou dans sa thèse de doctorat [226] pour obtenir des tétramères. En parallèle, l'équipe de Suzuki a créé des oligomères de catéchines en protégeant la position 8 et en activant la position 4 de deux manières différentes afin de faire une polymérisation à la chaîne [241]. Quelques années après, cette même équipe, en se basant sur la même stratégie, a synthétisé un tétracosamère avec 22 unités de base en contrôlant totalement la régio- et la stéréosélectivité. Par cette stratégie, l'oligomérisation était contrôlée en réalisant un couplage séquentiel d'oligomère successif par dimérisation d'oligomère de plus en plus volumineux [242].

Chapitre 2 :

Matériels et Méthodes

I. Généralités (solvants, réactifs, produits)

Deux types de solvants différents ont été utilisés. Les premiers ont été employés pour les extractions et tous les protocoles effectués à la paillasse. Les seconds sont des solvants spécifiques utilisés pour l'UPLC-UV-ESI-QTOF. Pour les premiers, l'eau a été purifiée par un système Milli-Q (H_2O, Millipore, Bedford, MA, États-Unis). Les principaux solvants utilisés sont le méthanol (MeOH, 100 %, VWR), l'éthanol (EtOH, 99 %, VWR), l'acétate d'éthyle (AcOEt, 99,9 %, VWR), le chloroforme ($CHCl_3$, 99.3%, VWR), l'éther de pétrole (100 %, VWR), le dichlorométhene (CH_2Cl_2, 100 %, VWR), l'hexane (C_6H_{14}, 95 %, Fisher), l'éther diéthylique (99 %, Fisher Chemical), le tétrahydrofurane (THF, 99 %, Acros Organics) et le N,N-diméthylformamide (DMF, 99,8 %, Acros Organics).

Les principaux acides utilisés sont l'acide formique (Pureté ≥ 99,3 %, Fisher Scientific), l'acide chlorhydrique (HCl, ≥ 37 %, 12N, Sigma-Aldrich), l'acide trifluoroacétique (TFA, Reagent Plus® 99 %, Sigma-Aldrich), l'acide tartrique (99,5 %, Sigma-Aldrich) et l'acide ascorbique (99,5 %, Sigma-Aldrich).

Les solvants utilisés pour l'UPLC-UV-ESI-QTOF sont l'eau Optima® (Qualité LC/MS, Fisher Scientific), le méthanol Optima® (Qualité LC/MS, Fisher Scientific) et l'acide formique Optima® (Qualité LC/MS 99,5 %, Fisher Scientific).

Les produits utilisés sont la catéchine (98 %, Sigma-Aldrich), l'épicatéchine (90 %, Sigma-Aldrich), le phloroglucinol (≥ 99 %, Sigma-Aldrich), le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 99,5 %, Sigma-Aldrich), l'acétate de sodium (≥ 99 %, Sigma-Aldrich), le réactif de Folin-Ciocalteu (concentration 2N, Sigma-Aldrich), le chlorure de sodium (NaCl, 99,5 %, Fisher Scientific), le carbonate de sodium (99,5 %, Sigma-Aldrich), le tampon phosphate salin (PBS, ≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich), le bromure de benzyle (BnBr, 98 %, Sigma-Aldrich), le carbonate de potassium (K_2CO_3, 99 %, Acros Organics), l'éthylène glycol (99.8 %, Sigma-Aldrich), le 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ, 98 %, Sigma-Aldrich), le 4-diméthylaminopyridine (DMAP, 99 %, Sigma-Aldrich), la triéthylamine (TEA, 99 %, Sigma-Aldrich), le bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$, 99 %, Sigma-Aldrich), le thiosulfite de sodium ($Na_2S_2O_2$, 98 %, Sigma-Aldrich), le N-bromosuccinimide (NBS, 98 %, Sigma-Aldrich), le tétrachlorure de titane ($TiCl_4$, 99,9 %, Acros Organics), le boron trifluoride etherate ($BF_3.O-C_2H_5-_2$, 100 %, Sigma-Aldrich) et le palladium hydroxide sur carbone (Pd $[OH]_2$/C à 20 %, Acros Organics).

II. Extraction des tanins couronnes dans les matériaux végétaux

Différents échantillons provenant d'origine différente ont été utilisés afin d'obtenir des résultats uniques. Pour tous ces échantillons, le but était d'étudier la teneur et l'accumulation des tanins couronnes.

A. Les échantillons du raisin et des autres organes de la vigne

Une partie des échantillons provenaient de plusieurs propriétés situées dans la région bordelaise dans le sud-ouest de la France. Un lot d'échantillon de différentes parcelles du bordelais ont été collectés provenant du Médoc (P1, P2), des Graves (P3), de l'Entre deux Mers (P4), du Libournais (P5, P6) et enfin de Blaye-Bourg (P7) (**Figure 34**). Les échantillons de raisin collectés venaient tous de l'espèce *Vitis vinifera*, les cépages étant Cabernet-Sauvignon et Merlot. L'ensemble de ces échantillons proviennent des parcelles du réseau de suivi de maturité Bordeaux raisin piloté par le Pr. Laurence Geny.

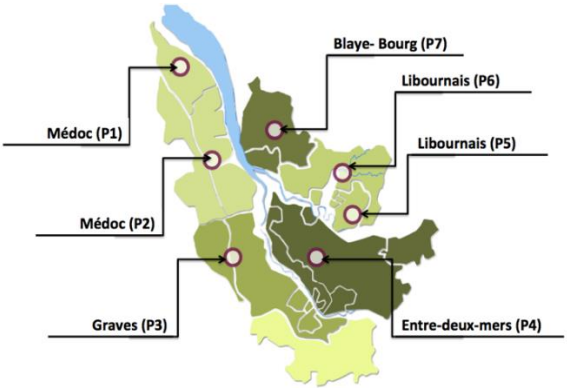


Figure 34 : Localisation géographique des différentes parcelles du Bordelais

Un premier échantillonnage a été collecté à maturité en septembre 2015. Ce premier set d'échantillon servira par la suite à la localisation des tanins couronnes dans la grappe de raisin (pépins, pellicules et rafle) et également à l'étude de la concentration en tanins couronnes en fonction du sol.

Pour le millésime 2016, un second set d'échantillon a été collecté sur les mêmes 7 différentes parcelles, en Cabernet-Sauvignon et en Merlot, mais cette fois-ci à différents stades de maturité : 100 % Véraison, Mi-Maturité et Maturité [204]. Cette nouvelle gamme d'échantillons sera utilisée pour l'étude de l'évolution des tanins couronnes durant la maturation du raisin (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Les différentes dates de prélèvements des échantillons sur les différentes parcelles du Bordelais

	100 % Véraison	Mi-maturité	Maturité
Merlot	29/08/2016	12/09/2016	28/09/2016
Cabernet Sauvignon	29/08/2016	19/09/2016	05/10/2016
Merlot	22/08/2016	12/09/2016	ABS
Cabernet Sauvignon	22/08/2016	19/09/2016	05/10/2016
Merlot	22/08/2016	12/09/2016	ABS
Cabernet Sauvignon	22/08/2016	19/09/2016	05/10/2016
Merlot	29/08/2016	12/09/2016	28/09/2016
Cabernet Sauvignon	29/08/2016	19/09/2016	05/10/2016
Merlot	29/08/2016	12/09/2016	28/09/2016
Cabernet Sauvignon	29/08/2016	19/09/2016	05/10/2016
Merlot	22/08/2016	12/09/2016	28/09/2016
Cabernet Sauvignon	22/08/2016	19/09/2016	05/10/2016
Merlot	29/08/2016	12/09/2016	28/09/2016
Cabernet Sauvignon	29/08/2016	19/09/2016	05/10/2016

Afin de réaliser une autre étude, une collaboration entre le laboratoire de l'EGFV (Écophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne) a été réalisée. Deux types d'échantillons ont alors pu être obtenus.

Dans un premier temps, une série de 30 échantillons de raisin (3 blancs et 27 noirs) ont été collectés sur la parcelle nommée « Vitadapt » à maturité (**Tableau 7**). Ces échantillons ont pu être obtenus grâce à une collaboration avec la Dr. Agnès Destrac. Cette parcelle est une parcelle d'étude expérimentale possédant 52 cépages, dont 21 cépages blancs et 31 cépages rouges. Parmi ces cépages, les cépages bordelais emblématiques sont présents, mais également des cépages du Languedoc, Espagnols, Italiens, Grecs, Portugais et des cépages d'Europe de l'Est (Bulgarie et Géorgie). Cette parcelle a pour but d'étudier le comportement des cépages bordelais et des autres dans le contexte du changement climatique. C'est pour cette raison que chaque cépage a été greffé sur un porte-greffe unique afin d'être comparable. Cinquante pieds par variété ont été plantés, à raison de 5*10 pieds, sur 5 blocs différents et de manière aléatoire. Le total d'individu est de 2600 réparti sur 42 rangs avec 13 piquetées de 5 pieds, pour une densité de 5500 souches/ha sur 0,6 ha.

Tableau 7 : Liste des cépages blancs et noirs collectés sur la parcelle Vitadapt

Cépages		
Arinarnoa	Mavrud	Sémillon
Cabernet Franc	Merlot	Syrah
Cabernet Sauvignon	Morrastel	Tannat
Carignan	Mourvèdre	Tempranillo
Carménère	Petit Verdot	Tinto Cao
Castets	Pinot noir	Touriga Francesa
Côt	Prunelard	Touriga Nacional
Gamay	Sangiovese	Ugni blanc
Grenache	Saperavi	Vinhao
Marselan	Sauvignon blanc	Xinomavro

Dans un second temps, des échantillons de feuille de vigne provenant d'une autre parcelle expérimentale de ce même laboratoire ont été obtenus grâce au Dr. Sabine Guillaumie. Les échantillons ont été collectés à différents stades phénologiques de développement du raisin : Fermeture de grappe, Mi-Maturité et Maturité, les variétés étant Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Petit Verdot, Sauvignon blanc et Ugni blanc. Ces échantillons ont été utilisés afin de localiser les tanins couronnes dans les feuilles de la vigne.

Enfin, d'autres échantillons de vigne ont été collectés afin d'être extraits avec la méthode développée sur les tanins couronnes, toujours dans l'optique de localiser les tanins couronnes dans l'ensemble de la vigne. Les échantillons collectés sont des broyats de sarment de vigne et des broyats de racine de vigne. Tous les deux proviennent du même château dans le bordelais de l'appellation Grave, les deux échantillons provenant du cépage Merlot et ils ont été récoltés durant le printemps 2017. Les deux échantillons sont des broyats en fin copeau de bois directement extraits après réception.

B. La méthode d'extraction des tanins couronnes

Après la découverte des tanins couronnes, l'un des premiers protocoles à développer était un protocole d'extraction de la totalité des tanins couronnes dans le matériel végétal de la vigne et surtout du raisin. Pour cela, différentes méthodologies ainsi que des solvants différents ont été testés. Le matériel végétal de la vigne était les rafles, les pépins, la pulpe, les pellicules dans un premier temps. Pour les parties de la baie de raisin, 100 baies ont été pelées afin de séparer les pellicules, la pulpe, les pépins et les rafles. Chaque échantillon a été rincé, congelé et lyophilisé pendant 48 h. Quand les échantillons étaient bien déshydratés, une poudre a été réalisée avec un mortier afin de perdre le moins de matériel végétal. Par la suite, des tests de solvants ont été appliqués afin d'extraire au mieux

les tanins couronnes. Il s'avère que le mélange 60 % Eau, 40 % Méthanol avec 0,1 % d'acide formique est le plus concluant.

Finalement, la méthode d'extraction la plus efficace retenu consiste à partir de 500 mg de poudre végétale (pépins, pellicules, rafles) dans 5 mL du mélange 60 % Eau, 40 % Méthanol avec 0,1 % d'acide formique. La suspension est agitée sur une table à agitation magnétique, pendant 16 h. Au bout de ce temps-là, le surnageant est récupéré, centrifugé à 4500 tour.min^{-1} et collecté avant d'être mis au congélateur en attendant la fin de tout le cycle d'extraction. Pendant ce temps, 5 mL du mélange de solvant sont à nouveau ajoutés aux parties solide et extraite une seconde fois pendant 8 h. Au bout de ce temps-là à nouveau, le surnageant est centrifugé et conservé au frais et à nouveau 5 mL de solvant remit dans le tube pour une troisième extraction pendant 16 h. C'est à la fin de ces trois extractions successives que les trois surnageants récupérés sont mélangés et évaporés à sec. L'échantillon sera alors repris dans 2 mL d'eau filtrés sur 0,45 µm afin d'être injecté en l'UPLC-UV-ESI-QTOF (**Figure 35**) (**Annexe 1**).

Figure 35 : Extraction des tanins couronnes dans les pellicules

C. Autre végétal testé en dehors de la vigne

En parallèle, des petits tests ont été réalisés sur d'autres échantillons de végétaux riches en polyphénols afin de découvrir la présence ou l'absence des tanins couronnes. L'un des végétaux testés a été la pomme. Le matériel végétal étant vraiment très différent par rapport au matériel végétal de la vigne, la méthode d'extraction développée pour obtenir la totalité des tanins couronnes n'a pas pu être utilisée. Afin d'extraire la majeure partie des polyphénols de la pomme pour ainsi voir si les tanins couronnes sont présents, une méthode d'extraction développée par Guyot *et al.* a été utilisée [243]. Les pommes étaient des Grannys Smith commerciales.

III. Les échantillons de vin

Différents échantillons de vin ont été analysés pour sur différents projets pour obtenir différents résultats.

A. Les vins issus des cépages de la parcelle Vitadapt

Comme développé plus haut, une trentaine de cépages de la parcelle Vitadapt nous ont été fournis pour réaliser une étude sur l'impact des cépages sur la concentration en tanins couronnes. Cette étude a été étendue en réalisant les microvinifications de certains de ces cépages sur les millésimes 2016 et 2017. Les microvinifications sont réalisées au sein de l'ISVV sur le plateau de microvinification prévue à cet effet. Les cépages microvinifiés étaient le Cabernet Franc, le Cabernet-Sauvignon, le Carménère, le Castets, le Côt, le Merlot, le Morastel, le Petit Verdot, le Prunelard, le Tinto Cao et le Touriga Nacional. Chaque cépage a été collecté séparément à maturité entre septembre et octobre pour les millésimes 2016 et 2017. Chaque cépage a été vendangé et pressé séparément et par la suite, une dose de SO_2 (5 $g.hL^{-1}$) a été ajoutée. Le processus de fermentation a été réalisé dans une cuve en inox de 30 L. Ensuite, la vendange a été levurée (Zymaflore®, Laffort®) et la fermentation alcoolique s'est déroulée à 25 °C. À la suite de l'écoulage, les vins ont été inoculés avec des bactéries lactiques (Lactoenos®, Laffort®) pour la réalisation de la fermentation malolactique. Lorsque cette fermentation a été finie, le vin a été filtré et mis en bouteille afin d'être conservé par la suite à 16 °C. Chaque échantillon collecté a été filtré sur 0,45 µm avant d'être injecté en l'UPLC-UV-ESI-QTOF.

B. Suivie de l'extraction de l'encuvage à l'écoulage dans le château en appellation Pauillac

Les différentes vinifications ont été mises en place sur une propriété située à Paulliac dans la région bordelaise. Une cinétique d'extraction des tanins couronnes tout au long des vinifications a été réalisée. Les vendanges ont eu lieu en octobre 2015 où le cépage Cabernet-Sauvignon a été récolté à maturité. Le même jour, le raisin a été écrasé et mis en cuve (2332 hL) avec du SO_2 (4$g.hL^{-1}$). Une température de 27 °C a été maintenue durant les 9 jours de la fermentation alcoolique. Préalablement, des levures commerciales (522 D, Lamothe Abiet) et des enzymes d'extraction (Vinozym Vintage FCE, Lamothe Abiet) ont été ajoutées. Durant la fermentation, deux types de vinification ont été conduites : une vinification par aspersion et une vinification avec une méthode de délestage. C'est deux méthodes vont être comparées afin d'observer l'extraction des composés phénoliques. Une macération d'une dizaine de jours a été effectuée avant l'écoulage. Chaque échantillon collecté a été filtré sur 0,45 µm avant d'être injecté en l'UPLC-UV-ESI-QTOF.

C. Suivie de l'extraction de l'encuvage à la fin de la fermentation malolactique

Dans le cadre du réchauffement climatique, un « projet région » en collaboration avec différentes équipes de l'ISVV sur la thématique de l'acidité dans les raisins et dans les vins a été mis en place. De ce fait, un gros set d'échantillon a été récolté sur différentes parcelles auprès de différents châteaux dans la région bordelaise et charentaise. Les raisins provenaient de cépages noirs (Cabernet-Sauvignon, Merlot) et de cépage blanc (Ugni blanc) sur 4 châteaux répartis dans la région avec 3 dates de prélèvement (sous-maturité, maturité et surmaturité) en duplicata pour chaque prélèvement. Chaque échantillon différent ainsi que son duplicat a été microvinifié sur le plateau de microvinification prévue à cet effet dans l'ISVV, faisant un total d'une trentaine de microvinification pour le millésime 2016 et 2017. Les microvinifications ont été réalisées de la même manière que dans le paragraphe III. A ci-dessus. Des prélèvements à des moments clés de la vinification ont été réalisés : moût (M), fin fermentation alcoolique (FA), fin Macération (Mac) et fin fermentation malolactique (FML). Chaque échantillon collecté a été filtré sur 0,45 µm avant d'être injecté en l'UPLC-UV-ESI-QTOF.

D. Verticale d'un vin d'un Château en appellation Pauillac

Un partenariat avec un château de l'appellation Paulliac a été entreprit. Ce château nous a fourni 17 vins composants une verticale dont les millésimes sont les suivants : 2016, 2014, 2012, 2010, 2008, 2006, 2004, 2002, 2000, 1998, 1996, 1994, 1992, 1988, 1986, 1984 et 1982. Les bouteilles étant stockées dans les caves annexes au chai du château avec des conditions de conservation idéale à 16 °C. Chaque échantillon collecté a été filtré sur 0,45 µm avant d'être injecté en l'UPLC-UV-ESI-QTOF

IV. Le protocole d'oxydation des vins

Afin de compléter une étude sur la résistance à l'oxydation des tanins couronnes, un protocole de saturation en oxygène des vins a été développé. Pour cela, deux vins commerciaux de cépage 100 % Merlot de millésime 2009 et 2016 ont été utilisés. Le vin du millésime 2009 est appelé « vins vieux » et le vin du millésime 2016 est nommé « vins jeunes ». Les bouteilles de chaque millésime sont en triplicat. Chaque vin a été caractérisé au Foss® avant le début du temps de saturation. Par la suite, une dose d'oxygène à 8 $mg.L^{-1}$ a été injectée dans chaque bouteille de vin toutes les semaines. La concentration d'oxygène injectée a été mesurée par un oxymètre (Oxymètre portable HQ30D). Cette saturation chaque semaine a duré pendant 20 semaines. Durant ce temps-là, chaque bouteille a été saturée en oxygène avec de l'air comprimé une fois par semaine. Ainsi, un échantillon était collecté

toutes les semaines et filtré sur 0,45 µm avant d'être injecté en l'UPLC-UV-ESI-QTOF. Les bouteilles étaient ensuite conservées à 12 °C.

V. Le système d'analyse UPLC-UV-ESI-QTOF

Les échantillons ont été analysés sur le système UPLC-UV-ESI-QTOF. Cet appareillage est un système de chromatographie liquide Agilent 1290 Infinity composé d'une pompe binaire (1290 Infinity), d'un compartiment à colonne à thermostat (1290 Infinity Thermostatted Column Compartment), d'un injecteur d'échantillon (1290 Infinity Autosampler) et d'un détecteur à barrette de diodes (1290 Infinity Diode-Array Detector) qui est couplé à un spectromètre de masse ESI-Q-TOF (Agilent 6530 Accurate Mass). Afin de contrôler la sensibilité de l'analyse, une solution aqueuse à 80 $mg.L^{-1}$ de catéchine a été injectée régulièrement. De plus, le nettoyage de la source a été réalisé tous les deux jours ainsi que la calibration de la MS Q-TOF a été entreprise quotidiennement. Les différentes quantifications ont été obtenues sur cet appareillage en utilisant les séparations chromatiques par la colonne Éclipse Plus C-18 et le détecteur MS Q-TOF. Les résultats ont ainsi été traités par la suite grâce au logiciel MassHunter Qualitative Analysis et les quantifications ont été effectuées avec le logiciel MassHunter Quantitative Analysis.

L'analyse des tanins couronnes a été réalisée avec cet appareillage et dans les paragraphes suivants, les méthodes de détection et quantification réalisées en masse (MS) seront séparées des méthodes de fragmentation réalisées en masse/masse (MS/MS).

A. Les méthodes de détection et de quantification des tanins couronnes

Afin d'étudier les tanins couronnes, une méthode couplant l'UPLC ainsi que la masse QTOF, dite une méthode de « routine », a été utilisée afin de réaliser la détection et la quantification de cette famille. Pour entreprendre toutes ses quantifications, une courbe étalon du tétramère couronne pure [20] a été utilisée. La concentration est représentée en « x » et la réponse de masse est représentée en « y ». La courbe de calibration linéaire obtenue correspond à :

$$y = 1826{,}18 * x - 683{,}65$$

$R^2 = 0{,}997$

La méthode est décrite ci-dessous (**Figure 36**) correspond à une méthode utilisée ponctuellement sur l'UPLC-UV-ESI-QTOF pour détecter les tanins couronnes.

Appareillage : UCLHP Agilent 1290 *Infinity* series
Colonne : Agilent Eclipse Plus C-18 2,1×100 mm, 1,8 µm
Solvants : **A :** H_2O avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
B : MeOH avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
Débit : 0,3 mL/min
Volume d'injection : 5 µL
Longueur d'onde d'acquisition : 280 nm
Postime : 3 min
Gradient d'élution :

Temps (min)	0	0,5	14	18
Solvant A (%)	94	94	5	5
Solvant B (%)	6	6	95	95

Appareillage Masse : Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF
Mode : positif
Débit de gaz de séchage : 9 L/min
Température gaz de séchage : 300 °C
Débit gaz de gaine : 11 L/min
Température gaz de gaine : 350 °C
Tension capillaire : 3500 V
Fragmenteur : 200 V
Gamme de masse : 100-3000 m/z

Figure 36 : Méthode de détection et de quantification des tanins couronnes

En parallèle, des analyses ont été réalisées sur les tanins condensés non cycliques allant des simples dimères aux pentamères. Avec cette même méthode, des tanins possédant des liaisons de type A aux tanins possédant des liaisons de type B ont également été analysés. Pour ces analyses et quantifications, une autre méthode a été développée et utilisée (**Figure 37**). Les concentrations en tanins condensés sont exprimées en équivalents de catéchine ($mg.L^{-1}$). Une courbe de calibration linéaire a été réalisée. Le « x » représente la concentration et le « y » représente la réponse de la masse, la courbe de calibration de la catéchine correspond à :

$$y = 101894{,}93 * x + 250513{,}94$$

$$R^2 = 0{,}975$$

Appareillage : UCLHP Agilent 1290 *Infinity* series
Colonne : Agilent Eclipse Plus C-18 2,1×100 mm, 1,8 µm
Solvants : **A :** H_2O avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
B : MeOH avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
Débit : 0,3 mL/min
Volume d'injection : 10 µL
Longueur d'onde d'acquisition : 280 nm
Postime : 3 min
Gradient d'élution :

Temps (min)	0	0,5	20	25	30	32
Solvant A (%)	94	94	50	0	0	94
Solvant B (%)	6	6	50	100	100	6

Appareillage Masse : Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF
Mode : négatif
Débit de gaz de séchage : 9 L/min
Température gaz de séchage : 300 °C
Débit gaz de gaine : 11 L/min
Température gaz de gaine : 350 °C
Tension capillaire : 3500 V
Fragmenteur : 200 V
Gamme de masse : 100-3000 m/z

Figure 37 : Méthode de détection et de quantification des tanins condensés

B. Les méthodes de fragmentation des tanins couronnes et des tanins liés par des liaisons de type A

Une méthode de fragmentation a été développée sur l'UPLC-UV-ESI-QTOF afin de pouvoir fragmenter le tétramère couronne et le tétramère majoritaire lié avec une liaison de type A. L'énergie de collision a été testée de 10 à 30 %. La méthode utilisée est décrite ci-dessous (**Figure 38**).

Appareillage : UCLHP Agilent 1290 *Infinity* series
Colonne : Agilent Eclipse Plus C-18 2,1×100 mm, 1,8 µm
Solvants : **A :** H_2O avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
B : MeOH avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
Débit : 0,3 mL/min
Volume d'injection : 5 µL
Longueur d'onde d'acquisition : 280 nm
Postime : 3 min
Gradient d'élution :

Temps (min)	0	0,5	14	18
Solvant A (%)	94	94	5	5
Solvant B (%)	6	6	95	95

Appareillage Masse : Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF
Mode : positif
Débit de gaz de séchage : 9 L/min
Température gaz de séchage : 300 °C
Débit gaz de gaine : 11 L/min
Température gaz de gaine : 350 °C
Tension capillaire : 3500 V
Fragmenteur : 200 V
Gamme de masse : 100-3000 m/z
Masse fragmentée : 1153,2614
Energie de collision : 20

Figure 38 : Méthode de fragmentation en MS/MS pour les tanins couronnes

VI. Purification du pentamère couronne

La purification du pentamère couronne a été développée en laboratoire et se divise en trois étapes. À chaque étape de la purification, des injections de contrôle ont été effectuées sur l'UPLC-UV-ESI-QTOF.

A. Extraction en phase solide avec une cartouche SPE C18

Le vin utilisé est un vin du millésime 2016, cépage 100 % Merlot, originaire de la région bordelaise. 20 mL de vin ont été évaporés à sec et ensuite repris dans 20 mL d'eau acidifiée à 0,1 % d'acide formique. Une colonne (cartouche) SPE C18 (d : 3 cm, h : 4,5 cm) (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France) a été activée avec 50 mL de méthanol et rééquilibrée avec 50 mL d'eau. Ensuite, les 20 mL d'échantillon repris ont été déposés sur la colonne. S'en suit une succession de solvants d'élution sur la colonne :

1. 150 mL d'un mélange de méthanol/eau (5/95, v/v), solvant utilisé pour éluer les tanins couronnes.
2. 100 mL de méthanol, solvant utilisé pour laver la colonne

3. 100 mL d'eau, solvant utilisé pour rééquilibrer la colonne

Tous les solvants sont acidifiés à 0,1 % d'acide formique. La fraction possédant les tanins couronnes est alors évaporée à sec, repris dans 1,5 mL d'eau et filtrée sur filtre 0,45 µm avant d'être injecté en l'UPLC-UV-ESI-QTOF pour faire un contrôle.

B. Fractionnement sur un gel TSK HW-40-S

Cette première fraction a été ensuite déposée sur une colonne de gel Toyopearl TSK HW-40-S (d : 2 cm, h : 17 cm) (Tosoh, Tokyo, Japon). Le solvant d'élution est du méthanol acidifié à 0,1 % d'acide formique à un débit de 1 $mL.min^{-1}$. Les pentamères couronnes et le tétramère couronne se retrouvaient respectivement dans les fractions sortant à 4 h et 5 h. Chacune des différentes fractions a été évaporées à sec séparément et resolubilisées dans 500 µL d'eau pour être purifiées par la suite en HPLC semi-préparative.

C. Purification par HPLC semi-préparative

L'HPLC semi-préparative est un système comprenant une pompe quaternaire (1260 Infinity), un compartiment à colonne thermostatée (1290 Infinity), un injecteur d'échantillon (1260 Standart Autosampler) et un détecteur à barrette de diodes (1260 DAD VL+). Un second injecteur manuel externe de 500 µL a été ajouté au système. Le logiciel de traitement est le LC Open Lab. Les volumes d'injection manuelle variaient entre 200 et 500 µL (**Figure 39**). Toutes les fractions obtenues pures collectées après l'HPLC semi-préparative ont été évaporé à sec, repris dans de l'eau et lyophilisées afin d'obtenir une poudre blanche.

Appareillage : HPLC semi-préparative (*Varian Prostar*) système Agilent

Colonne : Nucleosil 8 × 250 mm, 5 µm

Solvants : **A :** H_2O avec 0,025 % de TFA (v/v)

B : MeOH avec 0,025 % de TFA (v/v)

Débit : 2,5 mL/min

Volume d'injection : 500 µL

Longueur d'onde d'acquisition : 280 nm

Gradient d'élution :

Temps (min)	0	25	35	36	40	40,5	42
Solvant A (%)	92	92	70	0	0	95	95
Solvant B (%)	8	8	30	100	100	5	5

Figure 39 : Résumer de la méthode utilisée pour purifier les tanins couronnes

VII. Analyses des pigments polymérisés

L'étude de l'évolution des pigments polymérisés a été étudiée sur une gamme de vin. Le protocole décrit pour réaliser cette étude utilise la dépolymérisation chimique par phloroglucinolyse

A. Dépolymérisation chimique par phloroglucinolyse

Dans un premier temps, un fractionnement du vin rouge sur une cartouche SPE C-18 (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France) a été entrepris afin d'obtenir une fraction polyphénolique concentrée du vin rouge. 2,5 mL de vin ont été évaporés à sec avec un évaporateur rotatif afin de retirer toute trace d'éthanol présent dans l'échantillon. L'échantillon a été alors redissous dans 10 mL d'eau distillée. En parallèle, une cartouche SPE C-18 a été activée avec 50 mL de méthanol et la cartouche a été en suivant rééquilibrée avec de l'eau distillée. Les 10 mL d'échantillon ont été alors déposés en tête de cartouche. Après un lavage à l'eau (50 mL), 50 mL de méthanol ont été élués sur la colonne afin de récupérer la fraction polyphénolique. Cette fraction est alors évaporée à sec sous pression réduite avant d'être reprise dans 1 mL de méthanol. Cette fraction sera alors concentrée 2,5 plus que le vin de départ. L'échantillon est alors conservé à 4 °C avant d'être utilisé pour la réaction de phloroglucinolyse. Cette fraction sera nommée « fraction polyphénolique ».

Pour la réaction de dépolymérisation chimique, 100 µL d'échantillon préparé préalablement est ajouté à 100 µL de réactif de phloroglucinolyse. Ce réactif est composé d'un mélange de 50 $g.L^{-1}$ de phloroglucinol et de 10 $g.L^{-1}$ d'acide ascorbique dissous dans du méthanol acidifié à 0,1 N d'acide chlorhydrique. Le mélange réactionnel est alors chauffé à 50 °C pendant 20 min. Passé ce temps, un millilitre d'une solution aqueuse d'acétate de sodium (40 mmol L^{-1}) a été ajouté dans chaque réaction pour arrêter celle-ci.

B. Les pigments polymérisés

Pour étudier les pigments polymérisés, la fraction polyphénolique témoin a été comparée à la fraction polyphénolique ayant subi la réaction de phloroglucinolyse. Les volumes et l'acidité ont été ajustés afin d'avoir les mêmes dilutions et le même pH. Pour la fraction polyphénolique témoin, 200 µL de la fraction polyphénolique du vin rouge ont été mélangés à 200 µL de méthanol acidifié à 2 % d'acide formique dans un vial prévu à cet effet de 2 mL. Le pH étant proche de 1, 95 % des anthocyanes du milieu sont sous forme de cation flavylium. 1 mL de solution Stop a été ajouté dans le vial avant injection. Pour la fraction polyphénolique subissant la dépolymérisation, 200 µL de la fraction polyphénolique du vin rouge ont été mélangés à 200 µL du réactif de phloroglucinolyse. Le mélange

réactionnel a été chauffé à 50 °C pendant 20 min. Après ajout d'1 mL de solution Stop, le vial est directement injecté. Les vials témoins et ceux dépolymérisés sont alors injectés en ULPC-UV-ESI-QTOF après filtration sur filtre 0,45 µm. Les concentrations des pigments monomériques et polymériques sont exprimées en équivalent de malvidine-3-*O*-glucoside en $mg.L^{-1}$. La courbe de calibration a été calculée entre 6,25 et 200 $mg.L^{-1}$ correspondant à l'équation est suivante :

$$y = 400656 * x$$

$$R^2 = 0,965$$

Les échantillons ont été injectés sur le système UPLC-UV-ESI-QTOF. Une méthode a été développée afin d'observer l'ensemble de cette grande famille. La méthode est décrite ci-dessous (**Figure 40**).

Appareillage : UCLHP Agilent 1290 *Infinity* series
Colonne : Agilent Eclipse Plus C-18 2,1×100 mm, 1,8 µm
Solvants : **A :** H_2O avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
B : MeOH avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
Débit : 0,3 mL/min
Volume d'injection : 1 µL
Longueur d'onde d'acquisition : 280 nm
Postime : 3 min
Gradient d'élution :

Temps (min)	0	0,5	13,5	17,5
Solvant A (%)	94	94	5	5
Solvant B (%)	6	6	95	95

Appareillage Masse : Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF
Mode : négatif
Débit de gaz de séchage : 9 L/min
Température gaz de séchage : 300 °C
Débit gaz de gaine : 11 L/min
Température gaz de gaine : 350 °C
Tension capillaire : 3500 V
Fragmenteur : 200 V
Gamme de masse : 100-3000 m/z

Figure 40 : Méthode d'identification et de quantification des pigments monomériques et polymériques dans les vins

VIII. Hémisynthèse des tanins de type A

Dans une optique de comparaison avec les tanins couronnes, les tanins possédant une liaison de type A ont été étudiés et leurs hémisynthèses a été réalisées en laboratoire. Toutes les fractions décrites dans le protocole ont été analysées en UPLC-UV-ESI-QTOF.

A. Hémisynthèse et purification des tanins liés par une liaison de type A

Avant de commencer l'hémisynthèse des tanins de type A, une fraction de tanins oligomères de type B a été obtenue par extraction liquide-liquide à partir d'un extrait brut de tanins de pépins du cépage Cabernet-Sauvignon. Cette fraction avait été, au préalable, obtenue par extraction solide-liquide avec un mélange acétone-eau (v/v) 70/30. Pour éliminer la matière lipophile (lipides,

chlorophylles et autres composés indésirables), 5 g d'extrait brut ont été solubilisés dans 400 mL d'eau et extrait trois fois avec 400 mL de chloroforme. En suivant, la phase aqueuse a été extraite quatre fois avec 400 mL d'acétate d'éthyle pour obtenir deux fractions distinctes : une fraction de procyanidines de faibles poids moléculaires (tanins monomères/oligomères) dans la phase organique et une fraction de procyanidines de hauts poids moléculaires (tanins polymères) dans la phase aqueuse. Ces deux fractions ont été concentrées et lyophilisées pour obtenir des poudres sèches. Par la suite, 500 mg de la fraction organique de faibles poids moléculaires ont été solubilisés dans 400 mL d'eau qui ont été extraits trois fois avec 400 mL d'éther diéthylique afin d'éliminer les monomères présents alors dans la phase organique. En parallèle, la fraction aqueuse a été de nouveau concentrée et lyophilisée pour obtenir des poudres sèches. Après ce traitement, la fraction finale obtenue était composée uniquement de tanins de type B allant des dimères aux pentamères.

La conversion des tanins ayant des liaisons de type B en tanins ayant une liaison de type A a été réalisée suivant le protocole décrit par Chen *et al.* [163]. Ainsi, 50 mg de tanins oligomères ont été solubilisés dans 22,5 mL de méthanol. Par la suite, une solution de DPPH, obtenue à partir de 45 mg de DPPH mélangés dans 25 mL de méthanol, et 2,4 mL de tampon phosphate salin à 0,01 M, pH = 7,4 ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été chauffé à 37 °C pendant 3 h. Enfin, le milieu a été évaporé à sec et repris dans 3 mL d'eau désionisée avant d'être filtrée sur 0,45 µm.

La purification sur colonne SPE C18 a pour but d'enlever toute trace de DPPH présent dans le milieu. Après avoir été activée, équilibrée et déposé l'ensemble de l'échantillon sur la colonne, une succession d'élution a été réalisée avec différents solvants. L'ordre d'élution était le suivant :

- 50 mL d'eau désionisée pour éliminer les sels résultants de l'hémisynthèse et le DPPH,
- 50 mL de méthanol afin de récupérer l'ensemble des tanins formés.

Cette dernière fraction a alors été évaporée à sec et reprise dans 2 mL de méthanol avant d'être filtrée sur filtre 0,45 µm et injectée en UPLC-UV-ESI-QTOF avec la méthode développée pour ces tanins (**Figure 41**).

Appareillage : UCLHP Agilent 1290 *Infinity* series
Colonne : Agilent Eclipse Plus C-18 2,1×100 mm, 1,8 µm
Solvants : **A :** H_2O avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
B : MeOH avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
Débit : 0,3 mL/min
Volume d'injection : 5 µL
Longueur d'onde d'acquisition : 280 nm
Postime : 3 min
Gradient d'élution :

Temps (min)	0	0,5	20	25	30	35
Solvant A (%)	94	94	50	0	0	94
Solvant B (%)	6	6	50	100	100	6

Appareillage Masse : Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF
Mode : négatif
Débit de gaz de séchage : 9 L/min
Température gaz de séchage : 300 °C
Débit gaz de gaine : 11 L/min
Température gaz de gaine : 350 °C
Tension capillaire : 4000 V
Fragmenteur : 200 V
Gamme de masse : 100-3000 m/z

Figure 41 : Méthode UPLC pour la détection des tanins de type A

Afin de confirmer les structures des tanins de type A et de type B, une méthode a été développée en MS/MS afin d'analyser les masses issues de la fragmentation (**Figure 42**).

Appareillage : UCLHP Agilent 1290 *Infinity* series
Colonne : Agilent Eclipse Plus C-18 2,1×100 mm, 1,8 µm
Solvants : **A :** H_2O avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
B : MeOH avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)
Débit : 0,3 mL/min
Volume d'injection : 5 µL
Longueur d'onde d'acquisition : 280 nm
Postime : 3 min
Gradient d'élution :

Temps (min)	0	0,5	20	24	27	28	30
Solvant A (%)	90	90	35	5	5	90	90
Solvant B (%)	10	10	65	95	95	10	10

Appareillage Masse : Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF
Mode : négatif
Débit de gaz de séchage : 9 L/min
Température gaz de séchage : 300 °C
Débit gaz de gaine : 11 L/min
Température gaz de gaine : 350 °C
Tension capillaire : 4000 V
Fragmenteur : 200 V
Gamme de masse : 100-3000 m/z
Masse fragmentée : 1153,2614
Energie de collision : 20

Figure 42 : Méthode d'identification des tanins ayant une liaison de type A par MS-MS

B. Méthode de quantification des tanins de type A

Après l'hémisynthèse, les tanins ayant une liaison de type A ont été quantifiés par phloroglucinolyse. Une solution de phloroglucinolyse a été préparée à partir de 50 g.L^{-1} de phloroglucinol ainsi que 10 g. L $^{-1}$ d'acide ascorbique dissout dans du méthanol acidifié à 0,1 N d'acide chlorhydrique. Dans un vial de 2 mL, 100 µL de solution d'extrait de tanins et 100 µL de solution de phloroglucinolyse ont été mélangés. Ce mélange est alors chauffé à 50 °C pendant 20 min. Par la suite, 1 mL de solution Stop, composée d'une solution aqueuse d'acétate de sodium à 40 mmol.L^{-1}, a été ajouté pour arrêter la réaction. L'analyse a été effectuée par UPLC-UV-ESI-QTOF en utilisant les conditions décrites dans la **Figure 9**.

C. Méthode d'interaction des tanins et des protéines par turbidimétrie

L'interaction des tanins avec les protéines a été évaluée par turbidimétrie en mesurant le trouble formé résultant de cette réaction. Un turbidimètre Hach 2100 N (Hach Company, Loveland, USA) a été utilisé et celui-ci a été étalonné avec des solutions de formazine fournies avec l'appareil correspondant à 0,1-20-200-1000 et 4000 NTU (Nephelometric Turbidity Unit). Des solutions de tanins (tanins oligomères de type B et de type A) et de protéines (BSA), de concentration deux fois plus élevée que la concentration finale, ont été réalisées en solution modèle de vin (12 % d'éthanol, pH = 3,5 et 5 g. L^{-1} d'acide tartrique). C'est alors que 15 mL de chaque solution respective des tanins et des protéines ont été mélangés dans un tube de 30 mL placé au turbidimètre. Le moment du mélange des deux solutions correspondait au temps 0.

Des mesures de turbidité ont alors été réalisées à des intervalles de temps précis : 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 secondes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 30 minutes, 1, 2, 3, 4, 8, 24 et 48 heures. Les échantillons ont été agités 30 secondes avant chaque mesure à partir de la première minute. La BSA est la protéine modèle utilisé pour réaliser cette analyse, car il a été montré qu'elle a un comportement, d'un point de vue macromoléculaire, très proche de la salive [122].

En parallèle, des études de différents facteurs tels que l'éthanol et le pH ont été réalisées. Pour l'éthanol, des pourcentages de celui-ci variant de 0, 5, 10, 15 et 20 % ont été testés afin de comparer le comportement de l'interaction tanins-protéine dans le milieu. Enfin, des pH à 3, 3,5 et 4 ont été testés également, paramètres importants dans la formation des complexes tanins-protéines.

IX. Les analyses de spectrophotométrie et de colorimétrie

Dans la littérature actuellement, il existe un grand nombre de méthodes rapides permettant d'analyser les polyphénols dans les vins par spectrophotométrie ainsi que la couleur par colorimétrie.

A. Les méthodes par spectrophotométrie

Le spectrophotomètre utilisé est un Jasco V630 à double faisceau, possédant une lampe deutérium pour les longueurs d'onde comprises entre 190 à 350 nm, ainsi qu'une lampe halogène dont la gamme de longueurs d'onde varie de 330 à 1100 nm. Le logiciel utilisé était Spectra Manager. Les différentes méthodes citées ci-dessous ont été utilisées pour plusieurs échantillons de vin (verticale des vins de l'appellation Pauillac) ou des échantillons de raisin (pellicules de raisin extraites). Pour chaque échantillon analysé, un triplicat a été mesuré et ainsi la moyenne et l'écart type ont été calculés.

a. L'Indice des Polyphénols Totaux ou IPT

L'indice des polyphénols totaux permet de mesurer tous les composés phénoliques absorbants à 280 nm. Le vin rouge a été dilué 100 fois. La densité optique a été mesurée à 280 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique dans une cuve perméable aux UV en quartz ou plastique spécial. Le résultat est exprimé par un indice :

$$I = DO \times dilution.$$

b. Le dosage des tanins totaux

La méthode est basée sur la transformation des proanthocyanidines en anthocyanidines par chauffage en milieu acide. Dans deux tubes à essai (normal et hydrolyse) ont été ajoutés 4 mL de vin (dilution 1/50), 2 mL d'eau distillée et 6 mL d'HCl (12N). Les tubes à essai à hydrolyse ont été placés dans un bain-marie à 100 °C pendant 30 minutes tandis que les tubes normaux ont été laissés à température ambiante. Une fois la transformation terminée, les tubes ont été laissés à refroidir et en suivant, 1 mL d'éthanol ont été ajoutés dans tous les tubes à hydrolyse et normaux. La densité optique a alors été mesurée à 550 nm par rapport à l'eau sous un 1 cm de parcours optique. La concentration, en $g.L^{-1}$ a été calculée en reportant la différence de densités à partir de la formule suivante :

$$C = 19,33\ \Delta d$$

c. Le dosage des anthocyanes totales

Les anthocyanes ont été analysées par la méthode utilisant le bisulfite de sodium. Une solution mère a été préparée avec 1 mL de vin, 1 mL d'éthanol à 0,1 % d'HCl et 20 mL d'HCl à 2 %. Dans deux tubes à essai différents ont été placés 10 mL de la solution mère. Dans un premier tube, 4 mL d'eau distillée ont été ajoutés tandis que dans le second tube a été ajouté 4 mL d'une solution de bisulfite de sodium à 15 % (solution du commerce d = 1,24 diluée au ½). Les densités optiques ont été mesurées après 20 min d'attente malgré le fait que la décoloration est instantanée. Les mesures ont été réalisées à 520 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique. La concentration, en $mg.L^{-1}$, a été calculée en reportant la différence des densités optiques à l'aide de la formule suivante :

$$C = 875\ \Delta d$$

d. Les caractéristiques chromatiques du vin rouge

Les spectres des vins jeunes rouges jeunes présentent un maximum d'absorption à 520 nm (caractéristique de la couleur rouge) et un minimum vers 420 nm (caractéristique de la couleur jaune), et une absorption non négligeable, mais faible à 620 nm (caractéristique de la couleur mauve). Afin de

caractériser la couleur des vins, des coefficients faisant intervenir ces densités optiques à ces longueurs d'onde ont été utilisés.

L'intensité colorante IC est la somme des densités optiques à 420 nm et 520 nm mesurées sous 1 mm de parcours optique par rapport à l'eau distillée. En parallèle, l'intensité colorante modifiée IC' est la somme des intensités optiques à 420 nm, 520 nm et 620 nm mesurées dans les mêmes conditions.

$$IC = d\ 420 + d\ 520$$

$$IC' = d\ 420 + d\ 520 + d\ 620$$

La teinte correspond au rapport de la densité optique à 420 nm sur la densité optique à 520 nm, correspondant à la proportion de couleur jaune par rapport à la couleur rouge. Au cours du vieillissement d'un vin, la couleur rouge (d 520) diminue tandis que la couleur jaune (d 420) reste constante, donc la teinte diminue.

$$Teinte = d\ 420 / d\ 520$$

B. La colorimétrie par la méthode de CIE

Plusieurs méthodes ont été mises au point au cours du temps afin de quantifier et de mesurer la couleur. Les espaces couleurs sont des méthodes permettant d'exprimer la couleur d'un objet ou d'une source lumineuse au moyen d'une notation spécifique. Deux méthodes ont été développées par la Commission Internationale de l'Éclairage (CIE). La première est l'espace couleur Yxy (XYZ) s'appuyant sur les valeurs tristimulus XYZ. Cette méthode, créée en 1931, possède une limite majeure à savoir que sur le diagramme de chromacité x, y ne représentent pas des différences égales des couleurs perçues. Afin de pallier à ce problème, quelques années plus tard en 1976, une deuxième méthode vue le jour et ayant pour nom l'espace couleur L*a*b (aussi nommé CIELAB). Cette méthode, actuellement la plus utilisée, permet de mesurer et de caractériser la couleur en se basant sur l'absorption de tout le spectre visible. En effet, cet espace de couleur permet quant à lui de caractériser plus fidèlement les écarts entre les couleurs perçues par la vision humaine. La composante L* représente la clarté variant de 0 (noir) à 100 (blanc). La composante a* représente une gamme de 600 niveaux sur un axe allant du rouge (+299 valeurs positives) au vert (-300 valeurs négatives) en passant par le gris (0) au centre. La mesure s'effectue par balayage entre 380 et 770 nm avec des intervalles de 1, 5 ou 10 nm (**Figure 43**). En 2009, l'Organisation Internationales des Vins (OIV) a adopté cette méthode.

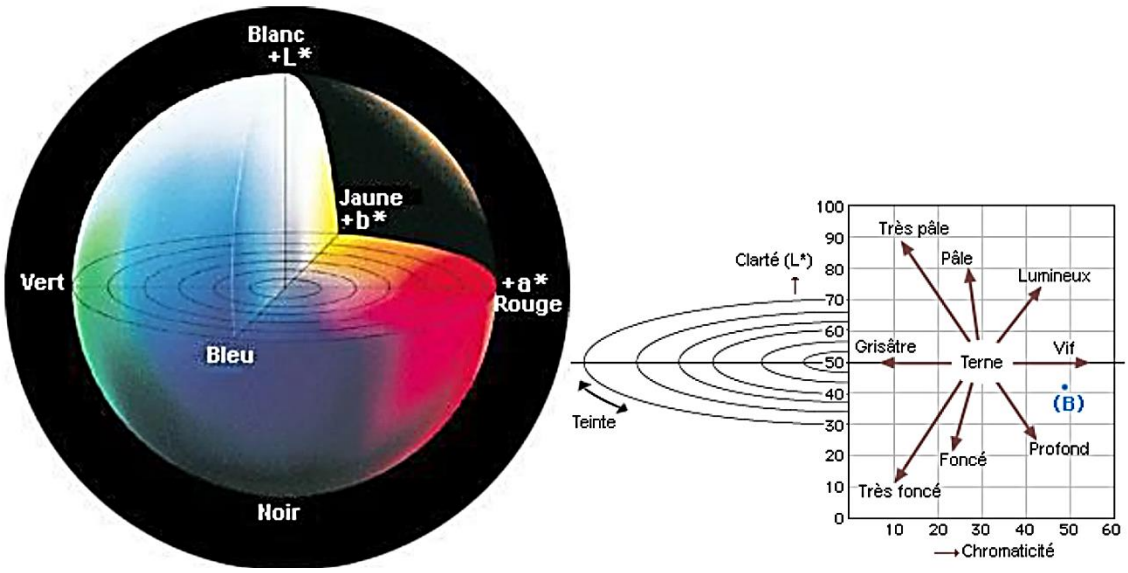


Figure 43 : Représentation de l'espace couleur L*a*b*

Pour le vin, les valeurs obtenues par cette méthode permettent de représenter la couleur du vin selon un modèle basé sur trois axes orthogonaux comprenant la clarté L* et les deux coordonnées de chromacité indiquant la direction des couleurs a*et b*. Pour a*, le +a* correspond à la couleur rouge et le -a* à la couleur verte. Pour le b*, le +b* correspond à la couleur jaune et le -b* à la couleur bleue. Pour le vin rouge, la zone de la couleur se situe [+a*, +b*].

La couleur de deux vins peut-être alors comparée dans l'espace couleur L*a*b. Pour cela, l'écart de couleur est exprimé par une formule mathématique, ΔE*ab, indiquant de combien et pas comment les deux couleurs sont différentes. ΔE*ab est définie par l'équation suivante :

$$\Delta E^*ab = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Ces mesures ont été réalisées avec un spectrophotomètre Konica Minolta CM-5 équipé d'une source lumineuse D65 et contrôlé par le logiciel SpectraMagic NX. Avant chaque mesure, l'appareil a été calibré en transparent (0 %) et en noir (100 %). 10 mL de vin rouge ont été nécessaire pour remplir la cuve possédant 1 cm de parcours optique. Chaque échantillon a été mesuré deux fois pour avoir des duplicat et ainsi par la suite pouvoir calculer la moyenne et l'écart type.

C. Analyses des paramètres chimiques courant en utilisant le WineScan (FOSS)

Certains paramètres classiques du vin ont été mesurés par un FOSS WineScan 79000 (FOSS, Nanterre) qui est un appareil proche infrarouge à transformer de Fourrier piloté par le logiciel Foss Integrator. Les échantillons analysés étaient des vins finis dont les analyses ont été effectuées en triplicat. Une sonde située à l'extérieur de l'appareil a permis de prélever directement 20 mL de vin

pour faire toutes les analyses. Les différents paramètres mesurés par le FOSS sont : pH, titre alcoométrique volumique (TAV, % vol.), concentration en CO_2 ($mg.L^{-1}$) et l'acidité totale (AT, $g.L^{-1}$ d'H_2SO_4).

X. Les analyses sensorielles

Afin de compléter nos études sur les tanins couronnes et les tanins possédant des liaisons de type A, des analyses sensorielles ont été mise en place. Les deux familles de composés ont fait l'objet de deux analyses sensorielles différentes qui seront détaillées par la suite séparément.

A. Les analyses sensorielles des tanins couronnes

Une analyse sensorielle a été mise en place sur une verticale d'un château de l'appellation Pauillac (Paragraphe III. D). Cette verticale de vin était constituée de 17 bouteilles de vin de 1982 à 2016. Cette analyse a pour but de trouver une tendance organoleptique entre la verticale de vin et les analyses chimiques réalisées sur les tanins couronnes et les pigments polymérisés.

Les 17 vins ont été dégustés individuellement avec une fiche de dégustation possédant tous les descripteurs pour chaque vin. En début d'analyse sensorielle, un vin de calage a été proposé au dégustateur, vin provenant de la même appellation Pauillac et possédant les mêmes proportions de cépages que ceux de notre verticale. Ce vin de calage a été préalablement dégusté par quelques professionnelles afin de lui attribuer une note pour chaque descripteur (**Annexe 2**). Ce vin a permis de réaliser la comparaison entre tous les vins de la verticale. Un profil gustatif en semi-monadique a été proposé. Sur chaque poste individuel, les 17 vins de la verticale étaient proposés, l'ordre de dégustation étant noté sur les fiches. La norme NF EN ISO 8589 : 2010 définit les conditions normalisées de l'analyse sensorielle. La dégustation a eu lieu dans la salle de dégustation normée de l'ISVV avec toutes les conditions optimales réunies (température, lumières et postes individuels). Des crachoirs étaient à disposition ainsi que de l'eau et des crackers non salés afin de pallier à la fatigue due à l'astringence. L'heure de la dégustation était en fin de matinée, condition idéale, car les juges étaient en état d'appétence. Par ailleurs, sachant qu'il s'agit d'une verticale de vin, l'analyse sensorielle a été menée à l'aveugle dans des verres INAO noirs (ISO 3591 : 1977) afin que la couleur n'altère pas les attentes gustatives du panel. Chaque échantillon a été anonymé par un nombre à trois chiffres générés aléatoirement. Chaque dégustateur a suivi un ordre de présentation randomisé qui lui a été attribué par le biais des fiches de dégustation également codées.

Le nombre de dégustateurs était de 21, nombre limite pour une analyse sensorielle, mais le coût élevé des vins ainsi que le faible nombre de bouteilles par millésime (une seule) pour réaliser toutes les analyses chimiques et sensorielles ont limitées le nombre de participants. Le panel choisi était composé de dégustateurs de l'ISVV, 16 femmes et 5 hommes âgés de 23 à 50 ans, choisi pour leurs expériences et qui ont été entrainés au préalable au gustatif des vins rouges. Les fiches de dégustation ont été rédigées avec la collaboration avec le Dr. Sophie Tempère, spécialiste des analyses sensorielles (**Annexe 3**). Pour le test descriptif, la norme ISO 13299 : 2003 (F) a été respectée et suivie. Une liste préétablie des descripteurs gustatifs les plus pertinents pour décrire gustativement le vin a été proposée aux dégustateurs. De plus, les descripteurs ont été notés sur une échelle discontinue allant de 0 à 7.

La limite de cette dégustation était le grand nombre d'échantillons à déguster en bouche et donc la fatigue gustative qui s'installe au fur et à mesure des verres bien que des solutions pour pallier à cette fatigue ont été proposées (verre d'eau et crackers sans sel). Ces analyses sensorielles ont été corrélées aux analyses chimiques réalisées sur les vins et notamment sur les tanins couronnes par des analyses statistiques.

B. Les analyses sensorielles des tanins ayant une liaison de type A

Afin de compléter notre étude sur les tanins ayant une liaison de type A, des analyses sensorielles ont été réalisées en comparant les tanins ayant une liaison de type A aux tanins ayant des liaisons de type B.

Actuellement, aucune étude n'a démontré l'impact sensoriel des tanins ayant une liaison de type A dans le vin. Pour cela, deux types d'analyse ont été utilisés. Dans un premier temps, la détermination du seuil de ces tanins a été réalisée afin de faire une comparaison avec le seuil de détection des tanins ayant des liaisons de type B. Dans un second temps, des tests triangulaires ont été entrepris afin de déterminer les différences organoleptiques entre ces deux types de tanins.

Dans un premier temps, le seuil de détection a été déterminé pour les tanins de type A et B grâce à une série de tests triangulaires de difficulté décroissante, impliquant un choix forcé à chaque niveau. Ce test provient de la procédure d'essais 3 - AFC (3 alternatives à choix forcé ISO 13301, 2002). Pour chaque tanin, dans une solution aqueuse, une gamme de concentration allant de 4 $mg.L^{-1}$ à 256 $mg.L^{-1}$ a été testée par les dégustateurs. Pour chaque concentration, trois verres étaient proposés : deux contenant une solution aqueuse simple et un verre contenant le produit à détecter. Les participants devaient répondre à une question : « Quel est l'échantillon différent ? » et choisir obligatoirement une

réponse parmi les trois échantillons proposés (**Annexe 4**). Le panel de dégustateur choisi était composé de personnes déjà entrainées à l'analyse sensorielle en bouche sur cette famille de molécule.

La méthode de calcul du seuil d'un composé (norme ISO 13301) permet de déterminer, la concentration à laquelle la probabilité de détection est de 0,5, c'est-à-dire le seuil absolu ou statistique. La probabilité de donner une bonne réponse au hasard, mais également les effets de fatigue ou d'inattention sont prise en compte. La fréquence de réponses correctes en fonction de la concentration en tanins correspond alors à une sigmoïde. Il est possible de tracer la probabilité de détection corrigée en fonction du log 10 de la concentration, avec p : la proportion de réponses correctes pour chaque concentration.

La fonction psychométrique étant modélisée par une sigmoïde, son équation peut s'écrire :

$$\mathrm{P} = \frac{Pmax}{(1 + e - \frac{(x - xo)}{D}}$$

P : la proportion corrigée par l'effet hasard (1/3 dans le cas d'un test 3-AFC).

b = 1/D avec b la pente de la courbe, où P max = 1, xo = constante

Quand P = 0,5 alors x = xo, c'est-à-dire que xo est égale au seuil de détection.

Dans un second temps, un test triangulaire a été réalisé permettant de déterminer s'il existe une différence sensorielle perceptible entre les échantillons de deux produits. Ces deux tests ont été réalisés avec le même panel que précédemment (**Annexe 5**)

XI. Les analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R ou R studio. Des tests de Pearson avec le niveau de significativité limité à 5 % ont été réalisés afin d'obtenir des coefficients de corrélations et des niveaux de significativité entre les paramètres étudiés.

Pour l'analyse sensorielle de la verticale, les résultats de la dégustation et des analyses chimiques ont été comparés sur le logiciel R. Des Analyses en Composante Multiple (ACP) ont été réalisées.

XII. La synthèse du dimère B5 pour la synthèse des couronnes

Un protocole de synthèse a été développé en laboratoire afin de produire le tétramère couronne chimiquement sans passer par l'étape de purification. Cette synthèse est une synthèse organique

multi-étape qui fait intervenir un grand nombre de molécules intermédiaires. Chaque intermédiaire a été caractérisé et analysé par de nombreuses méthodes analytiques.

A. Les méthodes analytiques

a. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres 1D RMN (^{1}H, ^{13}C) ainsi que les 2D RMN (HMBC et HMQC) ont été réalisés avec un spectromètre de RMN Bruker Avance III 600 ou 400 (Bruker BioSpin, Allemagne). Les déplacements chimiques ont été exprimés en δ partie par millions (ppm) relatifs aux solvants utilisés comme référence interne et les constantes de couplage (*J*) ont été exprimées en Hz. Les solvants utilisés étaient le chloroforme-*d* pour les molécules benzylées et méthanol-*d4* pour les molécules non-benzylées. Tout les produits de réaction ainsi que toutes les molécules synthétisées ont été analysés par RMN. Les spectres ont alors été analysés avec le logiciel Mestrenova.

b. Les différentes chromatographies

Les réactions ont été suivies par Chromatographie sur Couche mince de silice (plaques de silice HPTLC 60 F_{254}). Les révélations ont été effectuées par lumière UV. Les purifications des produits réactionnels ont été réalisées par chromatographie sur gel de silice 60 (0,063 – 0,200 mm, Merck) (chromatographie flash). Les mêmes solvants étaient utilisés pour la CCM et pour la chromatographie flash pour une même molécule. Avant de confirmer la structure en RMN, la masse des molécules synthétisées a été confirmée par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-UV-ESI-QTOF), système décrit dans la partie V. Pour les molécules non-benzylés, les produits ont été injectés avec la même méthode utilisée que pour la détection des tanins condensés (décrite paragraphe V.A) tandis qu'en parallèle, les produits synthétisés benzylés ont été injectés avec une méthode, décrite ci-dessous (**Figure 44**), n'utilisant que le spectromètre de masse.

Appareillage : UCLHP Agilent 1290 *Infinity* series

Colonne : Capillaire de connexion

Solvants : **A :** H_2O avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)

B : MeOH avec 0,1 % d'HCOOH (v/v)

Débit : 0,3 mL/min

Volume d'injection : 2 µL

Longueur d'onde d'acquisition : 280 nm

Postime : 3 min

Gradient d'élution :

Temps (min)	0	0,5	3
Solvant A (%)	0	0	0
Solvant B (%)	100	100	100

Appareillage Masse : Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF

Mode : positif/négatif

Débit de gaz de séchage : 9 L/min

Température gaz de séchage : 300 °C

Débit gaz de gaine : 11 L/min

Température gaz de gaine : 350 °C

Tension capillaire : 4000 V

Fragmenteur : 200 V

Gamme de masse : 100-3000 m/z

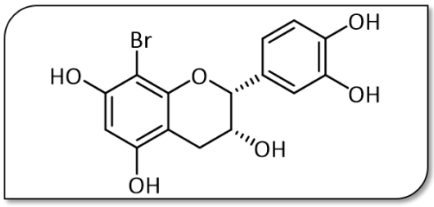
Figure 44 : Méthode de détection seulement en spectrométrie de masse des molécules synthétisées

B. Caractérisation des produits synthétisés

Pour chaque molécule synthétisée, une petite fiche a été créée avec le protocole pour la réaliser, les conditions de purification, le rendement et le traitement des spectres RMN.

♣ *3',4',5,7-tétra-O-benzyl-8-bromo-épicatéchine*

Protocole : Bromation de la position 8.



100 mg d'épicatéchine (0,34 mmol) ont été dissouts dans 5 mL de DMF. À -55 °C, 25 mg de NBS (0,49 mmol, 3,5 éq.), préalablement recristallisé, ont été ajoutés au milieu réactionnel. La solution a été agitée pendant 2 heures. À la suite de cette réaction, la purification a directement été réalisée sur le milieu réactionnel obtenu.

Purification : Chromatographie sur colonne SPE C18 avec du méthanol et de l'eau. Le gradient d'élution était le suivant :

- 100 mL d'H_2O avec 0,1 % d'acide formique,
- 200 mL à 15 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 30 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 50 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 100 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique.

Les molécules d'intérêt ont été trouvées dans les fractions à 30 % et 50 % de méthanol. Celles-ci ont été évaporées à sec. Une poudre blanche a été obtenue.

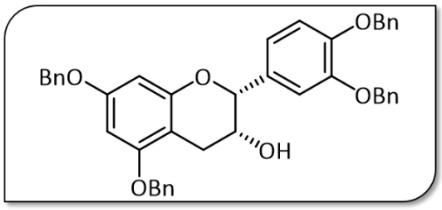
Rendement : 78 %

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD, ppm) : δ = 6,96 (H2', d, 1H, $J_{2',6'}$ = 2,1 Hz) ; 6,76 (H6', dd, 1H, $J_{6',5'}$ = 8,2 Hz, $J_{6',2'}$ = 1,7 Hz) ; 6,68 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$ = 8,2 Hz) ; 6,02 (H6 ou H8, s, 1H) ; 4,82 (H2, s, 1H) ; 4,15 (H3, m, 1H) ; 2,80 et 2,68 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,8 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 4,3 Hz et $J_{4\beta,3}$ = 2,5 Hz).

MS (QTOF) : m/z = 367,9853 mesurée pour $[M-H]^-$, m/z = 367,9895 $[M-H]^-$ calculée pour $C_{15}H_{13}O_6Br$ (9 diff ppm).

♣ *3', 4', 5, 7-tétra-O-benzylépicatéchine*

Protocole : Benzylation des fonctions phénols.



Après dissolution de 1 g d'épicatéchine (3,35 mmol) dans 15 mL de DMF, 2,86 g de carbonate de potassium (20,7 mmol, 6 éq.) et 1,8 mL de bromure de benzyle (15,5 mmol, 6 éq.) ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a alors été agité à 0 °C pendant 2 heures puis à température ambiante pendant 48 heures. Après ce temps, le milieu a été dilué dans 100 mL d'acétate d'éthyle et ensuite lavé à la saumure. Après une extraction liquide-liquide, la phase organique a alors été séchée au sulfate de magnésium et le solvant a été alors évaporé à sec. Un solide de couleur blanche a été obtenu après purification.

Purification : Chromatographie flash sur gel de silice avec comme solvant 100 % de dichlorométhane. Les solvants ont été évaporés à sec pour obtenir au final une poudre jaunâtre.

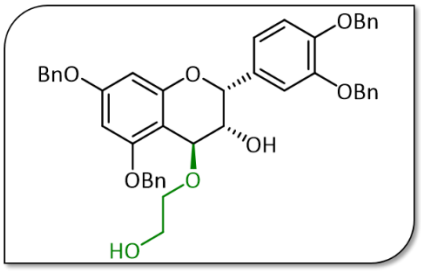
Rendement : 82 %

RMN ^{1}H (600 MHz, CDCL$_3$, ppm): δ = 7,45 - 7,28 ($H_{aromatiques}$, m, 20 H) ; 7,14 (H2', d, 1H, $J_{2', 6'}$ = 1,8 Hz) ; 6,98 (H6', dd, 1H, $J_{6', 5'}$ = 8,4 Hz, $J_{6', 2'}$ =1,7 Hz) ; 6,97 (H5', d, 1H, $J_{5', 6'}$ = 8,4 Hz) ; 6,26 (H6 et H8, s, 1H) ; 5,17 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,15 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,00 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,99 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,88 (H2, s, 1H) ; 4,18 (H3, m, 1H) ; 2,99 et 2,96 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\,\alpha,4\beta}$ = 17,2 Hz, $J_{4\alpha,\,3}$ = 1,7 Hz et $J_{4\beta,\,3}$ = 4,5 Hz).

MS (QTOF) : m/z = 649,2662 mesurée pour $[M-H]^-$, m/z = 649,2618 $[M-H]^-$ calculée pour $C_{43}H_{37}O_6$ (6 diff ppm).

♣ *3', 4', 5, 7-tétra-O-benzyl-4β— (2-hydroxyéthyloxy) épicatéchine*

Protocole : Fonctionnalisation avec l'éthylène glycol de la position 4.



800 mg d'épicatéchine benzylée (1,23 mmol) ont été dissous dans 40 mL de dichlorométhane. À ce mélange, 1,22 mL (22 mmol, 20 éq.) d'éthylène glycol ainsi que 558 mg de DDQ (2,46 mmol, 2 éq.) ont été ajoutés. L'addition du DDQ fait apparaitre un précipité vert instantanément dans le milieu réactionnel et en suivant la solution a été agitée pendant 3 heures à température ambiante. Après cette période de temps, 600 mg (4,91 mmol, 4 éq.) ont été ajoutés dans le milieu réactionnel et l'agitation fut poursuivie pendant 10 min. Après purification, une poudre blanc-jaunâtre a été obtenue.

Purification : Chromatographie flash sur gel de silice avec comme solvant 50 % éther de pétrole et 50 % acétate d'éthyle. Les solvants ont été évaporés à sec pour obtenir au final une poudre blanche.

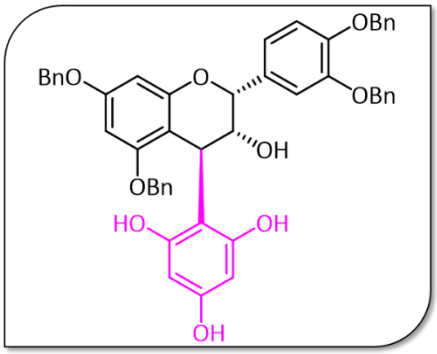
Rendement : 80 %

RMN ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,49 - 7,35 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20 H) ; 7,16 (H2', d, 1H, $J_{2', 6'}$ = 1,7 Hz) ; 7,04 (H6', dd, H1, $J_{6', 5'}$ = 8,4 Hz, $J_{6', 2'}$ = 1,6 Hz) ; 6,99 (H5', d, 1H, $J_{5', 6'}$ = 8,3 Hz) ; 6,30 (H8 et H6, dd, 2H, $J_{8, 6}$ = 21,5 Hz) ; 5,21 (CH_2Bn, s, 1H) ; 5,20 (CH_2Bn, s, 1H) ; 5,12 (CH_2Bn, s, 1H) ; 5,10 (H2, s, 1H) ; 5,03 (CH_2Bn, s, 1H) ; 4,62 (H4, d, 1H, $J_{4, 3}$ = 2,7 Hz) ; 3,98 (H3, m, 1H) ; 3,83 - 3,60 (H9 et H10, m, 4H).

MS (QTOF) : m/z = 709,2818 mesurée pour $[M-H]^-$, m/z = 709,2801 $[M-H]^-$ calculée pour $C_{45}H_{41}O_8$ (2,3 diff ppm).

♣ *3', 4', 5, 7-tétra-O-benzyl-4β— (benzène-1, 3, 5-triol) épicatéchine*

Protocole : Fonctionnalisation avec le phloroglucinol de la position 4.



544 mg d'épicatéchine benzylée fonctionnalisé par l'éthylène glycol (0,76 mmol) ont été dissous dans 3 mL de THF et en parallèle, 115,8 mg de phloroglucinol (0,92 mmol, 1,2 éq.) ont été dissous dans 3 mL de dichlorométhane. Les deux solutions ont été mélangées et 1,53 mL de $TiCl_4$ (1,53 mmol, 2 éq.) ont été ajoutés goutte à goutte à 0 °C au milieu réactionnel mélangé. La solution, devenue alors rouge brique en présence du $TiCl_4$, a été agitée pendant 3 heures à température ambiante. Passé ce laps de temps, 15 mL d'une solution saturée en $NaHCO_3$ et 10 mL d'eau ont été additionnés lentement au milieu réactionnel. Un précipité blanc de $TiO_2.\times H_2O$ a été éliminé par filtration et rincé avec du dichlorométhane et de l'eau. En suivant, la phase organique a été lavée avec de la saumure et la phase aqueuse a été extraite avec du dichlorométhane. Après avoir mis en commun les phases organiques, celles-ci ont été séchées sur $MgSO_4$ et après évaporées à sec.

Purification : Chromatographie flash sur gel de silice avec comme solvant 80 % pentane et 20 % acétate d'éthyle. Les solvants ont été évaporés à sec pour obtenir au final une poudre rose.

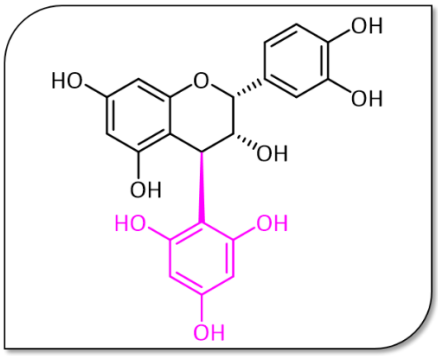
Rendement : 59 %

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,33 – 7,18 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20 H) ; 7,06 (H2', d, 1H) ; 6,88 (H6', dd, 1H, $J_{6', 5'}$ = 7,3 Hz) ; 6,78 (H5', d, 1H) ; 6,29 et 6,14 (H8 et H6, dd, 2H) ; 6,16 [$H_{phloroglucinol}$, dd, 2H, $J_{3'', 5''}$ = 5,0 Hz] ; 5,09 (CH_2Bn, s, 1H), 4,99 (CH_2Bn, s, 1H) ; 4,93 (CH_2Bn, s, 1H) ; 4,91 (CH_2Bn, s, 1H) ; 4,76 (H2, s, 1H) ; 4,53 (H4, d, 1H) ; 3,98 (H3, m, 1H).

MS (QTOF) : m/z = 775,1375 mesurée pour $[M-H]^-$, m/z = 775,2907 $[M-H]^-$ calculée pour $C_{49}H_{43}O_9$ (19 diff ppm).

♣ *4β – (benzène-1, 3, 5-triol) épicatéchine*

Protocole : Débenzylation de l'épicatéchine fonctionnalisé en position 4 avec du phloroglucinol.



50 mg de l'épicatéchine benzylée fonctionnalisée en position 4 par du phloroglucinol (0,064 mmol) ont été dissous dans 2 mL d'acétate d'éthyle et 2 mL de méthanol. Par la suite, 30 mg de catalyseur de Pearlman $Pd(OH)_2/C$ à 20 % (0,16 mmol, 2,6 éq.) et 87 µL de triéthylamine (0,64 mmol, 10 éq.) ont été ajoutés au milieu réactionnel. La solution a alors été agitée pendant 19 heures à température ambiante sous H_2. Après filtration du milieu réactionnel et lavage à l'acétate d'éthyle, le solvant a été évaporé à sec.

Purification : Chromatographie sur colonne SPE C18 avec du méthanol et de l'eau. Le gradient d'élution est le suivant :

- 100 mL d'H_2O avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 4 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 8 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 100 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique.

Les molécules d'intérêt ont été trouvées dans les fractions à 4 % de méthanol. Celles-ci ont été évaporées à sec. Une poudre blanche a été obtenue.

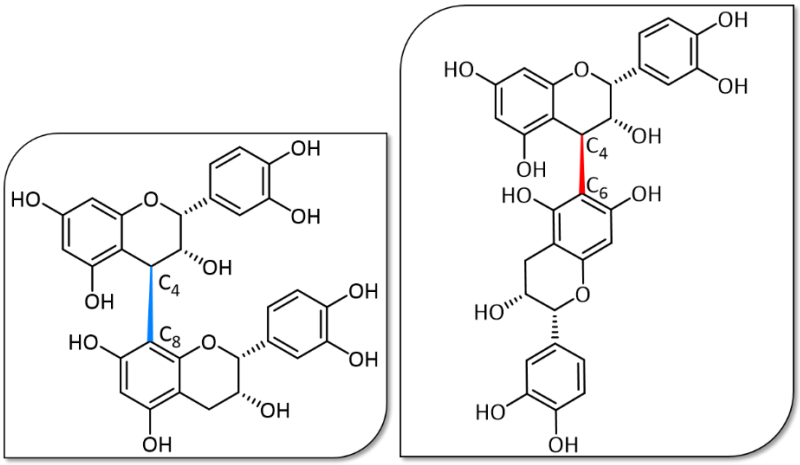
Rendement : 100 %

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD, ppm) : δ = 6,79 (H2', d, 1H, $J_{2',6'}$ = 1,8 Hz) ; 6,63 (H5', 1H, d, $J_{5',6'}$ = 8,1 Hz) ; 6,59 (H6', 1H, dd, $J_{6',5'}$ = 8,3, $J_{6',2'}$ = 2,0 Hz) ; 5,90 (H6 et H8, 2 H, dd, $J_{6,8}$ = 21,4 Hz) ; 5,75 – 5,73 ($H_{phloroglucinol}$, m, 2H) ; 4,93 (H2, s, 1H) ; 4,41 (H4, 1H, d) ; 3,84 (H3, 1H, m).

MS (QTOF) : m/z = 413,0913 mesurée pour $[M-H]^-$, m/z = 413,0872 $[M-H]^-$ calculée pour $C_{21}H_{17}O_9$ (10 diff ppm).

♣ *Formation des dimères B2 et B5 en mélange*

Protocole : Couplage en milieu acide faible avec HCl.



250 mg d'épicatéchine non-benzylée fonctionnalisé par le phloroglucinol (0,605 mmol) ont été dissous dans 5 mL de méthanol. En suivant, 87 mg d'épicatéchine seule (1,8 10^{-2} mol, 3 éq.) a été ajoutés dans le milieu réactionnel. La réaction commence à l'ajout des 2 % d'HCl. Une cinétique réactionnelle a été réalisée sur 6 heures de temps avec un prélèvement fait toutes les heures.

Purification : Chromatographie sur colonne SPE C18 avec du méthanol et de l'eau. Le gradient d'élution est le suivant :

- 100 mL d'H_2O avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 5 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 10 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 15 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 20 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 30 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 50 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 100 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique.

Les molécules d'intérêt ont été trouvées dans les fractions à 30 % et 50 % de méthanol. Celles-ci ont été évaporées à sec. Une poudre marron a été obtenue.

Rendement : 60 %

Dimère B2 :

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD, ppm) : δ = 6,87 (H2'B, d, 1H, $J_{2'B, 6'B}$ = 1,8 Hz), 6,78 (H2'E, m, 1H), 6,74 (H6'B, 1H, m), 6,71 (H5'B et H5'E, m, 2H), 6,69 (H6'E, d, 1H, $J_{2'E, 6'E}$ = 1,8 Hz), 5,84 (H6D, d, 1H, $J_{6D, 8D}$ = 2,3 Hz),

5,82 (H6A, s, 1H), 5,81 (H8A, d, 1H, $J_{8DA, 6 DA}$ = 2,3 Hz), 4,94 (H2C, m, 1H), 4,72 (H2F, m, 1H), 4,53 (H4C, m, 1H), 4,08 (H3C, m, 1H), 3,80 (H3F, m, 1H), 2,75 et 2,65 (H 4 Fα et H 4 Fβ, ABX, 2H, $J_{4Fα, 4 Fβ}$ = 16,9).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD, ppm) : δ = 158,2 (C7D) ; 158,1 (C8aA) ; 158,0 (C8aD) ; 157,8 (C5D) ; 157,7 (C7A) ; 157,4 (C5A) ; 146,0 (C4'B) ; 145,9 (C3'B) ; 145,8 (C4'E) ; 145,63 (C3'E) ; 135,6 (C1'E) ; 134,9 (C1'B) ; 119,4 (C6'E) ; 119,3 (C6'B) ; 116,1 (C5'B) ; 116,0 (C5'E) ; 115,3 (C2'E) ; 115,2 (C2'B) ; 109,6 (C8D) ; (C4aA) ; 100,0 (C4aD) ; 96,4 (C6D) ; 96,1 (C8A) ; 95,8 (C6A) ; 79,9 (C2F) ; 77,1 (C2C) ; 73,5 (C3C) ; 67,0 (C3F) ; 37, 2 (C4C) ; 29,7 (C4F).

Dimère B5 :

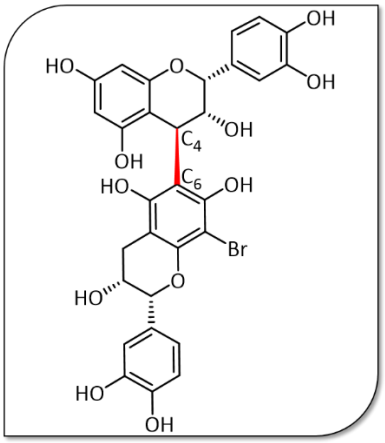
RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD, ppm) : δ = 7,02 (H2'B, m, 1H, $J_{2'B, 6'B}$ = 1,7 Hz), 6,94 (H2'E, d, 1H), 6,83 (H6'B, m, 1H), 6,81 (H6'E, m, 1H, $J_{2'E, 6'E}$ = 1,4 Hz), 6,79 (H5'B, d, 1H), 6,73 (H5'E, d, 1H), 6,04 (H8D, s, 1H), 5,99 (H6A, dd, 1H, $J_{6DA, 8DA}$ = 2,1 Hz), 5,97 (H8A, dd, 1H, $J_{8DA, 6DA}$ = 2,1 Hz), 4,96 (H2C, m, 1H), 4,95 (H2F, m, 1H), 4,61 (H4C, s, 1H), 4,21 (H3C, m, 1H), 4,07 (H3F, m, 1H), 2,89 et 2,80 (H 4 Fα et H 4 Fβ, ABX, 2H, $J_{4Fα, 4 Fβ}$ = 16,7).

RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD, ppm) : δ = 158,0 (C7D) ; 157,9 (C8aA) ; 157,7 (C8aD) ; 157,6 (C5D) ; 157,4 (C7A) ; 157,2 (C5A) ; 146,0 (C4'B) ; 145,8 (C3'B) ; 145,8 (C4'E) ; 145,7 (C3'E) ; 132,3 (C1'E) ; 132,2 (C1'B) ; 119,4 (C6'E) ; 119,2 (C6'B) ; 116,1 (C5'B) ; 116,0 (C5'E) ; 115,3 (C2'E) ; 115,2 (C2'B) ; 100,7 (C6D) ; 100,1 (C4aA) ; 100,0 (C4aD) ; 97,0 (C8D) ; 96,4 (C8A) ; 95,8 (C6A) ; 79,8 (C2F) ; 79,7 (C2C) ; 67,5 (C3F) ; 67,4 (C3C) ; 34,4 (C4C) ; 30,4 (C4F).

MS (QTOF) : **B2** : m/z = 577,1410 mesurée pour $[M-H]^-$, m/z = 577,1346 $[M-H]^-$ calculée pour $C_{30}H_{25}O_{12}$ (11 diff ppm) ; **B5** : m/z = 577,1415 mesurée pour $[M-H]^-$, m/z = 577,1346 $[M-H]^-$ calculée pour $C_{30}H_{25}O_{12}$ (12 diff ppm)

♣ *Formation du B5 seul*

Protocole : Couplage en milieu acide faible avec HCl.



61 mg d'épicatéchine non-benzylée fonctionnalisé par le phloroglucinol (0,147 mmol) ont été dissous dans 5 mL de méthanol. En suivant, 108 mg d'épicatéchine bromée en position 8 (0,294 mmol, 2 éq.) a été ajoutés dans le milieu réactionnel. La réaction a commencé à l'ajout des 2 % d'HCl. Une cinétique réactionnelle a été réalisée sur 6 heures de temps avec un prélèvement fait toutes les heures.

Purification : Chromatographie sur colonne SPE C18 avec du méthanol et de l'eau. Le gradient d'élution est le suivant :

- 100 mL d'H_2O avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 5 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 10 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 15 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 20 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 30 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 50 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique,
- 50 mL à 100 % de méthanol avec 0,1 % d'acide formique.

Les molécules d'intérêt ont été trouvées dans les fractions à 30 % et 50 % de méthanol. Celles-ci ont été évaporées à sec. Une poudre marron a été obtenue.

Rendement : 52 %

RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD, ppm) : δ = 6,89 (H2'B, d, 1H, $J_{2'B, 6'B}$ = 1,8 Hz), 6,80 (H2'E, m, 1H), 6,76 (H6'B, 1H, m), 6,73 (H5'B et H5'E, m, 2H), 6,71 (H6'E, d, 1H, $J_{2'E, 6'E}$ = 1,8 Hz), 5,84 (H6A, s, 1H), 5,82 (H8A, d, 1H, $J_{8D, 6D}$ = 2,3 Hz), 4,96 (H2C, m, 1H), 4,83 (H2F, m, 1H), 4,62 (H4C, m, 1H), 4,12 (H3C, m, 1H), 3,90 (H3F, m, 1H), 2,85 et 2,75 (H 4 Fα et H 4 Fβ, ABX, 2H, $J_{4F\alpha, 4 F\beta}$ = 16,9).

MS (QTOF) : m/z = 655,0495 mesurée pour $[M-H]^-$, m/z = 655,0529 $[M-H]^-$ calculée pour $C_{30}H_{25}O_{12}Br$ (5 diff ppm).

Chapitre 3 :

Les tanins couronnes dans la vigne

Les tanins couronnes ont été découverts pour la première fois dans le vin rouge durant la thèse de Liming Zeng [20]. Malgré le grand nombre d'analyses réalisées afin d'identifier et de caractériser ces nouvelles molécules, leurs origines et leurs localisations n'avaient alors pas été explorées. Dans la partie suivante, les origines, la localisation ainsi que la quantification des tanins couronnes dans la vigne ont été étudiées.

I. Localisation et extraction des tanins couronnes dans la baie de raisin

Les tanins couronnes ont été découverts dans un vin rouge commercial. Deux hypothèses concernant leur origine ou leur formation ont alors été postulées. Hypothèse 1, les tanins couronnes sont présents dans le raisin et sont alors extraits durant la vinification pour se retrouver dans le vin. Hypothèse 2, les tanins couronnes sont formés au cours de la vinification et de l'élevage. Afin de définir l'hypothèse correcte, des extractions en laboratoire sur les différentes parties de la baie de raisin ont été réalisées [244]. En parallèle, le développement d'une méthode d'extraction de l'intégralité des tanins couronnes dans le matériel végétal a été entrepris.

A. La localisation des tanins couronnes dans la baie de raisin

Afin de localiser les tanins couronnes dans la baie de raisin, les différentes parties de la baie de Merlot et de Cabernet-Sauvignon ont été séparées manuellement (pellicules, pépins, rafles et pulpes) avant d'être extraites afin de vérifier la présence des tanins couronnes dans la baie et de localiser la ou les parties de la baie d'où ils proviennent (**Figure 45**). Les échantillons utilisés étaient des échantillons provenant de sept parcelles différentes de la région bordelaise et les raisins ont été récoltés à maturité (~ 230 sucres en $g.L^{-1}$, ~ 3,3 AT $g.L^{-1}$ d'H_2SO_4).

Les pellicules et les pépins en particulier ont été respectivement séparés de la pulpe. Ces deux parties ont alors été lavées avec de l'eau distillée afin d'éliminer le sucre et de possibles restes de pulpe. Les différentes parties ont alors été congelées afin d'être par la suite lyophilisées pendant 48 h. La lyophilisation permettra de conserver plus longtemps les échantillons sans que ceux-ci ne se dégradent. Après que les échantillons aient été déshydratés, ceux-ci ont été broyés au mortier avant d'être soumis à une extraction solide-liquide.

Echantillon de rafles

Echantillon de pellicules

Echantillon de pépins

Figure 45 : Différents échantillons de végétaux de la baie de raisin lyophilisés

Ainsi, par la suite, 500 mg de poudre de pépin, de pellicule ou de rafles ont été extraits en utilisant un mélange de 40/60 (v/v) méthanol/eau acidifié à 0,1 % d'acide formique pendant 16 h. La pulpe a-elle aussi été soumise à une procédure d'extraction identique mais sans lyophilisation. Toutes les extractions ont été réalisées en triplicat pour toutes les parcelles et les deux cépages. Tous les échantillons ont alors été injectés en UPLC-UV-ESI-QTOF, les chromatogrammes ayant alors été analysés pour tous les échantillons provenant de toutes les parties végétales extraites.

Dans la pulpe après extraction aucun pic n'a été détecté en UPLC-UV-ESI-QTOF pour les ions moléculaires m/z 1153,2615 et 1441,3242 caractéristiques du tétramère et des pentamères couronnes respectivement. Ce résultat est peu surprenant puisque les composés phénoliques majoritaires de la pulpe sont principalement les acides phénols et que cette dernière ne contient pas de tanins condensés.

Pour l'extraction réalisée sur les pépins, l'extraction des ions moléculaires, suite à l'analyse en UPLC-UV-ESI-QTOF, a montré qu'aucune procyanidine couronne n'était présente dans les pépins, peu importe l'échantillon testé (**Figure 46**). Ces résultats étaient étonnants vu que dans la baie de raisin, le pépin possède une majorité de procyanidine. De plus, les tanins couronnes recherchés, notamment le tétramère couronne dont la structure a été déterminée par RMN, sont composés uniquement d'épicatéchine qui est l'un des monomères principaux des tanins condensés localisés dans les pépins. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les rafles des deux cépages (**Figure 47**).

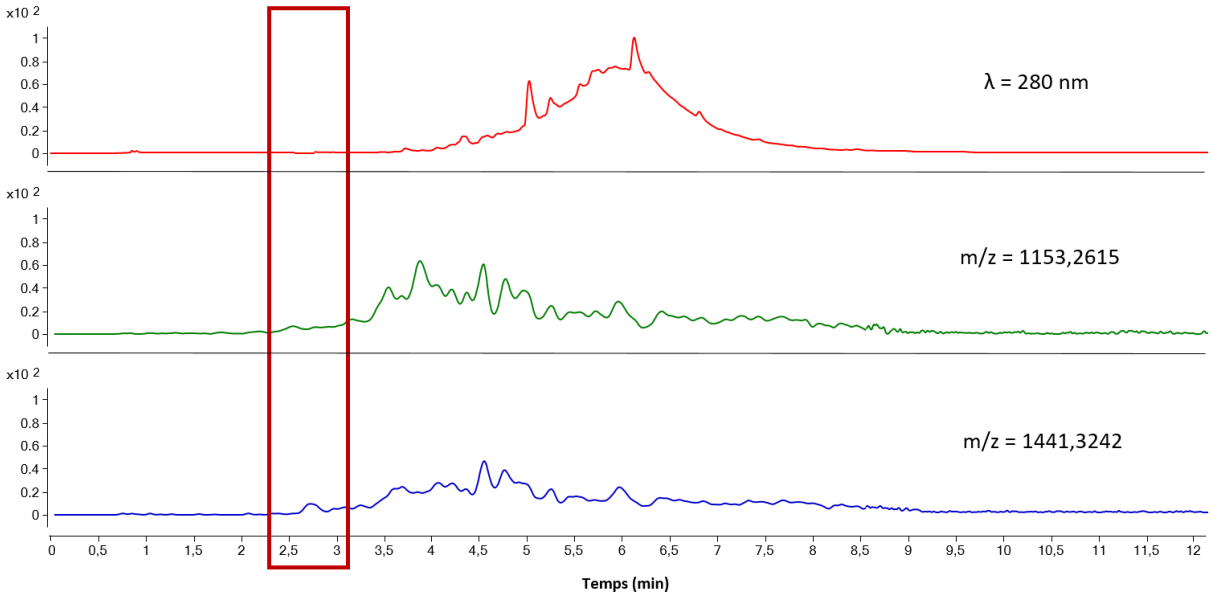


Figure 46 : Chromatogramme d'un échantillon de pépins

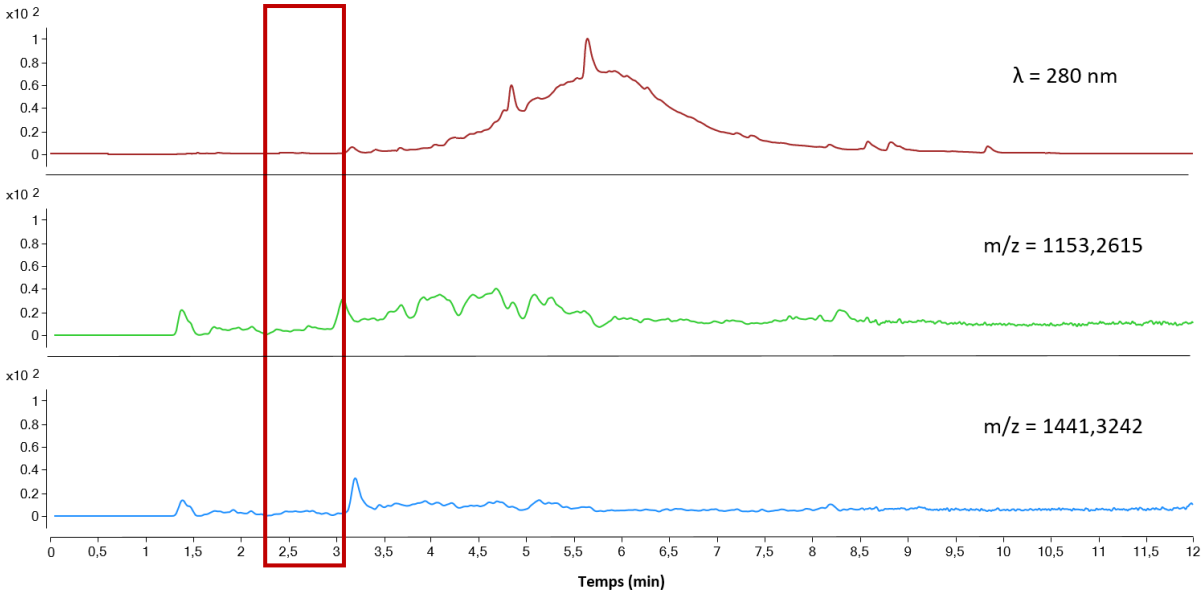


Figure 47 : Chromatogramme d'un échantillon de rafles

Enfin, concernant les extractions des pellicules, les résultats obtenus pour l'extraction des ions moléculaires m/z 1153,2615 et m/z 1441,3242 ont montré, pour chacun d'eux, la présence d'un pic correspondant au tétramère couronne et d'un pic correspondant aux deux pentamères couronnes co-élués (**Figure 48**). Ce résultat a été vérifié pour les 14 échantillons testés, peu importe le cépage ou la parcelle. Les tanins couronnes sont donc spécifiquement localisés dans la pellicule des raisins dans le cas du Merlot et du Cabernet-Sauvignon. Au vu de la structure du tétramère couronne composée uniquement d'épicatéchine et de la composition monomérique des tanins condensés localisés dans la pellicule du raisin (composé principalement d'epigallocatéchine), ce résultat est d'autant plus

surprenant et inattendu. Ce résultat questionne notamment sur les raisons de cette localisation spécifique de cette famille de composé, sur leur biosynthèse et surtout est-ce que cela est spécifique au Merlot et au Cabernet-Sauvignon ou est-ce que cela est également retrouvé dans les autres cépages ?

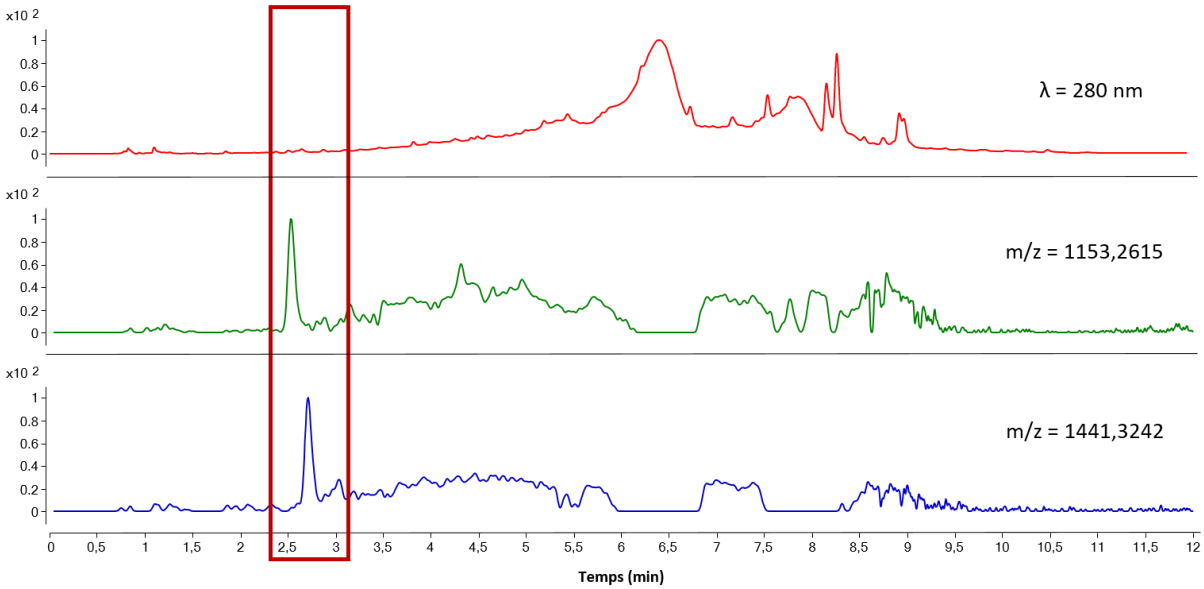


Figure 48 : Chromatogramme d'un échantillon de pellicules

B. La méthode d'extraction des tanins couronnes dans le matériel végétal

Après avoir découvert que les tanins couronnes étaient exclusivement présents la pellicule de la baie de raisin, une méthode d'extraction permettant d'extraire la totalité de ceux-ci du matériel végétal a été développée. Afin de trouver le meilleur solvant pour extraire la totalité des tanins couronnes du raisin et ainsi pouvoir utiliser cette procédure d'extraction pour comparer différents cépages ou échantillons entre eux, des tests d'extractions avec les solvants ci-dessous ont été réalisés :

- Solvant 1 : 70/30 (v/v) acétone/eau suivi de 40/60 (v/v) méthanol/eau
- Solvant 2 : 70/30 (v/v) acétone/eau suivi de 40/60 (v/v) méthanol/eau avec chaque solvant acidifié à 5 $g.L^{-1}$ d'acide tartrique
- Solvant 3 : Solution modèle de vin (solution à 12 % d'éthanol avec 5 $g.L^{-1}$ d'acide tartrique et le pH à 3,5)

Les tests de solvant ont été réalisés sur des broyats de pellicule de Cabernet-Sauvignon. 500 mg de pellicule ont alors été extraits par 5 mL (soit un ratio solide liquide de 1 pour 10) de chaque solvant sous agitation mécanique et dans un vial à l'abri de l'oxygène. La première extraction durait 16 h et,

en suivant, le surnageant a été récupéré après centrifugation pendant 15 min à 4500 rpm. Ensuite, le surnageant a été conservé et à nouveau 5 mL du même solvant ont été rajoutés aux pellicules déjà extraites une première fois. Débute alors une deuxième extraction de 16 h. Les deux surnageants sont alors combinés, évaporés à sec, filtrés et repris dans 1 mL d'eau Milli-Q. Les différents échantillons obtenus en fonction des solvants d'extraction utilisés ont été injectés et analysés en UPLC-UV-ESI-QTOF avec la méthode développée pour détecter les tanins couronnes : m/z 1153,2615 pour le tétramère couronne et m/z 1441,3242 pour les pentamères couronnes.

Le solvant 1 correspondait aux extractions successives avec 70/30 (v/v) acétone/eau suivies de 40/60 (v/v) méthanol/eau sans ajout d'aucun acide. Les extractions avec ce solvant ont été injectées et de faibles quantités d'ions moléculaires m/z 1153,2615 et m/z 1441,3242 au temps de rétention des tanins couronnes, tétramère ou pentamères, ont été détectés. Concernant le second mélange de solvant, correspondant aux extractions successives avec 70/30 (v/v) acétone/eau suivies de 40/60 (v/v) méthanol/eau avec chaque solvant acidifié à 5 $g.L^{-1}$ d'acide tartrique, le tétramère et les pentamères couronnes ont pu être identifiés. De façon identique, l'utilisation du solvant 3 a également conduit à l'extraction et l'identification des composés. Le rendement d'extraction a été le meilleur avec le solvant 2 par rapport aux solvants 1 et 3. Néanmoins, malgré cette très bonne extraction du solvant 2, celui-ci n'a pas extrait la totalité des tanins couronnes en seulement deux extractions solide-liquide successives. Cependant, ces tests de solvant ont montré que l'extraction des couronnes se faisait plus efficacement dans un milieu acidifié.

Les investigations afin de trouver le nouveau solvant se sont donc poursuivies. Comme dit précédemment, cette nouvelle sous-famille de tanins condensés est beaucoup plus hydrophile et polaire que les tanins condensés classiques. Dans cette optique et au vu des premiers solvants testés, des solvants composés majoritairement d'eau et toujours acidifiés ont été utilisés. Différents types d'acides organiques ont alors été testés. L'acide formique a été choisi, car il est plus facile à éliminer par évaporation et c'est également l'acide présent dans les solvants utilisés en UPLC-UV-ESI-QTOF. Au final, le solvant conduisant au meilleur rendement d'extraction des tanins couronnes est un mélange de 40/60 (v/v) méthanol/eau acidifié avec 0,1 % d'acide formique.

Ayant pour objectif d'avoir une méthode pouvant permettre l'extraction d'un grand nombre d'échantillons, l'optimisation du temps de contact solide-liquide est un paramètre également important comme peut l'être le solvant utilisé. Ainsi, une séquence d'extraction enchaînant une extraction de 16 h (réalisée durant la nuit) suivie d'une extraction de 8 h (durant la journée) a été testée avec collecte du surnageant à chaque temps et ajout de 5 mL de solvant frais. Cette séquence d'extraction étant moins chronophage que des blocs de 16 h comme testés précédemment. Au total,

6 extractions successives ont été réalisées correspondant à 3 jours d'extraction en tout. Chaque fraction a alors été injectée séparément afin de suivre la cinétique d'extraction des tanins couronnes jusqu'à épuisement complet de la matière première. Il s'est avéré qu'au bout de trois fractions (16 h-8 h-16 h), la totalité des tanins couronnes contenus dans l'échantillon étaient extraits, puisqu'aucune procyanidines couronnes n'ont été détectées par UPLC-UV-ESI-QTOF dans la 4ème extraction.

En conclusion, la méthode optimale pour l'extraction de la totalité des tanins couronnes des pellicules est une extraction avec un mélange de 40/60 (v/v) méthanol/eau acidifié à 0,1 % d'acide formique. La masse du matériel de départ est de 500 mg d'échantillons lyophilisés dans 5 mL de solvants, le temps d'extraction est de 16 h, 8 h et 16 h suivies de la collecte du surnageant entre chaque fraction et resuspension du matériel végétal avec 5 mL du mélange de solvant décrit ci-dessus. Les trois surnageants récupérés en fin d'extraction sont alors évaporés à sec ensemble et par la suite repris dans 2 mL d'eau Milli-Q (**Annexe 1**)

II. Quantification des tanins couronnes dans différents cépages

Une étude sur un large panel de cépages mondiaux a été entreprise pour déterminer s'il existait une variabilité de teneur en tanins couronnes en fonction des cépages et pour également confirmer la localisation spécifique des tanins couronnes dans la pellicule de la baie pour l'ensemble des cépages, comme observé pour le Merlot et le Cabernet-Sauvignon. Les échantillons utilisés pour cette étude proviennent d'une collaboration avec l'unité de recherche EGFV et en particulier la Dr. Agnès Destrac. Cette collaboration a permis d'obtenir des échantillons de raisin provenant d'une parcelle particulière nommée Vitadapt. Dans le cadre du projet Vitadapt mené par le Dr. Kess Van Leeuwen, cette parcelle expérimentale a pour but d'étudier l'évolution phénotypique de 52 cépages dans les conditions climatiques de la région Bordelaise. Sur les 52 cépages répertoriés, une trentaine, dont 27 cépages noirs et 3 cépages blancs, ont été collectés pour déterminer la teneur en tanins couronnes dans la baie de raisin (pépins et pellicules) (Voir Matériels et Méthodes II. A). L'étude a été réalisée pour trois millésimes consécutifs soit 2016, 2017 et 2018 sur les 30 mêmes cépages, l'Ugni blanc étant absent du millésime 2016. Enfin, une information essentielle et importante à retenir est que le seul paramètre variant dans cette étude est le cépage. En effet, les cépages ont tous été plantés dans le même sol, en utilisant le même porte-greffe, et avec une répartition en bloc de répétition ayant subi les mêmes conditions météorologiques et les mêmes traitements phytosanitaires. De plus, ils ont tous été collectés à un niveau de maturité identique. Selon un protocole de collecte stricte, 100 baies ont été ramassées pour chaque cépage. Pour un même cépage, les cent baies étaient récoltées sur les 5 blocs de chaque cépage répartis sur l'ensemble de la parcelle. Ainsi, les baies provenaient de différentes

grappes, sur différents pieds toutes collectées à maturité technologique du cépage. Ce protocole permet ainsi une homogénéisation et une représentativité de l'échantillonnage.

Après avoir été collectées, les baies de tous les cépages ont été pesées afin d'obtenir le poids de 100 baies pour chaque échantillon. Pour chaque cépage, les 100 baies ont été pelées et les pépins et les pellicules ont ensuite été rincés, congelés et lyophilisés. Débute alors le protocole d'extraction de la totalité des tanins couronnes en partant de 500 mg de broyat de pépins ou de pellicules lyophilisés dans 5 mL du mélange 60/40 (v/v) eau/méthanol acidifié à 0,1 % d'acide formique. À la fin du protocole d'extraction, réalisé en triplicat sur chacun des cépages, tous les échantillons ont été injectés en l'UPLC-UV-ESI-QTOF avec la méthode de quantification développée pour les procyanidines couronnes. La quantification a été réalisée pour le tétramère couronne et pour les pentamères couronnes. Les concentrations ont été déterminées grâce à une courbe de calibration réalisée avec le tétramère couronne pur et les concentrations sont exprimées en $mg.g^{-1}$ de pellicules lyophilisées. Dans le cas du pentamère couronne, ces concentrations sont exprimées en équivalent tétramère couronne. Les graphiques dans la suite de ce chapitre ont été réalisés pour chaque année, en classant les cépages du moins concentré au plus concentré, faisant varier la concentration en tétramère ou pentamère couronne en $mg.g^{-1}$ d'extrait sec en fonction du cépage.

A. Comparaison de la concentration en tétramère et en pentamères couronnes en fonction des cépages

Après avoir collecté sur la parcelle les raisins de 30 cépages, 27 cépages noirs et 3 cépages blancs nécessaires à notre étude, l'intégralité de ceux-ci ont été pelés et épépinés afin de conserver exclusivement les pellicules et les pépins. Tous les échantillons ont alors été congelés, lyophilisés et broyés afin d'obtenir une poudre de pellicules et de pépins. Ainsi, le protocole d'extraction développé pour extraire la totalité des tanins couronnes a débuté. Après avoir extrait toutes les pellicules et tous les pépins de chaque cépage, les extractions ont été injectées en UPLC-UV-ESI-QTOF, et les résultats des extraits de pépins et de pellicules ont été traités séparément.

Après avoir extrait et quantifié tous les échantillons de pépins provenant des 30 cépages différents de la parcelle Vitadapt, les échantillons ont été analysés. La présence des tanins couronnes n'est apparue dans aucun échantillon de pépins sur les 30 cépages analysés. Cette analyse a donc confirmé l'absence totale des tanins couronnes des pépins de la baie de raisin, rendant ainsi la localisation de ces nouvelles molécules cycliques exclusivement dans la pellicule de la baie de raisin.

Après avoir confirmé que les tanins couronnes sont absents des pépins de la baie de raisin, les investigations se sont poursuivies avec pour objectif l'étude de la variabilité des concentrations en

tanins couronnes en fonction du cépage sur trois millésimes consécutifs. Afin de traiter les résultats sous différents angles et au vu des différentes informations à discuter, les résultats des différents millésimes seront traités un par un pour le tétramère couronne et ensuite pour les pentamères couronnes. Ainsi, par la suite, la comparaison des millésimes entre eux sera étudiée pour enfin finir par la comparaison des résultats entre le tétramère et les pentamères couronnes. Pour une compréhension plus claire, les résultats pour l'année 2016 correspondent aux graphiques de couleur bleue, ceux de 2017 sont représentés en orange et ceux de 2018 en vert.

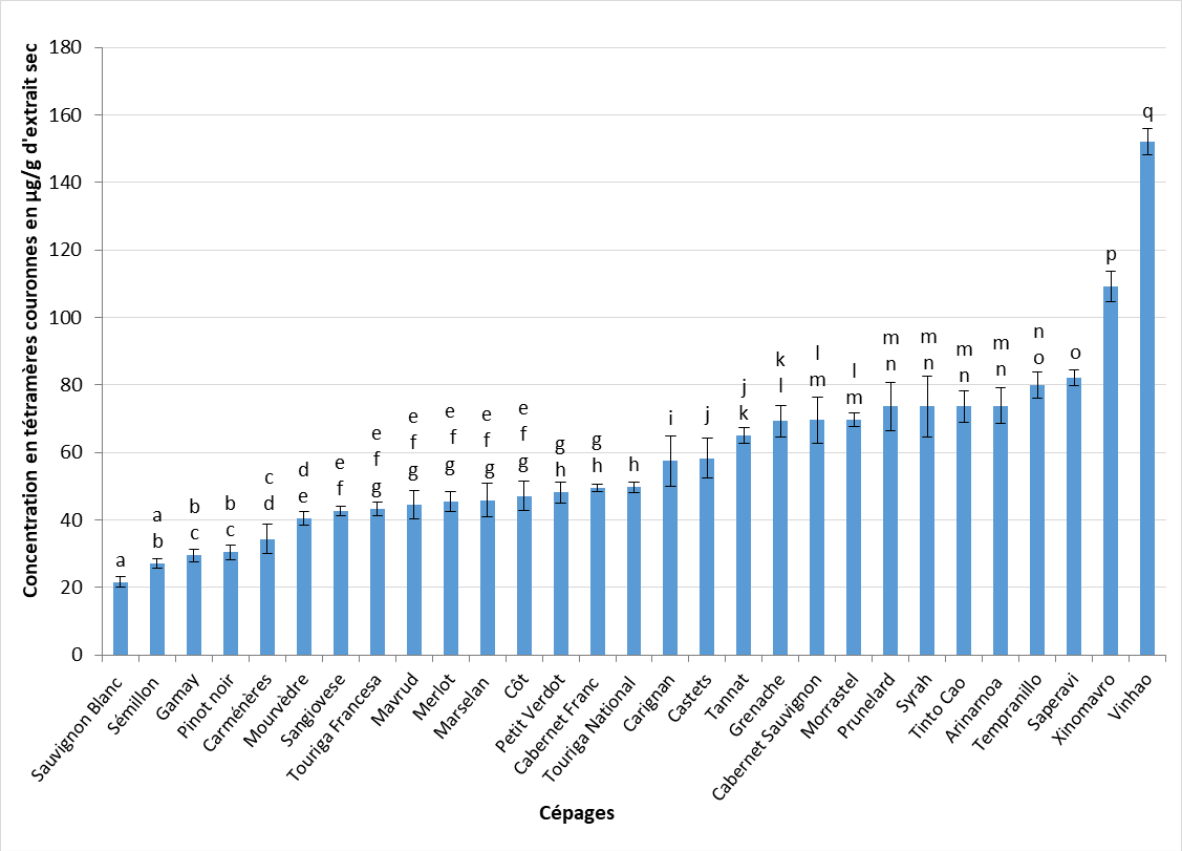


Figure 49 : Concentration en tétramère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2016

En 2016, les concentrations en tétramère couronne varient de 21 µg.g^{-1} de pellicules lyophilisées pour le cépage Sauvignon blanc jusqu'à 152 µg.g^{-1} pour le cépage Vinhao (**Figure 49**). Considérant les statistiques réalisées entre les différents échantillons analysés, toutes les concentrations en tétramère couronne pour chaque cépage ne sont pas forcément différentes de leur voisin. En effet, beaucoup de variétés ont des concentrations proches. En examinant les résultats de l'analyse statistique, l'histogramme peut se décomposer en 4 groupes : de Sauvignon blanc à Mourvèdre, de Sangiovese à Touriga National, de Carignan à Arinarnoa et enfin de Tempranillo à Vinhao. Cependant, cet histogramme apporte quand même un résultat majeur indiquant que les cépages blancs sont les

variétés les moins concentrées en tétramères couronnes et que les cépages teinturiers quant à eux sont les cépages les plus concentrés.

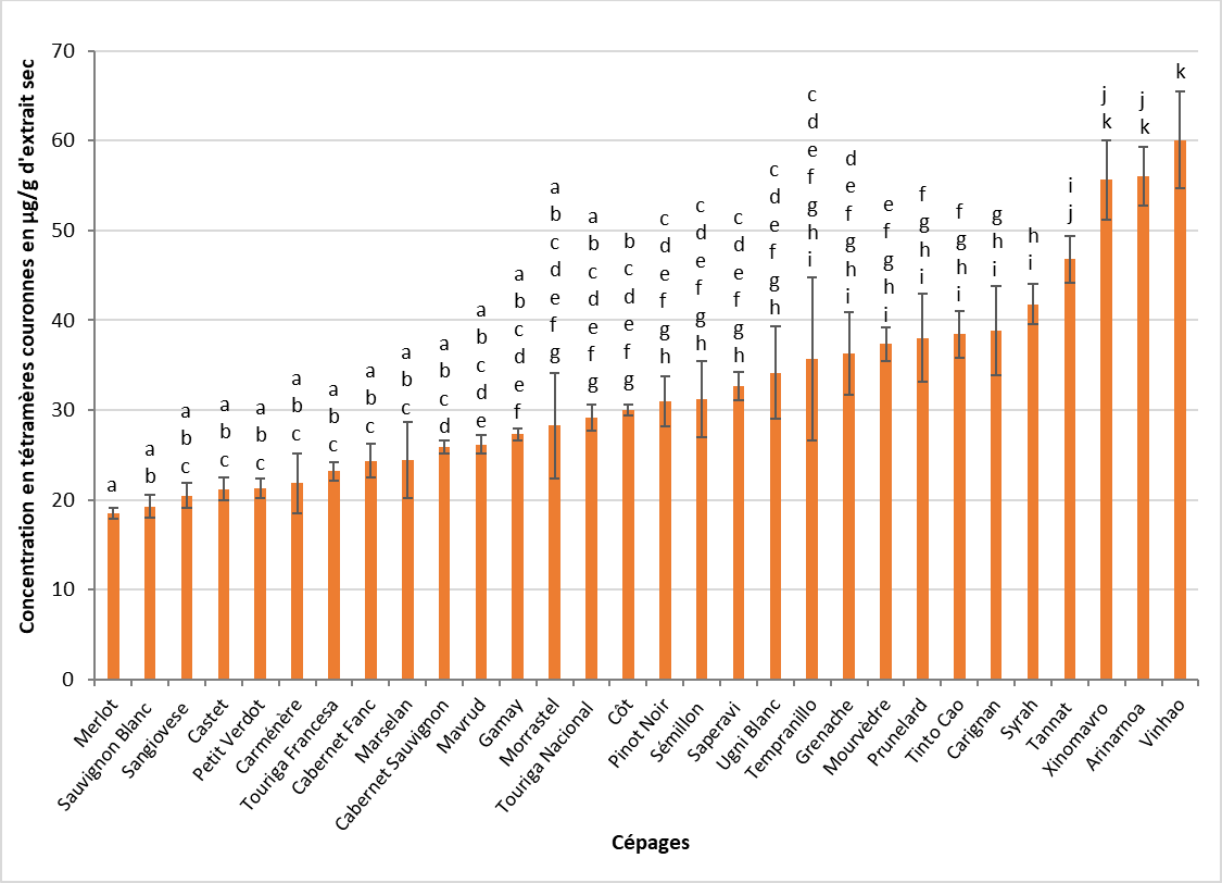


Figure 50 : Concentration en tétramère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2017

Pour le millésime 2017, les mêmes 30 cépages, plus l'Ugni blanc, provenant de la même parcelle ont de nouveau été récoltés à maturité et la concentration en tanins couronnes dans leurs pellicules a été déterminées par l'UPLC-UV-ESI-QTOF. Pour ce millésime, les concentrations en tétramère couronne varient de 18 µg.g^{-1} de pellicules lyophilisées pour le cépage Merlot jusqu'à 60 µg.g^{-1} pour le cépage Vinhao (**Figure 50**). Contrairement à 2016, les concentrations entre les cépages sont plus proches et donc les statistiques réalisées sur cet histogramme montrent beaucoup moins de différences entre les cépages même s'il existe un facteur trois entre les concentrations les plus faibles et les plus hautes. Trois groupes peuvent uniquement être définis sur la courbe : de Merlot à Touriga National, de Côt à Carignan et de Syrah à Vinhao. Bien que les concentrations observées soient presque deux fois plus faibles en 2017 que celles observées en 2016, ce sont malgré tout encore les cépages teinturiers qui ont les concentrations en tétramère couronne les plus élevées.

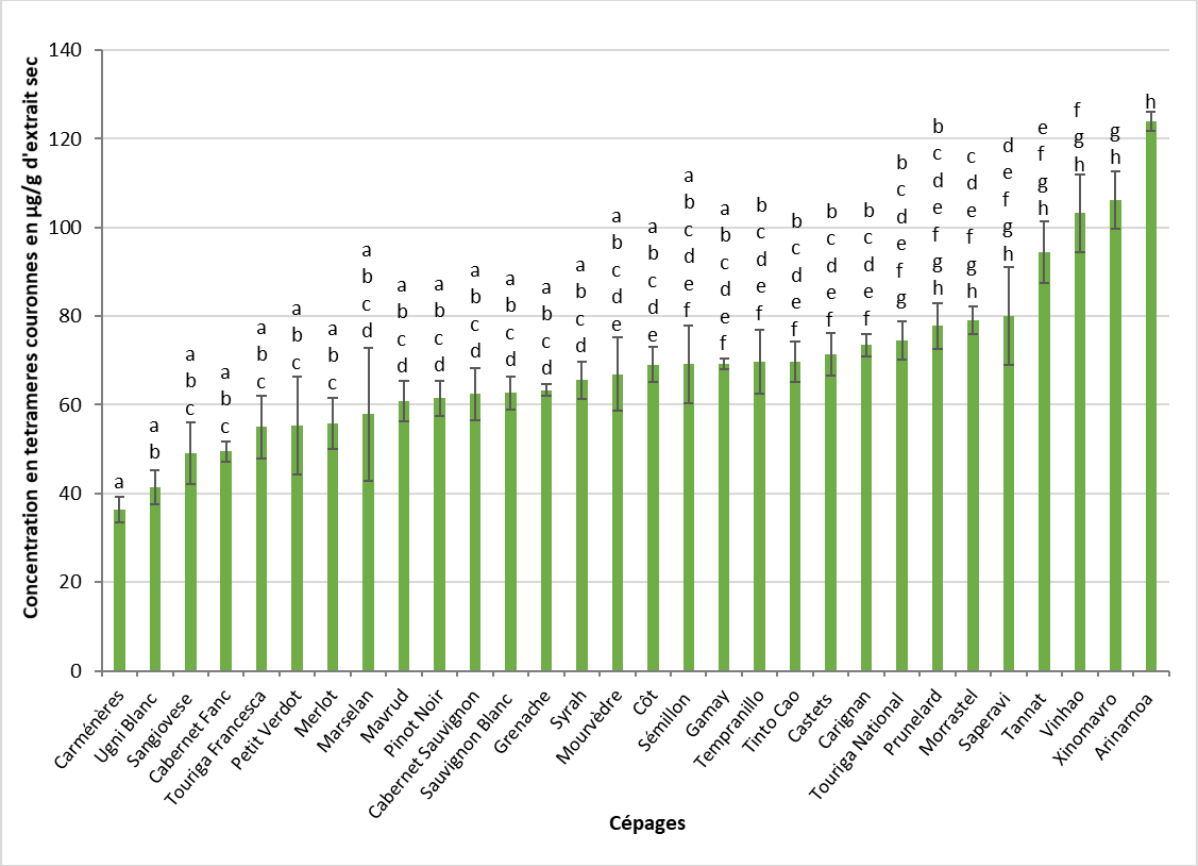


Figure 51 : Concentration en tétramère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2018

Pour le millésime 2018, les concentrations en tétramère couronne varient de 36 µg.g^{-1} de pellicules lyophilisées pour le cépage Merlot jusqu'à 123 µg.g^{-1} pour le cépage Arinarnoa (**Figure 51**). Comme observé sur les résultats du millésime 2017, la variation de concentration entre les cépages est plus resserrée qu'en 2016 et beaucoup moins de différences peuvent être observées statistiquement, bien que 3 groupes peuvent encore être définis : de Carménère à Syrah, de Mourvèdre à Prunelard et de Morastel à Arinarnoa. En revanche, la gamme de concentrations ressemble celle de 2016. Les cépages les plus concentrés sont soit les cépages teinturiers tels que le Vinhao ou le Saperavi, ou des cépages généralement riches en anthocyanes et en tanins condensés comme le Xinomavro, le Tannat ou l'Arinarnoa.

En résumé, au vu des observations réalisées sur les trois histogrammes montrant les concentrations en tétramères couronnes en fonction des cépages, il apparaît certaines tendances au niveau des groupes discutés plus haut pour chaque millésime, ces groupes pouvant se diviser en trois parties : le Groupe F (concentration faible), le groupe M (concentration moyenne) et le groupe H (concentration haute). Ils peuvent se différencier pour les trois millésimes. En effet, les cépages teinturiers et les cépages riches en polyphénols sont toujours les plus concentrés en tétramère couronne (Xinomavro, Vinhao, Tinto Cao), se trouvant ainsi dans le groupe H. Certaines variétés telles

que le Côt, le Prunelard ou même le Tempranillo ne changent pas de position d'un millésime à un autre, à l'inverse d'autres qui ne possèdent jamais la même position dans le classement tel que les cépages blancs, la Syrah voire même le Merlot changeant ainsi de groupes. Enfin, certains ont une concentration fluctuante d'une année sur l'autre, mais ne les faisant pas changer de groupe. C'est le cas pour le Tannat, le Carignan qui changent de position tout en restant dans le groupe H et du Petit Verdot ou du Carménère restant eux en position basse de l'histogramme dans le groupe F, l'influence du millésime affectant différemment les différents cépages.

Après avoir regardé la variabilité en tétramère couronne entre les cépages, les différences de concentrations en fonction des cépages pour les pentamères couronnes ont été déterminées en utilisant les mêmes échantillons que pour le tétramère. La même étude que précédemment avec le tétramère couronne a été réalisée sur les pentamères couronnes et les résultats seront traités dans le même ordre.

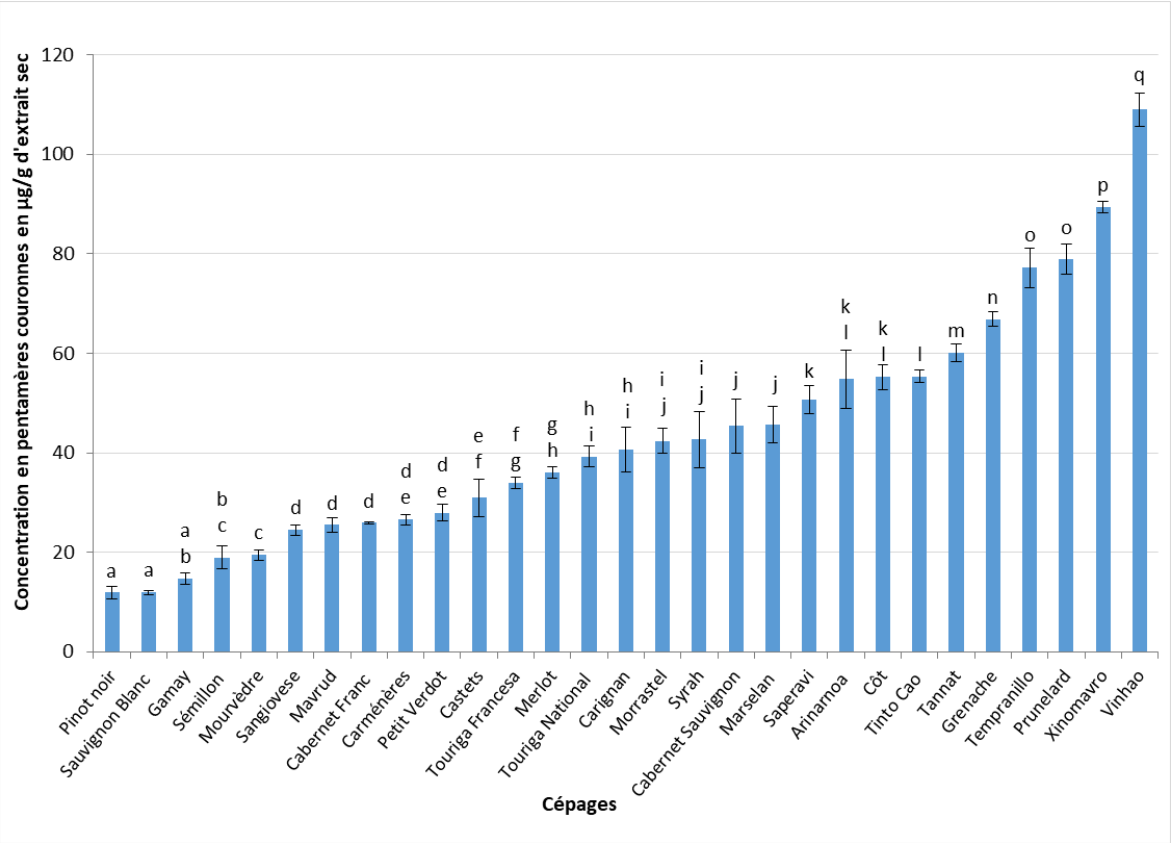


Figure 52 : Concentration en pentamère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2016

Pour les raisins récoltés en 2016, les concentrations en pentamères couronnes varient de 12 µg.g^{-1} de pellicules lyophilisées pour le cépage Pinot noir jusqu'à 109 µg.g^{-1} pour le cépage Vinhao. D'après les analyses statistiques, comme c'était le cas pour le tétramère, quatre groupes en fonction de leurs concentrations peuvent se détacher de l'histogramme : de Pinot noir à Mourvèdre, de

Sangiovese à Carignan, de Morrastel à Tinto Cao et enfin de Tannat à Vinhao. Le cépage le plus concentré en pentamères couronnes est le Vinhao tandis que le moins concentré est le Pinot noir (**Figure 52**).

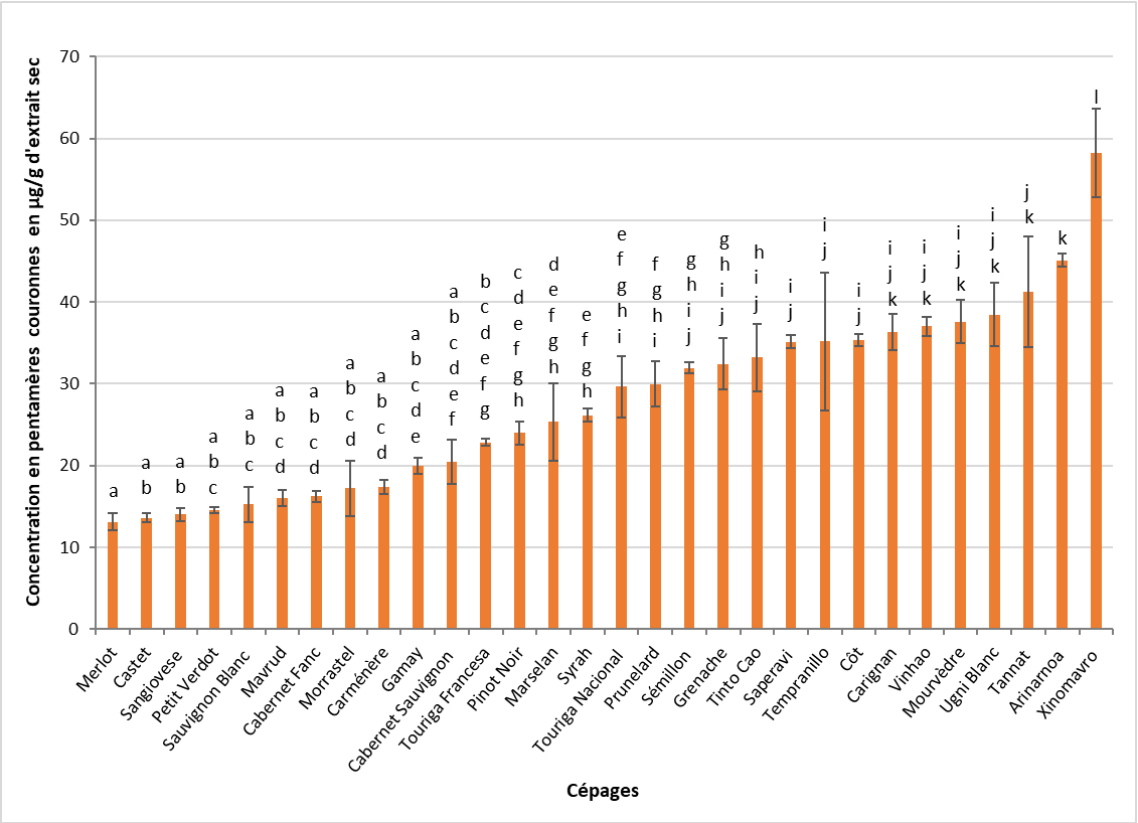


Figure 53 : Concentration en pentamère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2017

Pour le millésime 2017, les concentrations en pentamères couronnes varient de 13 µg.g^{-1} de pellicules lyophilisées pour le cépage Merlot jusqu'à 60 µg.g^{-1} pour le cépage Xinomavro (**Figure 53**). L'analyse statistique montre que trois groupes peuvent se détacher de l'histogramme en fonction de leurs concentrations : de Merlot à Cabernet-Sauvignon, de Touriga Francesca à Carignan et de Vinhao à Xinomavro. Le cépage le plus concentré est le cépage teinturier Xinomavro tandis que le moins concentré est le Merlot comme observé pour le tétramère couronne.

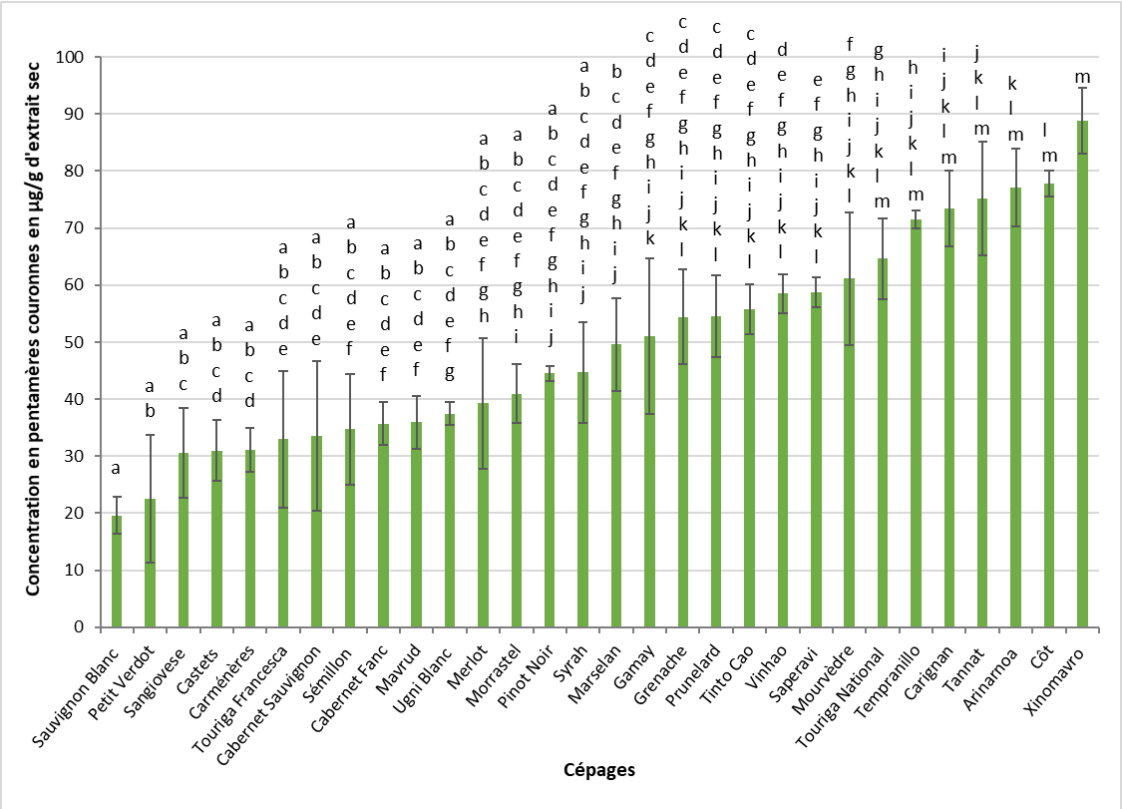


Figure 54 : Concentration en pentamère couronne en fonction des cépages pour le millésime 2018

Pour les raisins récoltés en 2018, les concentrations en pentamères couronnes varient de 20 µg.g^{-1} de pellicules lyophilisées pour le cépage Sauvignon blanc jusqu'à 90 µg.g^{-1} pour le cépage Xinomavro. Comme observé en 2017, les résultats statistiques étant très proches, les différences entre les cépages sont moins notables bien que 3 groupes peuvent être déterminés : de Sauvignon blanc à Mavrud, de Ugni Blanc à Touriga National et de Tempranillo à Xinomavro. Le cépage le plus concentré est le Xinomavro comme observé en 2017 tandis que le moins concentré est le Sauvignon blanc (**Figure 54**).

En résumant les observations réalisées sur les trois histogrammes montrant les concentrations en pentamères couronnes en fonction des cépages, il apparaît certaines tendances au niveau des groupes discutés plus haut pour chaque millésime. En effet, les cépages teinturiers et les cépages riches en polyphénols sont toujours les plus concentrés en pentamères couronnes (Xinomavro, Tannat, Arinarnoa). Ils sont présents dans le groupe H. Certaines variétés telles que le Sangiovese, le Carménère ou même le Petit Verdot ne changent pas de groupe et font toujours partie du même groupe F, le moins concentré en pentamères couronnes d'un millésime à l'autre. A l'inverse d'autres peuvent changer de groupe ou de position au sein du même groupe tels que les cépages blancs, le Cabernet-Sauvignon voir même le Prunelard. Enfin, certains ont une concentration fluctuante d'une année sur l'autre. C'est le cas pour le Tempranillo ou le Côt qui changent de position tout en restant

dans la partie haute de l'histogramme (groupe H) et du Cabernet-Franc ou du Castets restant eux en position basse de l'histogramme (groupe F). Il est également possible de noter que le millésime impacte différemment la concentration en tanins couronnes en fonction des différents cépages.

En conclusion de ces six histogrammes, les cépages teinturiers sont les cépages les plus concentrés en tanins couronnes, tétramère ou pentamères, et les cépages blancs les moins concentrés, quelque soit le millésime. Des différences de concentration entre les millésimes sont notables quelque soient les tanins couronnes étudiés. Enfin, des différences entre le tétramère et les pentamères couronnes sont également notées. En effet, quelques soit le cépage et le millésime, la concentration en tétramère couronne dans les pellicules du raisin est toujours supérieure à la concentration en pentamères couronnes.

Après avoir détaillé toutes ces courbes et afin de comparer les trois millésimes, deux autres histogrammes ont été réalisés sur la base des concentrations déterminées précédemment pour chacune des deux molécules. Le classement a cette fois-ci été réalisé sur la base de la moyenne des concentrations des trois millésimes pour chaque cépage du moins concentré au plus concentré.

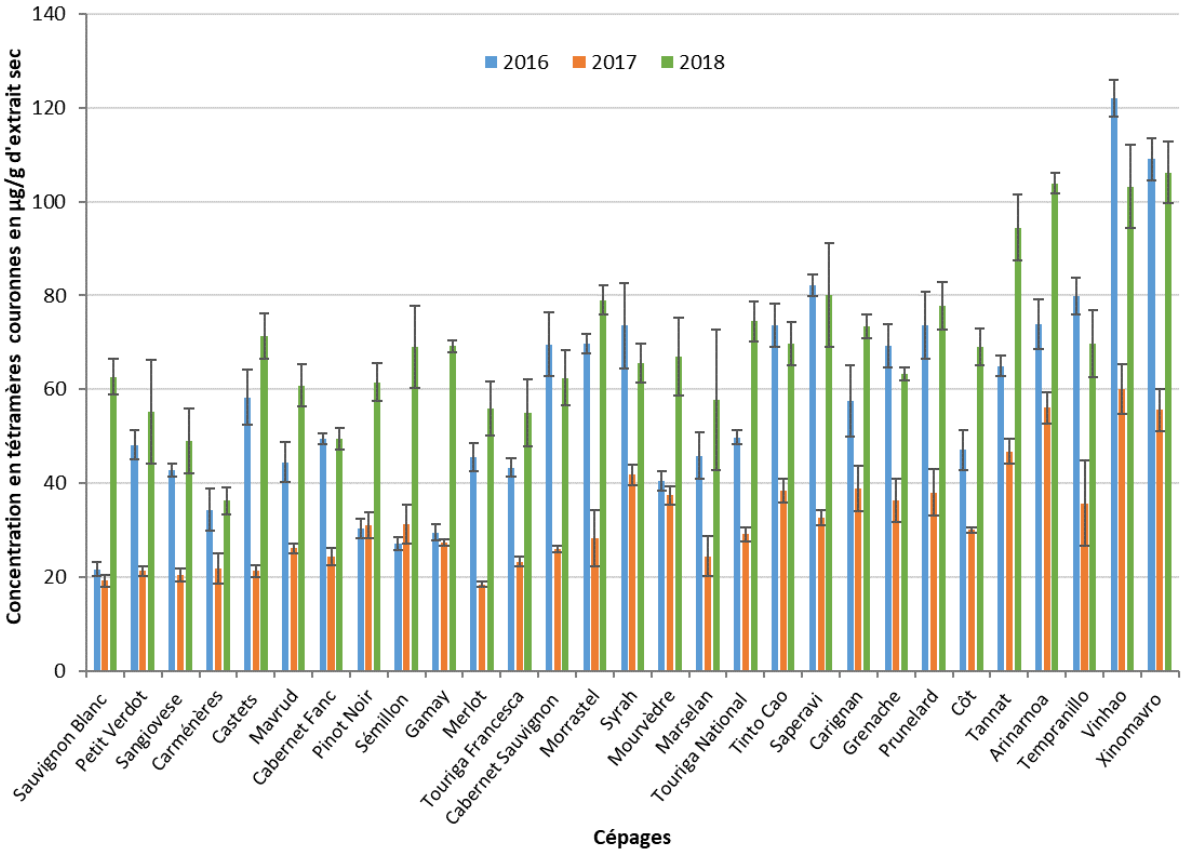


Figure 55 : Concentration en tétramère couronne en fonction des cépages pour tous les millésimes

Pour le tétramère couronne (**Figure 55**), l'histogramme montre que les concentrations dans la pellicule sont fortement influencées par l'effet millésime, surtout pour l'année 2017 qui possède des concentrations très basses en comparaison aux deux autres millésimes possédant eux des concentrations en tétramère couronne du même ordre de grandeur. Cette différence s'explique par les conditions climatiques différentes entre les millésimes. En effet, l'année 2017 à Bordeaux a été un millésime très compliqué avec des gelées ainsi qu'un temps très pluvieux juste après le débourrement ce qui a perturbé la croissance de la vigne. En revanche en 2016, la vigne a bénéficié de bonne condition de croissance avec un temps clément et surtout un été chaud, permettant la formation et l'accumulation des métabolites secondaires dans la baie de raisin. Des pluies justes avant la période des vendanges ont causé un retour de pousse au niveau de la partie aérienne de la vigne, stoppant ainsi la concentration en molécules d'intérêts dans la baie de raisin. En 2018, le millésime a également été très pluvieux durant toute la période de croissance de la vigne, rendant ainsi les concentrations en tanins couronnes entre les cépages moins différentiables.

La synthèse de cet histogramme montre néanmoins qu'il existe un effet phénotypique de la concentration en tétramère couronne entre les cépages, malgré les variations résultant des différents millésimes. En effet, les concentrations en tétramère couronne varient de quelques dizaines de microgrammes par gramme de pellicules lyophilisées à une centaine de microgrammes. Après observation des différentes tendances, les cépages blancs sont souvent les moins concentrés en tétramère couronne (Sauvignon blanc) tandis que les cépages les plus concentrés sont soit des cépages teinturiers tels que le Vinhao, ou le Saperavi, soit des cépages riches en polyphénols comme le Xinomavro, le Tannat et l'Arinarnoa, fils du croisement Tannat et Cabernet-Sauvignon.

Les cépages teinturiers étant les cépages ayant le plus de tanins couronnes dans leurs pellicules, il a également été vérifié qu'ils ne possédaient pas ces tanins dans leur pulpe. Après extraction de leurs pulpes colorées, ces derniers ne possèdent que des tanins couronnes dans les pellicules et pas dans la pulpe comme observé pour tous les autres cépages. Ce résultat n'est pas forcément surprenant, puisque la pulpe des cépages teinturiers, même si elle renferme des anthocyanes, ne contient pas de tanins condensés, même non cycliques. Une corrélation existe peut-être entre les concentrations élevées en tanins couronnes et les cépages riches en anthocyanes.

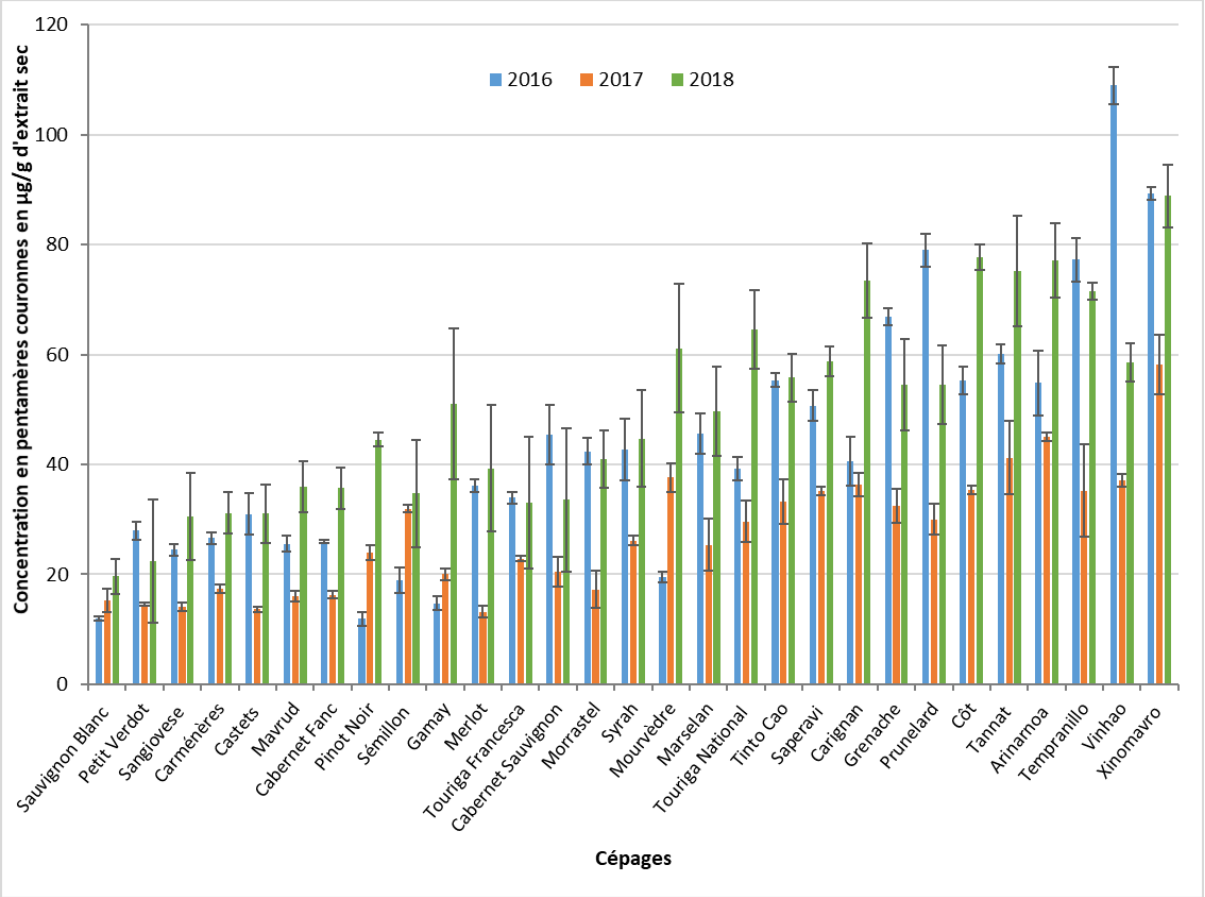


Figure 56 : Concentration en pentamère couronne en fonction des cépages pour tous les millésimes

La même analyse comparative des trois millésimes a été réalisée pour les pentamères couronnes (**Figure 56**). À part les concentrations en pentamères couronnes qui sont plus faibles que pour le tétramère couronne, des conclusions identiques peuvent être formulées. Les conditions climatiques des trois millésimes impactent bien la concentration en pentamères couronnes ce qui est surtout plus marqué pour l'année 2017, qui est un millésime beaucoup moins concentré comme observé pour le tétramère couronne. L'impact phénotypique des cépages est également observé, les cépages blancs faisant partie des cépages les moins concentrés en pentamères couronnes tandis que les cépages teinturiers et riches en polyphénols sont les plus concentrés.

Enfin, la comparaison des moyennes des concentrations en tétramères et pentamères couronnes montre un classement très similaire. La différence majeure étant que le tétramère couronne est un tiers de fois plus concentré que les pentamères dans la plupart des cépages, avec toujours les mêmes cépages les plus concentrés.

B. *Comparaison de la concentration en tétramère couronne et en tétramères non cycliques*

Les tanins condensés étaient, jusqu'à la thèse de Liming Zeng en 2015 et avant caractérisation des tanins couronnes par RMN, considérés comme ayant uniquement des structures non cycliques. Une étude comparative entre les concentrations en tanins couronnes et en tanins non cycliques de mêmes degrés de polymérisation a été réalisée dans les pellicules des cépages étudiés précédemment. L'objectif principal était de voir s'il y avait une corrélation entre les concentrations en tanins couronnes et en tanins non cycliques.

Les tétramères non cycliques ayant comme ion moléculaire m/z 1155,2614, ils ont été quantifiés par la même méthodologie que les tanins couronnes dans les pellicules, en équivalent catéchine. Sachant qu'il existe différents types de tétramères de masse m/z 1155,2614, le tétramère non cyclique majoritaire a été choisi pour la quantification, celui-ci étant le même dans tous les cépages. Un histogramme similaire à ceux réalisés pour les tanins couronnes a été construit et regroupe les concentrations des cépages classés en fonction des moyennes de tous les millésimes, du cépage le moins concentré au plus concentré (**Figure 57**).

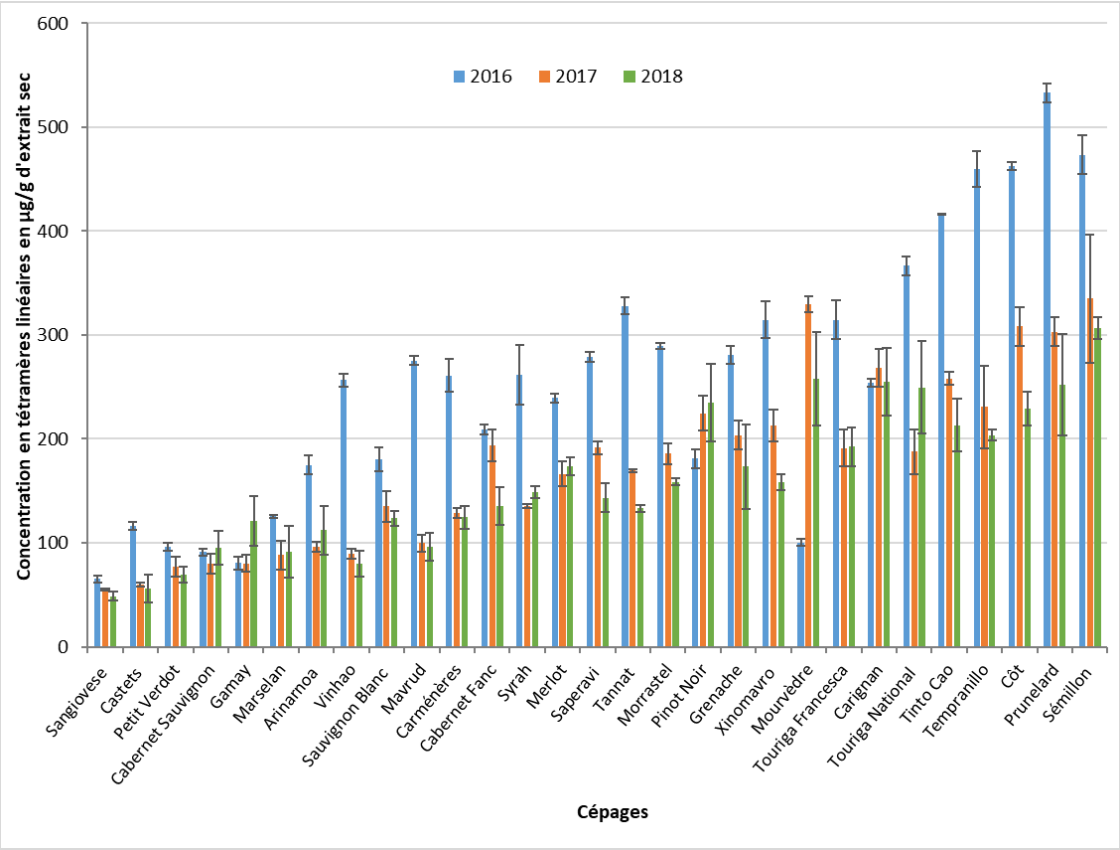


Figure 57 : Concentration en tétramère non cyclique en fonction des cépages pour tous les millésimes

La première observation est que le classement des cépages en fonction de la concentration en tétramères non cycliques est totalement différent du classement réalisé pour le tétramère couronne. En effet, les cépages blancs ainsi que les cépages teinturiers ne sont plus aux extrémités de l'histogramme comme pour le tétramère couronne. De plus, les tétramères non cycliques sont beaucoup plus concentrés. En effet, les concentrations en tétramères couronnes varient de 20 à 120 $\mu g.g^{-1}$ de pellicules lyophilisées tandis que les tétramères non cycliques ont des concentrations 5 fois supérieures variant de 70 à 520 $\mu g.g^{-1}$, tous millésimes confondus.

À présent, en regardant indépendamment chaque millésime, il avait été observé pour le tétramère couronne que le millésime 2017 était beaucoup moins concentré que les deux autres années tandis que pour les tétramères non cycliques, c'est le millésime 2017 et également le millésime 2018 qui semblent les moins concentrés. En effet, le millésime 2016 est beaucoup plus concentré en tétramères non cycliques que les autres. Dans le cas des tétramères couronnes, la différenciation des cépages pour le millésime 2016 était de loin la meilleure en comparaison aux autres millésimes. Cela montre que l'accumulation des tanins non cycliques et des tanins couronnes dans la pellicule ne sont pas influencés de la même manière par le millésime et donc par les conditions climatiques, cette différence pouvant être le résultat de facteur de régulation différent.

L'ensemble de ces résultats entre ces deux types de tanins condensés tétramériques (tétramère couronne et tétramère non cyclique) pourrait impliquer des mécanismes de biosynthèses ou de régulations différents au niveau de la pellicule de la baie de raisin pour chacune de ces molécules.

III. Evolution de la concentration en tanins couronnes selon différents paramètres viticoles

L'étude précédente décrite sur une large gamme de cépages a montré une possible corrélation entre les concentrations élevées en tanins couronnes et les cépages riches en polyphénols, voir teinturiers, ce qui laisserait supposer un possible lien entre les cinétiques d'accumulation de ces composés spécifiquement localisés dans les pellicules et les anthocyanes. L'objectif de cette étude a été d'analyser la cinétique d'accumulation de ces tanins couronnes en fonction de différents stades de maturité du raisin, ainsi que l'impact du sol sur la concentration en tanins couronnes.

Pour cela, une collaboration avec différents châteaux au sein de la région bordelaise nous a permis de mener à bien cette étude, collaboration réalisée avec l'équipe du Pr. Laurence Geny-Denis et réseau de suivi de maturité Bordeaux raisin. Parmi ces châteaux, deux parcelles étaient situées dans le Médoc (P1 et P2), une dans les Graves (P3), une dans l'Entre-deux-mers (P4), deux dans le Libournais (P5 et

P6) et enfin une à Blaye (P7). Les cépages collectés étaient les deux cépages majoritaires de la région bordelaise : Merlot et Cabernet-Sauvignon. Enfin, les raisins ont été collectés durant le millésime 2016 à trois stades de maturité différents : Véraison (V), Mi-Maturité (MM) et Maturité (M). Tous les échantillons ont été pelés, congelés et lyophilisés avant d'être extraits avec la méthode développée pour extraire la totalité des tanins couronnes des pellicules de raisin en utilisant 500 mg de pellicules au départ. À la fin de l'extraction, tous les échantillons ont été injectés en UPLC-UV-ESI-QTOF.

Pour le cépage Merlot, les résultats ont été traités pour uniquement cinq parcelles en raison des soucis techniques pour le prélèvement des échantillons à maturité pour les parcelles P2 et P3. Les échantillons seront traités à la suite par molécules en comparant les deux cépages, des cinq ou sept parcelles et des trois stades de maturité.

A. Cinétique d'accumulation des tanins couronnes en fonction de la maturité du raisin

Dans un premier temps, les résultats concernant les concentrations en tétramère couronne en fonction des différents stades de maturité pour les deux cépages étudiés seront discutés.

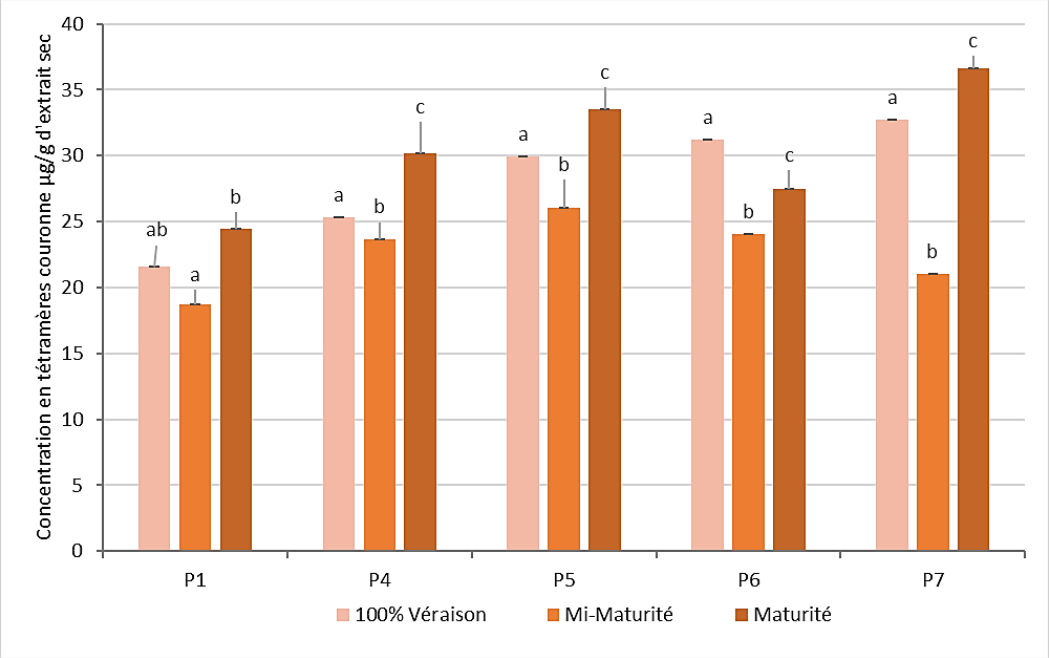


Figure 58 : Cinétique d'évolution du tétramère couronne en fonction des stades de maturité pour le cépage Merlot

Pour le cépage Merlot, une tendance à l'accumulation des tanins couronnes a été observée (**Figure 58**). En effet, pour l'ensemble des parcelles excepté la P1, tous les stades de maturité sont significativement différents. Entre le stade à Véraison et à Mi-Maturité, la concentration diminue significativement tandis qu'une augmentation apparaît entre le stade à Mi-Maturité et à Maturité.

Malgré ces observations, le stade à Maturité reste le plus concentré pour la majorité des parcelles. Cependant, des cinétiques d'accumulation différentes apparaissent entre les parcelles, preuve d'un effet terroir non négligeable.

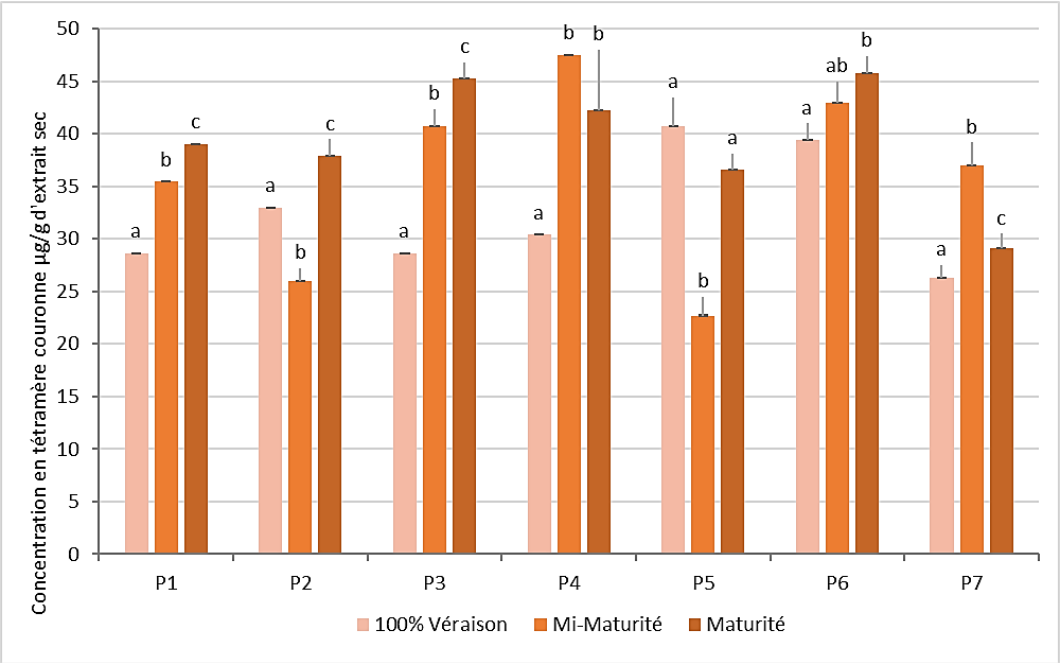


Figure 59 : Cinétique d'évolution du tétramère couronne en fonction des stades de maturité pour le cépage Cabernet-Sauvignon

Pour le cépage Cabernet-Sauvignon, les cinétiques d'accumulation du tétramère couronne sont beaucoup plus variables entre les parcelles (**Figure 59**). Les mêmes tendances que pour le cépage Merlot, sont observées pour les parcelles P2 et P5. Une accumulation croissante est en revanche observée pour les parcelles P1, P3, P4 et P6, la parcelle P7 étant une exception avec une diminution de l'accumulation du tétramère couronne. La tendance générale tend cependant vers une augmentation du tétramère couronne dans la pellicule de la baie de raisin.

Plusieurs observations et conclusions peuvent être formulées à partir de ces premiers résultats. Pour l'évolution du tétramère couronne en fonction des différents stades de maturité, la tendance générale montre une accumulation du tétramère couronne durant la maturation du raisin. Le fait que les concentrations à Mi-Maturité soient plus faibles que pour les deux autres stades est probablement dû aux facteurs environnementaux. En effet, le millésime 2016 est caractérisé par un mois d'août très sec et par des précipitations en septembre à l'origine de reprises de croissance des parties aériennes de la vigne et un grossissement rapide des baies. De plus, comme vu précédemment dans la partie II ci-dessus, une différence de concentrations entre ces deux cépages a été observée, le Cabernet-Sauvignon étant toujours plus concentré en tanins couronnes que le Merlot. Cette différence

a également été observée dans l'étude précédente sur les concentrations en tanins couronnes dans les différents cépages. Une dernière observation concerne les différences de concentrations pour tous les stades de maturité en fonction des parcelles. La grande variabilité entre ces dernières peut s'expliquer par le terroir très différent entre les parcelles, comme les facteurs environnementaux (microclimat, sol, âge de la vigne), mais également les facteurs humains (traitements, taille, conduite de la vigne).

Les cinétiques d'accumulation des pentamères couronnes dans la pellicule de la baie de raisin en fonction des différents stades de maturité du raisin ont également été déterminées pour les deux cépages. Des tendances proches de celle observée pour le tétramère couronne ont été notées (**Figure 60**). Cette tendance tend vers une augmentation des pentamères couronnes durant la maturation du raisin pour les parcelles P4, P5 et P7. Cette observation n'est pas vérifiée pour les parcelles P6 et P7, qui respectivement montrent une décroissance et une stabilité des tanins couronnes durant la maturation. Les tendances observées sur ces deux dernières parcelles ne sont pas définies au vu des analyses statistiques qui sont peu différentes entre les stades de maturité.

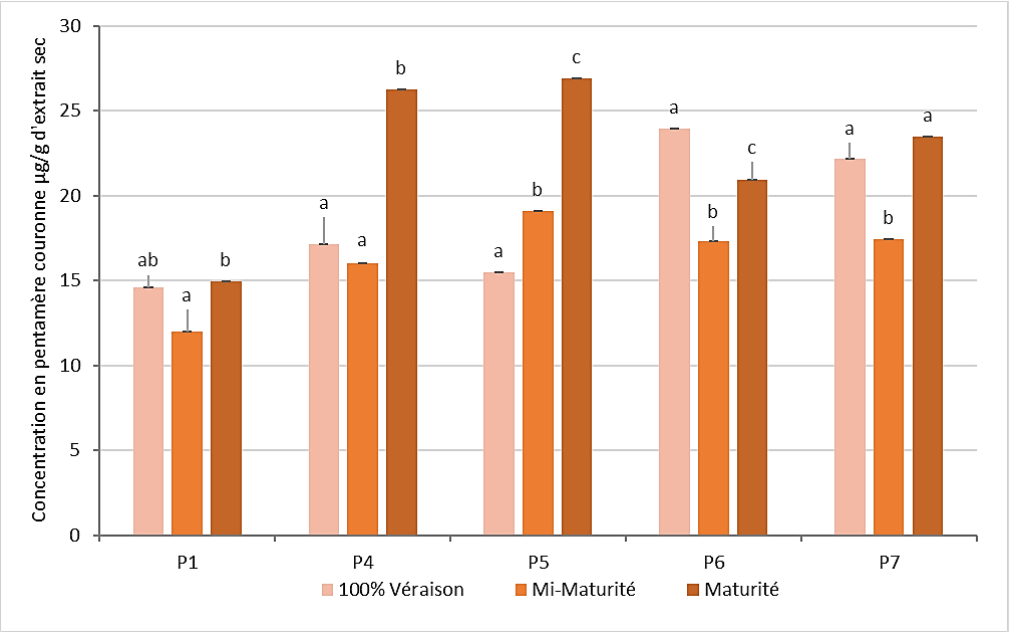


Figure 60 : Cinétique d'évolution des pentamères couronnes en fonction du stade de maturité pour le cépage Merlot

Une tendance similaire à celle observée pour le Merlot a également été notée pour le cépage Cabernet-Sauvignon (**Figure 61**) avec une tendance à l'augmentation des pentamères couronnes en fonction du stade de maturité pour les parcelles P1, P2, P3 et P5. Les parcelles P4 et P6 ne montrent pas de différences significatives entre le stade à Véraison et le stade à Maturité. Avec une tendance contraire, la parcelle 7 montre une diminution significative de la concentration en pentamères

couronnes. Un comportement différent de cette parcelle avait également été noté pour le tétramère couronne.

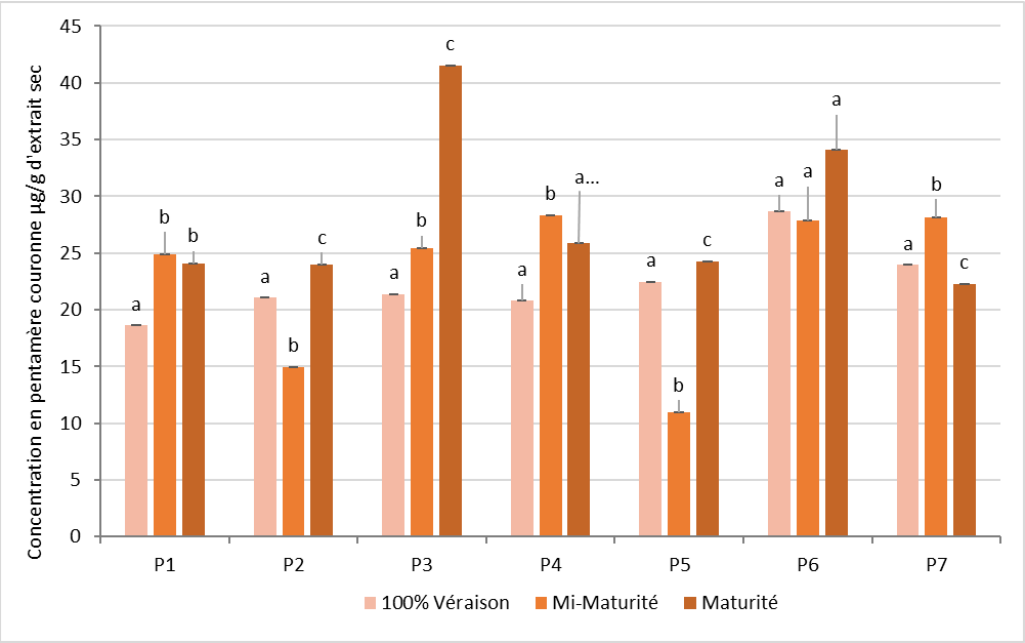


Figure 61 : Cinétique d'évolution des pentamères couronnes en fonction des stades de maturité pour le cépage Cabernet-Sauvignon

Pour les pentamères couronnes, une tendance générale se détache malgré des différences statistiques entre les parcelles peu définies. La tendance tend vers une accumulation des pentamères couronnes durant la maturation du raisin, comme observée pour le tétramère couronne.

Dans le but de comparer le comportement des tanins couronnes et des tanins condensés non cycliques, leur quantification a été réalisée afin de comparer leurs évolutions au cours de la maturation du raisin.

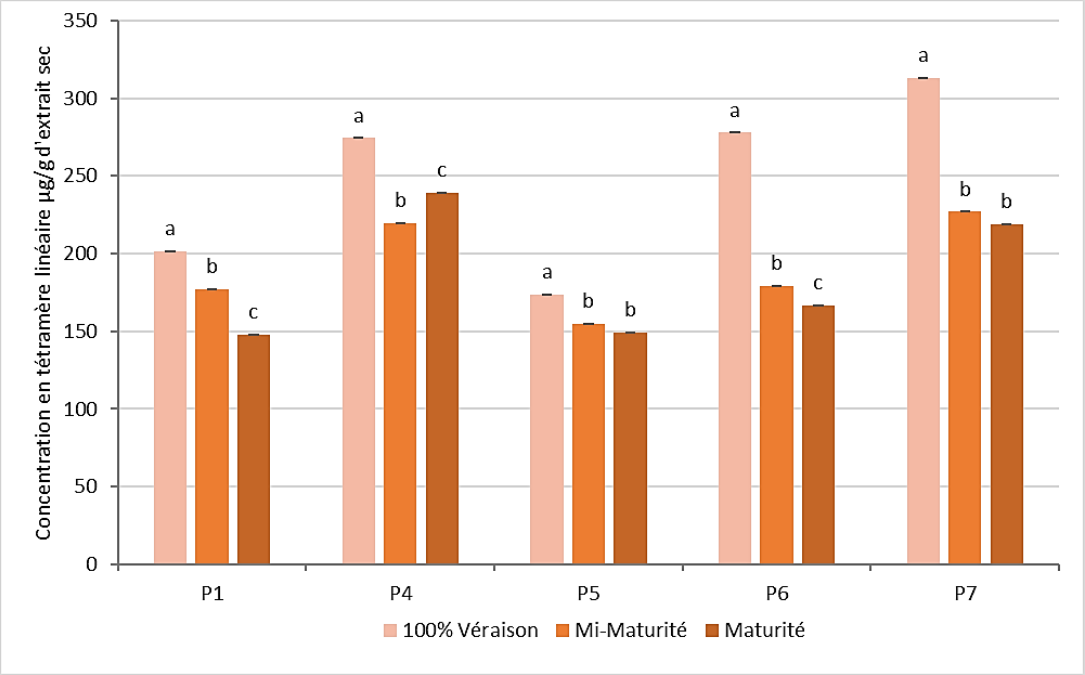


Figure 62 : Cinétique d'évolution du tétramère non cyclique en fonction du stade maturité pour le cépage Merlot

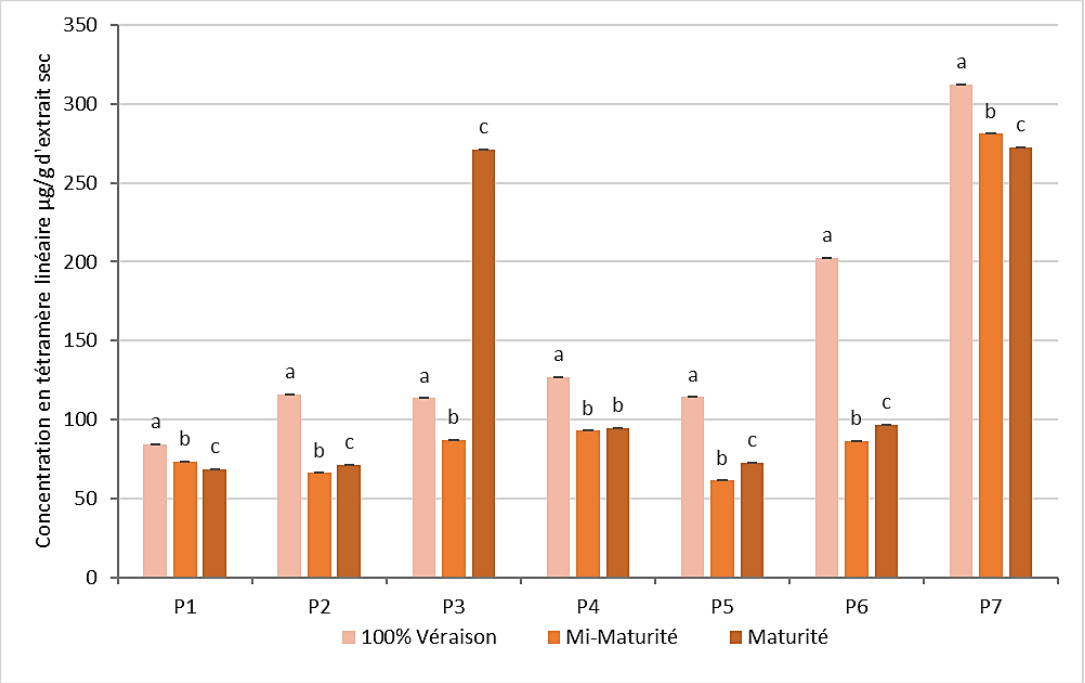


Figure 63 : Cinétique d'évolution du tétramère non cyclique en fonction du stade de maturité pour le cépage Cabernet-Sauvignon

Sur l'ensemble des parcelles pour le cépage Merlot, les concentrations en tétramère non cyclique diminuent significativement (**Figure 62**). Pour le cépage Cabernet-Sauvignon, la même diminution significative a été observée pour toutes les parcelles (**Figure 63**). À noter que la concentration de la parcelle P3 à Maturité et la concentration de la parcelle P6 à Véraison sont très probablement aberrantes, car beaucoup trop élevées en comparaison aux concentrations des autres stades pour les mêmes parcelles. Malheureusement, ces échantillons n'ont pas pu être répétés pour des raisons de disponibilité de matériel végétal. De plus, une autre observation surprenante concerne les concentrations de la parcelle P7 qui sont toutes 3 à 4 fois plus importantes que celle des autres parcelles pour le cépage Cabernet-Sauvignon. Donc, les tétramères non cycliques ont tendance à diminuer avec la maturation du raisin. De plus, ces tétramères non cycliques ont des concentrations beaucoup plus importantes que le tétramère couronne, observation déjà réalisée auparavant sur les concentrations en tanins couronnes dans les pellicules des différents cépages.

En conclusion, les concentrations dans les pellicules en tétramère et pentamères couronnes tendent à une augmentation durant la maturation du raisin contrairement aux tétramères non cycliques qui eux diminuent avec le niveau de maturité. Ces différences de tendance montrent une accumulation différente de ces molécules dans la pellicule de la baie de raisin et donc surement une différence au niveau de la régulation de leur biosynthèse. De plus, la concentration du tétramère couronne est toujours plus élevée que celle des pentamères couronnes quel que soit le cépage, le niveau de maturité, ou même la parcelle. Cette observation avait déjà été réalisée dans l'étude précédente des tanins couronnes dans les différents cépages. Une autre observation importante est la différence de concentration entre les cépages Merlot et Cabernet-Sauvignon, le Cabernet-Sauvignon étant toujours plus concentré en tanins couronnes que le Merlot.

De plus, un important effet parcelle a également été observé. Ces différences peuvent s'expliquer par différents facteurs tels que le type de sol, de gestion de la parcelle et du microclimat des parcelles, car bien que cette étude se déroule dans la même région, le climat peut être différent sur quelques kilomètres. Ces résultats ne sont qu'une tendance, car ils n'ont été entrepris que sur un seul millésime et il aurait fallu plus de données afin que les analyses statistiques soient plus robustes.

B. Étude de la concentration en tanins couronnes en fonction du type de sol

Dans cette partie, l'étude a été focalisée sur l'impact du sol sur la concentration en tanins couronnes. Dans la région bordelaise, différents types de sols existent, le Peyrosol (pH légèrement acide), sol graveleux constitué d'une texture caillouteuse et pierreuse, est le plus commun. En effet, les parcelles P1, P2, P3 et P6 ont été plantées sur ce type de sol. La parcelle 4 est un sol de type

Redoxisol (pH acide) caractérisé par des alternances de périodes humides et sèches causées par la remontée et redescente de la nappe. La parcelle 5 a été plantée sur un sol de type Rendosol (pH basique) qui est le sol le plus fréquent en France. Il est le plus souvent saturé en calcaire et il est peu évolué en comparaison aux autres sols présentés. Enfin, la dernière parcelle étudiée, la parcelle 7, a été cultivée sur un sol de type Brunisol (pH légèrement acide), qui est caractérisé par un sol non calcaire, coloré en brun par les oxydes de fer liés à l'argile. [245].

Pour cette étude, les mêmes sets d'échantillon que précédemment ont été utilisés, mais uniquement sur le cépage Cabernet-Sauvignon. Après extraction, les échantillons ont été par la suite injectés en UPLC-UV-ESI-QTOF et quantifiés avec le logiciel Mass Hunter. Comme énoncé ci-dessus, les échantillons ont été séparés par type de sol avec P1, P2, P3 et P6 ensemble de parcelles appartenant au même sol Peyrosol et les parcelles P4, P5 et P7 séparées étant respectivement des sols Redoxisol, Rendosols et Brunisols. Le tétramère couronne ainsi que les pentamères couronnes ont été quantifiés.

Les résultats montrent que les concentrations les plus élevées en tanins couronnes ont été observées pour le Rendosol tandis que les concentrations les moins élevées sont observées pour le type de sol Redoxisol (**Figure 64**). Une telle différence entre ces deux types de sols a déjà été observée par une étude de Renouf *et al*. en 2010 [80]. Dans cette étude, il avait été déterminé que le sol Rendosol donnait une meilleure qualité au vin que les sols Redoxisols. Dans notre étude, le classement par ordre croissant des sols en fonction de la concentration en tanins couronnes a été effectué donnant l'ordre suivant : Redoxisol > Brunisol > Peyrosol > Rendosol. Concernant les procyanidines couronnes, les différences de concentration en fonction des sols pourraient être influencées par le pH du sol. En effet, un pH bas favoriserait la formation des tanins couronnes (Rendosol) au contraire des pH élevés (Redoxisol). De plus, il a été noté que le sol n'a pas d'impact sur la différence de concentration entre tétramère et pentamères couronnes. En effet, la concentration en tétramère couronne est toujours supérieure aux pentamères couronnes. Cependant, un grand nombre de facteurs, autres que le sol, peuvent influencer les différences entre parcelles observées et devront être approfondis. Parmi ces facteurs, on retrouve l'âge de la vigne, le porte-greffe utilisé, le mode de taille ainsi que l'orientation de la parcelle, l'exposition, les traitements, etc…

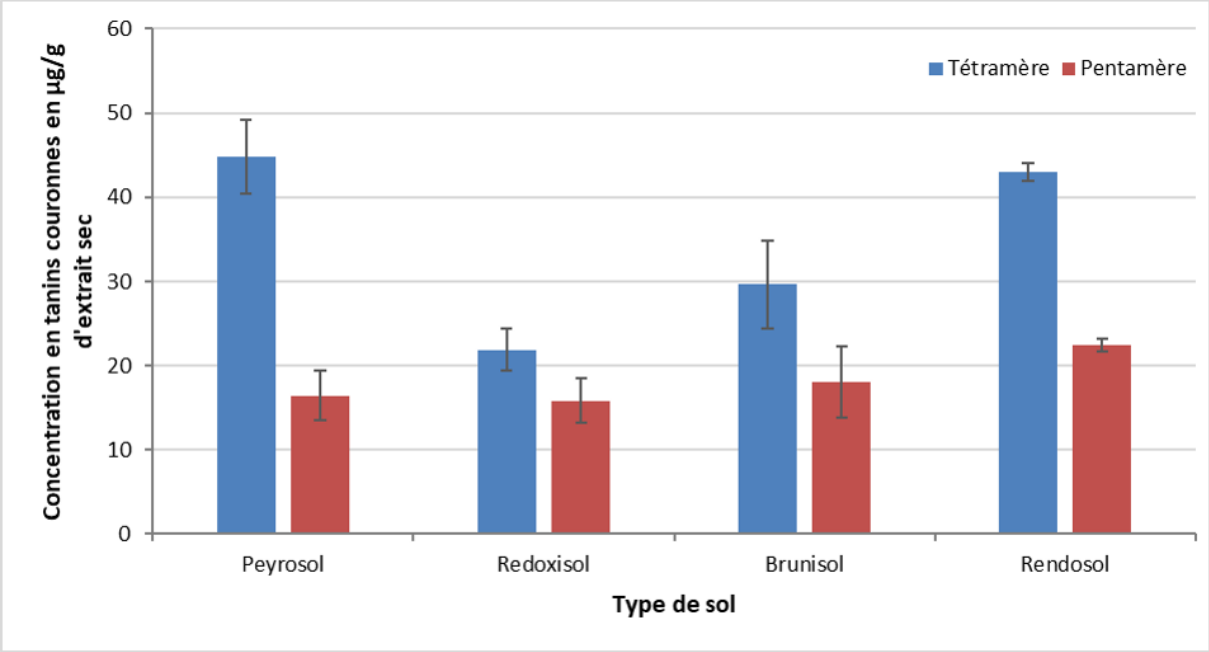


Figure 64 : Concentration en tanins couronnes en fonction du type de sol étudié

C. Impact du mode de culture de la vigne sur la concentration en tanins couronnes

Après avoir étudié l'influence des cépages ainsi que l'influence des différents types de sols sur les concentrations en tanins couronnes, une étude préliminaire a été menée sur l'influence du mode de conduite de la vigne sur les concentrations de cette nouvelle sous-famille de tanins condensés. Pour cela, des raisins provenant de deux parcelles côte à côte, dont l'une était en conduite conventionnelle et l'autre en conduite biologique, ont été comparées. Les différences entre les deux parcelles sont uniquement le mode de culture et principalement les produits utilisés pour les traitements phytosanitaires. Cette étude a été réalisée sur le cépage Merlot uniquement et les raisins ont été collectés à maturité en septembre 2015. Les échantillons de pellicule lyophilisée ont été préparés et extraits avec la même méthode qu'utilisée précédemment et ceux-ci ont été injectés, à la suite de l'extraction, en UPLC-UV-ESI-QTOF. Les quantifications ont été réalisées sur le tétramère et les pentamères couronnes.

Les résultats montrent clairement une différence entre les deux modes de culture, les tanins couronnes étant deux fois plus concentrés en conduite biologique qu'en conduite conventionnelle et ce, pour le tétramère couronne et pour les pentamères couronnes (**Figure 65**).

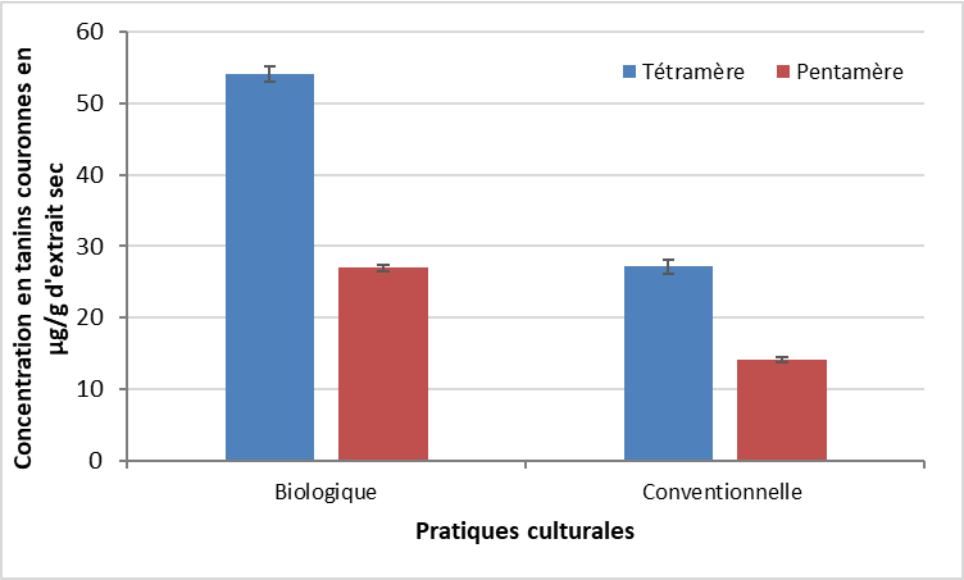


Figure 65 : Concentration en tanins couronnes en fonction du type de culture étudiée

Ce résultat soulève la question de l'utilité de cette sous-famille de tanins condensés pour la plante. En effet, les tanins couronnes sont localisés uniquement dans la partie externe de la baie de raisin, partie qui est également en contact avec les agents pathogènes. Se pourrait-il donc que la différence de concentration en tanins couronnes soit une réponse de la plante à un stress ? Cette étude préliminaire devra être confirmée dans le futur par d'autres études sur un plus grand nombre d'échantillons et sur différents modes de culture en ajoutant la culture en biodynamie par exemple.

IV. Localisation des tanins couronnes dans la vigne ou dans d'autres produits riches en polyphénols

Les tanins couronnes sont spécifiquement localisés dans la pellicule de la baie de raisin et nous venons de montrer l'impact du cépage, du niveau de maturité du raisin ainsi que du sol et du mode de conduite du vignoble sur leurs concentrations. Le fait que les tanins couronnes soient absents des pépins et localisés uniquement dans les parties externes de la baie de raisin, mais également que leurs concentrations soient également influencées par le mode de conduite de la parcelle, nous a amené aux questions suivantes : les tanins couronnes sont-ils présents dans les autres parties externes de la vigne telle que les rameaux, les feuilles ou les racines qui sont aussi des organes connus pour renfermer des tanins condensés ? Et pour aller plus loin : les tanins couronnes sont-ils présents dans d'autres végétaux riches en polyphénols et surtout en tanins condensés ?

A. Localisation des tanins couronnes dans l'ensemble de la vigne

Dans les parties précédentes, les différentes composantes de la baie de raisin ont été extraites à savoir la pellicule, la pulpe, les pépins et les rafles. Les tanins couronnes ont alors été exclusivement localisés dans la pellicule de la baie de raisin. Ils étaient totalement absents des autres parties. Or, les polyphénols dans la vigne ne sont pas présents que dans la baie de raisin, ils sont aussi localisés dans les racines en allant jusqu'aux feuilles. L'objet de cette étude a été d'extraire les autres parties végétales de la vigne, hors baie de raisin, afin de voir si les tanins couronnes sont localisés ailleurs dans la plante.

Pour cela, des extraits de vigne notamment des sarments, des racines et des feuilles de vigne ont été analysés. Les différents échantillons de végétaux ont été collectés, congelés et lyophilisés afin d'en faire de la poudre. Tous les échantillons de matière végétale ont été extraits avec la méthode développée pour l'extraction de l'intégralité des tanins couronnes dans la matière végétale, méthode utilisée pour l'extraction des pellicules. Les injections ont ainsi été effectuées en UPLC-UV-ESI-QTOF avec la méthode développée pour les tanins couronnes.

Les échantillons de feuilles provenaient de cinq cépages, trois cépages noirs et deux cépages blancs : Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Petit Verdot, Sauvignon blanc et Ugni Blanc. Ces cépages proviennent d'une parcelle expérimentale appartenant à l'INRA, dans le cadre d'une collaboration avec la Dr. Sabine Guillaumie. Chaque feuille de chaque cépage a été collectées à différents stades phénologiques de développement du raisin que sont : fermeture de grappes (FG), Mi-Maturité (MM) et Maturité (M).

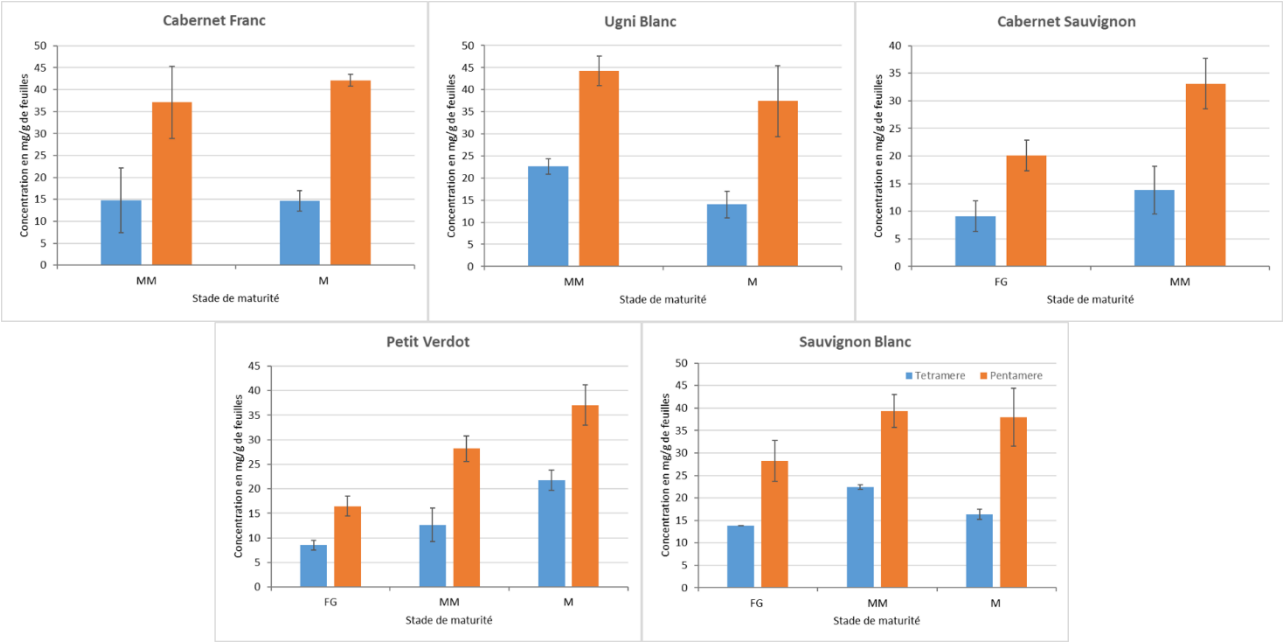


Figure 66 : Concentration en tétramère et pentamères couronnes dans les feuilles de vigne de différents cépages

Le premier résultat de ces analyses a montré que les tanins couronnes étaient présents dans les feuilles de chacun des cépages étudiés. Ce résultat surprenant a soulevé encore plus de questions vis-à-vis de la biosynthèse de ces molécules.

Une analyse plus détaillée des résultats obtenus pour ce set d'échantillon a montré une modification importante du ratio tétramère et pentamères couronnes par rapport aux résultats obtenus sur la baie de raisin (**Figure 66**). En effet, dans nos résultats précédents, le tétramère couronne a toujours été plus concentré que les pentamères couronnes quelques soient les échantillons. Dans les feuilles, le résultat inverse est obtenu. Les pentamères couronnes sont plus concentrés que le tétramère couronne, quel que soit le cépage ou le stade de développement phénologique de la vigne. Ce résultat vient appuyer les questions sur le rôle de ces molécules dans la plante et donc dans les feuilles ainsi que leurs biosynthèses.

L'évaluation de la concentration en tanins couronnes en fonction du stade de développement phénologique de la plante ici correspondant au développement de la grappe de raisin sur la période a été étudiée. Les résultats sont très variables en fonction des cépages. Le cépage Cabernet-Franc a des concentrations en tanins couronnes qui ne varie pas d'un stade à l'autre, tandis que pour l'Ugni blanc, les concentrations semblent diminuer contrairement aux cépages Cabernet-Sauvignon, Petit Verdot et Sauvignon blanc où les concentrations augmentent avec les stades phénologiques. La seule conclusion serait qu'il existe un effet phénotypique entre les cépages influençant les concentrations en tanins couronnes en fonction des différents stades comme observé précédemment sur l'étude des cépages.

Ces quelques résultats pourraient être le début d'un autre axe de recherche sur cette nouvelle famille de tanins couronnes.

Après avoir montré la présence des tanins couronnes dans les feuilles, des investigations sur la présence des tanins couronnes dans d'autres parties de la vigne ont été réalisées. Après la collecte de sarments de vigne et de racines, ces échantillons ont été extraits avec la méthode d'extraction développée en laboratoire sur les tanins couronnes. Les extraits ont alors été injectés sur l'UPLC-UV-ESI-QTOF. Pour les sarments de vigne, il apparait qu'après analyse les tanins couronnes sont bien présents. Étonnamment, les tanins couronnes les plus abondants sont les pentamères couronnes, le tétramère couronne étant détecté à l'état de traces. Le ratio entre tétramère et pentamères observé est du même ordre de grandeur que celui découvert dans les feuilles. De plus, la concentration en pentamères couronnes dans les sarments est légèrement supérieure aux concentrations retrouvées dans les feuilles. La présence des tanins couronnes dans les sarments de vigne est peu étonnant en vue de la composition de ceux-ci. En effet, de nombreuses publications se sont intéressées aux polyphénols et notamment aux tanins condensés présents dans cette partie de la vigne [246].

En ce qui concerne les racines de vigne, les tanins couronnes apparaissent également dans les mêmes proportions que dans les sarments et donc que dans les feuilles. Les pentamères couronnes sont les plus abondants, le tétramère étant présent à l'état de traces. Les racines de vigne ont été moins étudiées que les autres parties de cette plante, mais des études sur les racines de différentes autres plantes (*Sanguisorba oficinalis,* plante de la famille des rosacées, les pinacées ou encore le thé du Labrador) ont déjà montré qu'il existe une grande proportion de tanins condensés dans ce matériel végétal [247–249]. Il est donc probable que les racines de vigne possèdent des tanins condensés et donc qu'elles puissent renfermer des tanins couronnes. En effet, en analysant plus précisément les résultats obtenus en spectrométrie de masse, des procyanidines dimères et oligomères similaires à ceux présentes dans les pépins ont été détectés.

Cette étude préliminaire sur les racines et sur les sarments n'a été mise en place que sur un seul type d'échantillon de sarment et de racine. Il faudra par la suite utiliser une gamme conséquente d'échantillons afin de confirmer et valider ces résultats et de vérifier si la concentration des tanins couronnes dans ces parties de la plante est également influencée par le mode de conduite, le sol et les conditions climatiques.

Le plus surprenant dans ces résultats est les proportions différentes entre les tanins couronnes qui sont présents dans la pellicule de la baie de raisin et dans les autres parties de la plante. L'hypothèse pourrait être que les tanins couronnes sont synthétisés différemment dans les pellicules et dans le

reste de la plante. De plus, une autre possibilité serait que les tanins couronnes sont transportés entre les différentes parties de la vigne, ce qui pourrait expliquer ces différences.

B. Localisation des tanins couronnes dans d'autres produits riches en polyphénols

Dans l'optique d'étendre l'étude des tanins couronnes dans le règne végétal, quelques végétaux ont été sélectionnés afin d'être extraits dans le but de détecter leur présence dans d'autres matrices que le raisin et la vigne. Des végétaux riches en polyphénols tels que les pommes ont été choisis. Les échantillons de pomme choisis étaient des Grany Smith. Ce nouveau type d'échantillon étant très différent des pellicules de baie de raisin habituellement extraites, une méthode d'extraction spécifique à cette matrice a été choisie par rapport à la littérature. Une méthode développée par le Dr. Guyot a permis d'extraire la totalité des polyphénols de la pomme [243]. Après les extractions faites, les échantillons ont été injectés en UPLC-UV-ESI-QTOF.

Dans les pommes les extractions de chaque partie ont alors été réalisées et analysées. Les résultats ont alors montré que les tanins couronnes étaient présents dans la peau et dans la chair de la pomme (**Figure 67**). Dans la littérature, il a été constaté que les tanins condensés de la pomme sont très proches structurellement des tanins condensés du raisin. De plus, le ratio tétramère et pentamères couronnes ressemble à celui trouvé dans les feuilles de vigne, les pentamères couronnes étant plus concentrés que le tétramère couronne. Ces résultats sont à l'inverse de ceux retrouvés dans les pellicules des baies de raisin. Dans le futur, d'autres matrices végétales riches en polyphénols tels que les fruits rouges, le thé ou le cacao pourraient être testées.

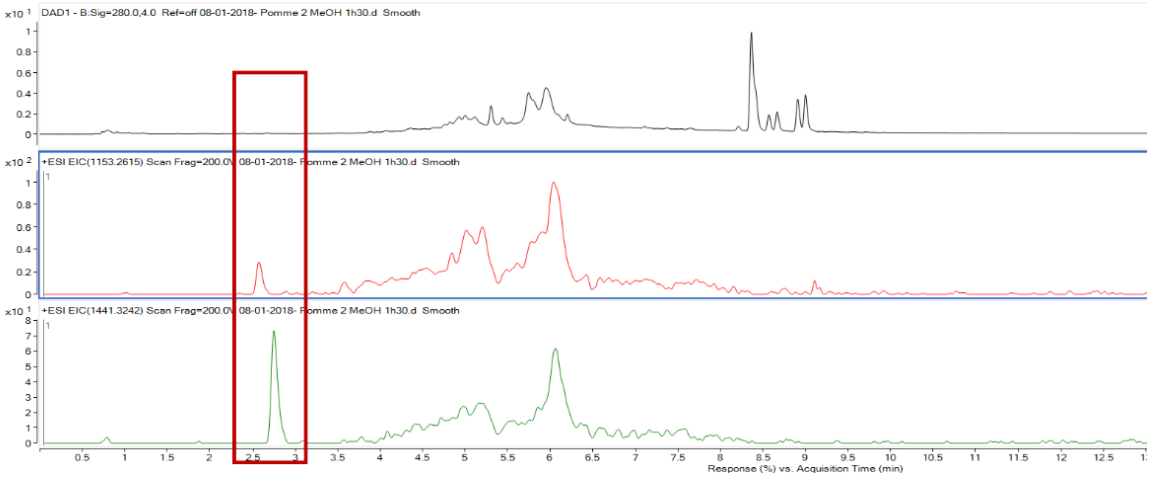


Figure 67 : Chromatogramme UV et spectre de masse des tanins couronnes dans les pommes

V. Conclusions

En conclusion de ce premier chapitre, il a été montré que le tétramère et les pentamères couronnes avaient été localisés spécifiquement dans les pellicules de la baie de raisin, ces molécules étant absentes des autres parties de la baie (pépins, pulpe et rafle). De plus, une méthode d'extraction de la totalité des tanins couronnes présents dans la pellicule a été développée. Grâce à cette nouvelle méthode, par la suite, l'impact des différents facteurs viticoles sur la concentration en tanins couronnes a été évalué. L'influence du cépage sur la concentration en tanins couronnes a fait l'objet d'une grande partie de notre étude démontrant ainsi une variabilité phénotypique entre les cépages pour les tanins couronnes. L'effet millésime est également un paramètre de variabilité important sur la concentration de ces nouvelles molécules cycliques. Le sol ainsi que le mode de conduite du vignoble impactent aussi fortement les tanins couronnes dans la pellicule de la baie de raisin. Ainsi, à la suite de ces études, l'évolution des tanins couronnes dans la pellicule de la baie de raisin durant la maturation de cette dernière a fait l'objet d'une recherche. L'étude a ainsi montré une accumulation de ces nouveaux composés cycliques dans la pellicule durant la maturation du raisin entre véraison et maturité. Toutes ces études soulèvent beaucoup de questions sur la biosynthèse de ces tanins dans la baie de raisin. Ces questions nous ont menées à notre dernière étude sur la localisation des tanins couronnes dans l'ensemble de la vigne montrant ainsi la présence, principalement des pentamères couronnes, dans les feuilles, les sarments, mais également les racines de la vigne. Cette investigation devra être prolongée sur un échantillonnage plus large à l'avenir. Les tanins condensés présents dans les pommes étant des procyanidines similaires à celles présentes dans le raisin, les tanins couronnes y ont donc été recherché et ces analyses ont ainsi montré la présence des tanins couronnes dans la pomme.

Chapitre 4 :

Les tanins couronnes dans le vin

Après avoir étudié dans la première partie la localisation et l'accumulation des tanins couronnes dans la baie de raisin et dans la vigne en général, le deuxième objectif est d'étudier l'évolution de cette nouvelle famille de molécules aux propriétés particulières durant le processus d'élaboration du vin. En effet, il a été constaté que ces molécules possédaient des propriétés bien différentes des tanins non cycliques. Dans cette deuxième partie, l'étude portera sur l'extraction des tanins couronnes durant le processus de vinification, mais également sur leur évolution durant le vieillissement en bouteille, ainsi que leur comportement vis-à-vis de l'oxydation. Cette partie sera d'ailleurs en lien avec l'étude des tanins couronnes dans les cépages mise en œuvre dans le Chapitre 3 II. Tous les échantillons de vin en cours de fermentation ou de vins finis ont été filtrés et injectés en UPLC-UV-ESI-QTOF, aucun autre traitement n'a été réalisé sur ces échantillons. La méthode utilisée était la méthode développée spécifiquement pour détecter les tanins couronnes et enfin les quantifications ont été réalisées avec le logiciel Mass Hunter.

En parallèle de l'étude des tanins couronnes durant le vieillissement, les pigments polymérisés ont également fait l'objet d'investigation durant le vieillissement en bouteille des vins rouges en utilisant la stratégie de dépolymérisation chimique en milieu acide développée par Zeng *et al*. 2016 [204]. Les pigments polymérisés sont composés d'un grand nombre de composés chimiques possédant différents types de liaisons, quatre familles principales de pigments ont été choisies afin de suivre leur évolution.

I. Extraction des tanins couronnes durant la vinification

Afin de mener à bien cette investigation, différentes modalités ainsi que différentes expérimentations (microvinification à l'ISVV, ou suivi de vinification en condition réelle en château) à partir d'échantillons de raisins différents ont été étudiées et analysées. Une brève description de la mise en œuvre expérimentale sera réalisée en début de chaque paragraphe.

A. Évolution des tanins couronnes durant la fermentation alcoolique

a. Extraction des tanins couronnes durant la fermentation alcoolique

Cette étude a été menée à bien en collaboration avec un château de l'appellation Pauillac. Le suivi de vinification a été réalisé à grande échelle, dans les conditions de vinification utilisées dans le château. Les détails de la conduite de la vinification sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes. Un suivi cinétique de l'extraction des tanins couronnes a été réalisé durant la fermentation alcoolique avec des prélèvements tous les jours puis une analyse de la concentration en tanins couronnes a

également été faite à l'écoulage. Les échantillons ont directement été filtrés, injectés, et les tanins couronnes ont été quantifiés en UPLC-UV-ESI-QTOF.

La fermentation alcoolique est une étape importante dans l'élaboration du vin. Elle permet la transformation des sucres du jus de raisin en alcool grâce aux levures, présentes à la base sur le raisin et/ou rajoutées dans la cuve. Dans le cas de la vinification en rouge, les parties solides de la baie de raisin (pépins et pellicules) sont laissées au contact du jus durant la fermentation alcoolique ainsi que quelques jours après la transformation complète du sucre en alcool pour permettre notamment l'extraction des composés phénoliques. Cette étape de macération essentielle permet l'extraction des composés phénoliques des parties solides comme les tanins condensés et les anthocyanes.

Les suivis cinétiques montrent que les sucres, en violet sur la **Figure 68**, diminuent durant la fermentation alcoolique jusqu'à être totalement consommés. En parallèle, une extraction des polyphénols est réalisée entrainant une augmentation de leurs concentrations dans le milieu. Sur la **Figure 68**, les différents polyphénols suivis sont les anthocyanes en rouge, les tanins condensés en vert et les tanins couronnes en bleu. Durant la fermentation alcoolique, la majeure partie des anthocyanes sont extraites en début de fermentation alcoolique atteignant un maximum au bout que quelques jours. À l'inverse, les tanins condensés sont extraits majoritairement en fin de fermentation alcoolique. En effet, les tanins condensés ont besoin d'alcool pour être extraits tandis que les anthocyanes qui sont des composés très hydrosolubles peuvent être extraites dès le début de la macération simplement avec le jus de raisin. Qu'en est-il des tanins couronnes ? Étonnamment, ceux-ci sont extraits très rapidement en début de fermentation alcoolique. En effet au 3ème jour de fermentation, 70 % de la concentration totale en tanins couronnes est déjà atteintes. Cette nouvelle classe de molécule possède un comportement d'extraction plus proche de celui des anthocyanes que de celui des tanins condensés non cycliques. Ce résultat surprenant va à l'encontre de ce que l'on connaît du comportement des tanins condensés et donc de ce qui aurait été attendu pour les tanins couronnes. Cette extraction en début de macération montre bien que les tanins couronnes sont des molécules hydrosolubles et qu'ils ont des propriétés bien différentes des tanins non cycliques. Afin de prolonger et de compléter cette étude, l'impact sur la concentration en tanins couronnes de deux méthodes d'extraction différentes (remontage et délestage) a été évalué durant la vinification.

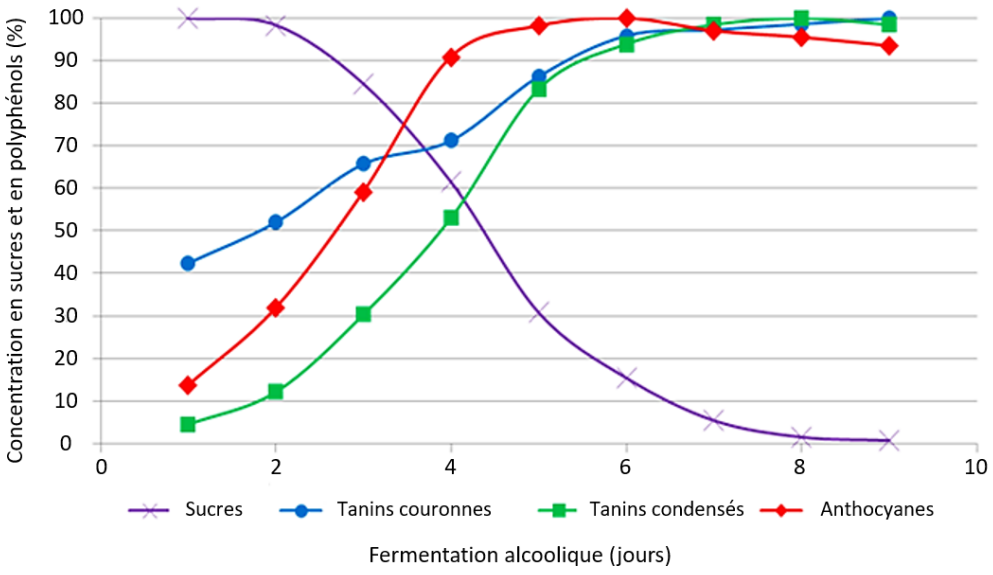


Figure 68 : Évolution des concentrations en sucre et en polyphénols durant la fermentation alcoolique

b. Impact de la méthode d'extraction durant la vinification sur la concentration en tanins couronnes

Après avoir déterminé la cinétique d'extraction des tanins couronnes durant la fermentation alcoolique, deux méthodes d'extraction utilisées durant la vinification ont été évaluées. Les deux méthodes sont : la méthode des remontages et la méthode des délestages. Les remontages consistent à asperger la totalité de la surface du marc avec du jus collecté en bas de la cuve afin d'assurer le renouvellement du jus au contact des parties solides et donc de favoriser une meilleure extraction des composés d'intérêt. Les délestages consistent à vider intégralement le jus de la cuve en fermentation dans une autre cuve afin de provoquer une désorganisation du marc qui va descendre au fond de la cuve et le jus sera alors aspergé par le haut de la cuve initiale permettant généralement une extraction plus forte des composés du raisin. Ces deux techniques d'extraction ont été réalisées sur des fermentations à 27 °C durant 9 jours dans des conditions identiques à l'étude précédente, soit le même domaine avec le cépage Cabernet-Sauvignon. Les paramètres classiques du suivi de l'extraction durant la fermentation (IPT, Anthocyanes totales et éthanol) sont décrits dans le chapitre 2. Des échantillons ont été collectés tous les jours durant la fermentation alcoolique et un point supplémentaire à l'écoulage a également été collecté. Ceux-ci ont été filtrés et injectés en UPLC-UV-ESI-QTOF, et le tétramère et les pentamères couronnes ont été quantifiés. Les concentrations en tétramère et en pentamères couronnes (en $mg.L^{-1}$) en fonction des jours de fermentation alcoolique ont été reportées en **Figure 69** sur deux courbes différentes : bleu pour l'extraction par remontage et rouge pour l'extraction par délestage.

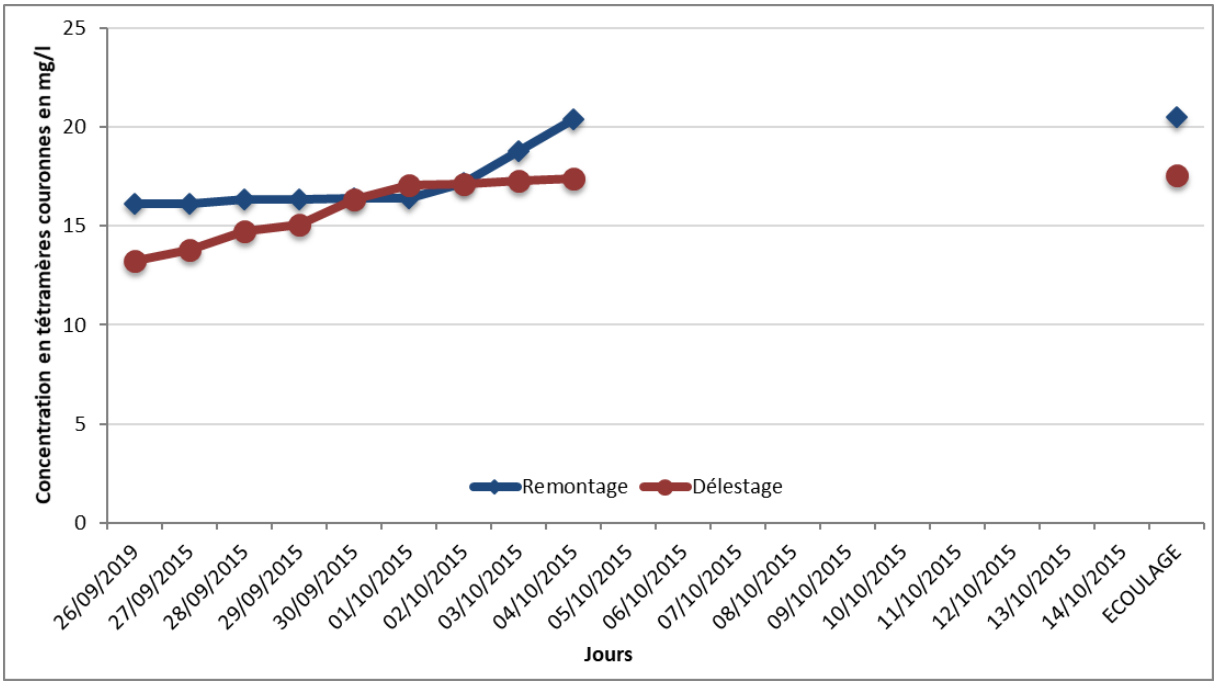


Figure 69 : Évolution du tétramère couronne (mg.L^{-1}) durant la fermentation alcoolique

Pour le tétramère couronne, les deux méthodes d'extraction montrent des cinétiques d'extractions un peu différentes. Pour la méthode des délestages, la concentration en tétramère couronne augmente plus rapidement en début de fermentation alcoolique et au bout de quelques jours, elle se stabilise. Une évolution inverse est observée pour la méthode des remontages. En effet, celle-ci est stable en début de fermentation alcoolique et après elle augmente au bout de quelques jours, au même moment où la concentration pour la méthode des délestages se stabilise. La concentration en tétramère couronne à la fin de la fermentation alcoolique semble plus élevée pour la méthode des remontages. Cette différence peut être due à la méthode d'extraction. Celle-ci se fait plus violemment avec la méthode des délestages qu'avec la méthode des remontages qui créera alors une extraction plus en continu.

De plus, il a été observé, pour les deux méthodes d'extraction, que la concentration en tanins couronnes ne changeait pas durant la macération post fermentaire, étape qui représente le temps entre la fin de la fermentation alcoolique et l'écoulage. En effet, la concentration obtenue à la fin de la fermentation alcoolique est similaire à celle à l'écoulage pour les deux méthodes d'extraction.

Pour les pentamères couronnes **Figure 70**, la même tendance a été observée pour chaque méthode d'extraction. La concentration en pentamères couronnes est stable en début de fermentation puis augmente rapidement avec la méthode des remontages tandis que pour la méthode des délestages, la concentration augmente petit à petit tout au long du processus de fermentation.

Comme observé pour le tétramère couronne, la concentration en pentamères couronnes est similaire entre la fin de la fermentation alcoolique et celle mesurée à l'écoulage pour les deux techniques utilisées.

Donc, les deux méthodes d'extraction permettent bien d'extraire les tanins couronnes. Il semblerait que la méthode des remontages soit légèrement plus efficace que la méthode des délestages. Comme démontré dans le paragraphe précédent, la majorité des tanins couronnes est extraites en début de fermentation alcoolique, quand le milieu est majoritairement aqueux, et ensuite la concentration en tanins couronnes reste stable jusqu'à l'écoulage. Les résultats de cette étude préliminaire réalisée sur deux cuves et sur un seul cépage doivent être confirmés par une étude des cinétiques d'extraction plus approfondie avec notamment des répétitions de modalité. Ainsi, afin d'approfondir notre étude sur l'extraction des tanins couronnes, l'étude a été étendue à l'ensemble de la vinification allant de l'encuvage jusqu'au début de l'élevage (soit après la fermentation malolactique).

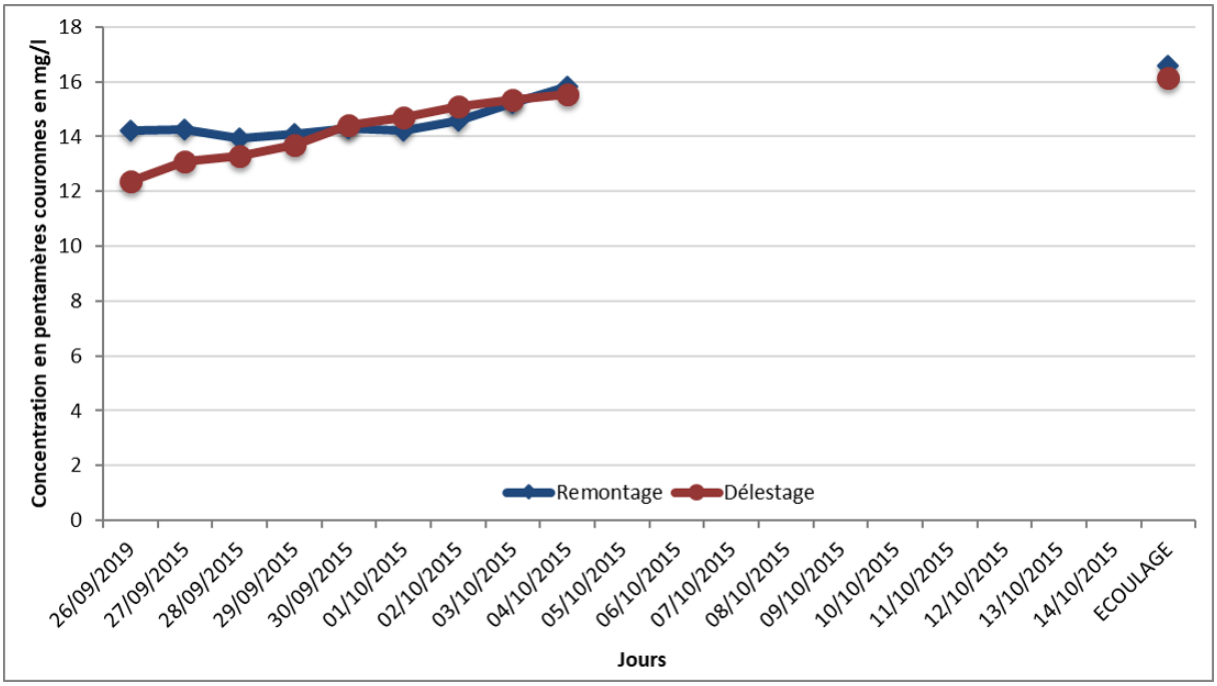


Figure 70 : Évolution des pentamères couronnes (mg.L^{-1}) durant la fermentation alcoolique

c. Évolution de la concentration en tanins couronnes de l'encuvage à la fin de la fermentation malolactique

Dans le cadre d'un projet région sur la thématique de l'acidité dans les vins liés au changement climatique dans la région bordelaise, de nombreux échantillons de vin ont été collectés. Plusieurs châteaux ont participé à ce projet en nous fournissant du raisin qui a ensuite été vinifié à l'ISVV, sur le plateau de microvinification. En tout, quatre châteaux ont participé à l'étude. Tous les châteaux ont fourni des raisins de cépages noirs, Merlot et Cabernet-Sauvignon à l'exception d'un château situé à cognac qui a fourni des raisins blancs d'Ugni Blanc. Les raisins ont été récoltés à trois stades de maturités différents : sous-maturité (M-1), maturité (M) et surmaturité (M+1). Chaque échantillon a été vinifié en duplicat. Cette étude s'est déroulée sur deux millésimes consécutifs : 2016 et 2017. Tous ces échantillons de raisin ont alors été microvinifiés sur le plateau de microvinification prévue à cet effet à l'ISVV. Le but, pour nous, était de voir l'évolution des tanins couronnes durant la vinification de tous ces échantillons. Un suivi de vinification a été effectué en réalisant un prélèvement à chaque étape d'intérêt, à savoir : le Moût (M) juste après l'encuvage, la fin de la Fermentation Alcoolique (FA), la fin de la Macération (Mac) et la fin de la Fermentation malolactique (FML). Tous les prélèvements ont directement été filtrés et injectés en UPLC-UV-ESI-QTOF afin de quantifier les tanins couronnes.

Les vinifications ainsi que les parcelles, pour lesquelles certains points de prélèvement ou échantillons sont manquants, ne seront pas décrites ici dans cette partie, mais ils sont présents en **Annexe 6**, **7** et **8**. La parcelle la plus représentative est une parcelle de Cabernet-Sauvignon. Comme précédemment, le tétramère et les pentamères couronnes ont alors été quantifiés séparément dans chacun des échantillons par l'UPLC-UV-ESI-QTOF. Les résultats obtenus avec le cépage Merlot pour les mêmes parcelles montrent des cinétiques d'extraction similaires.

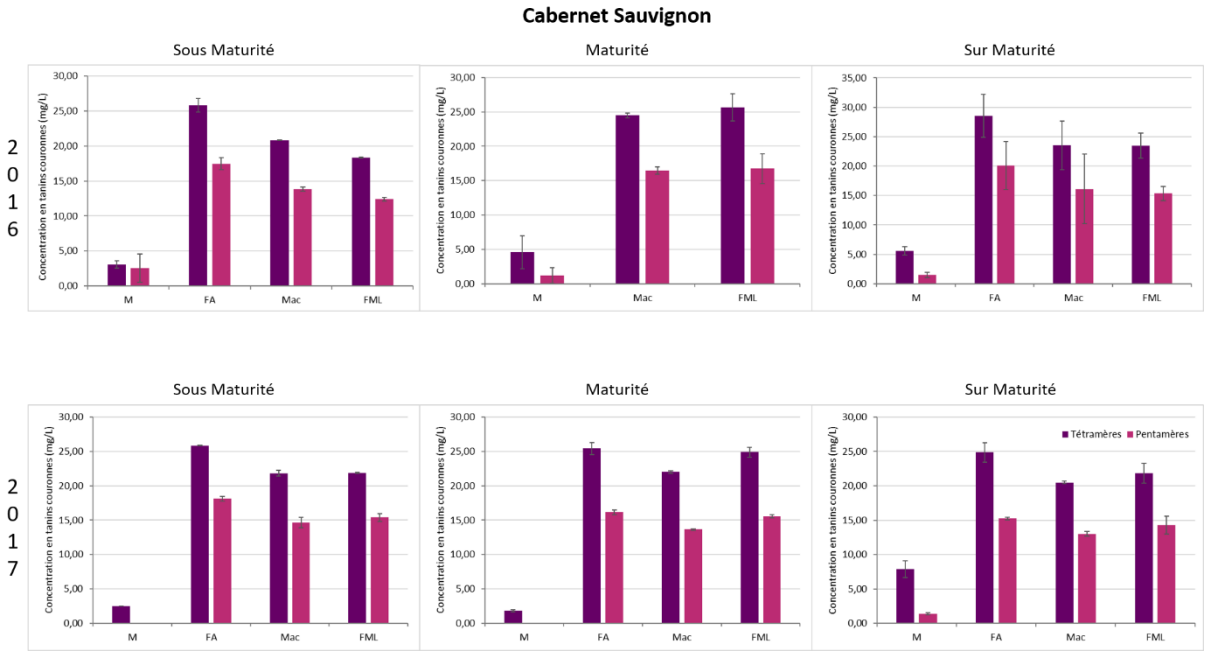


Figure 71 : Évolution des tanins couronnes durant la vinification

Sur la **Figure 71**, tous les stades de maturité sont présentés pour le cépage Cabernet-Sauvignon pour les millésimes 2016 et 2017. Les concentrations en tanins couronnes évoluent de manière similaire quel que soit le niveau de maturité du raisin ou le millésime. En effet, le tétramère et les pentamères couronnes ne sont quasiment pas présents dans le jus juste après encuvage. En revanche, par la suite, la totalité de ces nouvelles molécules est extraite durant la fermentation alcoolique puisque la concentration maximum de ces molécules est notée à la fin de la fermentation alcoolique, comme observé dans les paragraphes précédents (Chapitre 4 I.A.a). Durant le reste de la vinification, de la macération post-fermentaire jusqu'à la fin de la fermentation malolactique, la concentration en tanins couronnes, tétramère ou pentamères, reste stable. La présence des tanins couronnes dans le jus juste après encuvage, s'explique par la trituration même faible de la vendange durant les étapes d'éraflage et d'encuvage qui peuvent détériorer certaines baies de raisin et ainsi libérer les tanins couronnes dans le moût. En effet, comme discuté dans le chapitre précédent (Chapitre 3 I.A), les tanins couronnes sont totalement absents de la pulpe du raisin sans trituration de la baie. Donc, ils devraient être absents du jus avant le début du contact entre le jus et les parties solides de la baie. Ces résultats confirment une nouvelle fois que les tanins couronnes sont totalement extraits durant la fermentation alcoolique et qu'après leurs concentrations restent stables durant le reste de la vinification. Cette tendance a été confirmée pour les deux millésimes, tous les cépages et pour tous les stades de maturité étudiés (**Annexe 6**, **7**, **8**). Ces résultats montrent que ces nouveaux tanins cycliques sont très hydrosolubles et cela confirme également leurs différences avec les tanins condensés non cycliques.

B. Variation de la teneur en tanins couronnes dans les vins monovariétaux

Le but de cette étude est de comparer la concentration en tanins couronnes de différents vins monovariétaux issus des cépages utilisés dans l'étude qui fait l'objet du Chapitre 3 II A. La comparaison des extractions des pellicules de ces cépages avec leurs vins respectifs a été réalisée. Les cépages provenant de la parcelle utilisée pour la comparaison des cépages entre eux et qui ont été microvinifiés sont : le Cabernet Franc, le Cabernet-Sauvignon, le Carménère, le Castets, le Côt, le Merlot, le Morrastel, le Tinto Cao et le Touriga Nacional. Tous ces cépages ont alors été récoltés à maturité et microvinifiés au plateau de microvinification de l'ISVV. Des vins monovariétaux ont alors été obtenus pour les millésimes 2016 et 2017, les vinifications ont été conduites de façon identique pour les deux millésimes. Chaque échantillon de vin a été prélevé, filtré et injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF. Les molécules quantifiées sont le tétramère couronne, les pentamères couronnes et le tétramère non cyclique majoritaire. Afin de présenter tous ces échantillons, les concentrations des différentes molécules étudiées dans les vins monovariétaux ont été classées par ordre croissant, pour chaque millésime, en fonction de la concentration moyenne en tanins couronnes sur les deux millésimes.

Concernant la concentration en tétramère couronne dans les vins pour le millésime 2016, elle varie de 15 $mg.L^{-1}$ pour le Carménère à 35 $mg.L^{-1}$ pour le Cabernet-Sauvignon (**Figure 72**). Pour le millésime 2017, les concentrations varient de 13 $mg.L^{-1}$ pour le Carménère ou le Merlot à 30 $mg.L^{-1}$ pour le Touriga Nacional. La première observation importante est que le millésime 2016 est plus concentré en tétramère couronne que le millésime 2017. En comparant ces observations avec les concentrations en tétramère couronne dans les pellicules de ces cépages (Chapitre 3 II. A.), les deux résultats coïncident. L'impact du climat, favorable en 2016 contrairement à 2017, observé dans les pellicules a bien été trouvé par la suite dans les vins.

Dans le chapitre 3 II., les histogrammes de la concentration en tanins couronnes en fonction des cépages ont été séparés en trois groupes distincts : le Groupe F (concentration faible), le groupe M (concentration moyenne) et le groupe H (concentration haute). Les cépages choisis pour les microvinifications font partie du groupe M à l'exception du Carménère faisant partie du groupe F pour le millésime 2016. Les mêmes observations apparaissent pour le millésime 2017. Les cépages microvinifiés font partie du groupe F à l'exception du Tinto Cao et du Prunelard appartenant au groupe M. Sachant que les différences à l'intérieur des groupes sont non significativement différenciable, il est ainsi logique que nos vins microvinifiés possèdent entre eux de faibles différences.

Ainsi pour le millésime 2016, les cépages classés suivant leur teneur dans les pellicules (Chapitre 3 II. A.) et les vins monovariétaux correspondants possèdent un classement similaire. Le Carménère était le cépage le moins concentré et le Tinto Cao le plus concentré, respectivement aux deux classements

des vins et des pellicules. Pour le millésime 2017, tous les cépages font partie du groupe M à l'exception du Tinto Cao et du Prunelard qui eux font partie du groupe H. La comparaison entre les classements des pellicules extraites et des vins monovariétaux correspondants montre des similitudes de classements malgré les écarts de concentrations entre les cépages très faibles pour 2017. Par exemple pour ce millésime, le cépage Merlot est toujours le moins concentré. Ainsi, pour les deux millésimes étudiés, des similitudes de classement entre les extractions réalisées sur les pellicules et les vins correspondants ont été observées. Les écarts de concentrations entre les deux millésimes sont également similaires pour les deux types d'extraction.

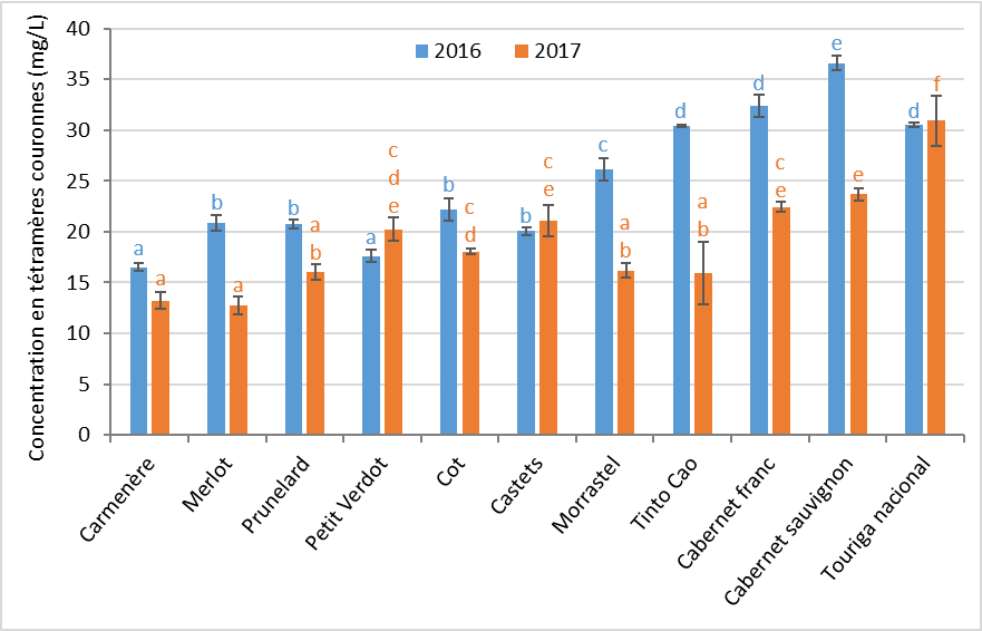


Figure 72 : Concentration en tétramères couronnes dans les vins monovariétaux

Passons à présent aux concentrations en pentamères couronnes dans les vins monovariétaux en fonction des cépages. Pour le millésime 2016, les concentrations varient de 7 mg.L^{-1} pour le Carménère à 26 mg.L^{-1} pour le Touriga Nacional (**Figure 73**). Les concentrations pour le millésime 2017 varient elles de 5 mg.L^{-1} pour le Merlot à 26 mg.L^{-1} pour le Touriga Nacional. Les mêmes observations ont été réalisées qu'avec l'histogramme du tétramère couronne ci-dessus. Pour tous les vins monovariétaux microvinifiés, les concentrations en pentamères couronnes pour le millésime 2016 sont plus élevées que pour le millésime 2017. Ce résultat est similaire à celui obtenu pour l'histogramme des concentrations en pentamères couronnes dans les pellicules des cépages correspondants.

Intéressons-nous maintenant au classement pour les millésimes 2016 et 2017. Pour le millésime 2016, les cépages choisis pour les microvinifications font tous partie du groupe M. La comparaison des classements entre les pellicules de cépage et les vins correspondants montrent des différences. En effet, la comparaison directe de l'ordre des classements est différente, mais plus que tous ces cépages font partie du même groupe M à la base, la différence est négligeable, car les écarts statistiques sont faibles. Les mêmes conclusions ont été tirées pour le millésime 2017. Cette fois-ci, les cépages sont répartis entre les groupes F et M concernant la classification à partir des pellicules. Le classement des vins monovariétaux possède les mêmes variétés moins concentrées en pentamère couronne comme le Merlot ou le Carménère. Finalement, les mêmes résultats ont été tirés entre les concentrations des pentamères et du tétramère couronne dans les vins monovariétaux.

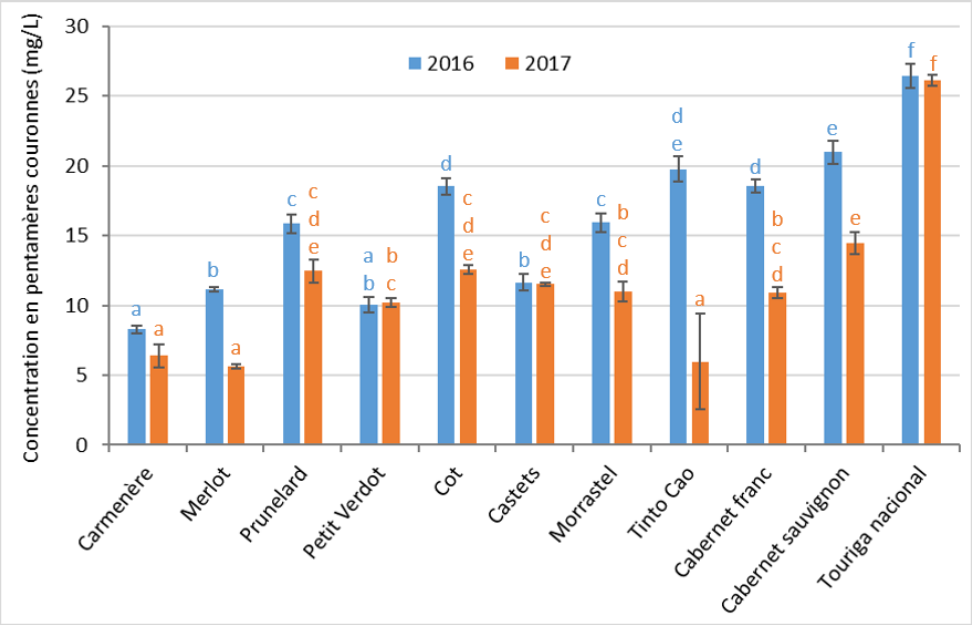


Figure 73 : Concentration en pentamères couronnes dans les vins monovariétaux

En conclusion, les comparaisons entre les concentrations en tanins couronnes, tétramère et pentamères, dans les pellicules des cépages et les vins monovariétaux correspondant à ces cépages ont montré des comportements similaires. En effet, les classements des cépages entre les pellicules et les vins sont proches. Cela vient du fait que les cépages choisis pour les microvinifications étaient à la base peu différente faisant ainsi partie du même groupe dans le classement des pellicules (Chapitre 3 II. A.). Pour plus de différence, les cépages totalement opposés en termes de concentration en tanins couronnes auraient pu être choisi. Ce classement similaire entre les concentrations dans les pellicules ou dans les vins montre qu'il est possible que l'intégralité des tanins couronnes soient extraits durant la vinification. De plus, d'autres conclusions ont été tirées de la comparaison entre le tétramère et les pentamères couronnes. Le classement des vins monovariétaux pour le tétramère et les pentamères

couronnes sont similaires. En revanche, les concentrations entre le tétramère et les pentamères couronnes sont bien différentes, le tétramère couronne étant plus concentré que les pentamères couronnes, comme cela avait été observé lors de l'analyse de ces composés dans les pellicules. Une autre observation qui ressort de ces courbes est la différence entre les deux millésimes étudiés. Les conditions climatiques avec un bon ensoleillement avec une reprise des précipitations en septembre pour le millésime 2016 sont des conditions climatiques beaucoup plus favorables que celle du millésime suivant. En effet, pour le millésime 2017, des pluies importantes durant l'été ont perturbé la bonne maturation du raisin.

Afin de pousser notre étude plus loin, les tétramères non cycliques ont été quantifiés dans les vins monovariétaux afin d'être comparés aux tanins couronnes par la suite (**Figure 74**). Le tétramère non cyclique majoritaire a été sélectionné pour la quantification. Les concentrations en tétramère non cyclique des vins monovariétaux ont été classées en fonction de la moyenne des cépages pour les différents millésimes étudiés et ils ont été classés par ordre croissant. Le vin le moins concentré est le Carménère avec 56 $mg.L^{-1}$ pour le millésime 2016 et 27 $mg.L^{-1}$ pour le millésime 2017 tandis que le cépage le plus concentré est le Côt avec 128 $mg.L^{-1}$ pour le millésime 2016 suivie de très près par le Prunelard qui lui-même est le plus concentrés avec 65 $mg.L^{-1}$ pour le millésime 2017. Comme observé pour les tanins couronnes, les classements entre les concentrations en tétramères non cycliques dans les pellicules et dans les vins correspondants sont similaires, malgré les écarts de concentrations faibles. Pour le millésime 2016 et 2017, les cépages les plus concentrés en tétramères non-cyliques sont les mêmes que ceux observés dans le classement des pellicules (Chapitre 3 II. B.).

La seconde observation est la grande différence de concentration qu'il existe entre les différents millésimes, le millésime 2016 étant deux fois plus concentré que le millésime 2017. Cela peut s'expliquer par le climat entre ces deux années totalement différentes. Cette différence a, par ailleurs, été observée pour les concentrations en tanins couronnes dans les vins monovariétaux précédemment, malgré le fait que les différences n'étaient pas aussi marquées.

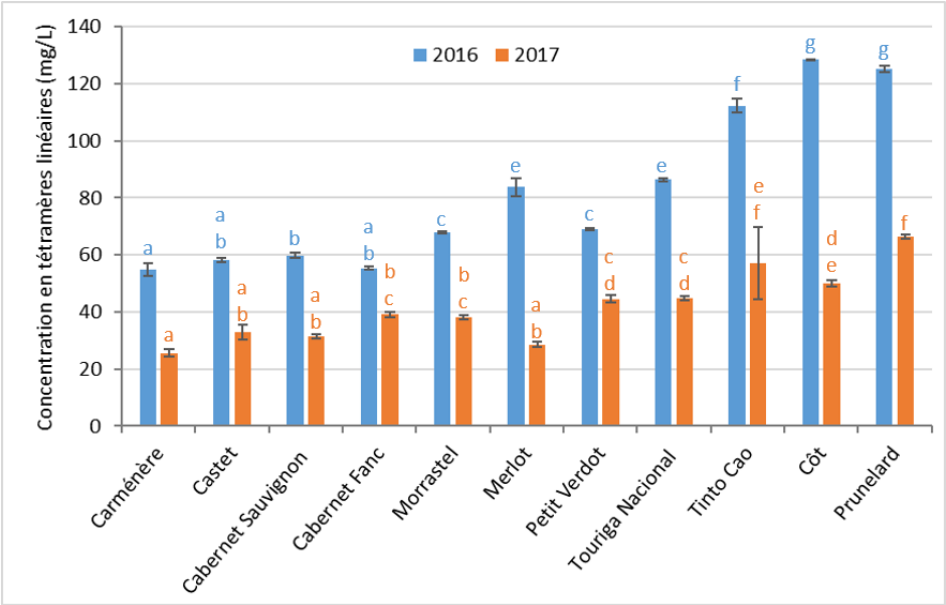


Figure 74 : Concentration en tétramères non cycliques dans les vins monovariétaux

Autres informations qui ressortent de cette courbe sont les différences de classement et de concentration en comparaison aux tanins couronnes. En effet, la comparaison des classements montre que les cépages les plus concentrés en tanins couronnes ne sont pas ceux qui sont les plus concentrés en tanins non cycliques. De même, pour la différence de concentration entre le tétramère couronne et les tétramères non cycliques, les concentrations sont bien plus importantes pour les tétramères non cycliques. Ces deux informations montrent bien la grande différence existant entre les tanins couronnes et les tanins non cycliques. Cette différence peut provenir à la base d'une différence de biosynthèse dans le raisin. Cette conclusion rejoint les conclusions tirées sur l'étude tanins couronnes dans les cépages (Chapitre 3 II).

Après avoir étudié l'évolution des tanins couronnes durant la vinification ainsi que dans les vins monovariétaux, l'étude des tanins couronnes se poursuit en suivant l'évolution du vin. La prochaine étude portera sur l'évolution des tanins couronnes durant le vieillissement.

II. Évolution des tanins couronnes durant le vieillissement des vins

A. L'évolution des tanins couronnes durant le vieillissement du vin en bouteille

Pour cette étude, une autre collaboration a été réalisée, cette fois-ci avec un château de l'appellation Pauillac. Des échantillons de vin issus d'une verticale allant de 1982 à 2016 nous ont été fournis. Les vins provenant de ce château ont été majoritairement vinifiés de la même façon. Les cépages utilisés ont toujours été les mêmes en fonction des années avec une majorité de Cabernet-

Sauvignon (85 %), de Merlot (12 %) et un peu de Cabernet Franc (3 %). Les millésimes étudiés et analysés sont : 2016, 2014, 2012, 2010, 2008, 2006, 2004, 2002, 2000, 1998, 1996, 1994, 1992, 1988, 1986, 1984 et 1982. Ces 17 vins ne sont pas des vins commerciaux, car ils ont été mis en bouteille sans étape de filtration. Sur chaque bouteille, un échantillon de chaque vin a été collecté, filtré et injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF afin d'étudier l'évolution de ces tanins couronnes, tétramère et pentamères, durant le vieillissement en bouteille. Dans sa thèse, Liming Zeng [20] avait déjà fait une étude préliminaire sur 3 verticales afin de voir l'évolution du tétramère couronne. Deux verticales provenaient respectivement de Saint-Émilion et de Saint-Estèphe, mais comptait peu de vins puisqu'il n'y en avait que huit pour chaque verticale ce qui paraît peu pour établir avec certitude une cinétique d'évolution. La dernière, composée de 16 vins, provenait du Sud de la France, de l'appellation Languedoc-Montpeyroux, avec des vins intégralement vinifiés avec de la Syrah (100 %). Le but de cette étude est de pouvoir comparer les deux verticales, Paulliac et Montpeyroux possédant chacune un grand nombre de millésimes. L'objectif est d'étudier la cinétique d'évolution des tannins couronnes durant le vieillissement en bouteille ainsi que leurs concentrations en fonction des deux appellations. L'étude a été réalisée sur les principaux tanins couronnes, tétramère et pentamère majoritaire, qui ont également été comparés avec le tétramère ou pentamère non cyclique majoritaire. Les quantifications de l'ensemble des molécules ont été réalisées avec le logiciel Mass Hunter.

Les concentrations en tétramère couronne et tétramère non cyclique pour chaque bouteille ont été classés du millésime le plus récent au millésime le plus ancien (**Figure 75**). Les concentrations en tétramère couronne varient de 56 $mg.L^{-1}$ à 32 $mg.L^{-1}$ tandis que les concentrations en tétramère non cyclique varient 48 $mg.L^{-1}$ à 15 $mg.L^{-1}$. Juste en regardant ces valeurs de concentrations entre les deux types de tétramères, une différence importante de concentration est observable pour le tétramère non cyclique. Sur l'histogramme de la **Figure 75**, les concentrations entre les deux types de tétramères sont similaires dans les vins jeunes alors que dans le vin le plus âgé, la concentration en tétramère non cyclique a presque été divisée par 3 au cours du vieillissement. Dans le même temps, il apparait que la concentration en tétramère couronne, elle, demeure stable. De plus, l'Indice des Polyphénols Totaux (IPT) a été mesuré pour tous les millésimes. Cependant, aucune corrélation entre l'IPT et la concentration en tanins couronnes n'a été mise en évidence. Les tanins couronnes étant très hydrosoluble et extrait en début de vinification, le fait de forcer plus au moins l'extraction durant la vinification en utilisant plus de remontage, par exemple, ne va avoir que peu d'impact sur leur concentration contrairement à celle des tanins non cycliques. Les tanins couronnes sont par contre eux fortement impactés par le millésime ce qui explique les différences parfois importantes entre les différents millésimes étudiés.

La comparaison des verticales de l'appellation Pauillac avec celle de l'appellation Languedoc Montpeyroux (**Figure 76**) qu'avait faite Zeng durant sa thèse présente des similitudes. Les tanins non cycliques diminuent drastiquement durant le vieillissement du vin en bouteille tandis que les tanins couronnes restent stables. La comparaison des deux appellations montre que les gammes de concentrations sont du même ordre, la diminution des tétramères non cycliques étant un peu plus marquée pour le cépage Syrah.

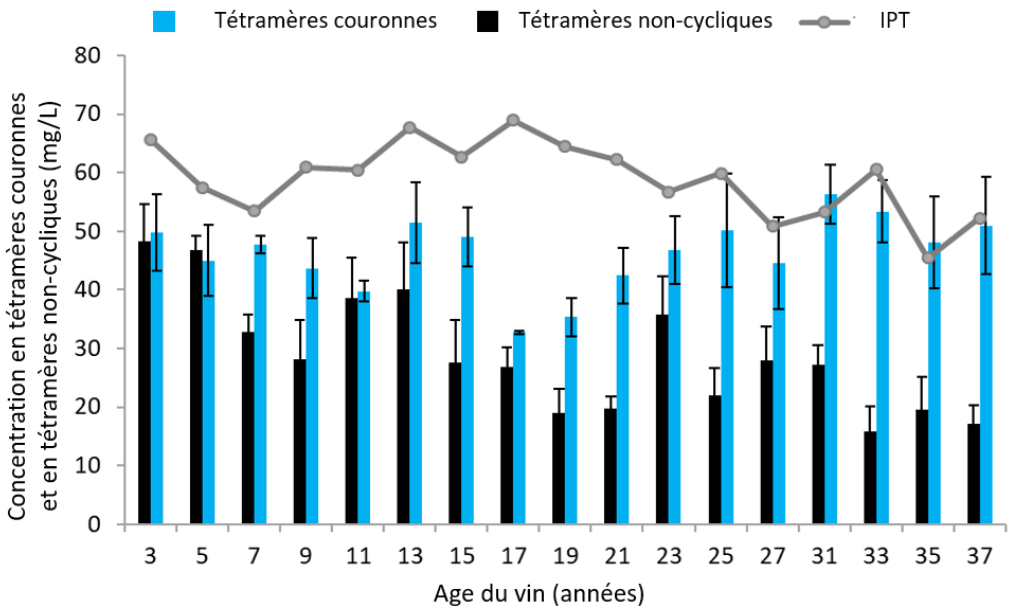


Figure 75 : Concentration en tétramères couronnes et non-cycliques en fonction de l'âge du vin pour l'appellation Pauillac

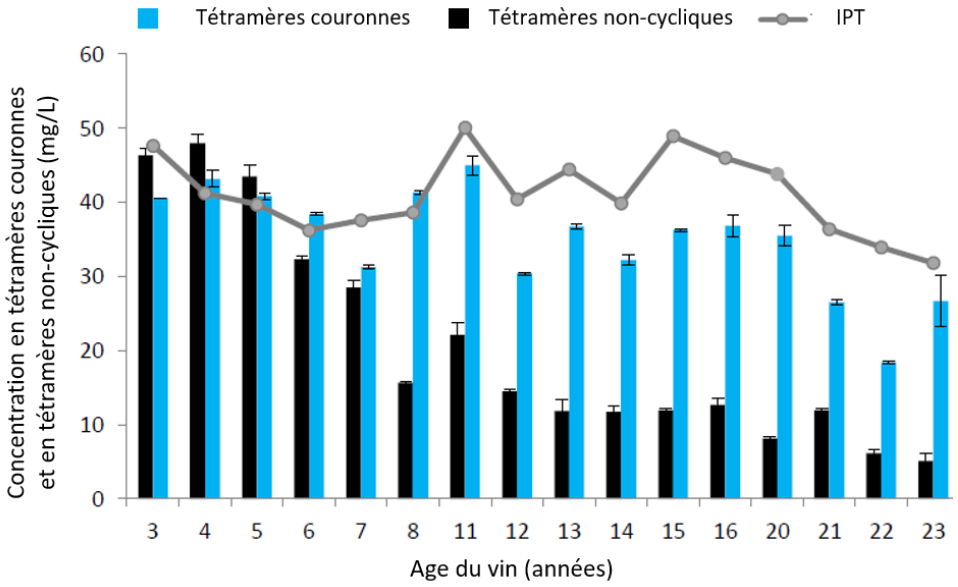


Figure 76 : Concentration en tétramères couronnes et non-cycliques en fonction de l'âge du vin pour l'appellation Languedoc Montpeyroux [20]

Passons maintenant à l'étude des pentamères, pour l'appellation Pauillac (**Figure 77**), les concentrations en pentamères couronnes varient de 31 $mg.L^{-1}$ à 15 $mg.L^{-1}$ tandis que les concentrations en pentamères non cycliques varient de 47 $mg.L^{-1}$ à 17 $mg.L^{-1}$ pour le vin de 37 ans. Comme pour l'étude des tétramères, les concentrations en pentamères, tous confondus, montrent une évolution bien différente selon la nature du pentamère (couronne ou non cyclique). La concentration en pentamères non cycliques est deux fois plus grande que celle des pentamères couronnes pour le vin le plus jeune, mais celle-ci diminue continuellement durant le vieillissement du vin en bouteille tandis que les pentamères couronnes restent stables tout au long du vieillissement du vin. La concentration en pentamères non cycliques diminue tellement qu'elle se trouve être plus faible que les pentamères couronnes pour les vins les plus âgés.

La comparaison de l'évolution des concentrations entre les deux appellations en pentamères couronnes et non cycliques conforte les résultats (**Figure 78**). En effet, la concentration en pentamère non cyclique diminue fortement durant le vieillissement des vins tandis que la concentration en pentamères couronnes reste constante dans les deux cas. Pour les deux appellations, les valeurs des concentrations en pentamères non cycliques et couronnes sont du même ordre de grandeur, l'observation majeure étant, là encore, que ces deux types de pentamères n'ont absolument pas le même comportement durant le vieillissement du vin.

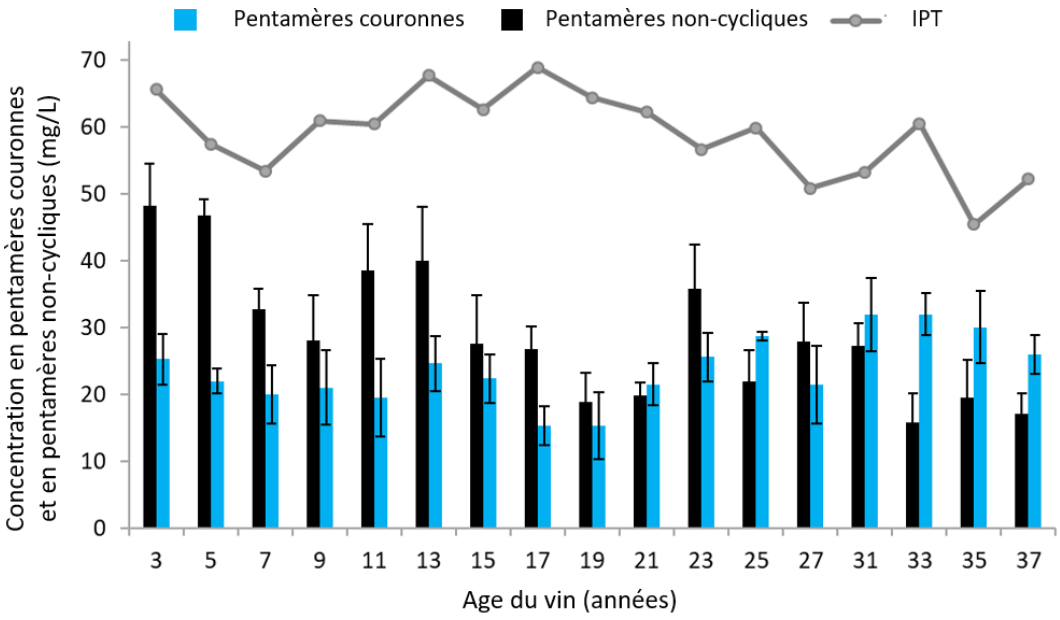


Figure 77 : Concentration en pentamères couronnes et non cycliques en fonction de l'âge du vin pour l'appellation Pauillac

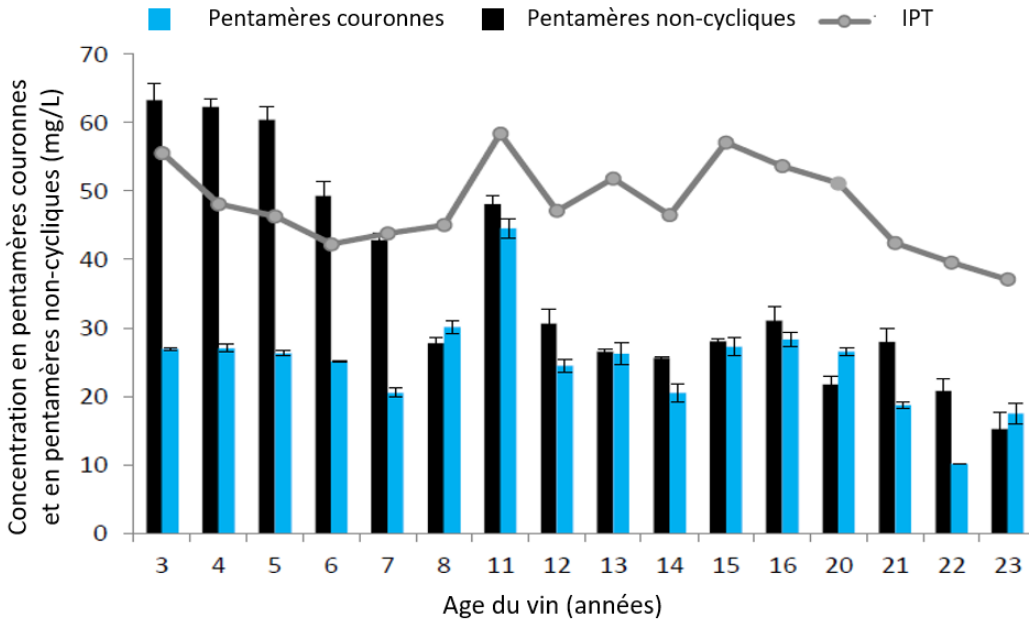


Figure 78 : Concentration en pentamères couronnes et non cycliques en fonction de l'âge du vin pour l'appellation Languedoc Montpeyroux [20]

La conclusion majeure de cette partie est le comportement différent des tanins couronnes durant le vieillissement du vin. En effet, ils restent stables tout au long du vieillissement tandis que les tanins non cycliques diminuent dramatiquement. Le tétramère ainsi que les pentamères couronnes

ont des concentrations constantes avec l'âge du vin. Cette stabilité des procyanidines couronnes par rapport aux procyanidines de type B non cycliques est forcément due à leur structure et probablement au fait que les tanins couronnes ne possèdent pas d'unité supérieure et d'unité terminale généralement impliquées dans les mécanismes d'évolution des tanins condensés, comme notamment la formation des pigments polymérisés. Cependant, cela ne suffit pas à expliquer cette stabilité de concentration dans le temps sans modification de structure. En effet, l'un des mécanismes importants de modification de structure des tanins condensés durant le vieillissement est leur oxydation suivie de la formation de liaisons intra ou intermoléculaires. Or, les tanins couronnes ont le même nombre de fonctions phénols et de cycles catéchol que les tanins non cycliques, ils devraient donc être sensibles à l'oxydation. Afin de vérifier cela, une expérience d'oxydabilité a été menée à bien.

B. L'oxydation des tanins couronnes

Le but de cette expérience est de vérifier si les tanins couronnes sont résistants à l'oxydation. Deux vins commerciaux de cépage Merlot ont été utilisés. Le premier provenant du millésime 2009, soit âgé de 9 ans lors de l'expérience, sera par la suite nommé « Vin vieux ». Le second, âgé de seulement 1 an lors de l'expérience, sera nommé « Vin jeune ». Le choix de ces deux vins plus et moins âgés a pour objectif de comparer l'effet de l'oxydation sur deux vins de matrices différentes, l'un possédant une matrice peu évoluée tandis que l'autre avait déjà subi une oxydation ménagée durant son vieillissement en bouteille et possédait déjà une matrice évoluée. Il y avait trois bouteilles par vin afin d'obtenir des triplicats. Chaque bouteille de chaque vin a alors été saturée à 8 $mg.L^{-1}$ d'oxygène dissout toutes les semaines durant les 20 semaines de l'expérience. Un échantillon de chaque bouteille a été prélevé toutes les semaines et a été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF. Les quantifications des différentes molécules ont été réalisées avec le logiciel MassHunter. Les molécules quantifiées étaient le tétramère couronne, les pentamères couronnes et enfin le tétramère non cyclique majoritaire.

Les concentrations en tanins couronnes et en tanins non cycliques ont alors été obtenues en fonction du temps. Pour le vin jeune (**Figure 79**), la concentration en tétramères non cycliques était de 71 $mg.L^{-1}$ en début de l'expérience et celle-ci diminue petit à petit pour atteindre une concentration d'environs 30 $mg.L^{-1}$ sur les cinq dernières semaines de l'étude. La concentration en tétramère couronne reste quant à elle constante passant simplement de 35 $mg.L^{-1}$ à 28 $mg.L^{-1}$ tout au long des 20 semaines. Les pentamères couronnes ont un comportement similaire au tétramère passant d'une concentration de 15 $mg.L^{-1}$ à 8 $mg.L^{-1}$. La comparaison des tanins couronnes et des tanins non cycliques montrent une grande diminution de ce dernier atteignant en fin d'expérience une concentration similaire à celle du tétramère couronne alors que le tétramère non cyclique était 2 fois plus concentré au début de la cinétique.

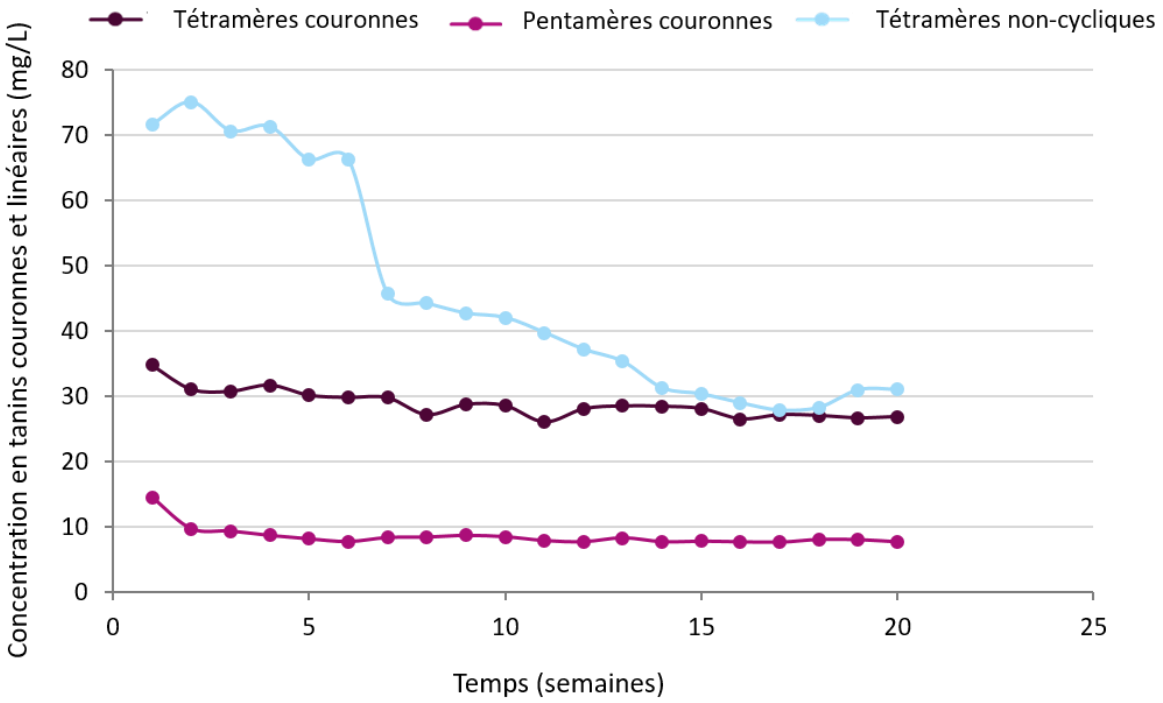


Figure 79 : Évolution des tanins couronnes et non-cycliques en fonction du temps dans un vin jeune

Dans le cas du vin vieux (**Figure 80**), la concentration en tétramère non cyclique était de 48 mg.L^{-1} en début d'expérience et celle-ci diminue petit à petit atteignant des concentrations de 12 mg.L^{-1} après 20 semaines de saturation hebdomadaire à 8 mg.L^{-1} d'oxygène. La concentration en tétramère couronne reste quant à elle encore une fois constante passant seulement de 51 mg.L^{-1} à 43 mg.L^{-1} tout au long des semaines de saturation en oxygène. Les pentamères couronnes ont, quant à eux, une concentration variant de 40 mg.L^{-1} à 31 mg.L^{-1}. Comme pour le vin jeune, les concentrations en tanins couronnes, tétramère et pentamères, restent stables tout au long du temps de saturation en oxygène tandis que les tétramères non cycliques diminuent très fortement. En effet, les concentrations, en début d'expérience, pour les trois molécules sont semblables tandis qu'en fin d'expérience après la forte diminution des tanins non cycliques de type B, leurs concentrations est trois voire quatre fois plus faible que celles des tanins couronnes.

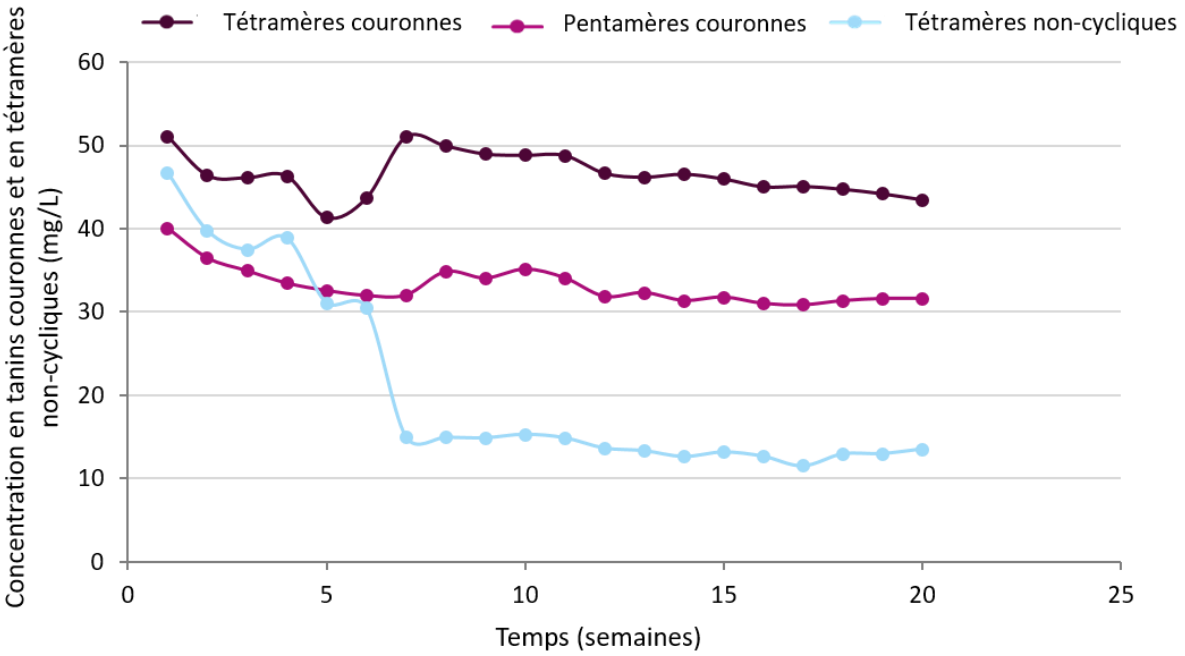


Figure 80 : Évolution des tanins couronnes et non-cycliques en fonction du temps pour un vin vieux

La comparaison des deux millésimes montre que, quel que soit l'état d'évolution et d'oxydation du vin au départ, l'évolution des tanins couronnes et des tanins non cycliques est drastiquement différente. En effet, les tanins non cycliques diminuent tout au long du temps d'oxygénation alors que les tanins couronnes, tous confondus, demeurent stables.

Cette stabilité des tanins couronnes vis-à-vis d'une l'oxydation poussée explique pourquoi durant le vieillissement des vins en bouteille leurs concentrations reste stable alors que celle des tanins non cycliques diminue fortement. De nouvelles investigations seront nécessaires afin de mieux comprendre et rationaliser les raisons de cette résistance à l'oxydation par rapport aux tanins non cycliques. Cette oxydabilité plus faible des tanins couronnes est probablement induite par leurs structures macrocycliques et les possibles liaisons intramoléculaires qui en découlent.

III. L'évolution de la couleur : étude des pigments polymérisés

Durant l'élevage et le vieillissement, le vin, qui est un milieu acide et oxygéné, évolue. Ainsi de nombreuses molécules, qui au départ provenaient du raisin, évoluent par le biais de mécanismes acides et/ou d'oxydation. La famille des polyphénols, en particulier les tanins condensés et les anthocyanes, sont très sensibles à ces mécanismes créant alors de nouvelles liaisons comme par

exemple, les liaisons de type A, les ponts éthylidènes, ou de nouveaux composés comme les pigments polymérisés provenant de liaisons entre les tanins condensés et les anthocyanes. La formation de ces pigments polymérisés va participer à la stabilisation et à l'évolution de la couleur du vin passant de pourpre/violet pour les vins jeunes à brique/orangé pour les vins âgés [250]. Concernant les pigments polymérisés, leur large gamme de masses allant des oligomères jusqu'aux polymères rend leur quantification individuelle difficile. Cependant une stratégie de dépolymérisation chimique en milieu acide par phloroglucinolyse a été utilisée afin de déterminer des marqueurs spécifiques de chaque famille de pigments polymérisés [204].

Pour l'étude suivante, les échantillons utilisés étaient ceux de la verticale des vins provenant du château de l'appellation Pauillac. La gamme était composée de 17 bouteilles, âgée de 3 à 37 ans, les millésimes étant 1982, 1984, 1986, 1992, 1994, 1996, 1998, 2000, 2002, 2004, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014 et 2016. Cet échantillonnage large est un bon modèle pour étudier le vieillissement des vins. Le but de cette partie est d'étudier l'évolution de la couleur des vins rouges par différentes analyses colorimétriques, spectroscopiques et chromatographiques.

A. L'analyse de la couleur durant le vieillissement des vins rouges

Les vins de la verticale ont fait l'objet d'une étude par colorimétrie et par spectrométrie. Dans un premier temps, l'ensemble des vins a été analysé par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier sur le WineScan du laboratoire pour obtenir les valeurs classiques telles que le pH, le CO_2, le TAV, et l'acidité totale du vin. Par ailleurs, des détails sur les cépages ont été fournis par le château lui-même afin de pouvoir visualiser l'homogénéité des échantillons de vin analysés (**Tableau 8**). Les données fournies par le WineScan montrent une faible variation des valeurs de base des différents vins comme le pH ou l'acidité totale. De plus, ces paramètres sont stables dans le temps et se ressemblent malgré les écarts d'âge important entre eux. De surcroit, la proportion des cépages utilisés est du même ordre entre tous les millésimes confirmant le fait que cette gamme de vin se prête bien à une étude sur l'évolution de la couleur durant le vieillissement en bouteille puisque les variations observées ne seront pas causées par de possibles effets de cépage.

Tableau 8 : Les valeurs des paramètres fondamentaux du vin données par le WineScan et par le château

Millésimes	Age	Cépages	CO2	TAV (%)	AT (g/L H_2SO_4)	pH
2016	3	Cabernet-Sauvignon : 83 %, Cabernet Franc : 1 %, Merlot : 15 %	194	13,49	3,67	3,56
2014	5	Cabernet-Sauvignon : 81 %, Cabernet Franc : 3 %, Merlot : 16 %	173	13,08	3,76	3,61
2012	7	Cabernet-Sauvignon : 90 %, Cabernet Franc : 2 %, Merlot : 8 %	202	13,19	3,27	3,73
2010	9	Cabernet-Sauvignon : 94 %, Merlot : 6 %	209	13,5	3,32	3,74
2008	11	Cabernet-Sauvignon : 83 %, Merlot : 17 %	230	13,06	3,15	3,7
2006	13	Cabernet-Sauvignon : 87 %, Merlot : 13 %	146	12,74	3,23	3,75
2004	15	Cabernet-Sauvignon : 69 %, Cabernet Franc : 13 %, Merlot : 12 %, Petit Verdot : 3 %	232	12,8	3,11	3,75
2002	17	Cabernet-Sauvignon : 86 %, Cabernet Franc : 2 %, Merlot : 12 %	272	12,95	3,41	3,69
2000	19	Cabernet-Sauvignon : 86 %, Merlot : 14 %	192	12,32	3,51	3,73
1998	21	Cabernet-Sauvignon : 86 %, Cabernet Franc : 2 %, Merlot : 12 %	243	12,35	3,29	3,66
1996	23	Cabernet-Sauvignon : 77 %, Cabernet Franc : 10 %, Merlot : 13 %	178	12,8	3,59	3,64
1994	25	Cabernet-Sauvignon : 80 %, Cabernet Franc : 8 %, Merlot : 10 %, Petit Verdot : 2 %	250	12,32	3,25	3,55
1992	27	Cabernet-Sauvignon : 75 %, Cabernet Franc : 10 %, Merlot : 13 %, Petit Verdot : 2 %	157	12,18	3,48	3,63
1988	31	Cabernet-Sauvignon : 75 %, Cabernet Franc : 10 %, Merlot : 13 %, Petit Verdot : 2 %	184	12,41	3,41	3,57
1986	33	Cabernet-Sauvignon : 75 %, Cabernet Franc : 10 %, Merlot : 12 %, Petit Verdot : 3 %	154	12,7	3,39	3,51
1984	35	Cabernet-Sauvignon : 78 %, Cabernet Franc : 10 %, Merlot : 12 %	189	11,96	3,33	3,52
1982	37	Cabernet-Sauvignon : 85 %, Cabernet Franc : 8 %, Merlot : 7 %	161	12,51	3,34	3,62

Outre ces paramètres classiques, les valeurs obtenues par spectrométrie et colorimétrie ont alors été répertoriées. Les analyses spectrométriques sur l'indice de polyphénols totaux et les tanins totaux montrent également une stabilité de ceux-ci dans le temps (**Tableau 9**). En revanche, les valeurs de l'étude colorimétrique montrent une importante variation de la couleur comme attendu. En effet, même si l'intensité colorante reste stable dans le temps sur la période étudiée, la teinte augmente avec l'âge du vin, ainsi qu'une augmentation de la composante jaune de la couleur (A420) alors que dans le même temps les composantes rouge (A520) et bleu-violet (A620) diminuent.

Tableau 9 : Les valeurs des analyses spectroscopiques et colorimétriques

Millésimes	Age	Analyses spectroscopiques							Analyses Cielab		
		IPT	Tanins totaux (g/l)	A420	A520	A620	IC	Teinte	L*	a*	b*
2016	**3**	65,66	4,22	6,17	8,44	1,94	16,56	0,73	6,02	34,02	10,18
2014	**5**	57,47	3,94	5,15	5,78	1,37	12,30	0,89	10,76	40,96	18,40
2012	**7**	53,49	3,88	5,88	6,26	1,61	13,75	0,94	8,22	37,96	14,10
2010	**9**	60,97	4,37	6,46	6,54	1,67	14,67	0,98	7,39	36,56	12,51
2008	**11**	60,48	4,46	4,92	4,52	1,14	10,58	1,09	13,46	42,97	23,08
2006	**13**	67,74	5,28	5,93	5,35	1,36	12,64	1,11	10,24	39,60	17,46
2004	**15**	62,70	4,63	6,20	5,59	1,43	13,22	1,11	9,87	39,45	16,86
2002	**17**	68,96	5,02	6,12	5,13	1,23	12,47	1,19	11,29	41,09	19,35
2000	**19**	64,45	4,53	5,76	4,76	1,12	11,64	1,21	13,42	43,25	22,99
1998	**21**	62,26	4,68	5,23	4,55	1,07	10,85	1,15	13,80	43,85	23,77
1996	**23**	56,72	4,41	5,34	4,51	1,03	10,86	1,18	14,28	44,40	24,62
1994	**25**	59,90	4,36	4,85	4,16	1,01	10,02	1,16	15,08	44,58	25,80
1992	**27**	50,90	3,68	4,40	3,24	0,79	8,42	1,36	23,31	48,90	39,74
1988	**31**	53,31	4,00	4,94	4,01	1,12	10,07	1,23	17,42	46,66	29,72
1986	**33**	60,53	4,50	5,91	4,70	1,21	11,83	1,26	11,29	40,04	19,25
1984	**35**	45,47	3,05	4,46	3,35	1,11	8,91	1,33	19,41	42,77	33,02
1982	**37**	52,27	4,53	5,95	4,37	1,20	11,51	1,36	14,77	41,80	25,25

Les analyses Cielab, avec les valeurs L*a*b*, ont permis une meilleure évaluation de la couleur du vin en fonction de son âge. L'augmentation de la variable L* indique que la clarté du vin s'accroît ce qui correspond à une couleur de moins en moins sombre. L'augmentation légère, mais continue des valeurs de a* pourrait laisser penser que la couleur rouge du vin augmente avec le temps. Cependant, cette légère augmentation de la composante a* est surtout corrélée à une très forte augmentation des valeurs de b* qui montre que le vin en vieillissant se rapproche de la couleur jaune. C'est donc la résultante de ces 3 variables qui montre que le vin passe d'une couleur rouge sombre à une couleur un peu plus claire et plus orangée. Grâce à ces 3 variables, une représentation en camembert a été créée montrant les 17 nuances de couleur du vin généré grâce à ces valeurs de L*a*b* en fonction de l'âge et du vieillissement du vin (**Figure 81**). Ainsi, la couleur montre une évolution continue de la gamme de rouge bordeaux allant des plus foncés aux plus clairs avec l'âge des vins.

Cependant, certains millésimes ressortent très fortement comme ayant soit une couleur évoluée pour leur âge ou au contraire une couleur mieux stabilisée et conservée. Par exemple, les millésimes 2008 et 1992 apparaissent avec une couleur plus claire et orangée pour leur âge alors qu'un millésime comme 1986 a une couleur proche de celle de millésime avec 20 ans de moins. Cette variabilité de la couleur est connue et fait partie des effets millésimes. En revanche, il est difficile d'identifier les indicateurs moléculaires responsables de cette variation qui pour les échantillons étudiés n'est pas liée à l'acidité ou la richesse phénolique du vin.

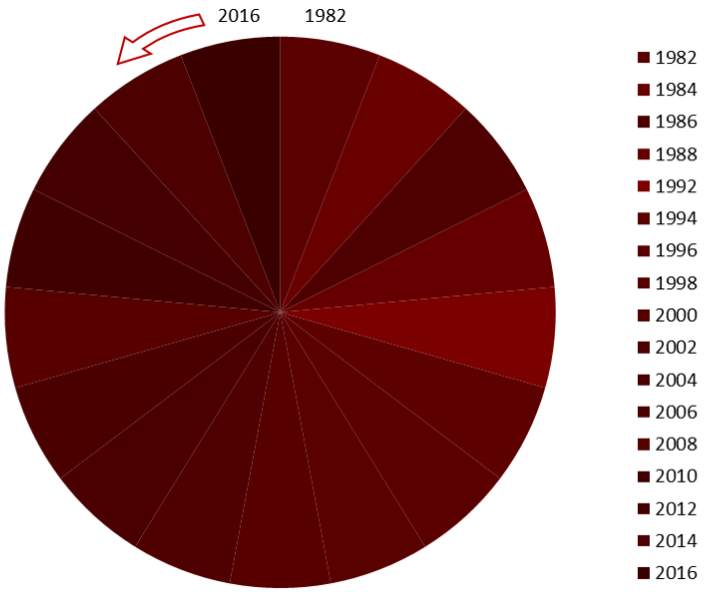


Figure 81 : Représentation de l'évolution de la couleur de la gamme de vin de l'appellation Pauillac

B. L'étude chromatographique des pigments polymérisés

L'objectif de cette partie était, dans un premier temps, de faire une analyse quantitative de chaque famille de pigments polymérisés. Par la suite, ces premières analyses ont été corrélées avec l'évolution et les variations de couleur observées dans le paragraphe précédent afin de voir si une relation existait. Les pigments polymérisés sont considérés comme l'une des grandes familles macromoléculaires du vin englobant un grand nombre de structures chimiques différentes. Dans les conditions acides et oxygénées du vin qui vieillit, de nombreuses réactions chimiques entre les anthocyanes et les autres constituants du vin, notamment les tanins condensés, vont conduire à la formation des pigments polymérisés et vont, ainsi, participer à la stabilisation de la couleur. Ces pigments polymérisés résultent d'une addition directe ou indirecte, par l'intermédiaire d'aldéhyde, entre une unité d'anthocyane et les tanins condensés.

La stratégie de la dépolymérisation chimique par phloroglucinolyse a été utilisée pour la quantification de chaque famille de pigments. En effet, lors de la dépolymérisation chimique, les liaisons de type B des chaînes tanniques oligomériques ou polymériques des pigments polymérisés sont coupées lors de la réaction de phloroglucinolyse conduisant alors à la libération de différents marqueurs, monomériques, dimériques ou bien sous forme de marqueurs avec un adduit phloroglucinol ajouté lors de la réaction [204]. Les marqueurs avec un adduit phloroglucinol ont été quantifiés dans la fraction dépolymérisée tandis que les autres marqueurs classiques proviennent de

la différence de concentrations avant et après phloroglucinolyse, cette différence correspondant à la partie libérée par la dépolymérisation.

Pour cela, trente marqueurs, répertoriées dans le (**Tableau 10**), caractéristiques de différentes familles de pigments polymérisés ont été préalablement identifiées et quantifiées dans les vins. Les différentes molécules ont été classées par famille de pigments polymérisés en fonction de leurs structures chimiques [20]. Les quatre différentes familles étudiées étaient les pigments polymérisés issus de condensations directes, les pigments polymérisés issus de condensations indirectes, les pigments polymérisés avec une liaison de type A et enfin la famille des pyranoanthocyanes. Ainsi, quelques molécules de chaque famille ont été choisies pour réaliser l'étude.

Un échantillon de chaque millésime a alors été prélevé, filtré et injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF avec la méthode développée pour les pigments polymérisés. La quantification a été réalisée sur le logiciel MassHunter Quantitative après identification des marqueurs par analyse MS/MS [204].

Tableau 10 : Les marqueurs des pigments polymérisés identifiés dans le vin rouge

Composés	Formule $[M]^+$ ou $[M+H]^+$	m/z calculé	T.R. (min)
EC-Mv-(3-*O*-glc) C-Mv-(3-*O*-glc)	$[C_{38}H_{37}O_{18}]^+$	781,1974	4,720 5,404
Mv-(3-*O*-glc)-C/EC	$[C_{38}H_{37}O_{18}]^+$	781,1974	6,679 7,172
Mv-(3-*O*-glc)-C(type A) Mv-(3-*O*-glc)-EC(type A)	$[C_{38}H_{38}O_{18}+H]^+$	783,2131	6,690 7,514
C/EC-[Mv-(3-*O*-glc)-C/EC(type A)]	$[C_{53}H_{50}O_{24}+H]^+$	1071,2765	4,923 5,597
[Mv-(3-*O*-glc)-C/EC(type A)]-C/EC	$[C_{53}H_{50}O_{24}+H]^+$	1071,2765	5,846 6,487
[Mv-(3-*O*-glc)-C/EC(type A)]-phloroglucinol	$[C_{44}H_{42}O_{21}+H]^+$	907,2291	5,490 5,648
Mv-(3-*O*-glc)-pont éthylidène-C/EC	$[C_{40}H_{41}O_{18}]^+$	809,2287	7,839 7,980 8,263 8,396
Mv-(3-*O*-glc)-pont éthylidène-C/EC-phloroglucinol	$[C_{46}H_{45}O_{21}]^+$	933,2448	7,562 7,845 8,053
Mv-(3-*O*-glc)-pont éthylidène-C/EC-C/EC	$[C_{53}H_{53}O_{24}]^+$	1097,2920	7,447
PyranoMv-(3-*O*-glc)-C/EC	$[C_{40}H_{37}O_{18}]^+$	805,1974	9,336 9,886
PyranoMv-(3-*O*-glc-acétylé)-C/EC	$[C_{42}H_{39}O_{19}]^+$	847,2080	9,611 9,819
PyranoMv-(3-*O*-glc-*p*-coumaroylé)-C/EC	$[C_{49}H_{43}O_{20}]^+$	951,2342	9,769
PyranoMv-(3-*O*-glc)-C/EC-C/EC	$[C_{55}H_{49}O_{24}]^+$	1093,2610	7,353 7,436
PyranoMv-(3-*O*-glc-acétylé)-C/EC-C/EC	$[C_{57}H_{51}O_{25}]^+$	1135,2714	7,561 7,644
PyranoMv-(3-*O*-glc-*p*-coumaroylé)-C/EC-C/EC	$[C_{64}H_{55}O_{26}]^+$	1239,2976	8,468

a. Les pigments polymérisés issus d'une condensation directe de type B entre tanins et anthocyanes

Dans la littérature, les condensations directes entre tanins et anthocyanes conduisant à la formation des pigments polymérisés de type A^+-T, et T-A^+ ont été montrées. Des marqueurs spécifiques de ces deux familles de composés ont également été caractérisés. Ceux-ci sont ainsi détectables et quantifiables par UPLC-UV-ESI-QTOF. Dans notre verticale de vin, les formes A^+-T et T-A^+ ont été identifiées et quantifiées et leurs concentrations ont été calculées en équivalents de malvidine-3-*O*-

glucoside. La différenciation entre les pics des molécules A^+-T et de pigment polymérisé de type T-A^+ étant parfois difficile, il a été décidé de représenter ces familles de molécules en une seule courbe. La quantification des adduits A^+-T et T-A^+ dans les vins montrent que ceux-ci sont résistants à la dépolymérisation chimique par phloroglucinolyse, observation réalisée par Liming Zeng dans son étude sur les pigments polymérisés [204].

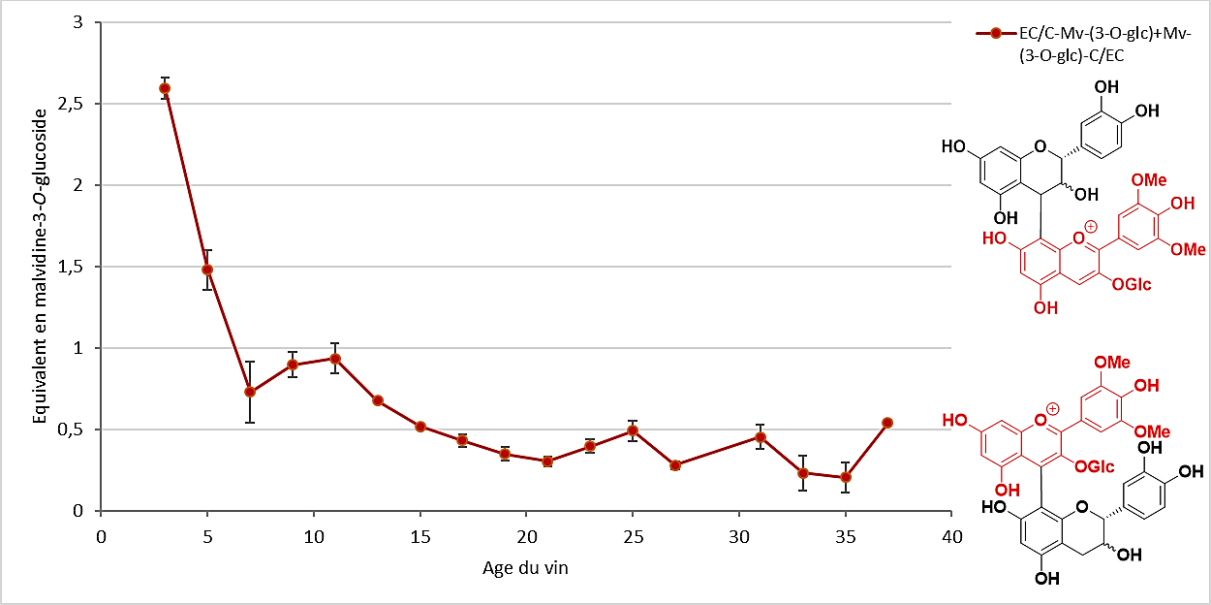


Figure 82 : Évolution des pigments polymérisés de type A^+-T et T-A^+ en fonction du vieillissement du vin

Dans la **Figure 82**, l'évolution des pigments polymérisés de type A^+-T et T-A^+, en équivalent de malvidine-3-*O*-glucoside, a été représentée en fonction de l'âge du vin. La tendance générale montre une diminution de l'ensemble de la famille durant le vieillissement du vin. Une importante chute de concentration est observée en début de vieillissement et par la suite, la diminution de la concentration de cette famille est plus douce. Cette diminution peut être attendue puisqu'ils peuvent par oxydation à nouveau se transformer en d'autres molécules colorées et plus stables nommées, xanthyliums. Cette transformation justifie le fait que cette famille de molécules diminue avec le temps. Cependant, aucune corrélation entre la variation de concentration de cette famille de pigments polymérisés et les variations de couleur observées ne peut être déduite. Il est donc peu probable que ce soit cette famille de pigment qui induise les variations de couleur même si elle doit y participer.

b. Composés polymériques ayant une liaison de type A entre tanins et anthocyanes

Le mécanisme de formation des pigments polymérisés de type [A^+-T] possède un intermédiaire clé qui par oxydation peut conduire à leur formation, mais peut également conduire à la formation des polymères incolores avec une liaison de type A. Différents marqueurs de cette famille de composés

ont été identifiés et assignés durant la thèse de Liming Zeng. Ceux-ci ont été utilisés pour la quantification de cette famille dans les échantillons de notre verticale. Les molécules de pigments polymérisés de type A qui ont été choisies sont : les dimères malvidine-3-*O*-glucoside (Mv-3-*O*-glc) avec la catéchine (C) ou l'épicatéchine (EC) ayant une liaison de type A, les trimères C/EC — [Mv — (3-*O*-glc) — C/ EC (type A)] et [Mv — (3-*O*-glc) — C/ EC (type A)] — C/ EC et enfin le dimère [Mv — (3-*O*-glc) — C/ EC (type A)] — Phloroglucinol. Tous ces composés ont été quantifiés et leurs concentrations ont été calculées en équivalents de malvidine-3-*O*-glucoside.

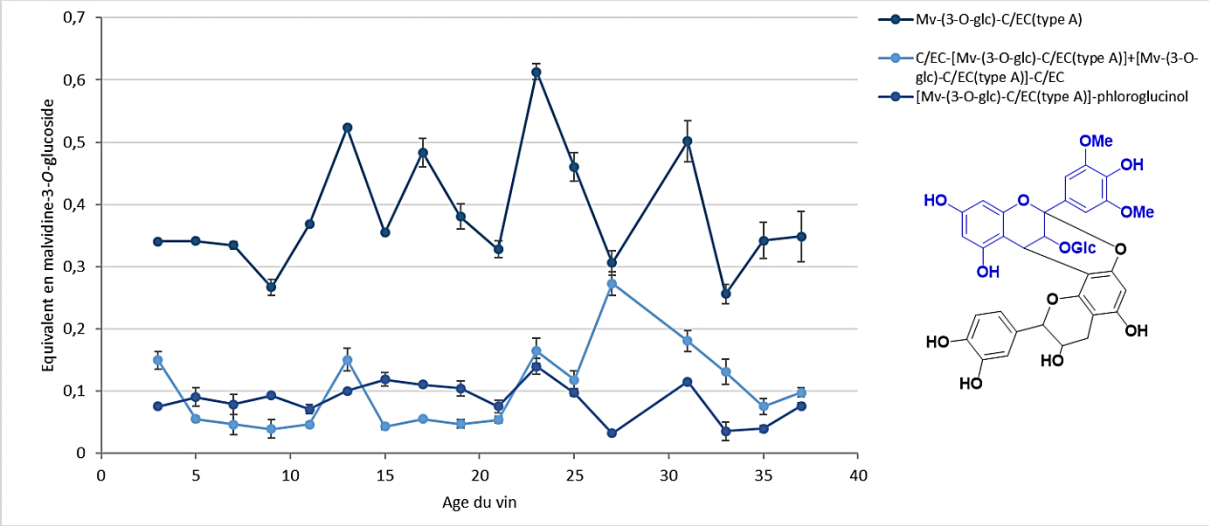


Figure 83 : Évolution des pigments polymérisés de type A durant le vieillissement du vin rouge

Sur la **Figure 83**, les concentrations des pigments polymérisés de type A ont été représentées en fonction de l'âge du vin. Les différents marqueurs étudiés possèdent tous le même comportement de stabilité en fonction de l'âge du vin. Ces conclusions peuvent être tirées alors que les courbes ne sont pas forcément très linéaires et que certains écarts types sont élevés malgré le fait que les variations de concentration sont-elles très faibles. Toutes ces molécules sont stables tout au long du processus de vieillissement. Ces résultats montrent ainsi qu'après formation de la liaison de type A, ces molécules resteront sous leurs formes de liaisons de type A et ne sont pas oxydées durant le vieillissement du vin. Cette étude cinétique montre également qu'en plus de leur stabilité, ces molécules sont donc formées durant la vinification et l'élevage des vins, restant ainsi stables dans la matrice. De plus, une autre information importante ressort de cette étude : la concentration en dimère de type A est toujours plus importante que celle des trimères ou même des oligomères. Ces derniers résultats montrent que la formation de ce composé incolore se fait très majoritairement avec les flavanols monomères et très peu avec les procyanidines oligomères.

c. Les pigments polymérisés possédant un pont éthylidène entre tanins et anthocyanes

Continuons notre étude avec les pigments polymérisés liés par une liaison éthylidène entre tanins et anthocyanes. Durant l'évolution du vin, des condensations indirectes peuvent se former entre les différentes unités monomériques, qu'elles soient de nature tanique ou anthocyaniques. Ces condensations indirectes se font par l'intermédiaire de l'acétaldéhyde le plus souvent, celui-ci provenant des métabolites des levures générées pendant la fermentation ou de l'oxydation de l'éthanol.

Dans cette partie, trois marqueurs de pigments polymérisés liés par un pont éthylidène ont été sélectionnés : le dimère Mv — (3-*O*-glc) — pont éhtylidène-C/EC, son équivalent en adduit avec un phloroglucinol en plus, Mv — (3-*O*-glc) — pont éhtylidène-C/EC-phloroglucinol et le trimère Mv — (3-*O*-glc) — pont éhtylidène-C/EC-C/EC. Ils ont tous été quantifiés en UPLC-UV-ESI-QTOF en équivalent de malvidine-3-*O*-glucoside. Ainsi, les marqueurs de cette famille sont A^+-pont éthylidène–T sans rupture de la liaison indirecte, c'est pour cela que l'adduit avec le phloroglucinol est possible.

Sur la **Figure 84** ci-dessous, les concentrations des trois marqueurs de pigments liés par un pont éthylidène sont représentées en fonction de l'âge du vin. Les tendances pour les trois pigments polymérisés sont différentes. En effet, une diminution de la concentration du dimère Mv — (3-*O*-glc) — pont éhtylidène-C/EC ainsi que des pigments oligomères matérialisés par le marqueur Mv — (3-*O*-glc) — pont éhtylidène-C/EC-phloroglucinol a été observée, celle-ci étant drastique dans les vins jeunes pour ensuite se stabiliser au cours du temps. Le trimère, quant à lui, reste stable tout au long du vieillissement du vin. Cette diminution de la concentration de ces pigments polymérisés liés par un pont éthylidène, peu importe le millésime, montre que ces pigments sont formés durant la vinification et l'élevage et non pas durant le vieillissement en bouteille. Cette diminution provient de l'oxydation du milieu au cours du vieillissement. En effet dans la littérature, il a été montré que ces composés, par réarrangement oxydatif, pouvaient se transformer en structure de type xanthylium [169]. Là encore, aucune corrélation entre la couleur observée et les variations de concentration de cette famille de molécule colorée n'a pu être déduite.

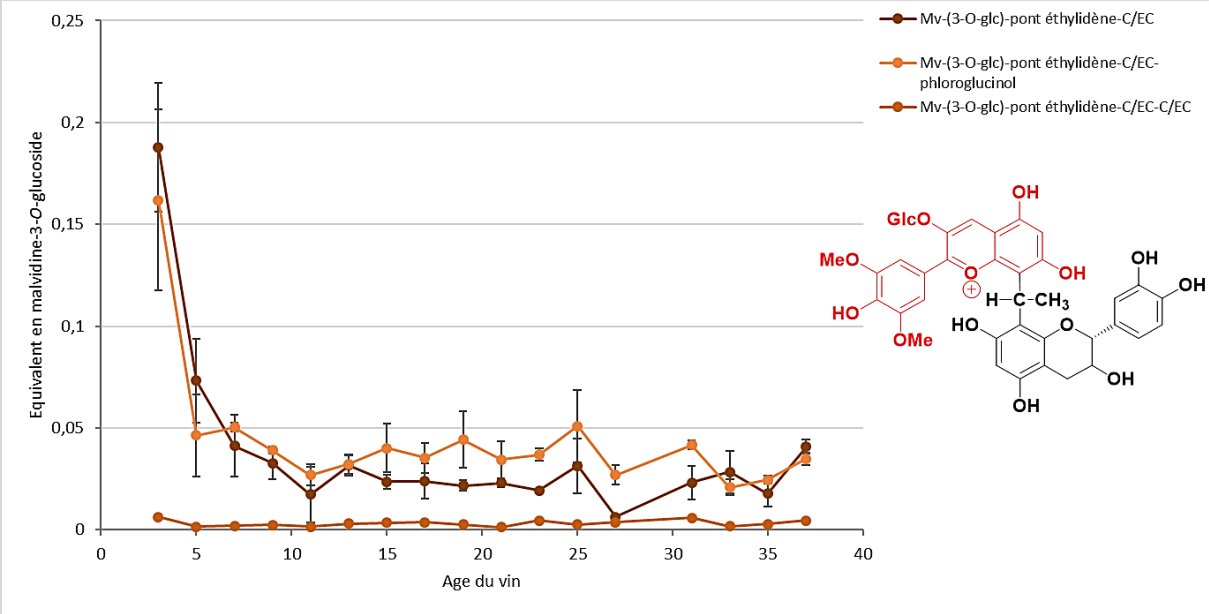


Figure 84 : Évolution des pigments polymérisés avec un pont éthylidène en fonction du vieillissement du vin rouge

d. Les pigments polymérisés de type pyranoanthocyanes

Enfin, la cinétique d'une dernière famille de pigments polymérisés, les pyranoanthocyanes a été déterminée. Cette famille provient au départ d'une anthocyane qui a subi une cyclisation intramoléculaire et un réarrangement oxydatif conduisant ainsi à la formation d'un cycle D sur la molécule. Ainsi, cette famille de molécules est très vaste, car les composés, avec lesquels cette cyclisation intramoléculaire se réalise, sont nombreux (voir figure 20 Chapitre 1 IV. C.). Pour la suite de notre étude, seule la famille des flavanol-pyranoanthocyanes a été étudiée.

Ainsi, pour notre étude, les marqueurs de la famille des flavanol-pyranoanthocyanes simples, acétylés ou coumaroylés ont été sélectionnés ainsi que leurs trimères respectifs. Ils ont tous été quantifiés en équivalents de malvidine-3-*O*-gluscoside. Par la suite, chaque classe de chaque structure de flavanol-pyranoanthocyane a été comparée.

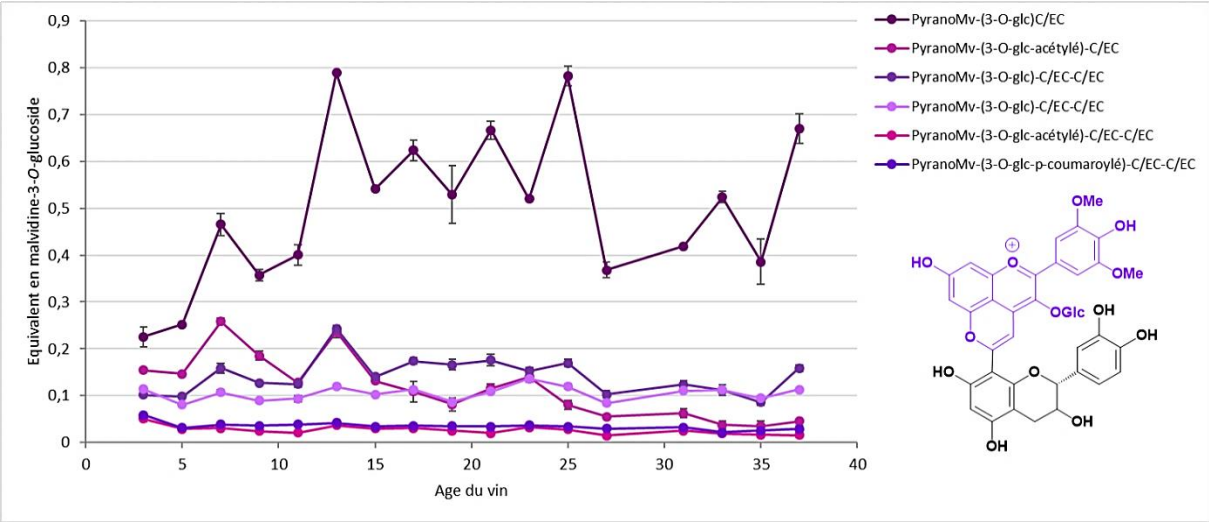


Figure 85 : Évolution des pigments polymérisés de type pyranoanthocyanes en fonction du vieillissement du vin rouge

Sur la **Figure 85**, les six flavanol-pyranoanthocyanes sont représentés en fonction de l'âge du vin. Les sous-familles de flavanol-pyranoanthocyanes étudiées sont les monoglucosides, les acétylés et les coumaroylés. De plus, les concentrations en dimères et trimères monoglucosides sont nettement supérieures aux autres sous-familles, ce qui est normal puisque les anthocyanes monoglucosides sont majoritaires par rapport aux acétylés et les *p*-coumaroylés dans le raisin et les vins. Néanmoins, la tendance générale de ces pigments polymérisés tend à une stabilité tout au long du vieillissement des vins. En général, les concentrations de ces pigments sont toutes du même ordre de grandeur tout au long du vieillissement du vin, excepté pour le dimère PyranoMv — (3-*O*-glc) — C/EC qui sort du lot avec des concentrations plus importantes. Là encore cette stabilité de concentration montre que ces pigments sont formés durant la vinification et l'élevage des vins et que ces composés ont principalement des structures résistantes à l'oxydation.

En conclusion de cette partie, quatre familles de pigments polymérisés, tous de structures différentes, ont été étudiées durant le vieillissement du vin. Les familles de pigments polymérisés étudiées étaient les pigments polymérisés liés par des condensations directes entre tanins et anthocyanes, liés avec une condensation indirecte avec un pont éthylidène, liés également par des condensations directes avec une liaison de type A et enfin les pigments polymérisés de type flavanol-pyranoanthocyanes. Les deux premières familles diminuent au cours du temps tandis que les deux dernières restent stables tout au long du vieillissement du vin. Ces différentes tendances observées dépendent des structures de ces molécules et de leurs stabilités permettant, ou non, leurs évolutions dans le temps et participant toutes ainsi à l'évolution de la couleur.

IV. Conclusions

Dans ce chapitre, l'évolution des tanins couronnes durant tout le processus de vinification ainsi que durant le vieillissement a été étudiée. Il apparait que ces nouvelles molécules cycliques ont un comportement très différent des tanins non cycliques classiques. En début de vinification durant l'étape de la fermentation alcoolique, les tanins couronnes sont extraits en quelques jours sans avoir besoin d'éthanol pour être extrait, ce qui est un comportement proche à celui des anthocyanes. Après extraction, ils restent stables tout au long de la vinification. Ensuite, durant le vieillissement en bouteille, ces molécules restent stables dans le temps. Ces résultats indiquent que ces molécules sont extraites rapidement et qu'ensuite, elles restent stables tout au long de la vie du vin signifiant qu'elles sont résistantes à l'oxydation, que ce soit pour le tétramère ou pour les pentamères couronnes, comme cela a pu être confirmé lors de leur cinétique d'évolution dans des vins saturés en oxygène durant 20 semaines. De plus, l'étude durant la vinification d'un panel de vin monovariétaux montre une différence de concentration entre tous les vins comparés entre eux, mais également un comportement de ces molécules totalement différent de leurs homologues les tétramères non cycliques. Cette étude a notamment pu mettre en évidence des différences entre cépages, du même ordre de grandeur, que les différences observées lors de l'analyse de ces composés dans les pellicules de ces mêmes cépages (Chapitre 3 II).

Enfin, différentes familles de pigments polymérisés ont été étudiées afin d'analyser leurs comportements et, par la suite, de trouver une possible corrélation à l'évolution de la couleur durant le vieillissement du vin en bouteille. Cette étude a montré que l'évolution de chaque famille était différente, certaines restant stable tout au long du vieillissement et d'autres diminuant au fur et à mesure du temps. Ces différentes tendances permettent une évolution de la couleur du rouge violet au rouge orangé. Cependant, aucune corrélation directe entre l'évolution des pigments polymérisés quantifiés et la couleur des vins n'a pu être établie. Ces résultats indiquent que les variations de composition moléculaire ne permettent pas d'expliquer les variations de couleur mesurées en fonction des millésimes. De futures études sur la possible présence de nouvelles formes de pigments polymérisés du phénomène de co-pigmentation intramoléculaire dans le cas de pigments polymérisés oligomères devront être engagées pour essayer d'identifier les déterminants moléculaires de la couleur des vins. Dans le contexte actuel du changement climatique (température, stress hydrique), de la réduction des intrants durant la vinification telle que la diminution du SO_2 ou de l'arrivée de nouveaux cépages, la compréhension des mécanismes chimiques et physico-chimiques impliqués dans la stabilisation de la couleur va être indispensable pour assurer la typicité des vins.

Chapitre 5 :

Les tanins de type A

Dans cette partie, les tanins couronnes ont un peu été laissés de côté, même si pour des raisons de formules brutes et de masses moléculaires exactes identiques, ils ne sont pas très loin. Le nouveau sujet de recherche mis en lumière dans cette partie est les tanins non cycliques ayant une liaison de type A. Plusieurs aspects de ces tanins vont être traités. Dans une première partie, l'hémisynthèse de ces tanins a été réalisée à partir des tanins non cycliques ayant des liaisons de type B. Par la suite, une stratégie de quantification, après identification des marqueurs de quantification spécifiques de ces tanins de type A, a été développée. De cette stratégie en découlera une étude comparative des tétramères non cycliques ayant une liaison de type A avec le tétramère couronne, les deux molécules possédant les mêmes masses exactes. Enfin, une étude sensorielle, *in vitro* et *in vivo*, a été mise en place. Pour cela, une première partie traitera des interactions tanins-protéines en milieu modèle en utilisant des protéines modèles commerciales, puis de deux analyses sensorielles qui ont été entreprises, l'une portant sur l'impact organoleptique des tanins ayant les liaisons de type A en comparaison aux tanins ayant les liaisons de type B tandis que la seconde analyse sensorielle a été réalisée avec la verticale des grands vins de Pauillac. Les résultats de cette dernière analyse sensorielle ont été mis en corrélation avec les analyses chimiques de ces vins et en particulier l'analyse de nos tanins couronnes.

Les tanins possédant une liaison de type A sont connus pour être des liaisons de base entre les flavonoïdes. La formation de ces liaisons provient d'une réaction d'oxydation, en passant par un intermédiaire quinonique, formant alors cette liaison supplémentaire entre le carbone C2 du cycle C de l'unité supérieure et l'hydroxyle du carbone C5 ou C7 de l'unité inférieure. Cette liaison peut se former entre différentes natures d'unités monomériques de tanins condensés, mais également entre les tanins et les anthocyanes comme vues précédemment dans les pigments polymérisés (chapitre IV. III.). Une multitude de combinaisons de tailles et de structures différentes peuvent alors se former. Le chapitre qui suit portera exclusivement sur les tanins possédant une liaison de type A avec comme unités monomériques les flavanols tels que la catéchine et/ou l'épicatéchine.

I. Étude approfondie sur l'hémisynthèse des tanins de type A

A ce jour, seulement quelques auteurs se sont intéressés à la transformation des liaisons de type B des tanins condensés en liaisons de type A en utilisant des dimères et des trimères purs afin de se focaliser principalement sur le mécanisme réactionnel [15,162,163]. Dans notre cas, l'objectif est d'étudier la formation de ces liaisons de type A sur une fraction oligomérique provenant du raisin, avec un degré de polymérisation compris entre 2 et 5, étude jusqu'alors jamais réalisée.

Dans un premier temps, afin de valider la conversion d'une partie des liaisons de type B en liaisons de type A sur cette fraction oligomérique complexe, le protocole d'hémisynthèse de la publication de Chen *et al.* [163] a été utilisé comme première approche. Dans un second temps, cette hémisynthèse a été optimisée en testant différents paramètres tels que le temps de réaction, la nature et la quantité d'oxydant ainsi que le pH.

A. Hémisynthèse des tanins de type A et étude en spectrométrie de masse

L'hémisynthèse a été réalisée sur une fraction oligomérique de tanins ayant des liaisons de type B. Cette fraction a été préalablement obtenue par traitement d'un extrait brut de tanins de pépins de Cabernet-Sauvignon. En effet, cet extrait brut obtenu par extraction solide-liquide avec un mélange acétone-eau (v/v) 70/30, a subi une série d'extractions liquide-liquide avec différents solvants afin d'obtenir une fraction finale oligomérique de tanins ayant des liaisons de type B de degré de polymérisation compris entre 2 et 5.

Ensuite, cette fraction de tanins oligomères a été solubilisée dans une solution de tampon de phosphate salin (PBS) afin de stabiliser le pH à 7,4. Dans leur protocole, Chen *et al.* [163] ont choisi comme oxydant le DPPH qui a été ajouté par la suite à la fraction précédente de tanins. Après 3 h de réaction à 37 °C, le milieu réactionnel a été analysé en UPLC-UV-ESI-QTOF en mode négatif. Ainsi, la comparaison des fractions oligomériques avant et après oxydation a pu être réalisée. L'analyse en UPLC-UV-ESI-QTOF de la fraction oligomérique avant réaction (**Figure 86**) montre la présence résiduelle de quelques monomères comme la catéchine et l'épicatéchine bien que les principaux composés soient surtout des dimères, trimères, tétramères et pentamères de tanins condensés ayant des liaisons de type B. Cette analyse a également permis de vérifier l'absence de tanins ayant des liaisons de type A, tout comme l'absence de tanins couronnes dans cet extrait. La comparaison des chromatogrammes UV des deux échantillons (avant et après réaction) montre que ceux-ci sont très différents. En effet, la majeure partie des composés présents avant oxydation se sont transformés durant la réaction comme attendu (**Figure 87**).

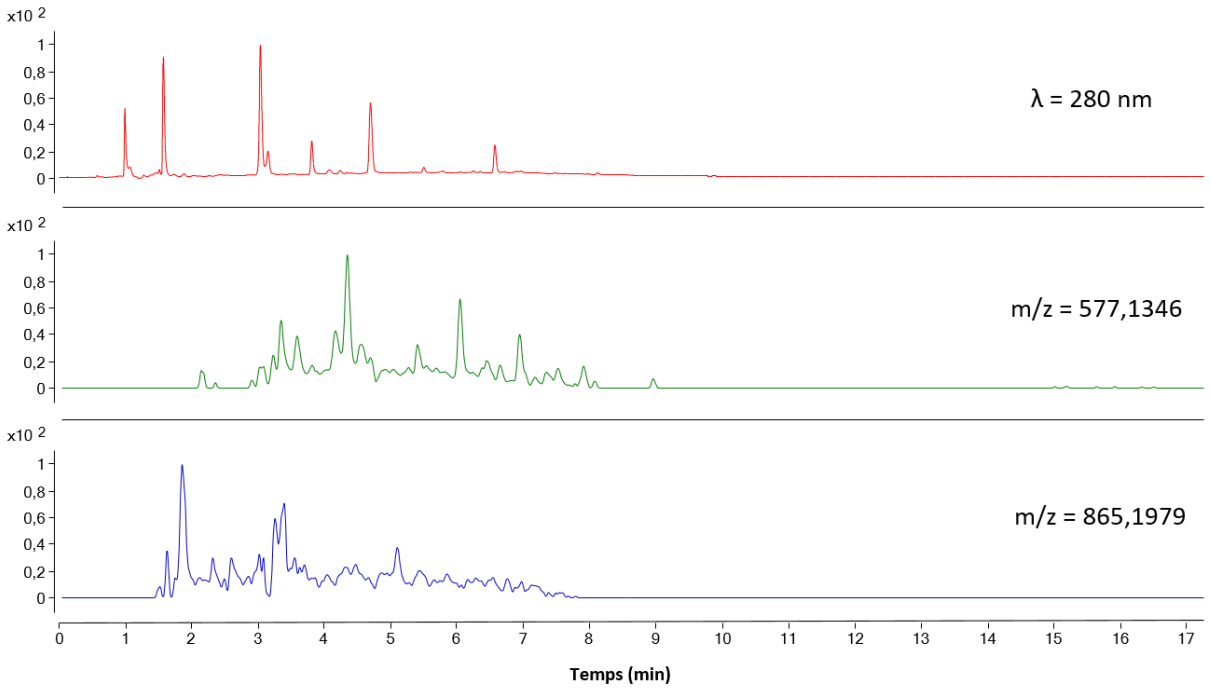


Figure 86 : Chromatogrammes UV et de masse de la fraction oligomérique de tanins avant oxydation

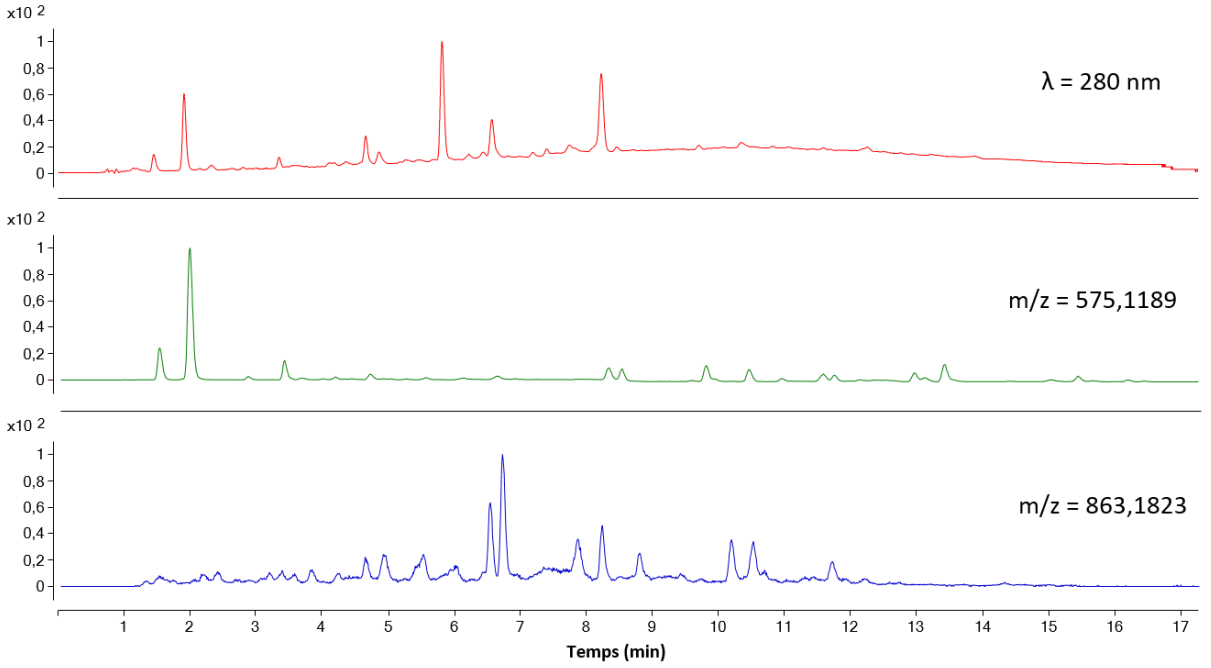


Figure 87 : Chromatogrammes UV et de masse de la fraction oligomérique de tanins après oxydation

De plus, l'analyse plus fine des chromatogrammes de masse spécifiques du milieu réactionnel après oxydation (**Tableau 11**), confirme la formation de dimères (m/z 575,1189), de trimères (m/z 863,1823), de tétramères (m/z 1151,2457) et de pentamères (m/z 1439,3091) ayant tous une liaison de type A. Pour chacune de ces masses, la différence entre la masse calculée et la masse mesurée est inférieure à 5 ppm, confirmant ainsi la formule brute de chacun de ces composés.

Cependant, la réaction n'étant pas complète, des oligomères de tanins ayant des liaisons de type B ont été retrouvés dans le milieu réactionnel. Leur présence était attendue puisque Chen *et al.* [163] ont rapporté un rendement d'uniquement 30 % de conversion à partir d'un trimère pur.

Tableau 11 : Les différentes masses exactes des tanins de type A et des tanins de type B

Composés	Formule brut (mode négatif)	Masse calculée	Masse mesurée	δ ppm
Dimère de tanins de type B	$C_{30}H_{25}O_{12}$	577,1346	577,1398	-5,05
Dimère de tanins de type A	$C_{30}H_{23}O_{12}$	575,1189	575,1220	-5,67
Trimère de tanins de type A	$C_{45}H_{35}O_{18}$	863,1823	863,1562	-2,14
Tétramère de tanins de type A	$C_{60}H_{47}O_{24}$	1151,2457	1151,2494	-1,15
Dimère de tanins de type de A + Phloroglucinol	$C_{36}H_{27}O_{15}$	699,1350	699,1380	-5,68

Une analyse par MS-MS sur les oligomères de type A a alors été réalisée sur les masses des dimères, des trimères et des tétramères ayant des liaisons de type A. Ici, les fragments attendus pour ces dimères sont de deux sortes : un fragment de masse m/z 423,071 1 qui correspond à une perte de -152 et un fragment de masse m/z 449,0851 correspondant à une perte de -126 (**Figure 88**).

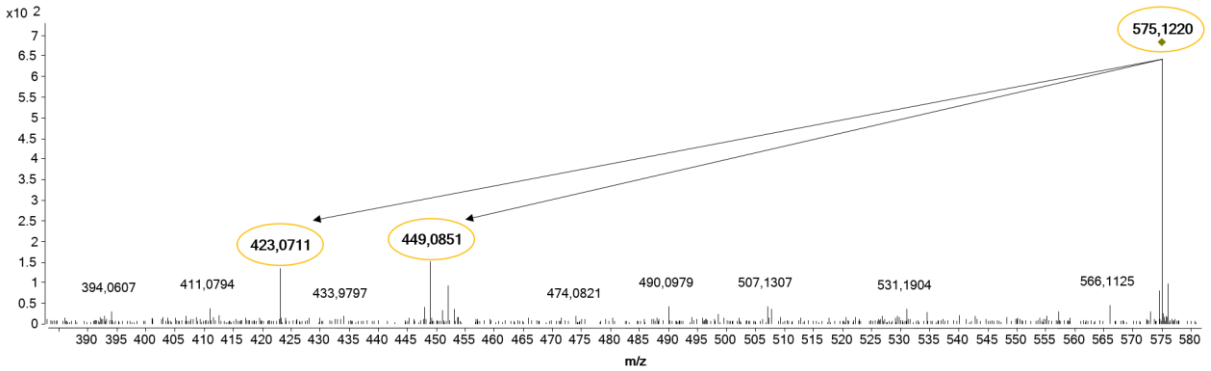


Figure 88 : Spectre de fragmentation du dimère de type A (575,1220) en MS-MS

Ce premier fragment provient d'une fragmentation en Retro Diels-Alder (RDA) tandis que le deuxième fragment provient d'une fission HRF (Heterocyclic Ring Fission) suivie d'un réarrangement spécifique aux liaisons de type A (**Figure 89**).

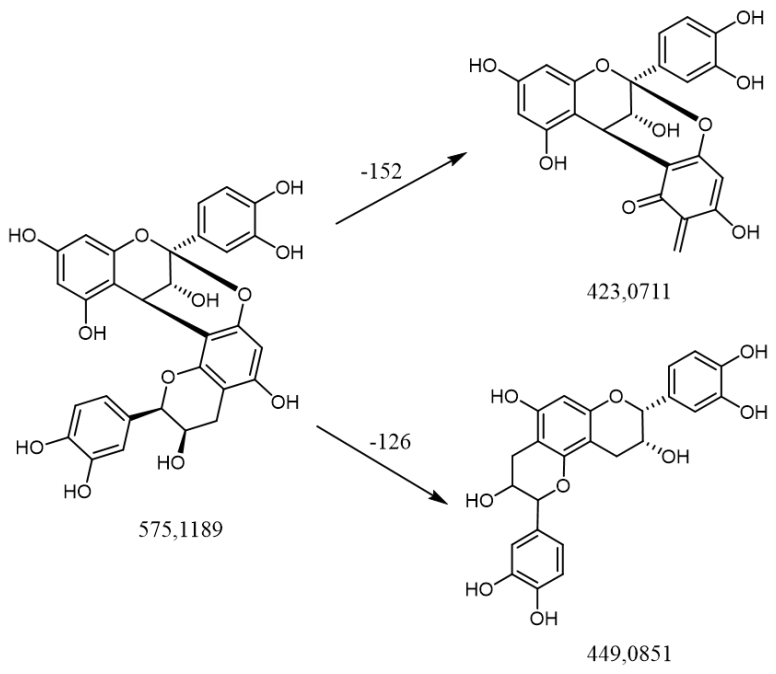


Figure 89 : Fragments du dimère de type A en MS-MS

La formation de ce dernier fragment entre les unités flavanols caractéristique des liaisons de type A, prouve la présence de cette liaison dans les oligomères de tanins après hémisynthèse. Les trimères et les tétramères présents dans le milieu après réaction ont également été analysés en MS-MS et ils possèdent tous le fragment caractéristique de m/z 449,0851 (**Annexe 9** et **Annexe 10**). Ces analyses prouvent bien que des tanins oligomères ayant une liaison de type A ont bien été synthétisés à partir d'une fraction oligomérique de tanins de pépins avec la méthode proposée par Chen *et al*.

Le Degré de Polymérisation Moyen (DPm) a également été déterminé pour les fractions avant et après oxydation. Le DPm permet de déterminer le nombre d'unités monomériques coupées par la réaction de phloroglucinolyse. Pour la fraction des tanins oligomères purifiée, le DPm obtenu est de 3,7 et pour la fraction obtenue après hémisynthèse, le DPm est de 3,4. Cette légère baisse du DPm était attendue en vue des liaisons de type A formées. En revanche, si la réaction d'oxydation n'a pas créé une polymérisation du milieu, celle-ci aura peut-être engendré la formation de liaisons intramoléculaires et/ou intermoléculaires autres que des liaisons de type A. C'est dans cette optique qu'après réaction dans le milieu des oligomères oxydés, il a été recherché un composé qui possèderait une liaison intermoléculaire et qui proviendrait d'un couplage entre les cycles B de deux molécules par un mécanisme de polymérisation oxydative désordonné [150,251,252]. Or, dans nos échantillons, aucunes masses correspondantes n'a été retrouvée dans notre milieu réactionnel. Cette absence, souhaitée dans notre cas, provient probablement du fait que le milieu durant l'étape d'oxydation est relativement dilué et donc que ce type de liaisons intermoléculaires ne sont pas privilégiées et ne se forment pas alors que les liaisons intramoléculaires, elles, sont favorisées. Par la suite, cette

hémisynthèse a été optimisée en testant différents paramètres impactant directement la cinétique et les rendements de cette réaction.

B. Optimisation de l'hémi synthèse des tanins de type A

Afin d'améliorer les résultats de l'hémisynthèse, un certain nombre de paramètres ont été testés. Parmi ces paramètres, la quantité d'oxydant, la nature des oxydants, le pH et le temps de réaction ont été modifiés afin d'améliorer le rendement de la réaction (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Différents composés et paramètres testés afin d'améliorer l'hémisynthèse des tanins de type A

Paramètres testés	Oxydants	Equivalences	pH	Temps de réaction
Composés ou paramètres utilisés	DPPH	1 → 3	Acide	3h
	Xanthine Oxydase (XO)	1 → 10	Neutre	Suivie de réaction : 0-24h

Le premier paramètre testé a été la nature de l'oxydant utilisé. Comme décrit précédemment dans le Chapitre 1, Chen *et al.* [163] ont testé plusieurs types d'oxydant différents : des oxydants chimiques et des oxydants enzymatiques. Le DPPH, un des oxydants chimiques, a été utilisé en priorité, car il est décrit comme étant l'oxydant le plus efficace de tous. La Xanthine Oxydase (XO) a également été utilisée afin de pouvoir tester la deuxième catégorie d'oxydants de type enzymatique. Les résultats obtenus sont aussi concluants avec la XO que ceux obtenus avec le DPPH, le pourcentage de formation en tanins de type A étant le même. Les catalyseurs enzymatiques se retrouvent dans les plantes tandis que les catalyseurs chimiques, malgré le fait qu'ils soient très efficaces, ne sont pas présents sous cette forme dans la nature. Il a alors été suggéré que l'O2° $^{-}$ provenant du système X/XO serait le catalyseur utilisé par les plantes pour faire la réaction [163].

Le second paramètre étudié a été la quantité d'oxydant utilisée par rapport à la quantité utilisée de tanins ayant des liaisons de type B, sachant que ce ratio trimère/oxydant était de 1 pour 3 dans la publication de Chen *et al.* [163]. Dans notre cas comme nous n'utilisons pas une molécule pure, mais une fraction complexe, c'est le DPm de la fraction de tanins ayant des liaisons de type B utilisé qui permet de définir la quantité d'oxydant à ajouter. La quantité d'oxydant ajoutée a été augmentée jusqu'à un ratio de 1 pour 10 afin de voir s'il y avait une augmentation dans la quantité de tanins ayant des liaisons de type A synthétisée. Après avoir comparé le rendement obtenu en modifiant le ratio tanins/oxydants sur plusieurs tests d'hémisynthèse, les résultats montrent que plus la quantité

d'oxydant est augmentée, plus la synthèse des tanins de type A est efficace, résultats peu surprenants. Cependant, malgré cette augmentation importante de la quantité d'oxydant, il n'a pas été possible d'arriver à une conversion totale des tanins ayant des liaisons de type B puisqu'il restait toujours de ces tanins natifs dans le milieu.

Le troisième paramètre étudié est l'influence du pH. L'hémisynthèse à pH neutre, comme décrit dans la publication de Chen *et al.* [163], a été testée en utilisant un tampon de phosphate salin (pH = 7,4). L'hémisynthèse a également été testée à pH acide en utilisant de l'acide tartrique (5 $g.L^{-1}$, pH = 2,5). La comparaison des résultats entre les deux pH différents démontre clairement que l'on obtient un meilleur rendement en tanins ayant des liaisons de type A à pH neutre. Ce résultat ne voulant pas dire que les tanins ayant des liaisons de type A ne se forment pas à pH acide. Ils peuvent se créer à pH acide, mais avec un rendement plus faible que dans les conditions chimiques optimales qui sont à pH = 7 ,neutre. C'est pour cette raison que l'on peut retrouver certaines de ces molécules possédant ces liaisons dans le vin.

Enfin, le dernier paramètre étudié est le temps de réaction de l'hémisynthèse. Le temps de réaction normalement utilisé dans la publication de Chen *et al.* [163] est de 3 h à 37 °C. L'hypothèse suivie a été qu'en augmentant le temps de réaction, la formation des tanins ayant des liaisons de type A augmenterait également. Un suivi cinétique de la réaction a été effectué durant 24 h en réalisant des prélèvements à 3 h, 6 h et 24 h. Les résultats obtenus à ces différents temps de prélèvement montrent que peu importe le temps de réaction, celui-ci n'impacte pas le rendement de la réaction. En effet après 3 h de réaction, la quantité de tanins ayant des liaisons de type A formée était la même qu'après 24 h de réaction sans que la formation de composés de suroxydation ne puisse être détectée après 24 h.

Finalement, il est possible de conclure que la conversion des liaisons de type B en liaisons de type A dépend de la nature de l'oxydant, de la quantité d'oxydant ajoutée et enfin du pH. Cette hémisynthèse réalisée en laboratoire dans des conditions optimales ne veut en rien dire que ce sont les seules et uniques conditions pour créer ces liaisons. Bien au contraire, par exemple, dans le vin aucune de ces conditions n'est réunie pour la création de ces liaisons. Or, les tanins ayant des liaisons de type A existent quand même dans les vins, car d'autres conditions ont favorisé leur formation et que le mécanisme d'oxydation radicalaire nécessaire à la formation des liaisons de type A reste le même, quel que soit le milieu.

II. Quantification et recherche des marqueurs spécifiques des tanins de type A

Après avoir développé l'hémisynthèse des tanins possédant une liaison de type A, la caractérisation du milieu réactionnel de ceux-ci fût nécessaire. Afin de réaliser cette quantification, différentes méthodes pouvaient être utilisées.

Parmi ces méthodes, la phloroglucinolyse, méthode de dépolymérisation chimique en milieu acide, a été préférentiellement choisie. Cette méthode est utilisée à la base pour évaluer le degré de polymérisation moyen (DPm) des tanins [7] - [9]. C'est une approche basée sur la dépolymérisation des tanins par rupture des liaisons interflavanes de type B en milieu acide, à chaud et en présence d'un agent nucléophile : le phloroglucinol. Elle permet alors la dépolymérisation des tanins et de séparer les unités terminales libérées, sous forme de flavanol, des unités d'extensions libérées, sous la forme d'un flavanol additionné de l'agent nucléophile, le phloroglucinol, en position C4. Si nous prenons l'exemple des procyanidines, les unités terminales libérées sont la catéchine, l'épicatéchine et l'épicatéchine-3-*O*-gallate. Les unités d'extensions reliées en position C4 au phloroglucinol donneront alors l'adduit catéchine-phloroglucinol, l'adduit épicatéchine-phloroglucinol et l'adduit épicatéchine galloylé-phloroglucinol. Cette méthode peut permettre de quantifier les tanins ayant une liaison de type A grâce à des marqueurs spécifiques libérés durant cette étape de dépolymérisation chimique. En effet, cette technique a déjà été utilisée pour réaliser la quantification de nombreux pigments polymérisés et notamment ceux présentant une liaison de type A entre les anthocyanes et les tanins, la liaison de type A n'étant pas dépolymérisée dans les conditions de phloroglucinolyse (Chapitre 4. III.) [204] (**Figure 90**).

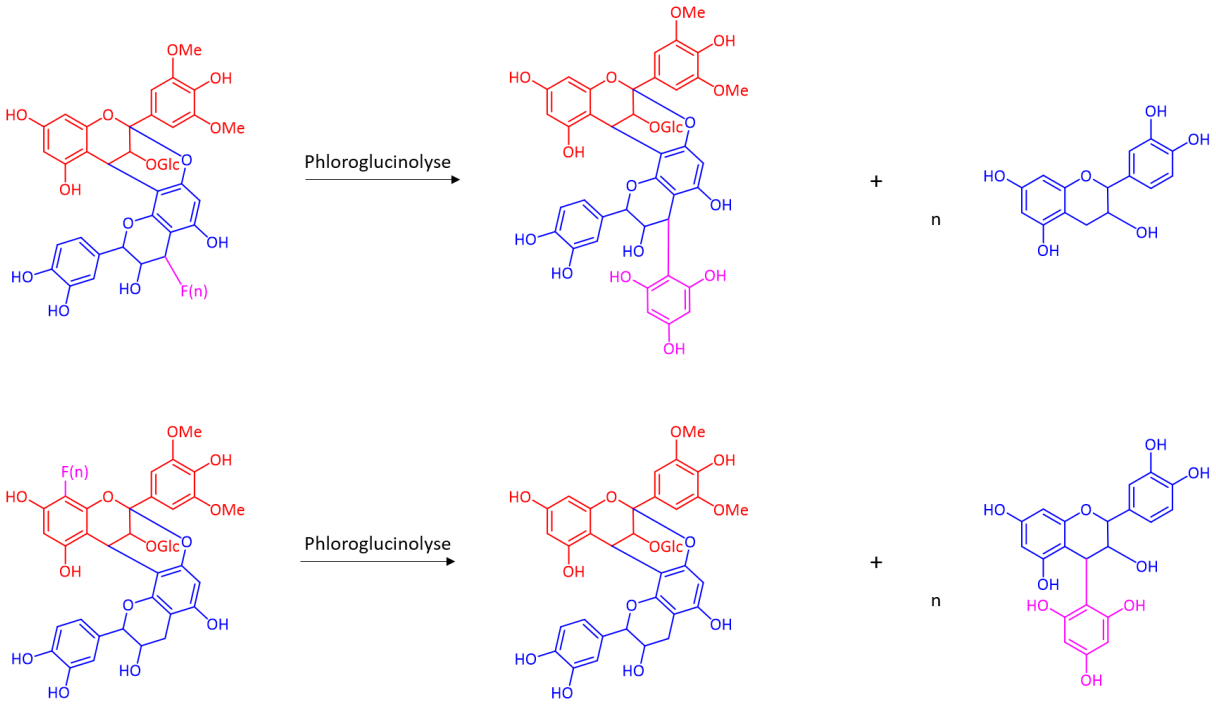


Figure 90 : Mécanisme de phloroglucinolyse pour les pigments tanins-anthocyanes liés par une liaison de type A [20]

L'hypothèse de départ était que les liaisons de type A entre unités flavanol ne sont pas coupées lors de la réaction de phloroglucinolyse. Afin de trouver des marqueurs spécifiques, deux cas de figure sont possibles en fonction de la position de la liaison de type A dans la chaine polymérique (**Figure 91**).

Dans le premier cas, la liaison de type A se trouve en première position sur la chaine polymérisée ou au centre de la chaine, l'acidité de la réaction va alors rompre toutes les liaisons de type B au-dessus et au-dessous de la liaison de type A et donc le phloroglucinol ira s'additionner sur l'unité inférieure du dimère lié par une liaison de type A qui elle restera intacte. Dans ce cas-ci, le marqueur spécifique sera un dimère de type A avec un groupement phloroglucinol possédant alors une masse exacte de m/z 699,1350 (**Tableau 11**). En plus, dans la solution, des flavanols provenant de la rupture de la liaison terminale devront être présent avec une masse de m/z 289,0712 ainsi que des adduits flavanol-phloroglucinol de m/z 413,087 2 provenant de la coupure des liaisons de type B étant au-dessus de la liaison de type A si elles existent.

Dans le second cas, la liaison de type A se trouverait en dernière position de la chaine polymérique de tanins condensés. Dans ce cas-là, les liaisons de type B supérieurs seront coupées durant la phloroglucinolyse et la liaison de type A sera libérée sous forme de dimère avec une simple liaison de type A entre les deux unités. Les flavanols libérés seront alors sous forme d'adduit flavanol-phloroglucinol. Donc dans ce cas-ci, le marqueur de la liaison de type A aurait une masse de m/z 575,1189.

C'est en partant sur ces deux hypothèses que les recherches sur l'UPLC-UV-ESI-QTOF ont été effectuées sur le milieu hémisynthétique des tanins de type A après leur réaction de phloroglucinolyse (**Figure 91**).

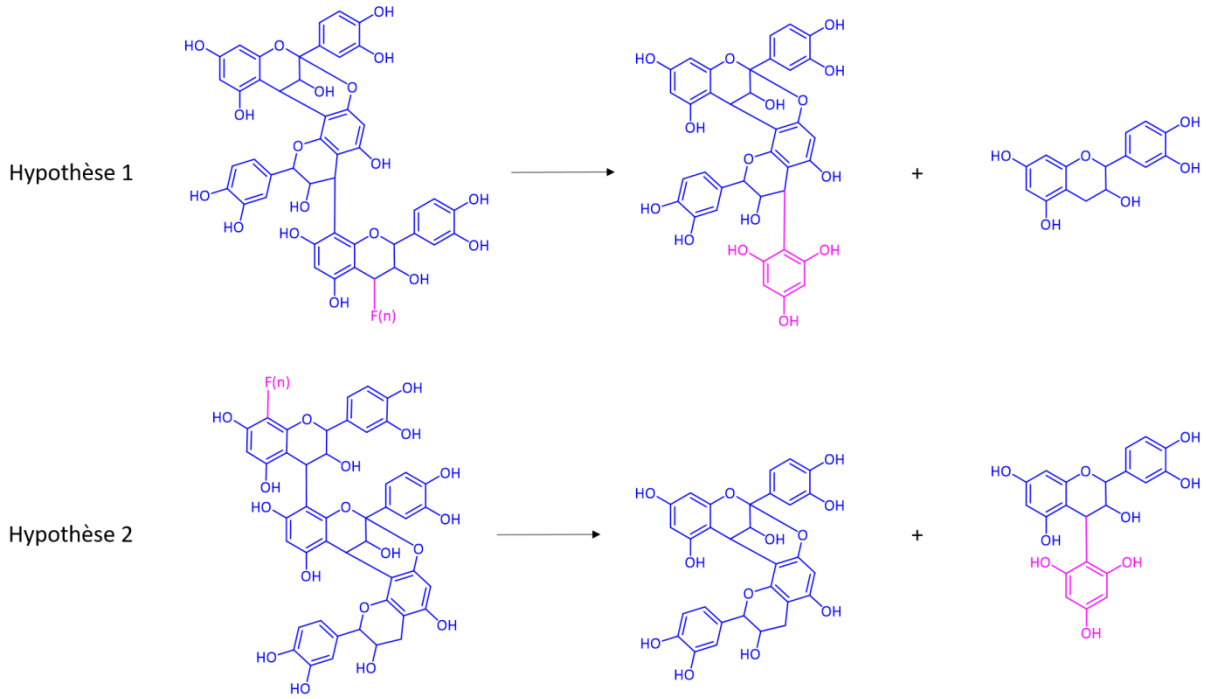


Figure 91 : Les différentes hypothèses de marqueurs spécifiques des tanins liés par une liaison de type A

La comparaison des chromatogrammes à 280 nm et de masse avant et après la réaction de phloroglucinolyse montre bien des différences significatives entre les composés, car tous les chromatogrammes sont totalement différents. Dans la fraction ayant subie la phloroglucinolyse, les premières masses spécifiques d'un marqueur potentiel cherchées étaient à m/z 699,1350 (masse calculée). Les résultats montrent que quatre composés possédant cette masse ont été libérés après la réaction de phloroglucinolyse, dont l'un d'entre eux étant très majoritaire. Ces composés de formule brute $C_{36}H_{27}O_{15}$ ($[M-H]^-$ = 699,1380 ; δppm = - 5,68) sont donc des dimères de type A possédant un adduit phloroglucinol dans une chaine polymérique de tanins. Ces marqueurs spécifiques identifiés indiquent la présence de liaisons de type A en début de chaine polymérique des tanins obtenus par hémisynthèse. C'est alors que les marqueurs de masse m/z 575,1189 ont été recherchés en suivant dans le milieu réactionnel obtenu après phloroglucinolyse et ils ont été trouvés. Cependant, la comparaison des intensités du marqueur m/z 575,1189 avant et après phloroglucinolyse montre qu'il n'y a pas de variation de cette intensité, ce qui prouve que les dimères de type A présent après phloroglucinolyse n'ont pas été libérés durant la dépolymérisation chimique, mais qu'ils étaient simplement présents avant cette réaction (**Figure 92**). La dépolymérisation chimique ne modifiant pas

la liaison de type A, les dimères de type A formés durant l'étape d'oxydation et présents dans l'échantillon avant phloroglucinolyse se retrouvent donc inchangés après cette réaction.

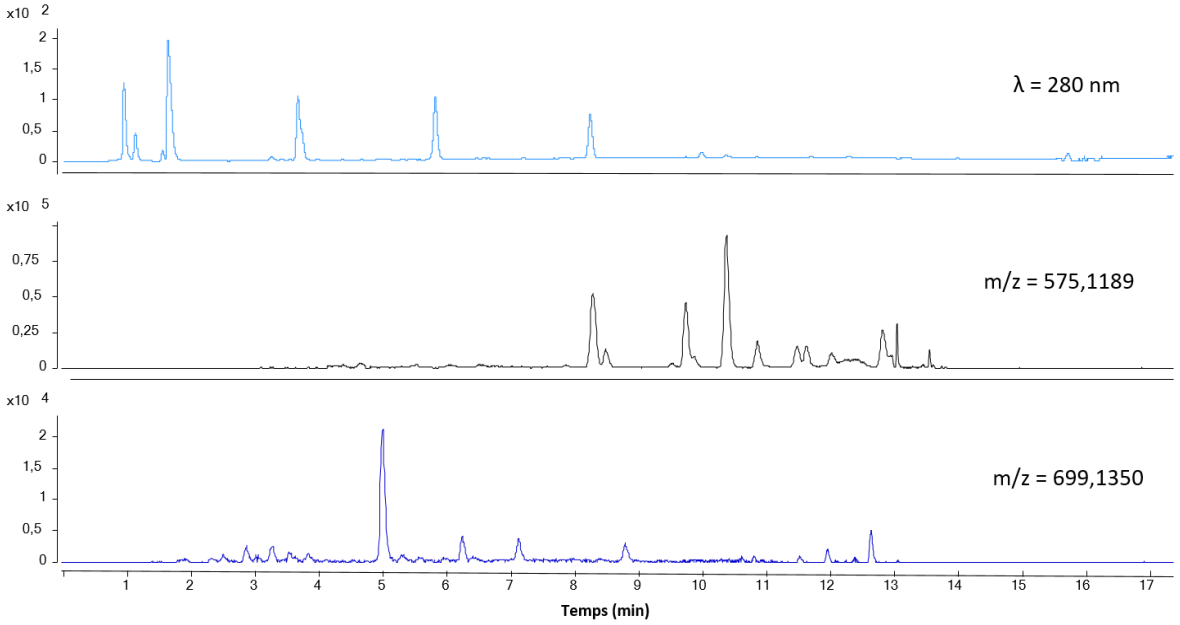


Figure 92 : Chromatogramme à 280 nm et de masse spécifique des marqueurs des tanins ayant des liaisons de type A

De plus, le fait qu'il n'y ait pas de dimères de type A libérés durant la dépolymérisation chimique prouve que durant l'hémisynthèse aucune liaison de type A n'a été formée à partir de la dernière liaison de type B de la chaine polymérisée. Cette régiospécificité était inattendue et n'avait jamais été rapportée jusqu'à présent. Des études de modélisation de la formation des radicaux sur la chaine de tanins condensés devront être menées pour pouvoir expliquer et rationaliser cette régiospécificité. Enfin, grâce à cette réaction et aux marqueurs identifiés de masse m/z 699,1350 ainsi qu'aux autres produits libérés durant la phloroglucinolyse, la quantification du nombre de liaisons de type A formée par hémisynthèse a pu être déterminée, celle-ci a été calculée à 10 % de l'ensemble des liaisons présentent dans les chaines de tanins.

III. Étude comparative des tétramères de type A et des tétramères couronnes en fragmentation

A. Étude préliminaire de fragmentation

En chimie, il n'est pas rare que la masse d'un composé corresponde à plusieurs molécules. La matrice vin étant tellement complexe, de nombreux isomères existent. Le tétramère couronne de masses m/z 1153,2615 possèdent un isomère en particulier possédant exactement la même masse exacte. Dans un vin, lorsque l'on recherche la masse du tétramère couronne, plusieurs pics avec comme ion moléculaire m/z 1153,2615 peuvent apparaitre. C'est également le cas dans le milieu réactionnel après oxydation des tanins ayant uniquement des liaisons de type B. Le tétramère couronne ayant été purifié et sa structure caractérisée par RMN, il est facile de le différencier des structures tétramériques ayant une liaison de type A au vu de son temps de rétention notamment. Cependant, cela devient beaucoup plus compliqué pour des tanins couronnes de plus hauts poids moléculaires qui n'ont pas encore été purifiés et caractérisés par RMN. C'est pour cela qu'une étude des voies de fragmentation de ces molécules a été conduite dans le but de vérifier rapidement si les molécules étudiées sont bien les tanins couronnes. Une méthode basée sur la MS-MS en utilisant l'UPLC-UV-ESI-QTOF a été développée afin de trouver si les deux tétramères (couronnes et de type A) de masses m/z 1153,2615 peuvent se différencier par des fragments spécifiques.

Pour cela, les règles et modes de fragmentations des flavanols ont été utilisés et sont rappelés ci-dessous (**Figure 93)**. La fragmentation permet le calcul des formules élémentaires de pertes neutres consécutives en partant de l'ion moléculaire jusqu'à la dernière génération d'ions fragments. Pour les monomères, oligomères et polymères des tanins condensés, il existe quatre voies principales de fragmentation qui sont [253] :

- La fission Retro-Diels-Alder (RDA) entrainant une perte de -152 Da,
- La fission de l'hétérocycle (HRF) correspondant à la perte de l'unité phloroglucinol (cycle A), entrainant donc une perte de -126 Da
- La fission en formant un benzofurane (BFF) au niveau de l'hétérocycle C générant alors une perte de -123 Da,
- La perte d'une molécule d'eau de -18 Da,
- La fission quinone méthine (QM) ne concernant que les structures oligo- et polymériques qui consiste à la rupture d'une liaison inter-flavane (C4-C6/C8) conduisant alors à une perte de -290,0790 Da pour l'unité supérieure libérée sous la forme de quinone conjuguée tandis que

l'unité inférieure libérée est simplement une unité flavanol déprotonée induisant alors une perte de -288,0634 Da.

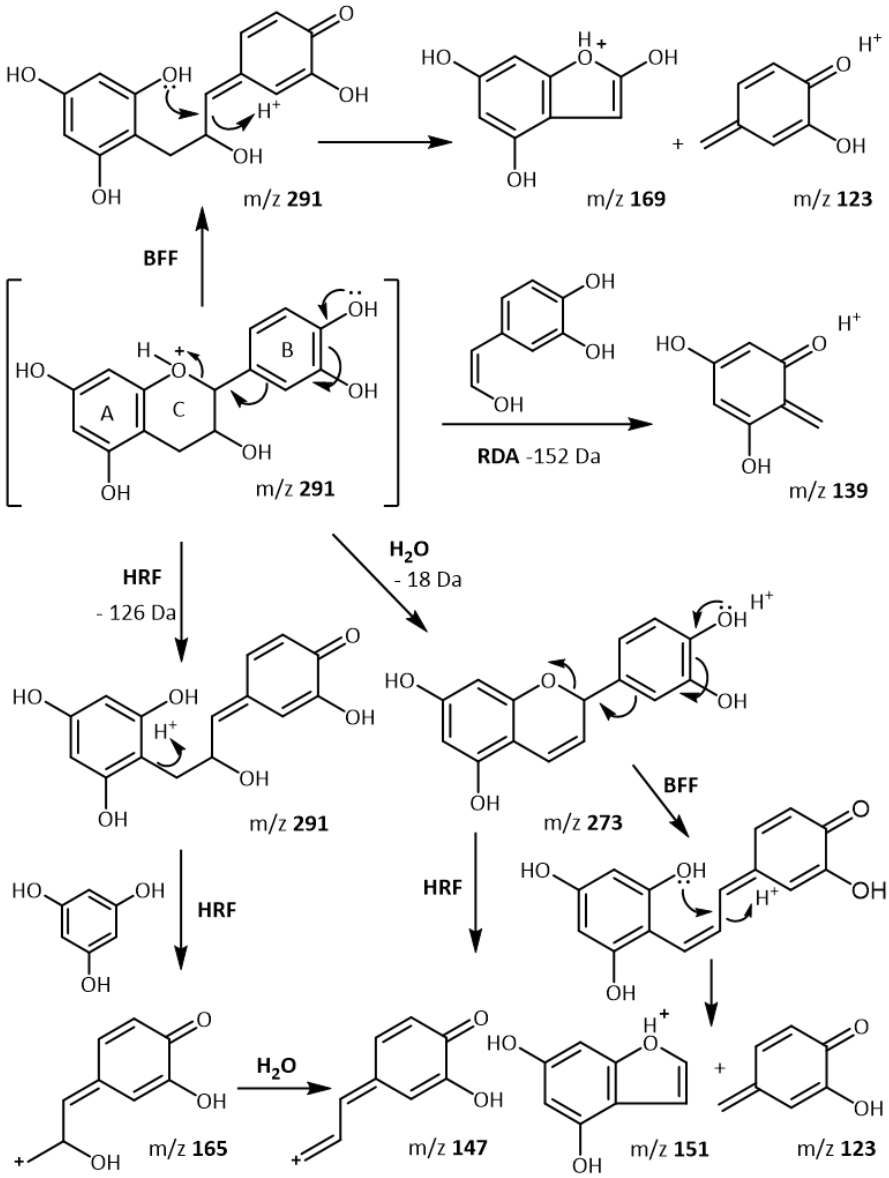


Figure 93 : Les différentes voies de fragmentation existantes [253]

Ce dernier mode de fragmentation (**Figure 94**) peut ainsi indiquer si l'unité rompue était d'une unité inférieure ou supérieure. Cependant, des pertes successives d'unité inférieure ne se traduisent pas par des pertes successives de 290 Da. Seule la première perte d'unité inférieure se traduit par une perte de -290 Da, les autres pertes en suivant correspondent à des pertes de -288 Da étant donné que l'unité perdue sera alors sous la forme de quinone conjuguée [20].

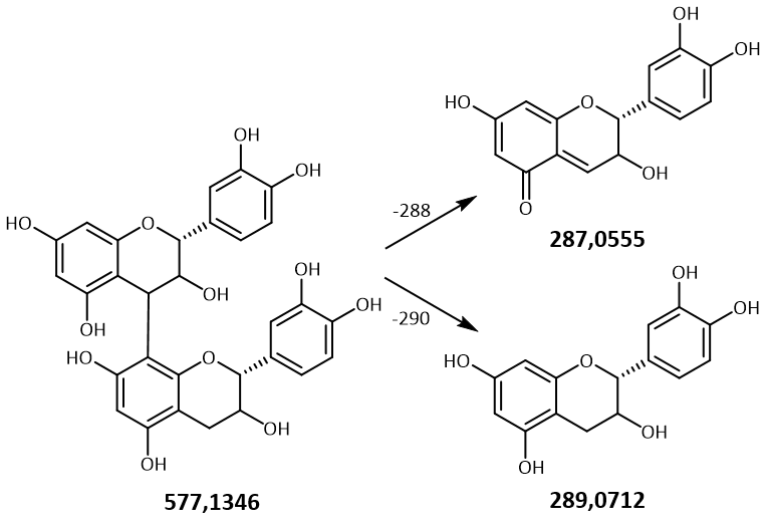


Figure 94 : Voie de fragmentation des quinones méthines avec un dimère de type B en mode négatif [20]

B. L'étude des fragments pour les deux tétramères : cyclique et non cyclique

Les fractionnements ont été réalisés sur le tétramère couronne et sur le tétramère majoritaire possédant une liaison de type A, ces deux molécules possédant la même masse exacte de m/z 1153,2615 et la même formule brute [$C_{60}H_{49}O_{24}$]. Ces fragmentations ont été réalisées à partir d'un échantillon de tétramère couronne purifié à partir du vin [19] et sur une fraction purifiée du milieu d'hémisynthèse des tanins ayant des liaisons de type A afin de limiter au maximum les possibles interférences sur ces molécules pures. Pour le tétramère possédant une liaison de type A, une étape de fractionnement sur colonne TSK a été réalisée afin de séparer au maximum les différents tanins oligomères de type A. Cette étape de fractionnement a permis l'obtention d'une fraction contenant principalement des tétramères de type A.

Par la suite, des tests ont été réalisés afin de trouver l'énergie de collision optimale afin d'obtenir l'ensemble des fragments de haut et de bas poids moléculaires, tout comme le mode d'ionisation en positif ou en négatif. L'énergie de collision a été testée de 5 % à 30 %. Finalement, la méthode de fragmentation optimale est en mode positif avec une force de collision fixée à 30 % sur le système UPLC-UV-ESI-QTOF utilisé.

a. La fragmentation du tétramère linéaire possédant une liaison de type A

Le spectre de fragmentation MS-MS obtenu pour le tétramère ayant des liaisons de type A majoritaire élué à 4,92 minutes (**Figure 95**) montre un grand nombre de fragments avec une perte de

-152 Da, (– $C_8H_8O_3$; m/z 1001,2116 ; m/z 713,1525) et une perte de -126 Da (– $C_6H_6O_3$; m/z 739,1655 ; m/z 449,0802), résultant respectivement des fissions RDA et HRF.

Des fragments issus de la perte d'eau (-18 Da) ont aussi pu être rapportés (m/z 1135,2390 ; m/z 983,2021 ; m/z 965,2034 ; m/z 695,1450 ; m/z 557,1125). Des pertes de -288 Da ont été observées à partir des fragments m/z 1153,2585 et 575,1188, donnant respectivement les fragments à m/z 865,1987 et m/z 287,0540. De plus des pertes de -290 Da ont elles aussi été observées à partir des fragments m/z 1153,2585 et m/z 865,1987, donnant respectivement des fragments avec m/z 863,1730 et m/z 575,1188. Ces pertes de -290 et -288 Da résultent de la fission QM qui induit une perte d'une unité supérieure ou inférieure.

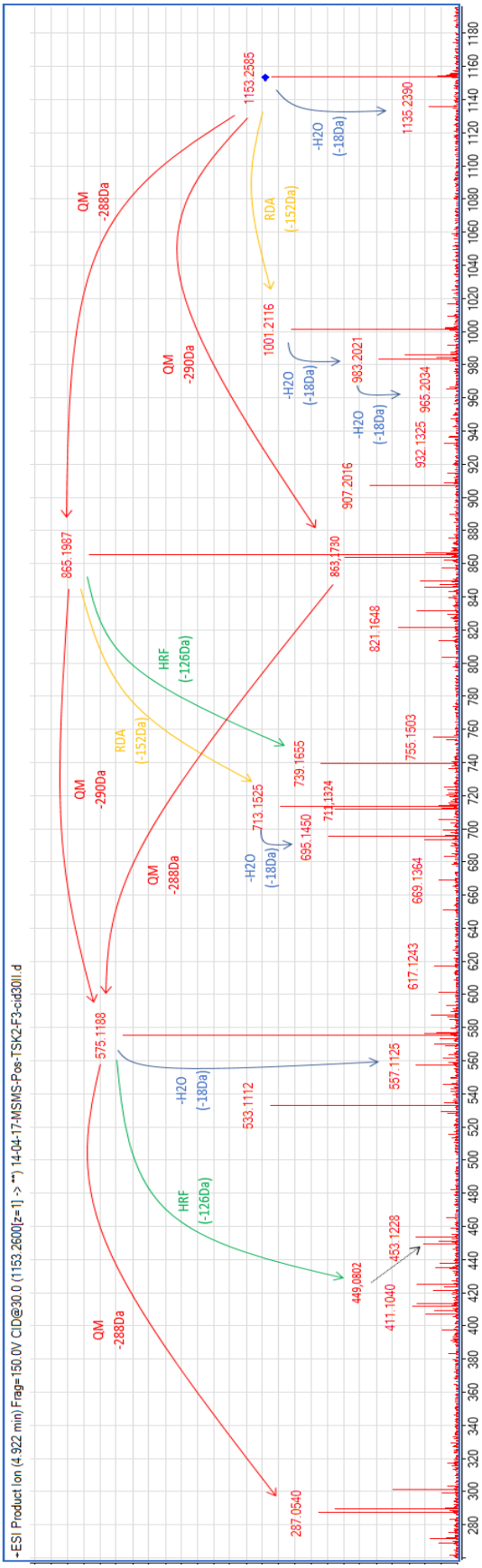


Figure 95 : Spectre de fragmentation du tétramères non cyclique ayant une liaison de type A (masse mesurée)

Il est important de préciser que l'échantillon utilisé pour réaliser cette fragmentation n'est pas un tétramère de type A purifié, mais un mélange de différents tétramères ayant tous une liaison de type A et des temps de rétention proches. En effet, le spectre de fragmentation présenté ici semble être le spectre de fragmentation de deux tétramères ayant une liaison de type A à différents niveaux dans la structure. En effet, la présence des fragments m/z 865,1987 (majoritaires) et m/z 863,1730 est explicable de deux façons. Une première explication serait la coélution de deux tétramères, le premier ayant sa liaison de type A en position supérieure, le second possédant une liaison de type A entre la seconde et la troisième unité, au centre de la structure.

La seconde explication serait que la fragmentation analysée provienne uniquement de la fragmentation d'un tétramère ayant une liaison de type A au centre de la structure entre la seconde et la troisième unité. De plus, l'étude précédente (Chapitre 5. II.) sur les marqueurs spécifiques des tanins liés par une liaison de type A a montré que ces liaisons sont formées préférentiellement sur l'unité supérieure ou dans le centre de l'oligomère, mais jamais sur l'unité en bout de chaine inférieure.

Cependant, la formation de ce type de liaison oxydative sur des tétramères n'a jamais été réalisée et seules une purification et une caractérisation complète des produits formés pourraient répondre à cette question. Cependant, la fragmentation d'un tétramère ayant une liaison de type A au niveau de l'unité terminale conduirait à un fragment de masse théorique égal à m/z 577,1346 qui n'a pas été observé. Ceci montrant qu'au moins une partie, si ce n'est l'intégralité des tétramères de type A fractionnés, possèdent leurs liaisons de type A au centre de leurs structures.

Néanmoins, le fragment m/z 575,1188 est issu soit de deux fissions QM successives (-288 et -290) (**Figure 96**, **Figure 97**) d'un tétramère ayant une liaison de type A au niveau de l'unité supérieure, soit de deux fissions QM à partir d'un tétramère ayant une liaison de type A entre sa seconde et troisième unité, correspondant aux pertes d'une unité supérieure (-288) et d'une unité inférieure (-290). Dans ce cas, en fonction de la perte de l'unité supérieure (-288) ou l'unité inférieure (-290), le fragment m/z 865,1987 ou le fragment m/z 863,1730 sera alors généré.

Dans l'ensemble des cas, le fragment m/z 575,1188 est observé et devient alors un fragment spécifique des tanins ayant une liaison de type A. Ce fragment ainsi que l'ensemble des fragments qui en sont issus surtout le fragment m/z 449,0802 et dans une moindre mesure m/z 287,0540 sont alors des marqueurs qui permettent d'identifier spécifiquement les tanins oligomères ayant une liaison de type A.

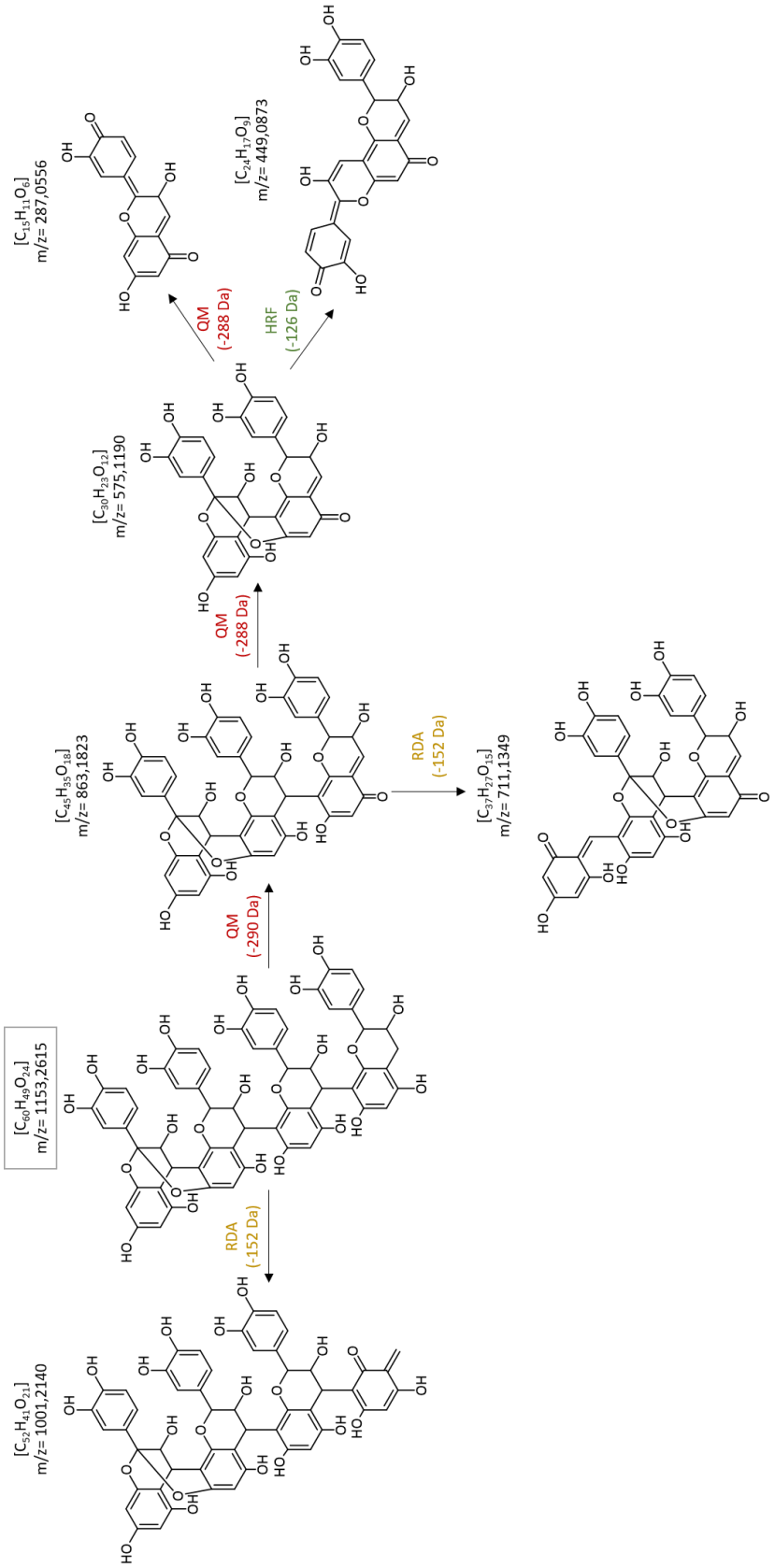


Figure 96 : Fragmentation du tétramère lié par une liaison de type A en position supérieure (masse calculée)

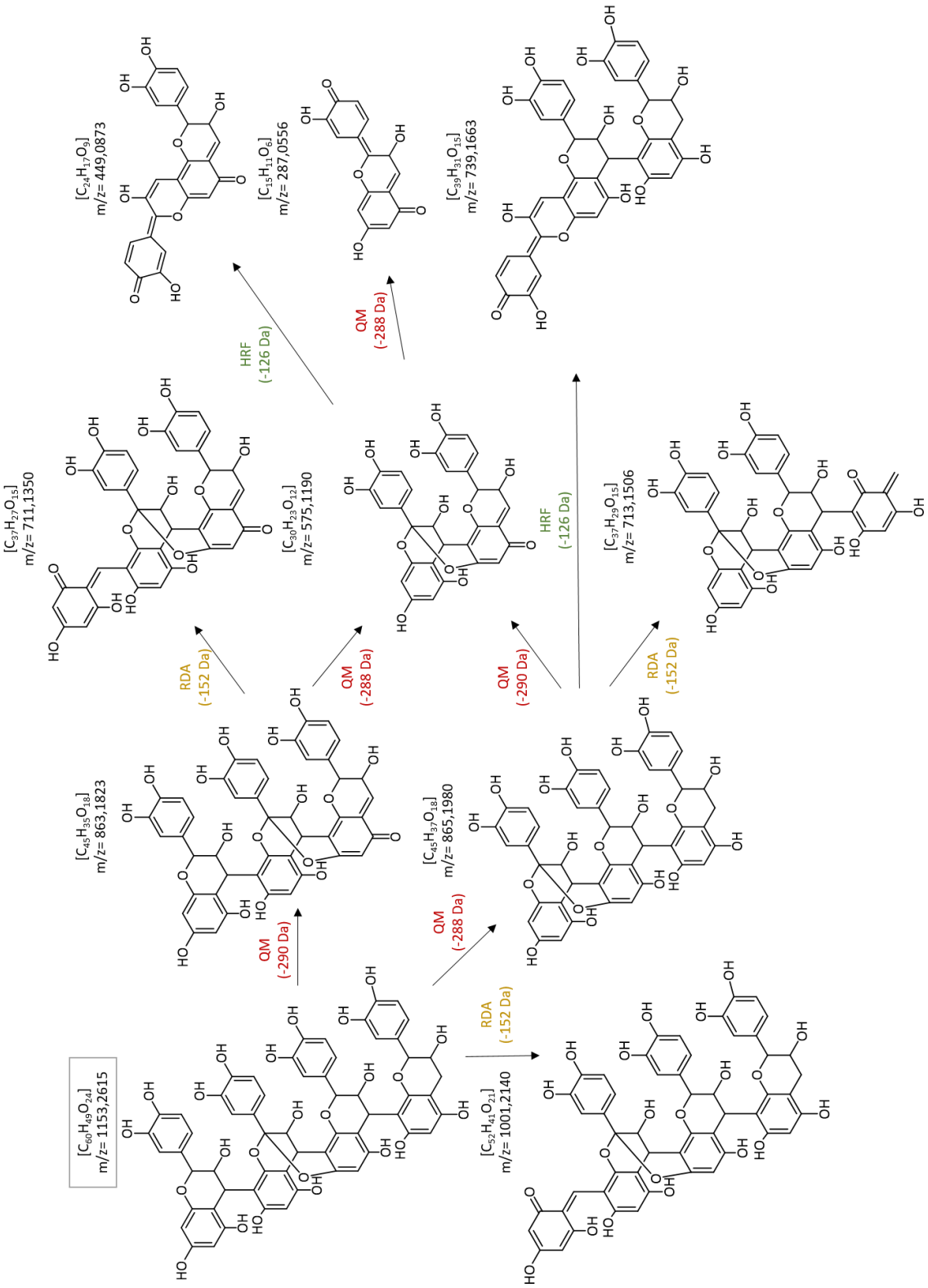


Figure 97 : Fragmentation du tétramère lié par une liaison de type A en position centrale (masse calculée)

b. La fragmentation du tétramère couronne

La fragmentation optimale du tétramère couronne a été trouvée également en mode positif avec une force de collision de 30 % (**Figure 98**). Le spectre MS-MS obtenu pour le tétramère couronne montre des fragments avec une perte de -152 Da, (-$C_8H_8O_3$, fragments à m/z 1001,2113 et à m/z 713,1552) et une perte de -126 Da, (-$C_6H_6O_3$, fragment à m/z 739,1755), qui résultent de la fission RDA et HRF respectivement. Des fragments issus de la perte d'eau (-18 Da) ont aussi pu être observés (m/z 1135,2838 ; m/z 695,1287 ; m/z 559,1110). Le fragment m/z 433,0919 résulte d'une perte d'eau et d'une fission HRF à partir du fragment m/z 577, 1309 en passant par le fragment m/z 451,1119. Quatre ions avec une différence de 288 Da (— $C_{15}H_{12}O_6$) ; m/ z 1153,2551 ; m/ z 865,2096 : m/z 577,1309 et m/z 289,0702) ont été trouvés, tous issus des fissions successives de QM à partir du tétramère couronne (m/z 1153,2551).

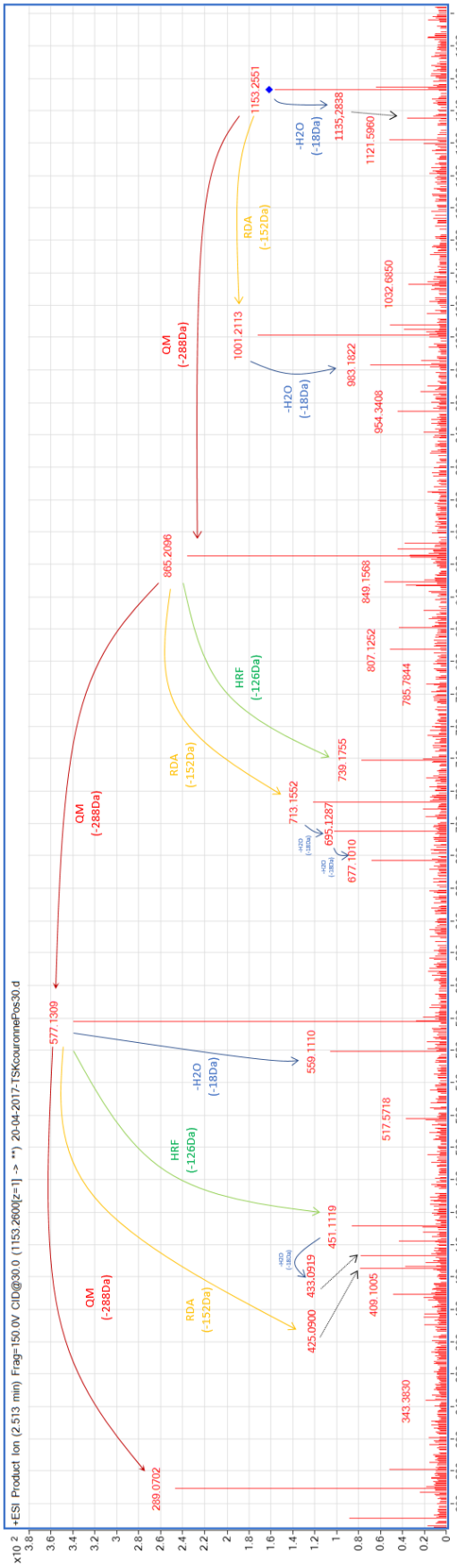


Figure 98 : Spectre de fragmentation du tétramère couronne (masse mesurée)

Une fois ionisé, le tétramère couronne peut subir un réarrangement de l'unité terminale ce qui va impliquer qu'aucune perte de -290 Da n'est possible. C'est pourquoi des pertes de 288 Da uniquement sont observées au cours de la fragmentation du tétramère couronne. Par ailleurs, aucun fragment spécifique lié à la liaison interflavane de type A (m/z 575,1188 ; m/z 449,0873) n'a été trouvé (**Figure 99**). L'absence de ces fragments spécifiques des liaisons de type A dans le spectre de fragmentation du tétramère couronne est une différence notable qui peut être utilisée pour le différencier des tanins oligomères ayant une liaison de type A par fragmentation en spectrométrie de masse.

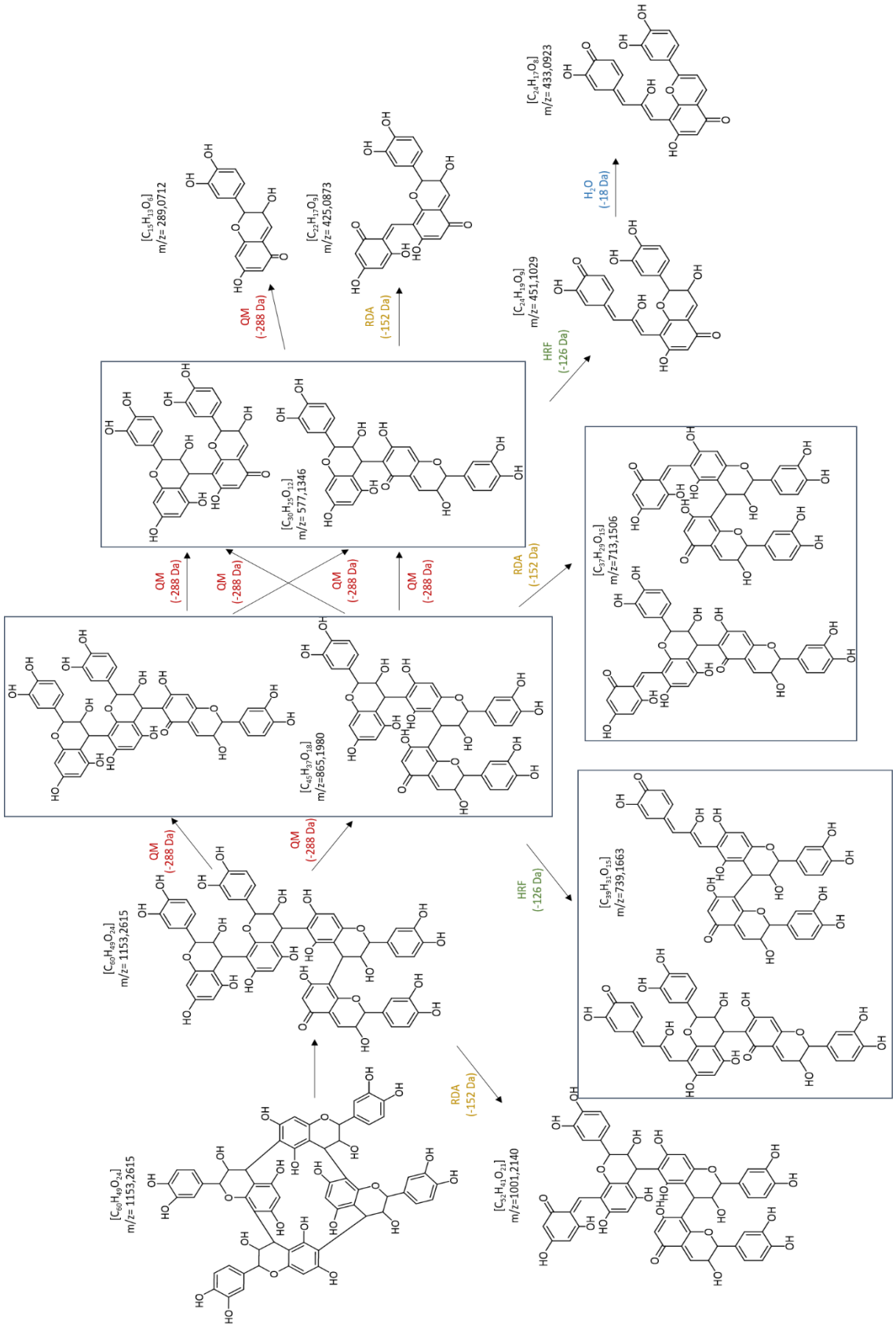


Figure 99 : Spectre de fragmentation du tétramère couronne (masse calculée)

L'approche par fragmentation en spectrométrie de masse a permis de proposer des voies de fragmentation spécifique pour le tétramère couronne et les tétramères non cycliques ayant des liaisons de type A. Des différences ont été observées au niveau des fragments formés au cours des fragmentations respectives de ces composés. Des fragments spécifiques des tétramères ayant une liaison de type A ont pu être identifiés (m/z 575,1188 ; m/z 449,0873 ; m/z 287,0556), ceux-ci étant absents du spectre de fragmentation du tétramère couronne. Ces fragments permettront de différencier un tétramère couronne d'un tétramère non cyclique ayant une liaison de type A par spectrométrie de masse malgré leurs masses et formules brutes respectivement identiques. D'une façon plus générale, ces fragments et la voie de fragmentation conduisant à leur formation pourront faciliter la différenciation entre de nouveaux tanins couronnes et les tanins ayant une liaison de type A directement dans le vin. La différentiation entre les tanins couronnes et les tanins non cycliques se faisant plus facilement puisque ces composés ont une différence de 2 unités de masse.

IV. Étude des propriétés sensorielles des tanins ayant une liaison de type A et des tanins couronnes

Passons à présent au volet suivant dans l'étude sensorielle des tanins couronnes et des tanins liés par une liaison de type A. Des analyses sensorielles ont alors été réalisées sur ces deux différentes classes de molécule.

Pour la famille des tanins ayant une liaison de type A, deux axes de recherche sur les analyses sensorielles ont été lancés. Dans un premier temps, une étude *in vitro* sur les interactions tanins-protéines a été réalisée. Des analyses aux turbidimètres ont alors été utilisées. Dans un second temps, des analyses sensorielles ont été effectuées afin de découvrir l'impact gustatif de ces molécules. En effet, tout au long de ces deux études, les tanins possédant une liaison de type B ont été comparés aux tanins possédant une liaison de type A, comparaison réalisée pour les études *in vitro* et *in vivo*.

Pour la famille des tanins couronnes, une analyse sensorielle a été entreprise avec la même verticale de vin de l'appellation Pauillac utilisée auparavant dans le Chapitre 4. II. Cette étude permettra de mettre en avant l'impact que peuvent avoir les tanins couronnes dans le vin, bien que la meilleure méthode serait de déguster les molécules purifiées. Les résultats ne pourront donner qu'une tendance si elle existe. Des corrélations entre les analyses chimiques et les analyses sensorielles seront également exécutées entre elles, analyses chimiques réalisées auparavant dans le Chapitre 4. II.

A. Analyses sensorielles in vitro et in vivo des tanins liés par une liaison de type A

a. Étude des interactions tanins-protéines sur les tanins de type A et de type B

L'une des caractéristiques principales des tanins est leur propriété à interagir avec les protéines. À de nombreuses occasions lors de l'élaboration du vin, ces deux molécules peuvent réagir entre elles. Cette interaction dépend en grande partie de la nature des tanins et des protéines qui se rencontrent et aussi des paramètres du milieu [122], un petit rappel de ceux-ci va être réalisé en suivant.

D'après la littérature, la masse moléculaire des tanins aurait un impact sur leurs interactions avec les protéines [254]. Plus les tanins ont une masse moléculaire élevée, plus la quantité de protéines précipitées serait importante. Cependant, à partir d'une certaine taille, la quantité de protéines précipitées reste constante. La présence de groupements galates estérifiés en position C3 ainsi que la polarité des tanins a également un impact non négligeable sur ces interactions. En effet, l'interaction s'effectuera au moyen de liaisons hydrogènes ou hydrophobes [255].

Les protéines possèdent différents sites d'interactions spécifiques. Parmi eux se trouvent les sites d'interactions forts, qui réagiront en premier et quand ceux-ci sont saturés, les sites d'interactions plus faibles entrent en jeu. Les nombreuses études réalisées sur le sujet ont montré que la masse moléculaire de la protéine est directement liée au nombre de sites de liaisons effectués. La présence de proline joue un rôle important sur la force et la quantité d'interaction tanins-protéines [254,256]. La structure spatiale des protéines intervient également comme un paramètre majeur dans l'interaction. Les tanins réagiraient très facilement avec la structure en pelote des PRPs, qui possèdent une structure flexible due à la présence importante de proline contrairement aux protéines globulaires, comme la BSA, qui sont-elles plus rigides [257].

Parmi les paramètres extérieurs influençant cette interaction, le ratio tanins-protéines ainsi que le pH et l'éthanol [258] en font partie. Par la méthode du turbidimètre, le trouble formé entre les tanins et les protéines au cours du temps forme une parabole : il ne cesse d'augmenter jusqu'à atteindre un palier, le trouble maximum. Celui-ci correspond à la concentration équivalente de tanins et de protéines qui permet d'occuper un maximum de sites d'interactions, permettant d'obtenir un réseau très complexe. Plus la concentration d'un des paramètres s'éloigne de cette valeur, plus les agrégats formés seront alors de petites tailles [259]. C'est justement avec cette technique que par la suite, l'interaction tanins-protéines a été analysée.

Après ce bref rappel, une étude *in vitro* des interactions tanins-protéines a été réalisée en mesurant le trouble formé par les complexes résultant de cette réaction. La turbidité, mesurée en NTU, permet de quantifier le trouble formé par l'interaction dans la solution. Cette interaction a été réalisée

entre une protéine modèle, la BSA à 1 $g.L^{-1}$, et les tanins étudiés à différentes concentrations allant de 50 $mg.L^{-1}$ à 1200 $mg.L^{-1}$ dans une solution modèle de vin (12 % éthanol, 5 $g.L^{-1}$ d'acide tartrique, pH = 3,5). Afin de pouvoir les comparer, deux types de tanins différents ont été utilisés : les tanins liés par une liaison de type B uniquement et les tanins ayant une liaison de type A.

Lors de cette interaction, deux comportements peuvent se distinguer : le comportement initial, se déroulant durant les 60 premières secondes, qui est un comportement linéaire et le comportement courant qui se forme durant l'ensemble de la réaction, c'est-à-dire de 0 à 48 h, qui lui a un comportement logarithmique. Chacun d'eux possède une relation mathématique spécifique. Durant les 60 premières secondes de l'interaction, le trouble suit la tendance d'une droite, il est donc possible d'écrire la relation suivante :

$$[\mathrm{NTU}]\ (\mathrm{t}) = a * t + b \quad (1)$$

a : vitesse initiale de développement du trouble (NTU/sec)

b : peut être interprété comme la somme des troubles des tanins et des protéines à la mise en contact

t : le temps (s)

[NTU] (t) : le trouble formé (NTU).

En revanche, la cinétique de l'interaction change totalement sur l'ensemble du temps de la réaction en évoluant selon une loi logarithmique s'écrivant :

$$[\mathrm{NTU}]\ (t) = A * \ln(t) + B \quad (2)$$

B : la turbidité au bout d'une unité de temps

t : le temps (h)

[NTU] (t) : le trouble formé

La vitesse courante de développement du trouble s'écrit alors :

$$\frac{d[NTU]}{dt}\ (t) = \frac{A}{t} \quad (3)$$

Comme l'indiquent les formules mathématiques (1) et (2), deux types de comportements sont obtenus. Grâce aux coefficients directeurs de ces courbes, une courbe représentant la vitesse de développement du trouble en fonction de la concentration en tanins peut être obtenue.

Dans un premier temps, l'interaction entre les tanins ayant des liaisons de type B, provenant de la fraction oligomérique avant oxydation, et la BSA a été étudiée (**Figure 100**). Cette courbe augmente jusqu'à un maximum de 600 mg.L^{-1} puis elle diminue. Ce maximum de 600 mg.L^{-1} est la concentration dite « optimum » pour laquelle les tanins et les protéines réagissent le plus rapidement, c'est la valeur à laquelle l'interaction tanins-protéines avec la formation de complexes et d'agrégats est la meilleure.

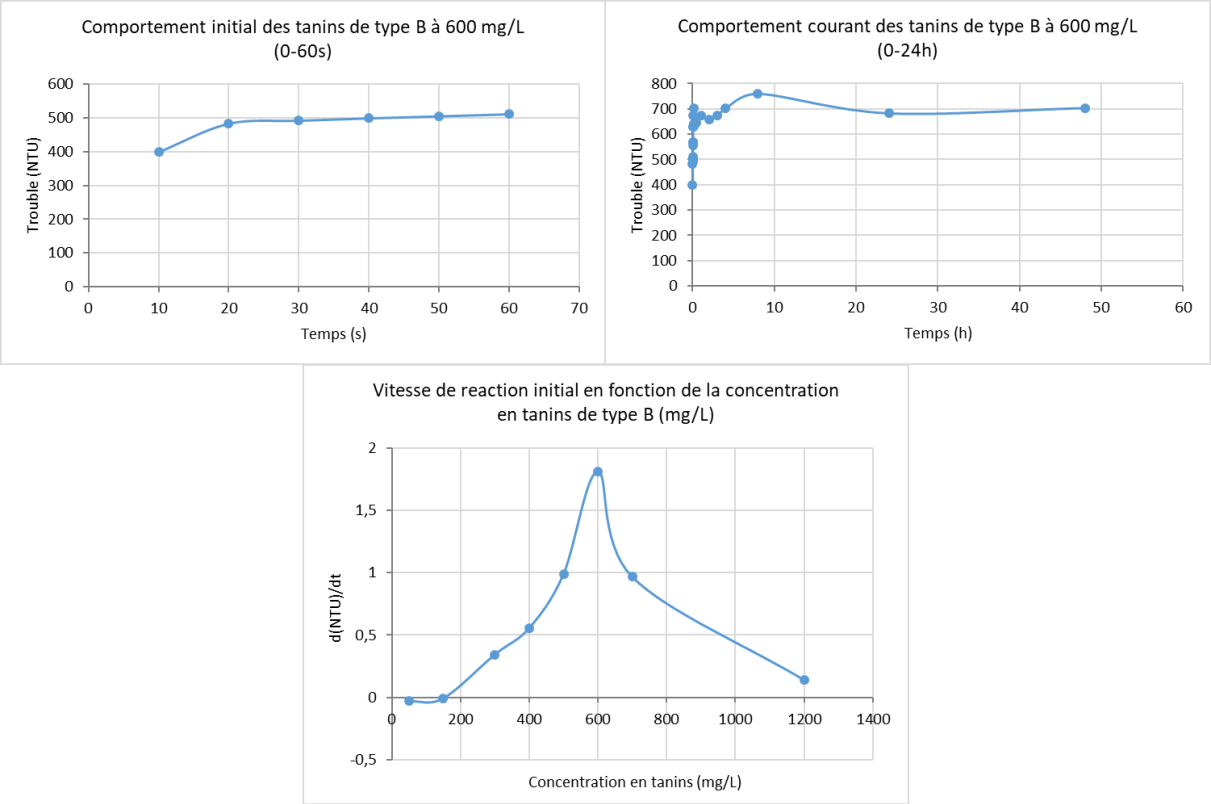


Figure 100 : Cinétique d'évolution des tanins ayant des liaisons de type B-protéines avec représentation de leur comportement initial, leur comportement courant et leur vitesse d'évolution

Dans un second temps, les tanins oligomères ayant une liaison de type A ont été étudiés afin de comparer leurs comportements avec les tanins ayant une liaison de type B. La concentration optimum obtenue pour les tanins de type A est de 700 mg.L^{-1} (**Figure 101**). C'est alors que la comparaison des concentrations optimum de formation entre les tanins ayant des liaisons de type B et les tanins ayant une liaison de type A apparait comme différente, concentration plus élevée pour les tanins ayant une liaison de type A. Cette différence peut s'expliquer par la rigidification de la chaine polymérique induite par les liaisons de type A. En effet, à cause de la liaison intramoléculaire supplémentaire, il ne peut pas y avoir de rotation des unités au niveau de la liaison interflavane diminuant alors la disponibilité de certaines fonctions phénols. Les tanins ayant une liaison de type A

possèderont alors moins de sites d'interaction disponibles pour réagir avec les protéines. Il faudra donc une concentration supérieure en tanins pour atteindre la concentration optimum.

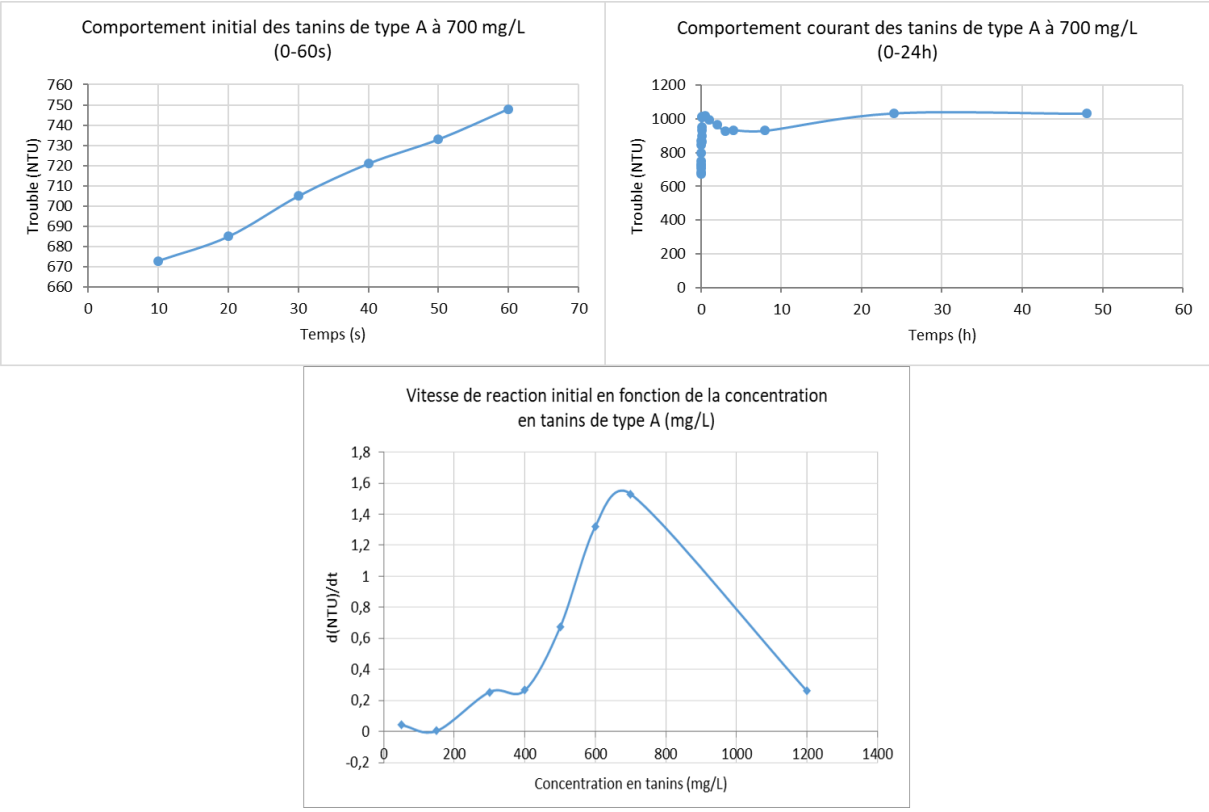


Figure 101 : Cinétique d'évolution des tanins ayant une liaison de type A-protéines avec représentation de leur comportement initial, leur comportement courant et leur vitesse d'évolution

Après avoir trouvé la concentration optimum des différents tanins étudiés, une étude comparative toujours de ces deux types de tanins a été réalisée en observant l'influence de différents paramètres impactant cette formation. Les paramètres étudiés sont le pourcentage d'éthanol et le pH. Ceux-ci n'influencent pas le profil général de l'interaction tanins-protéines, les comportements initiaux et les comportements courants suivent toujours les mêmes relations mathématiques (1) et (2).

Pour chacun de nos tanins, la référence de 600 mg.L^{-1} a été utilisée. Pour la variation du pourcentage d'éthanol, les pourcentages étudiés ont été de 0, 5, 10, 15 et 20 % d'éthanol. Les profils généraux des comportements initiaux et courants sont très proches, que ce soit pour les tanins ayant uniquement des liaisons de type B ou les tanins ayant une liaison de type A (**Figure 102**). Dans les deux cas, l'augmentation du pourcentage d'éthanol diminue la quantité de trouble formée représentant la quantité d'interaction tanins-protéines formée. Cependant, quelques différences apparaissent malgré tout entre les deux types de tanins. Pour les tanins oligomères ayant uniquement des liaisons de type B, toutes les courbes ont des troubles plus élevés que ceux des tanins ayant une liaison de type A, ce qui confirme l'observation effectuée précédemment concernant la concentration « optimum ».

D'après la littérature, le pourcentage d'éthanol a une influence sur le trouble formé par l'interaction. En effet, plus le pourcentage d'éthanol augmente dans les solutions modèles, plus la quantité de trouble diminue. L'éthanol est un récepteur de liaisons hydrogènes, ce qui va défavoriser l'interaction tanins-protéines et au contraire augmenter la solubilité des complexes formés. Ce paramètre va alors avoir une influence sur la perception de l'astringence, car plus le pourcentage d'éthanol augmente, plus la perception d'astringence diminuera [109]. L'étude de Demiglio et Pickering [131] a montré qu'à 0 % éthanol et avec une même quantité de tanins condensés, le vin était le plus astringent.

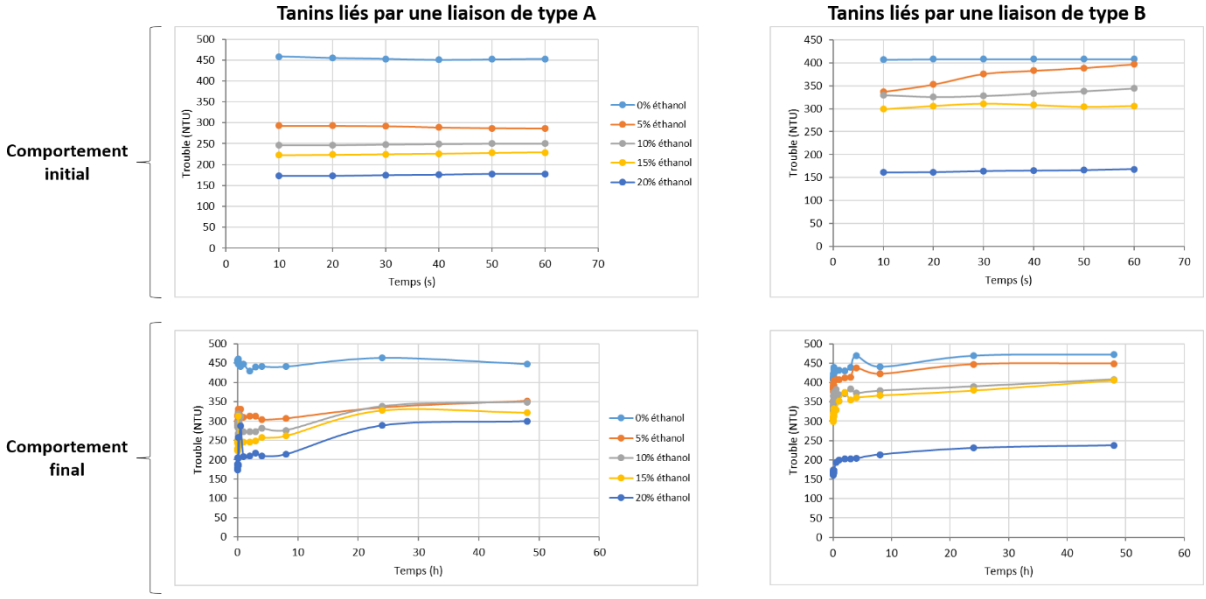


Figure 102 : Comportement initial et courants des tanins de type B et A en fonction du pourcentage d'éthanol

Le second paramètre étudié était le pH, paramètre important dans la matrice vin. Son impact sur l'interaction a été étudié à pH 3, 3,5 et 4. Ce facteur influence la conformation 3D des protéines et donc également les interactions tanins-protéines. Comme l'éthanol évoqué précédemment, le pH n'influence pas les deux comportements liés au développement du trouble qui se modélise toujours par les relations mathématiques (1) et (2). L'impact du pH sur la cinétique de développement du trouble pour les tanins ayant une liaison de type A ou les tanins ayant des liaisons de type B est encore une fois similaire (**Figure 103**). L'interaction à pH 3,5 comporte le trouble le plus élevé, suivi de pH 4 et de pH 3. En revanche, à pH = 3 le trouble formé est très faible alors qu'au contraire, à pH = 4 le trouble est le plus important.

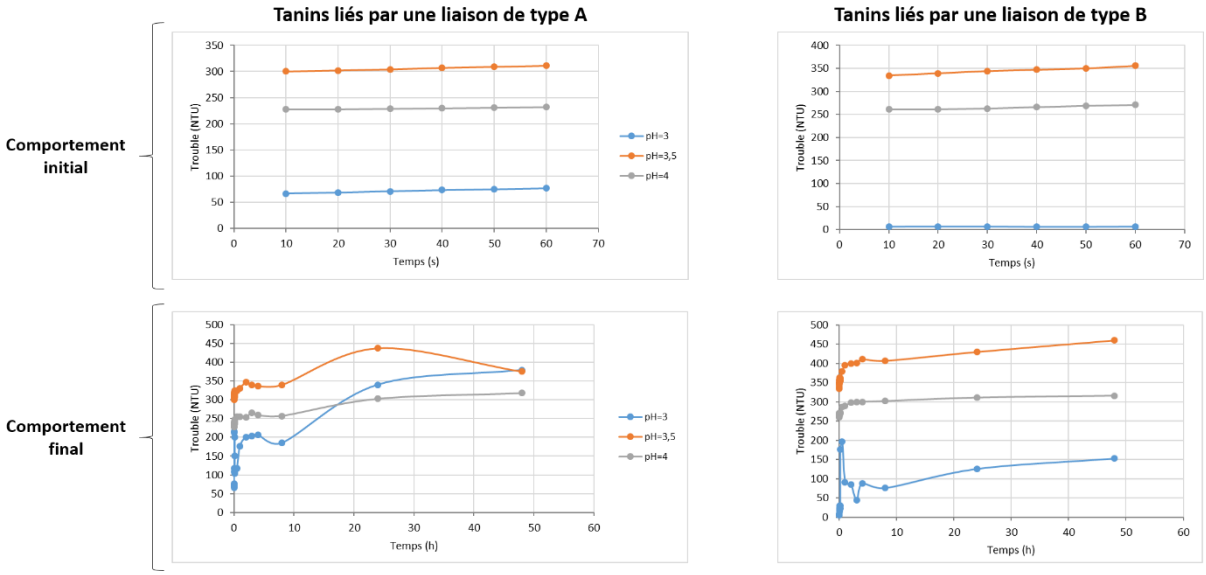


Figure 103 : Comportements initiaux et courants des tanins de type B et A en fonction du pH

En effet, à pH = 3, la BSA se trouve en conformation dite « ouverte » qui permet de former des liaisons tanins-protéines avec un grand nombre de molécules de tanins, ce qui diminue les molécules disponibles pour faire les liens de pontage entre deux protéines. Les complexes et les agrégats formés sont alors de plus petite taille et donc le trouble engendré est très faible. De plus, après la déformation de la protéine, son système hydrophobe est modifié. L'augmentation du pH induira alors une augmentation de la formation du trouble, donc une augmentation des interactions. À pH = 4-5, la conformation de la protéine est dite « fermée », mais les propriétés hydrophobes de la protéine permettent des interactions plus élevées [260] (**Figure 104**). En définitive, le pH = 3,5 est un pH pour lequel l'interaction tanins-protéines apparait la plus forte.

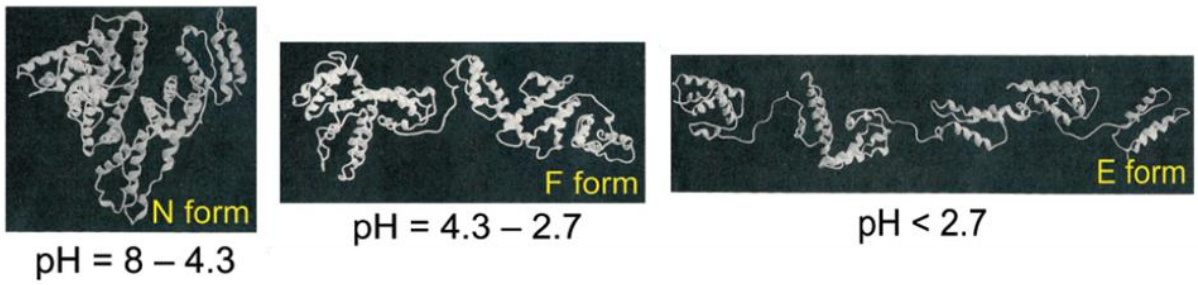


Figure 104 : Différentes formes de BSA en fonction du pH [260]

En conclusion de ces études *in vitro* d'interaction tanins-protéines, la présence des liaisons de type A dans la chaine polymérique des tanins ne modifie pas le mécanisme général de l'interaction tanins-protéines. Par ailleurs, le comportement général de ces tanins par rapport aux tanins de type B reste inchangé. Néanmoins, pour toutes les conditions testées, la présence de liaison de type A induit une plus faible formation de trouble, ce qui prouve que la conversion d'une liaison de type B en liaison de

type A dans une chaine polymérique de tanins condensés induit une diminution de la quantité d'interactions tanins-protéines formées. Cette diminution d'interaction pouvant être le résultat de la modification de la structure 3D et de la rigidité induite par la formation de la liaison intramoléculaire de type A.

b. Analyses sensorielles des tanins de type A en comparaison aux tanins de type B

Les tanins, dans leur ensemble, ont un impact organoleptique important dans les vins rouges. Ils sont responsables en particulier de l'amertume et l'astringence des vins. À ce jour, aucune publication n'a décrit précisément l'impact sensoriel des tanins possédant une liaison de type A. Afin de débuter cette étude, des analyses sensorielles de ces tanins ont été réalisées. Afin d'évaluer leurs impacts, une comparaison des résultats d'analyses sensorielles des tanins ayant une liaison de type A avec ceux ayant des liaisons de type B a été réalisée. Les analyses ont débuté par des seuils de détection pour chacun de ces deux types de tanins. Ensuite, des tests triangulaires ont été mis en place afin d'évaluer si des différences organoleptiques permettaient de les différencier.

Les échantillons utilisés pour ces dégustations ne sont pas des molécules pures, mais des fractions oligomériques purifiées. Deux types de fractions ont été utilisées, la fraction oligomérique ayant des liaisons de type A et la fraction oligomérique ayant uniquement des liaisons de type B. Chaque fraction a fait l'objet de vérifications par injection en UPLC-UV-ESI-QTOF. Pour l'analyse sensorielle, les échantillons ont été évaporés à sec et lyophilisés deux fois afin qu'il ne reste aucune trace de solvant.

L'étude des seuils a été réalisée dans le but de comparer les deux types de tanins analysés, sensoriellement parlant. Cette méthode sensorielle possède l'avantage d'utiliser très peu de produits. Une gamme de concentrations croissantes était proposée aux dégustateurs qui pour chaque concentration devaient faire un choix entre trois verres différents (**Annexe 4**). Le test étant gustatif, un verre d'eau était mis à disposition pour pallier la fatigue gustative et les effets d'accumulations. Une première gamme de concentrations dans l'eau allant de 4 $mg.L^{-1}$ à 256 $mg.L^{-1}$ a été proposée, mais les concentrations de cette gamme étant trop élevées, le seuil n'a pas été trouvé. Après avoir baissé les concentrations de 1 $mg.L^{-1}$ à 64 $mg.L^{-1}$, une deuxième gamme a été créée. Le seuil de détection trouvé pour les tanins de type B est de 3,32 $mg.L^{-1}$ tandis que le seuil pour les tanins de type A était de 5,58 $mg.L^{-1}$ (**Figure 105**). L'écart entre les seuils n'est pas assez significatif pour pouvoir conclure à des différences importantes.

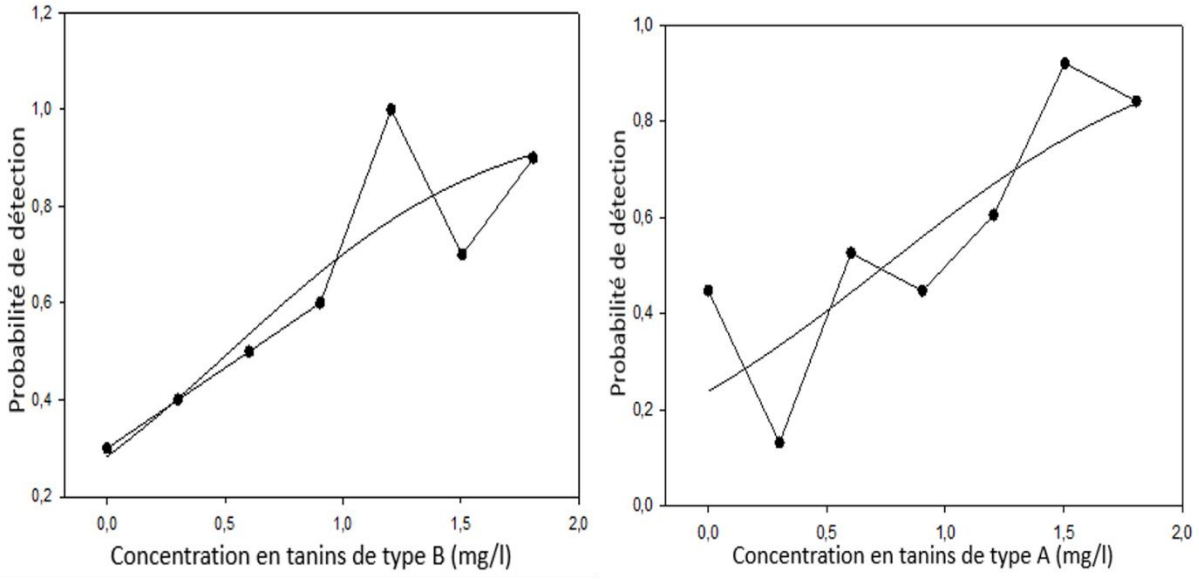


Figure 105 : Détermination du seuil de détection des tanins de type B (à gauche) et des tanins de type A (à droite)

En parallèle, un test triangulaire entre les tanins ayant une liaison de type A et les tanins de type B solubilisés dans de l'eau à une concentration de 500 mg.L^{-1} a été réalisé et s'est révélée concluants (**Annexe 5**). En effet, sur 25 dégustateurs, 16 ont réussi à trouver une différence. Ces résultats sont donc significatifs avec une barre d'erreur de 0,01 %. Ces résultats montrent donc qu'il existe bien des différences organoleptiques entre les tanins ayant une liaison de type A et les tanins ayant uniquement des liaisons de type B au niveau gustatif. Ce test a également été réalisé en solution modèle de vin (5 g.L^{-1} d'acide tartrique, 12 % éthanol, pH = 3,5) et les mêmes résultats concluants ont été obtenus.

De même pour l'analyse sensorielle, la purification des tanins de type A et de type B devra être réalisée afin de confirmer leurs propriétés sensorielles avec, par exemple un test par paire.

B. Analyses sensorielles sur la verticale de vin de l'appellation Pauillac

Après avoir déterminé sensoriellement l'impact des tanins liés par une liaison de type A et de type B, les tanins couronnes ont alors fait l'objet de la suite de cette étude. N'ayant pas assez de quantité de matière pour pouvoir faire déguster chaque molécule de cette famille indépendamment, la verticale de vin de Pauillac a été choisie pour réaliser une dégustation. Ainsi, l'incidence organoleptique de ces molécules non volatiles a été corrélée statistiquement aux données sensorielles. Les pigments polymérisés ont également été intégrés à cette étude. Ces derniers font l'objet d'un nouvel axe de recherche dont de récentes publications ont étudié l'impact sensoriel [26]. Pour les tanins couronnes, Zeng [20] a montré qu'une tendance organoleptique existerait entre le tétramère

couronne et l'intensité d'astringence dans le cas d'une verticale de vin rouge de Syrah. Dans notre cas, nous avons voulu voir si cette tendance pouvait être confirmée dans le cas du Cabernet-Sauvignon malgré la faible quantité de ces composés dans le vin. Les dégustateurs, au nombre de 21, devaient évaluer les 17 vins de la verticale par un profil gustatif évaluant : l'acidité, l'amertume, l'intensité d'astringence, la qualité tannique, la persistance de l'astringence et le volume (**Annexe 3**). Toutes les données ont ainsi été mises en commun pour être traitées par statistiques sur le logiciel R.

Dans un premier temps, l'analyse statistique a permis de déterminer si un consensus entre les dégustateurs existait. Si un consensus était observé, l'analyse sensorielle n'en serait que plus robuste ainsi que les résultats. Ainsi, des Analyses en Composantes Principales (ACP) ont été réalisées et ont montré qu'aucun consensus n'existait entre les dégustateurs créant ainsi une faible différenciation des vins. Ainsi, cette absence de consensus impacte les résultats suivants les rendant moins robustes.

Dans un second temps, une analyse à multi facteurs a ainsi permis la comparaison des analyses chimiques et sensorielles. Une carte des individus (**Figure 106**) et un cercle de corrélation (**Figure 107**) contenant les données chimiques et sensorielles ont été obtenus. Les deux résultats possèdent la même échelle les rendant ainsi comparables. Les deux axes montrent les dimensions 1 et 2, dimensions principales représentant le mieux les paramètres étudiés. Sur le cercle de corrélation, plus les variables sont proches de l'extérieur du cercle, plus la corrélation est forte.

L'analyse du cercle de corrélation ne montre aucune corrélation directe entre les données chimiques et les paramètres sensoriels. De plus, les tanins couronnes se positionnent quasiment seuls au centre du cercle prouvant ainsi l'absence de corrélation de ces tanins avec un paramètre sensoriel. En effet, même si une corrélation existait, celle-ci serait très faible. L'étude des corrélations des autres molécules avec les paramètres sensoriels ne montre également aucun résultat ni aucune tendance. L'étude de la carte des individus a montré que ceux-ci étaient très proches du centre des axes montrant une très mauvaise différenciation des vins par les dégustateurs comme vus ci-dessus. La comparaison de la position des individus avec les autres analyses n'a ainsi rien donné non plus. Les autres dimensions ont également été étudiées, mais aucune tendance n'en est ressortie.

Au final, aucune conclusion n'est ressortie de cette analyse sensorielle. À l'avenir, la constitution d'un panel possédant un meilleur entrainement sera nécessaire. Les nombreux vins à déguster étaient aussi un facteur limitant, les dégustateurs étant vite saturés. D'autres analyses sensorielles dans le futur devront être réalisées afin de déterminer si les tanins couronnes possèdent un impact gustatif.

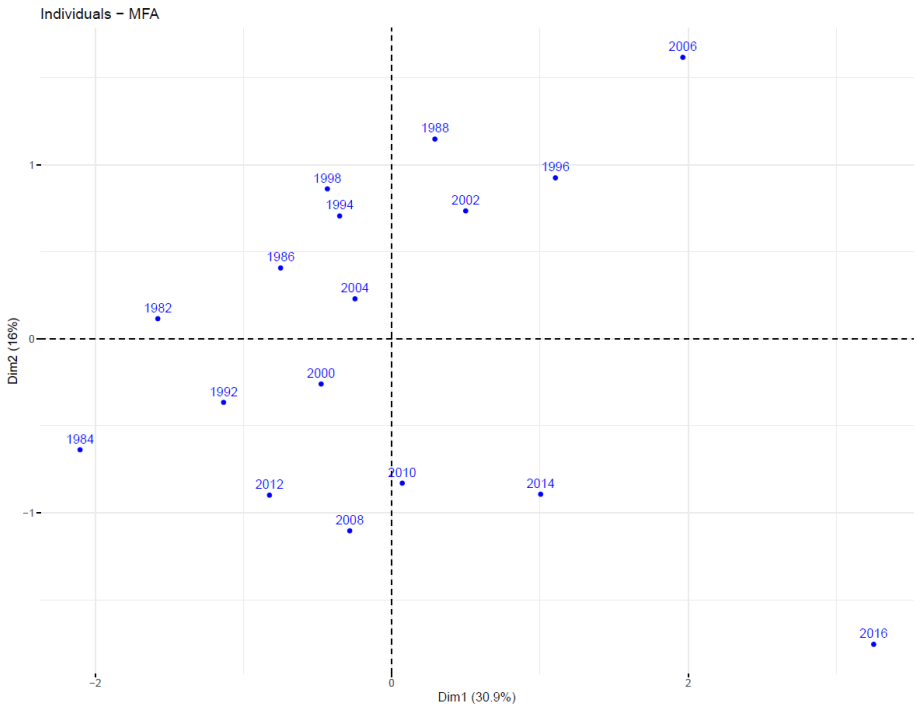


Figure 106 : Carte des individus déterminés par une analyse multi factorielle

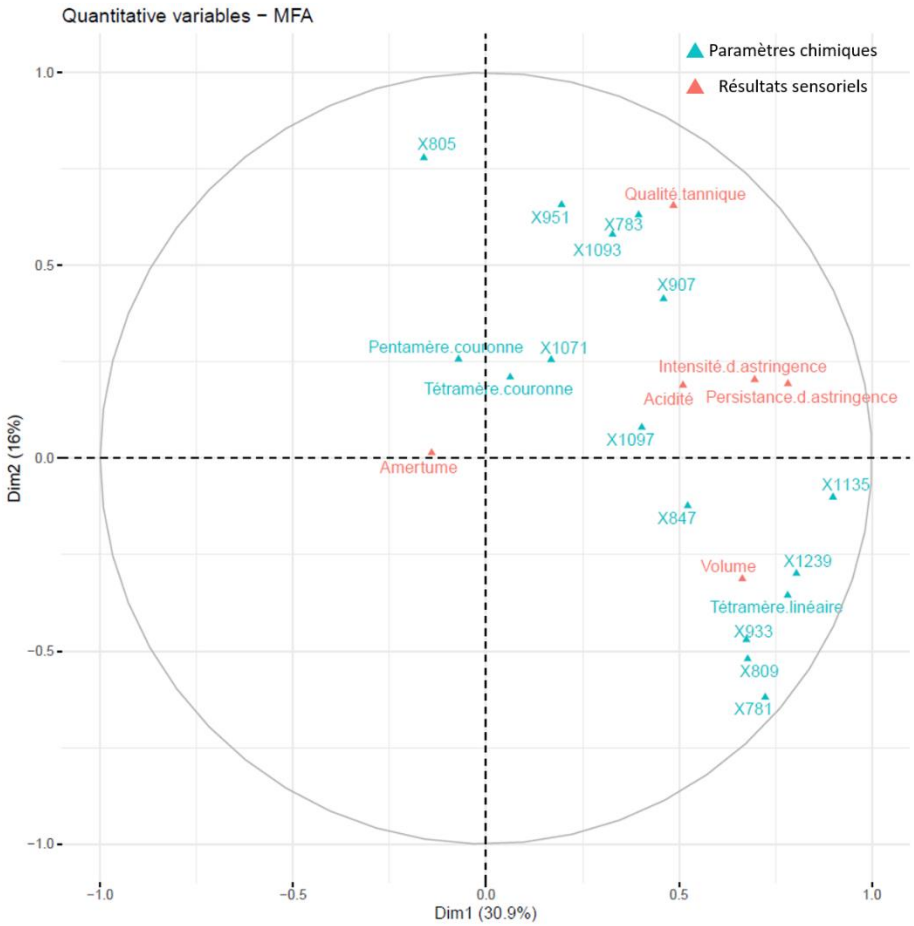


Figure 107 : Cercle de corrélation entre les paramètres sensoriels et les résultats chimiques

V. Conclusions

En conclusion de cette partie, une étude approfondie sur les tanins liés par une liaison de type A a été menée. Après avoir validé et optimisé l'hémisynthèse de ces tanins, leurs marqueurs spécifiques par fragmentation en spectrométrie de masse ont été recherchés. Les conditions de formation de ces tanins ont été optimisées en laboratoire. Bien que celles-ci soient totalement différentes des conditions de formation des liaisons de type A dans les vins, le mécanisme d'oxydation radicalaire pour la formation de ces liaisons reste le même. Il apparait que les liaisons de type A sont résistantes à la dépolymérisation chimique, étude qui avait déjà été menée pour les pigments Anthocyanes-Tanins possédant une liaison de type A [20]. Le marqueur de ces liaisons étant alors le dimère possédant une liaison de type A. De plus, il a été observé, pour la première fois, que la formation de la liaison de type A était régiosélective puisque dans les conditions de formation, les liaisons de type A dans les oligomères ou polymères ne sont jamais présentes au niveau de la dernière liaison impliquant l'unité terminale. Une réaction d'oxydation en utilisant un tétramère non cyclique pur devrait être envisagée avec purification des produits d'oxydation formés pour leur confirmation structurale par RMN et ainsi valider cette observation obtenue par des stratégies de dépolymérisation chimique et analyses en spectrométrie de masse.

Par la suite, une étude des voies de fragmentation en spectrométrie de masse a permis de différencier le tétramère couronne des tétramères possédant une liaison de type A. Des fragments spécifiques des tanins ayant une liaison de type A ont été identifiés permettant dès à présent de différencier les tanins couronnes de ces tanins. Cette différenciation par identification des fragments obtenus en spectrométrie de masse facilitera l'identification des tanins couronnes dans le futur et notamment dans le cas de matrices autres que le vin et pour des tanins couronnes ayant des monomères différents de l'épicatéchine.

Enfin, concernant les tanins ayant une liaison de type A, des analyses sensorielles ont été réalisées en comparaison aux tanins ayant uniquement des liaisons de type B. Pour les tanins de type A, des analyses *in vitro* par interaction tanins-protéines et des analyses *in vivo* par analyse sensorielle ont été réalisées montrant ainsi que les tanins de type A seraient plus astringents que les tanins de type B. L'analyse sensorielle de la verticale de Pauillac n'a donné aucun résultat concluant laissant ainsi la question de l'impact des tanins couronnes dans les vins toujours en suspens.

Chapitre 6 : Purification et synthèse des tanins couronnes

Dans ce dernier chapitre, les tanins couronnes ont fait l'objet d'une dernière étude qui se décompose en deux parties. Dans un premier temps, la purification des pentamères couronnes a été mise en œuvre. En effet, durant sa thèse, Zeng [20] a identifié et caractérisé le tétramère couronne par RMN. Une méthode de purification spécifique avait alors été développée pour purifier le tétramère couronne. C'est à la suite de ces analyses que la structure cyclique unique du tétramère couronne a été découverte pour la première fois et que par la suite, l'ensemble de la sous-famille des tanins couronnes a été postulée. Seul le tétramère couronne a fait l'objet à ce jour d'une caractérisation complète par RMN. C'est pour cela que le premier objectif de ce chapitre était de purifier les pentamères couronnes afin de voir si ceux-ci sont cycliques comme leur homologue le tétramère en l'analysant par spectroscopie RMN. À ce jour, la dernière étape de la purification est en cours. L'inconvénient de la purification est la perte de matière tout au long du processus qui amène au final à un composé totalement pur, mais possédant une masse très faible (quelques milligrammes).

C'est dans ce but que, dans un second temps, la synthèse totale des tanins couronnes a débuté. En effet, la synthèse chimique permet d'obtenir des molécules, déjà existantes ou non, par différentes stratégies. Cette technique chimique permet ainsi d'obtenir plus de matière en peu de temps quand le protocole de synthèse est déjà établi. Une méthode de synthèse permet également de pouvoir obtenir des composés non présents naturellement dans les plantes pour ainsi faciliter l'étude de leurs propriétés physico-chimiques. Dans notre cas, le but premier est de synthétiser le tétramère couronne afin de pouvoir faire des analyses physico-chimiques plus approfondies, notamment concernant ses propriétés sensorielles ainsi que les possibles mécanismes de chélation en lien avec la cavité au centre de la molécule. Par la suite, le protocole pourra aussi être mis en œuvre pour la synthèse des pentamères couronnes. Néanmoins, avant de se projeter dans l'avenir, il a fallu développer un protocole de synthèse sur ces nouvelles molécules cycliques qui n'ont à ce jour jamais été synthétisées. Toutes les étapes de synthèse seront détaillées ainsi que les analyses par UPLC-UV-ESI-QTOF et RMN des produits intermédiaires obtenus.

I. Purification des pentamères couronnes

En général, la purification est souvent composée de plusieurs étapes définies en fonction de la molécule à purifier. En fonction des caractéristiques chimiques de cette molécule, cette méthode s'affinera et le processus sera plus ou moins long. Pour les pentamères couronnes, le processus de purification a été réalisé suivant le protocole mis en place par Zeng [19]. La purification a été divisée en 3 étapes. Elle a été réalisée sur un vin rouge de Merlot du bordelais dans lequel la présence en procyanidines couronnes a été préalablement vérifiée par UPLC-UV-ESI-QTOF.

Les procyanidines couronnes, tétramère et pentamères, présentent une polarité plus élevée que les procyanidines non cycliques. C'est pourquoi la première phase de la purification a été réalisée sur SPE C-18 pour éliminer la plupart des composés ayant une polarité inférieure aux molécules d'intérêt. Pour commencer, le vin a été évaporé afin d'éliminer l'alcool présent, puis redissout dans de l'eau acidifiée à 0,1 % d'acide formique. Par la suite, l'échantillon a été élué sur une cartouche SPE C-18 préalablement équilibrée. Pour cela, de l'eau distillée a d'abord été utilisée pour éliminer les d'acides et les sucres tous en laissant les composés phénoliques sur le gel de la colonne. Ensuite, un mélange méthanol/eau (5/95, v/v) a été utilisé pour éluer une fraction contenant nos molécules d'intérêt. Par la suite, l'ensemble des composés phénoliques ont été élués avec du méthanol pur et la colonne a été rééquilibrée avec de l'eau avant de pouvoir être réutilisée de nouveau pour un nouveau cycle. Toutes les fractions ont été injectées en ULPC-UV-ESI-QTOF afin de vérifier la présence de nos procyanidines couronnes dans la fraction éluée avec 5 % de méthanol. Dans la **Figure 108**, le chromatogramme UV **A**, correspondant au vin de base, a été simplifié comme observé sur le chromatogramme UV **B**, après le passage sur la cartouche SPE C-18. En effet, nos molécules d'intérêt sont présentes en tout début de chromatogramme au temps de rétention 2,6 min pour le tétramère couronne et 2,8 min pour les pentamères couronnes. Grâce au gradient de méthanol utilisé, toutes les autres molécules du vin situées après 5 min sur le chromatogramme, faisant un dôme sur le chromatogramme **A**, ont été enlevées. La fraction obtenue avec 5 % de méthanol restant malgré tout encore très complexe, elle a alors été évaporée à sec et reprise dans de l'eau acidifiée pour subir une nouvelle étape de fractionnement.

La seconde étape de purification, réalisée sur le gel de filtration chromatographique TSK HW-40 S, a permis de séparer le tétramètre et les pentamères couronnes des autres composés de faible poids moléculaire présents dans la fraction obtenue après la première phase de purification sur SPE C-18. Ce gel, possédant un mode d'interaction différent des cartouches SPE C-18, est initialement utilisé pour la séparation des protéines sur la base du principe d'exclusion stérique. Cependant, il a été démontré que la séparation des flavanols et des oligomères de tanins condensés sur ce type de colonne est basée sur l'affinité des composés avec le gel, laquelle augmente avec la taille du composé [261]. Par conséquent, un niveau de polymérisation plus élevé signifie une plus grande affinité avec le gel et une plus grande difficulté à éluer le composé [66]. Dans cette étape, c'est le temps d'élution sur le gel qui a été déterminant pour pouvoir récupérer nos tanins couronnes. Dans les premières heures, les premières molécules à être éluées de la colonne ont été les procyandines de faible poids moléculaire (monomères). En suivant, des procyanidines oligomères (dimères et trimères) ont été éluées rapidement et elles ont été suivies par les pentamères et le tétramère couronne, qui sortent respectivement à 4 h et 5 h d'élution. Ces fractions ont alors été collectées et injectées pour

vérification en UPLC-UV-ESI-QTOF. En effet, la comparaison des chromatogrammes **B** et **C**, ce dernier correspondant au chromatogramme UV après élution sur le gel TSK, montre une évolution de ceux-ci. Après avoir enlevé les composés majoritaires comme les deux grands pics sur le chromatogramme **B**, les composés en faibles concentrations apparaissent comme majoritaires dans cette fraction de TSK dont nos tanins couronnes. Le chromatogramme **C** étant quand même bien complexe, les différentes fractions TSK ont été regroupées en fonction de leur ressemblance UV afin de concentrer les échantillons pour enfin passer à la dernière étape de la purification en HPLC semi-préparative.

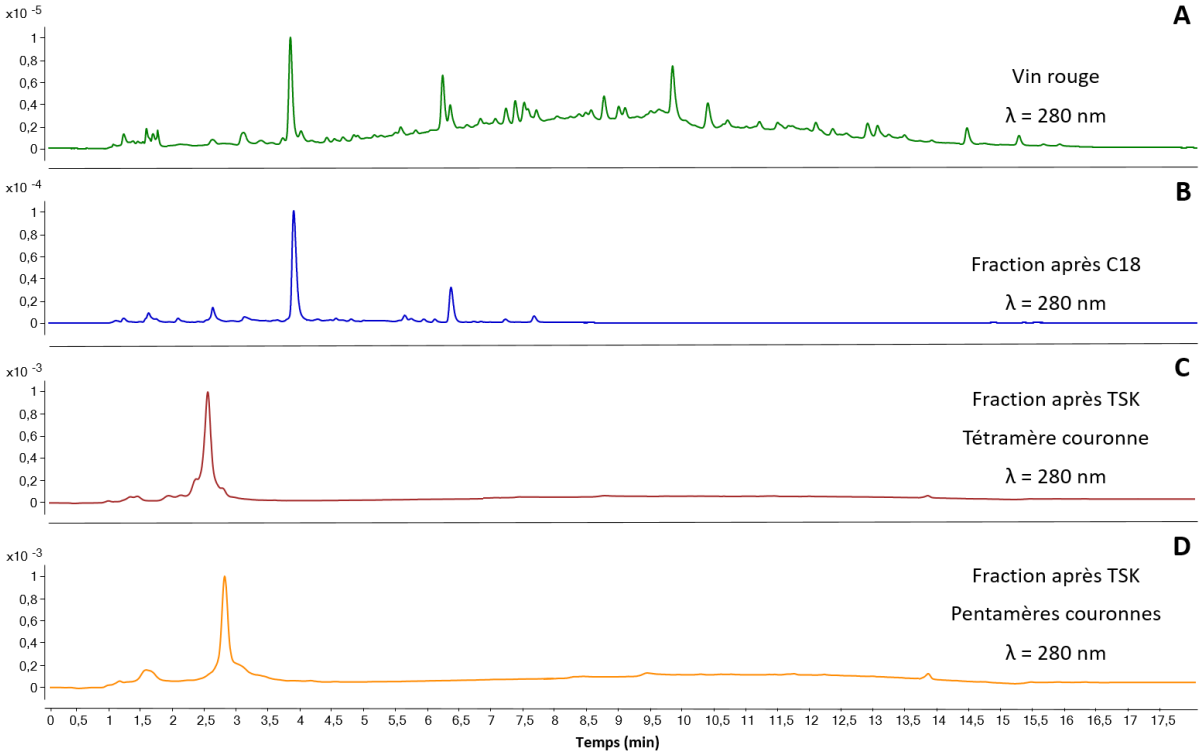


Figure 108 : Chromatogrammes UV des différentes étapes de purification des pentamères couronnes. A : Chromatogramme du vin rouge de base ; B : Chromatogramme du vin après passage sur cartouche C-18 ; C : Chromatogramme du vin après passage sur colonne TSK pour le tétramère couronne ; D : Chromatogramme du vin après passage sur colonne TSK pour les pentamères couronnes.

Cette technique chromatographique permet la séparation des molécules d'une matrice complexe en collectant les molécules d'intérêt en direct quand celles-ci sont éluées de la colonne. Après les avoir évaporées et redissoutes dans de l'eau acidifiée, les fractions obtenues après purification sur la colonne TSK ont été injectées en HPLC semi-préparative afin de séparer et de collecter chaque procyanidine couronne. En effet, le pic du tétramètre a été observé et collecté entre 17 et 18 minutes et le pic du pentamère majoritaire a été collecté entre 20 et 21 minutes (**Figure 109**).

Par la suite, chacun des tanins couronnes a séparément été évaporé à sec et à nouveau injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF afin de voir la pureté des fractions collectées.

À ce stade, la purification des pentamères couronnes est toujours en cours et les analyses RMN correspondantes aussi. La structure cyclique reste encore en suspens.

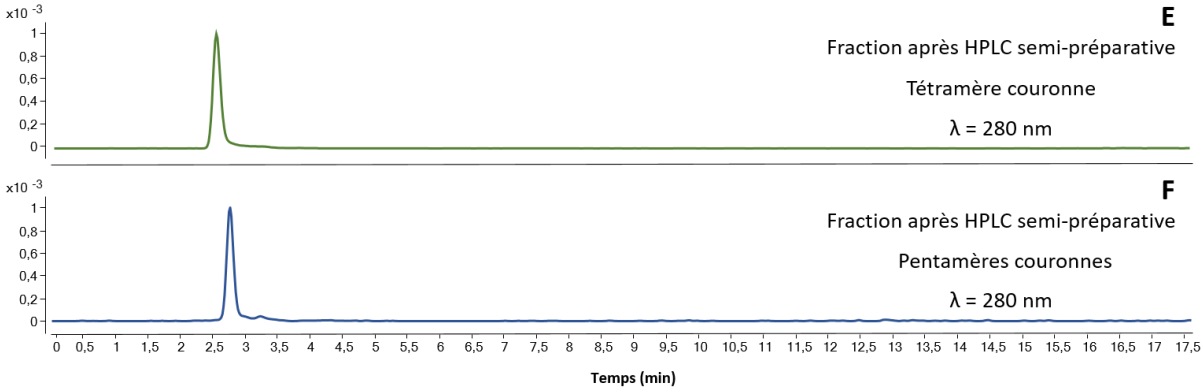


Figure 109 : Chromatogrammes UV de l'HPLC semi preparative avec la vérification en UV et en masse des tanins couronnes. E : Tétramère couronne ; F : Pentamère couronne majoritaire.

II. La synthèse du tétramère couronne

La synthèse du tétramère couronne a débuté en parallèle de la purification des pentamères couronnes. Le but final de cette synthèse était d'étudier plus en détail les propriétés sensorielles et physico-chimiques de cette molécule cyclique. Avant cela, une stratégie et un protocole de synthèse ont dû être établis.

A. La stratégie de synthèse

L'étude de la structure du tétramère couronne a été réalisée préalablement afin de pouvoir définir au mieux le protocole de synthèse adapté.

La structure du tétramère couronne a été caractérisée par spectrométrie RMN par Zeng [19]. Cette molécule est composée de quatre unités de base d'épicatéchine reliée par un enchainement de liaisons Unité 1 - (4β→6) - Unité 2 - (4β→8) - Unité 3 - (4β→6) - Unité 4 - (4β→8) - Unité 1 conférant une totale symétrie de structure au tétramère. À la suite de cette identification, une modélisation moléculaire a été réalisée permettant de mesurer une cavité d'une distance de 5 Å entre les cycles (**Figure 110**).

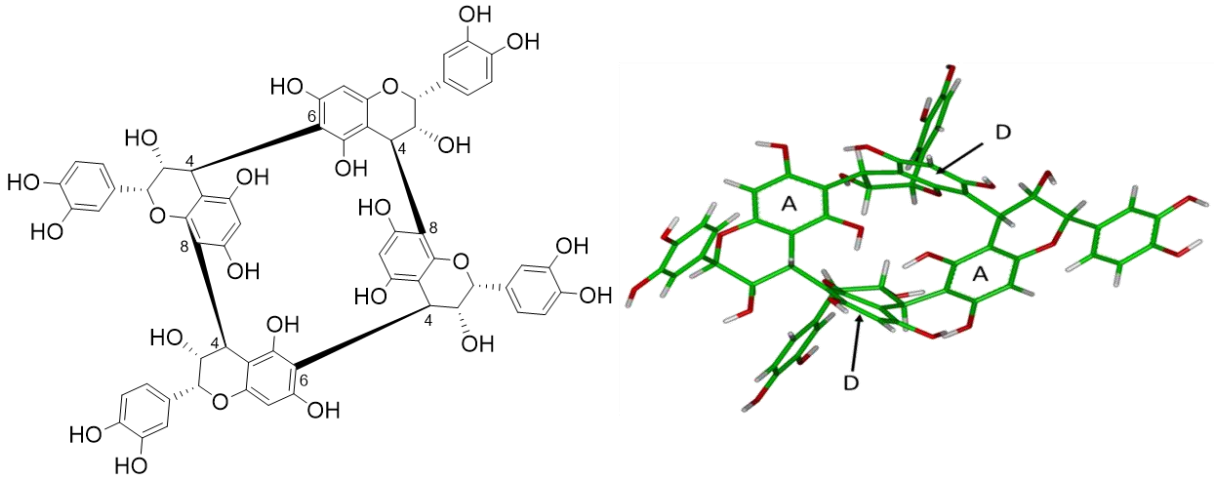


Figure 110 : Structure et conformation du tétramère couronne

Une première stratégie de synthèse par polymérisation non contrôlée a été testée pour obtenir le tétramère couronne. Cette stratégie a été de réaliser l'hémisynthèse des tanins couronnes avec la méthode utilisée par Victor De Freitas décrite dans sa thèse [66]. Il a développé l'hémisynthèse des procyanidines avec l'épicatéchine comme unité supérieure. Sa méthodologie était de péracétyler les hydroxyles présents sur les cycles benzoïques des monomères. Par la suite, il activait la position 4, afin de la rendre plus électrophile, en réalisant une bromation de cette position qui est ensuite suivie par une étape de condensation entre une épicatéchine péracétylée et bromée en position 4 et une épicatéchine péracétylée. Après une désacétylation, un mélange d'un grand nombre d'oligomères de procyanidines a été obtenu. De nombreux dimères et trimères ont alors été caractérisés à partir du mélange obtenu. Dans notre cas, le même protocole a été utilisé afin de pouvoir synthétiser le tétramère couronne parmi le grand nombre d'oligomères formés par cette méthode. Après avoir testé différents paramètres réactionnels, aucune formation du tétramère couronne n'a été détectée. Ce résultat est surement dû à la complexité de conformation du tétramère couronne. En effet, De Freitas a démontré qu'avec cette méthode la formation du dimère B5, épicatéchine-(4β→6)-épicatéchine (**Figure 111**), était obtenu avec des rendements très faibles alors que notre tétramère couronne doit posséder une alternance des liaisons (4β→6) et (4β→8).

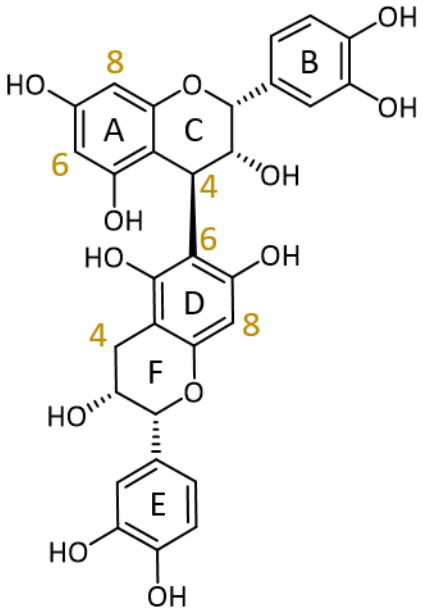


Figure 111 : Structure et conformation du dimère B5

Ainsi, au vu de ces premiers tests réalisés, une toute nouvelle stratégie multi-étape a été adoptée. Grâce à la structure du tétramètre couronne, la rétro synthèse ci-dessous a été postulée comme voie de synthèse permettant l'obtention du tétramère couronne (**Figure 112**).

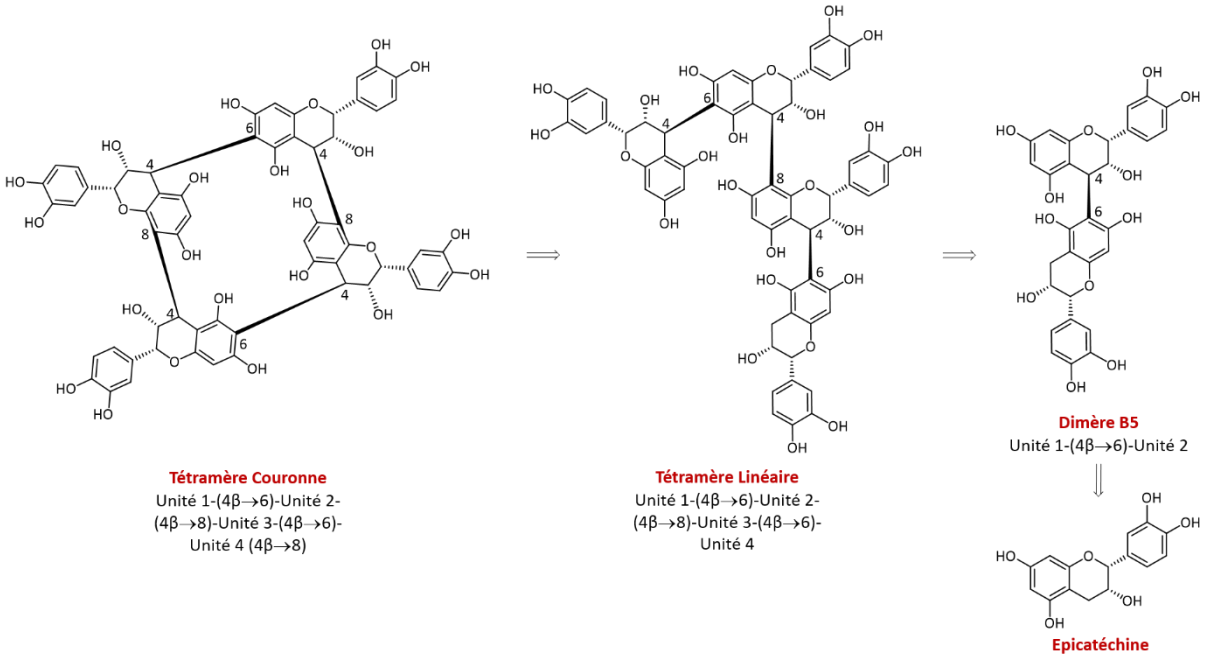


Figure 112 : Rétro synthèse du tétramère couronne

Cette rétro synthèse permet de mettre en avant les grandes étapes nécessaires à l'aboutissement de la synthèse. Elle est composée par les quatre molécules principales : le tétramère couronne, notre objectif, un tétramère linéaire et un dimère B5 qui sont tous les deux des

intermédiaires importants dans le cheminement de la synthèse, et la molécule de départ, l'épicatéchine. En effet, il a été décidé de construire les liaisons C4-C8 en dernier, car ce sont les liaisons interflavanes les plus faciles à faire. Donc en partant du tétramère couronne dans sa structure de base cyclique, et pour réaliser la cyclisation, un tétramère linéaire de conformation Unité 1 - (4β→6) - Unité 2 - (4β→8) - Unité 3 - (4β→6) - Unité 4 devra être obtenu. Ce tétramère linéaire pouvant être réalisé en partant du dimère B5 Unité 1 - (4β→6) - Unité 2. La synthèse de ce dimère est une étape clé dans la synthèse totale du tétramère couronne bien que celle-ci soit chimiquement plus compliquée à obtenir. En effet, la formation des liaisons (4β→6) n'est pas favorisée étant donné leurs encombrements stériques plus importants que pour les liaisons (4β→8) ainsi qu'au fait que le carbone C6 est moins nucléophile que le carbone C8. Dans notre stratégie, un double challenge devra être accompli : la formation du dimère B5 et celle du tétramère couronne. La formation du dimère B5 sera la première étape détaillée dans la suite de ce chapitre.

Bien que la synthèse du dimère B5 soit compliquée à synthétiser, ce dernier a quand même été choisi comme intermédiaire bien que dans la littérature la synthèse de son homologue, le dimère B2, existe sous différentes stratégies. Ce choix a son importance et est expliqué en suivant. Le tétramère couronne possède deux liaisons (4β→6) et deux liaisons (4β→8). Si la synthèse commence par un dimère B2 épicatéchine-(4β→6)-épicatéchine, la formation du tétramère par une dimérisation de dimères pour former alors une liaison (4β→6) sera d'autant plus compliquée que cette dernière n'est pas majoritaire. De plus, par la suite, la cyclisation devra alors être réalisée avec une nouvelle fois la liaison (4β→6). Si une stratégie comme celle-là était utilisée, le rendement final de la synthèse serait en prime très faible.

Dans la littérature, un grand nombre d'équipes de recherche ont réalisé des synthèses organiques sur les tanins [210,241]. La plupart de ces travaux utilisent la catéchine comme unité monomérique de base. En se basant sur ces travaux de recherche dont surtout ceux de Tuckmantel *et al*. [262] et de l'équipe de Suzuki [234,242], une voie de synthèse pour la formation du dimère B5 a été développée. La particularité de cette stratégie est qu'elle joue sur une alternance de protection et déprotection des phénols afin de former la liaison (4β→6).

B. Description de la voie de synthèse pour obtenir le dimère B5

La voie de synthèse utilisée pour obtenir le dimère B5 s'appuie sur les travaux de Tuckmantel *et al*. [262]. Par la suite, la synthèse, la purification et les analyses seront décrites pour chaque intermédiaire réactionnel.

a. Benzylation de l'épicatéchine

La première étape de la synthèse a été la protection des phénols par un groupement protecteur de type benzyle. Dans la littérature, un grand nombre de groupements protecteurs existe [263]. Les groupements benzyles ont ainsi été choisis pour leur facilité de déprotection en condition neutre, condition douce permettant de préserver les liaisons formées et les autres fonctions des composés obtenus. L'inconvénient des benzyles est leur taille puisqu'ils peuvent induire un encombrement stérique. La réaction de benzylation a été réalisée par substitution nucléophile en présence d'épicatéchine, de bromo-benzyle et de sel K_2CO_3 (**Figure 113**). Dans nos conditions de réaction, l'alcool en position 3 du cycle C n'a pas été benzylé, cela est dû au fait que la base utilisée est une base faible et que le pKa de l'alcool est plus élevé que le pKa des hydroxyles présents sur les phénols. La non-benzylation de cet alcool est souhaitée pour ne pas encombrer plus la molécule sachant que dans les étapes suivantes, l'addition d'une unité épicatéchine en position C-4 est envisagée.

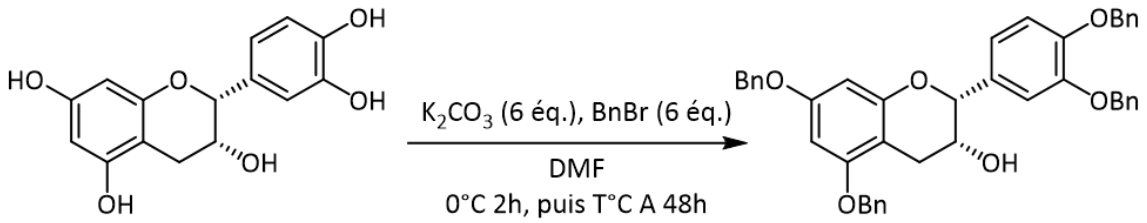


Figure 113 : Benzylation de l'épicatéchine

Le temps de réaction est assez long, mais celui-ci permet d'obtenir un très bon rendement qui est de 82 %. Par la suite, le milieu réactionnel a été purifié sur une colonne de silice par chromatographie flash avec 100 % de dichlorométhane. Le suivi de la purification a été réalisé sur des plaques de Chromatographie sur Couche mince (CCM) en utilisant 100 % de dichlorométhane. Après la purification, le produit a été évaporé afin d'obtenir une poudre blanche.

Afin de confirmer la structure de la molécule, le produit purifié a premièrement été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF avec une méthode d'injection directe. L'épicatéchine tétrabenzylée analysée en mode négatif possède une masse exacte calculée $[M-H]^-$ de m/z 649,2590 et la masse exacte mesurée était de m/z 649,2662 ce qui donne un δppm de 11,01 et confirme que la molécule a bien la formule brute $C_{43}H_{37}O_6$.

Enfin, la structure du produit de cette réaction a également été confirmée par RMN. Simplement, une analyse du proton a été réalisée, car la structure de l'épicatéchine tétrabenzylée a déjà été décrite dans la littérature. L'apparition des benzyles, sous la forme d'un gros massif, entre 7,28 et 7,45 ppm représentant les protons aromatiques des benzyles ainsi que les signaux des quatre CH_2 des benzyles entre 4,99 et 5,17 ppm confirme bien la présence des quatre benzyles implantés sur la structure de

l'épicatéchine. De plus, en comparaison avec l'épicatéchine de départ, le produit obtenu ne possède pas de modification importante des déplacements chimiques de la structure flavanol.

b. Fonctionnalisation et activation de la position 4 de l'épicatéchine benzylée avec un diol

Après avoir protégé les fonctions phénols de l'épicatéchine, l'objectif suivant était de fonctionnaliser le carbone C4 du cycle C. Dans la littérature, un grand nombre de réactions et de fonctionnalisations en vue de l'activation de cette position existe ainsi qu'un grand nombre de groupements d'activation. Dans la thèse de Fabre [264] et la publication de Tuckmantel *et al.* [262], ils utilisent de l'éthylène glycol comme groupement activateur tandis que Suzuki [234] utilise le 2-éthoxyétanol. Les deux groupements ont été testés, avec des rendements similaires, notre choix s'est alors penché sur l'éthylène glycol. Ainsi, la fonctionnalisation de la position C4 a été réalisée par l'oxydation de l'épicatéchine tétrabenzylée avec du 2,3 — Dichloro-5, 6-dicyano-1, 4-benzoquinone (DDQ) en présence d'éthylène glycol (**Figure 114**). L'utilisation du DDQ permet de contrôler la stéréochimie β de la liaison formée, par son approche par la face inférieure du cycle aromatique A [264].

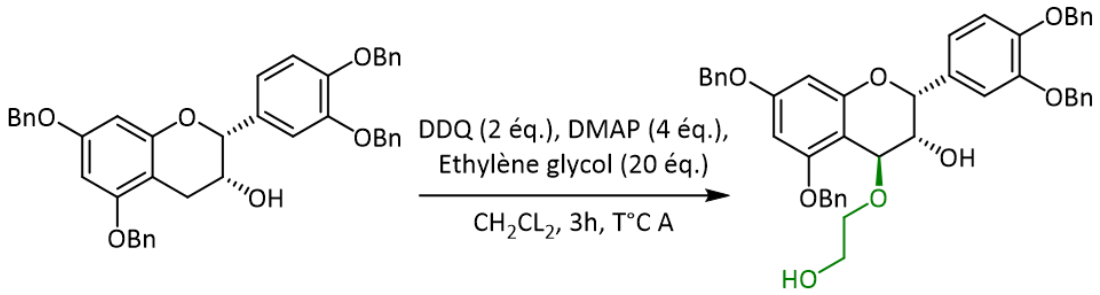


Figure 114 : Activation de la position 4 avec de l'éthylène glycol

La purification du produit a été réalisée par chromatographie flash sur silice en utilisant un mélange 50/50 (v/v) éther de pétrole/acétate d'éthyle. La purification a été suivie par CCM et après évaporation, une poudre blanche a été obtenue avec un rendement de 80 %. Afin de confirmer la structure de la molécule, le produit obtenu a été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF avec une méthode d'injection directe. L'épicatéchine tétrabenzylée activée en position 4 par un diol analysé en mode négatif possède une masse exacte calculée $[M-H]^-$ de m/z 709,2801 et la masse exacte mesurée était de m/z 709,2869 ce qui donne un δppm de 9,60, confirmant ainsi la formule brute $C_{45}H_{41}O_8$ pour la molécule obtenue.

La structure du produit de cette réaction a également été caractérisée RMN et comparée à l'aide de la littérature [264]. Ayant déjà identifié le spectre RMN du proton de l'épicatéchine benzylée, une comparaison de ce dernier avec la structure de l'épicatéchine benzylée fonctionnalisé avec un diol en

position 4 a été réalisée. En effet, l'ajout du diol en position 4 a conduit à l'élimination d'un des deux protons H4. Ainsi, le proton H4 se retrouve avec un déplacement chimique fortement déblindé puisque que celui-ci a augmenté de 1 ppm par rapport au CH_2 de l'épicatéchine benzylée. De plus, la présence entre 3,60 et 3,83 ppm des protons H9 et H10, correspondant aux CH_2 des diols, sont apparus et prouvent également la présence de ce nouveau groupement sur l'épicatéchine benzylée de départ.

c. Fonctionnalisation et activation de la position 4 de l'épicatéchine benzylée avec un phloroglucinol

Cette étape consiste à substituer le groupement fonctionnel qu'est l'éthylène glycol par un phloroglucinol. Ce produit est très proche de celui formé durant la réaction de dépolymérisation des tanins condensés par phloroglucinolyse [202,203]. Grâce à l'acidité de la réaction, les liaisons interflavanes sont coupées et le phloroglucinol peut ainsi venir s'additionner en bout de chaine suite à une attaque nucléophile. Durant nos différents travaux et analyses au laboratoire, il a été observé que la liaison flavanol-phloroglucinol était sensible à l'acidité et ainsi se coupait facilement. Il nous est alors apparu que la fonctionnalisation avec le phloroglucinol en position C4 sera une très bonne solution dans l'optique de fonctionnaliser la quatrième unité du tétramère linéaire juste avant la formation du tétramère couronne. De plus, cette cyclisation finale va probablement devoir se faire sans protection des fonctions phénols par les groupements benzyles puisque ces groupements, de par leur taille, vont induire un encombrement stérique et ainsi empêcher la cyclisation. Dans cette optique, le remplacement du groupement diol par un groupement phloroglucinol a donc été essayé sur unité flavanol seule. Dans la littérature, ce groupement avait déjà été utilisé pour d'autres synthèses organiques [14] - [16].

Dans notre cas, les réactifs utilisés étaient l'épicatéchine tétrabenzylée fonctionnalisée avec l'éthylène glycol en position 4, le phloroglucinol non-benzylé et un acide de Lewis, le tétrachlorure de titane ($TiCl_4$) (**Figure 115**). Cet acide a permis de conserver la stéréochimie de la liaison en β avec un rendement de la réaction de 45 %.

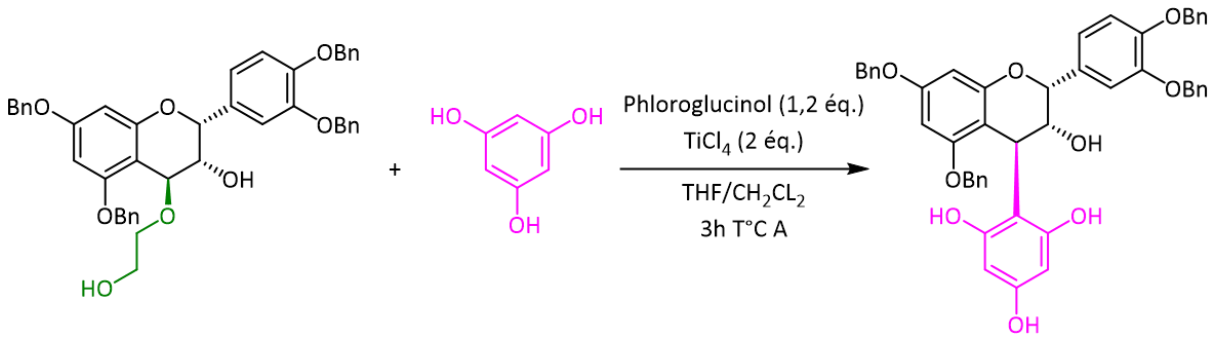


Figure 115 : Changement de groupement activateur avec du phloroglucinol

La purification du produit a été réalisée par chromatographie flash sur silice en utilisant un mélange 80/20 (v/v) pentane/acétate d'éthyle comme solvant. La purification a été suivie par CCM et après évaporation une poudre légèrement rose a été obtenue. Afin de confirmer la structure de la molécule, le produit obtenu a été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF. L'épicatéchine tétrabenzylée activée en position 4 par du phloroglucinol, analysée en mode négatif, possède une masse exacte calculée $[M-H]^-$ de m/z 775,2903, pour une masse exacte mesurée de m/z 775,296 7 soit un δppm de 8,25 confirmant la formule brute $C_{49}H_{43}O_9$.

Enfin, la structure du produit a également été caractérisée par RMN pour confirmer la structure de la molécule. L'identification de cette structure avec un nouveau groupement activateur phloroglucinol, toujours en position 4, a été réalisée en se basant sur l'analyse du spectre proton en comparaison avec la littérature [264]. Le but principal de l'analyse structurale ici est de confirmer que le substituant, le diol, en position 4 a bien été substitué par le nouveau groupement, le phloroglucinol. La comparaison du spectre proton obtenu avec les données de la littérature et avec le produit de départ montre que les seuls protons différents entre les deux spectres étaient les protons du diol H9 et H10 entre 3,60 et 3,83 ppm qui eux ont disparu et les deux protons aromatiques du cycle phloroglucinol qui sont apparus à 6,16 ppm comme attendu.

d. Débenzylation de l'épicatéchine phloroglucinol benzylée

Après avoir obtenu l'épicatéchine tétrabenzylée fonctionnalisée en position 4 par le phloroglucinol, une débenzylation de cette molécule a été réalisée. En effet, dans les synthèses chimiques, la débenzylation est souvent la dernière étape avant d'obtenir la molécule finale. Dans notre stratégie, la réalisation de la débenzylation permettra à ce stade de la synthèse de minimiser l'encombrement stérique produit par les benzyles afin que la position C6 du cycle A soit disponible. Le protocole de débenzylation utilisé est identique à celui déjà utilisé sur des composés proches dans la littérature [210]. Celui-ci utilise du palladium sur charbon [Pd $(OH)_2$/C] et de la triéthylamine. Le mélange des deux réactifs permet en général de débenzyler et si besoin de déshalogéner la molécule formée tout en évitant la dégradation du produit formé. Cette hydrogénolyse réalisée en conditions basiques permet d'empêcher la rupture de la liaison interflavane et ainsi la dépolymérisation (**Figure 116**). Le rendement de la débenzylation obtenu pour l'épicatéchine tétrabenzylée fonctionnalisé par le phloroglucinol est de 98 %.

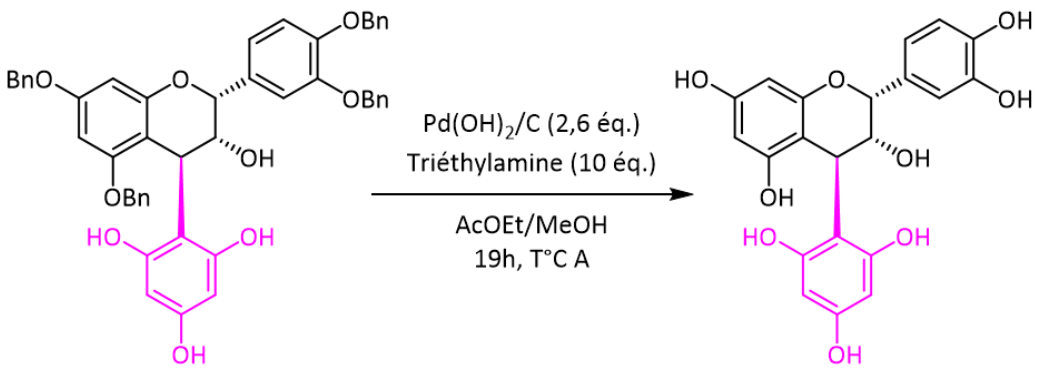


Figure 116 : Débenzylation de l'épicatéchine benzylée fonctionnalisée en position 4 par du phloroglucinol

Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel non purifié a été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF. La molécule étant débenzylée, cette fois-ci, la purification du produit a été développée sur une cartouche SPE C-18 en réalisant un gradient d'élution au méthanol. Trois mélanges de solvants ont été utilisés à 4 %, 8 % et 100 % de méthanol, la fraction avec notre produit étant la fraction éluée avec 4 %.

Afin de confirmer la structure du produit obtenu après la réaction de débenzylation, le produit obtenu a été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF. L'épicatéchine avec en position 4 le phloroglucinol analysée en mode négatif possède une masse exacte calculée $[M-H]^-$ de m/z 413,0895 et la masse exacte mesurée était de m/z 413,0872 pour un δppm de 5,56 et montre ainsi que la formule brute du composé obtenu est bien $C_{21}H_{17}O_9$.

La structure du produit de cette réaction a également été confirmée par RMN. Le spectre proton a notamment été comparé à la littérature et montre des signaux identiques [202]. De plus sur le spectre, il est très facile de noter l'absence des CH_2 des benzyles ainsi que de leurs protons aromatiques. La présence d'un multiplet entre 5,73 et 5,75 ppm montre que les deux protons du cycle phloroglucinol sont toujours bien présents. La débenzylation n'a ainsi pas altéré la liaison entre l'épicatéchine et le phloroglucinol. Les résultats de masse ainsi que de RMN confirment bien la structure de l'intermédiaire épicatéchine activée en position 4 par le phloroglucinol.

e. Couplage de deux unités en conditions douces

Dans notre stratégie, il a été décidé de synthétiser les dimères en conditions douces juste en présence de nos réactifs non-benzylés dans une solution faible d'acide (2 %), l'acide permettant une rupture de la liaison avec le phloroglucinol pour former un carbocation en position C4 (**Figure 117**). Dans la littérature, des couplages d'unités non-benzylées ont déjà été étudiés avec succès [266,267]. Dans nos conditions, avec l'épicatéchine en fort excès, la synthèse d'un mélange des dimères B2 et B5 sans polymérisation avec un rendement global de la réaction de 60 % a été synthétisée.

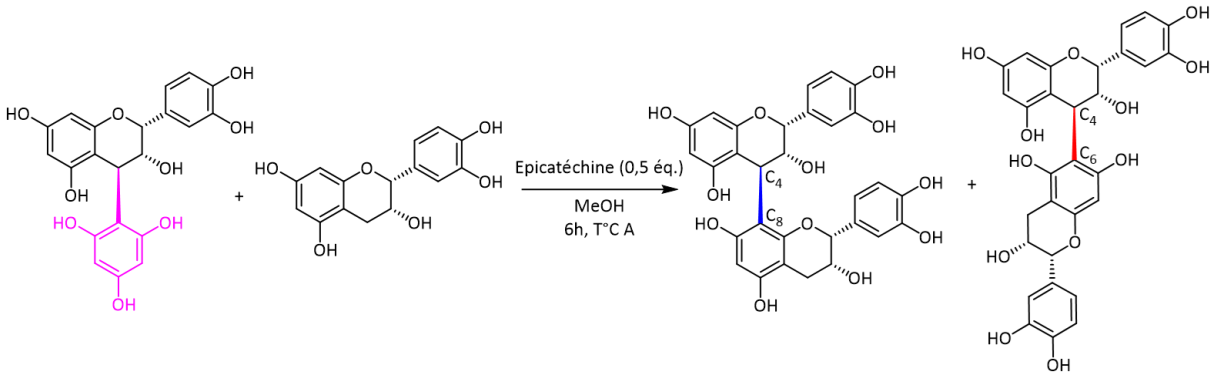


Figure 117 : Couplage de l'épicatéchine activée par le phloroglucinol avec l'épicatéchine

En effet, après vérification en UV et en spectrométrie de masse, trois pics majoritaires apparaissent : l'épicatéchine, qui était l'un des réactifs en fort excès, le dimère B2, dimère ayant une liaison 4β→8 et le dimère B5, dimère ayant une liaison 4β→6 (**Figure 118**). Le ratio entre les deux dimères était de 75 % pour le dimère B2 et de 25 % pour le dimère B5, la liaison 4β→8 étant toujours majoritaire. Ce ratio résultant de l'attaque nucléophile du carbone 8 et du carbone 6 sur un carbocation benzylique n'est pas surprenant puisqu'il a déjà été rapporté dans la littérature lors de l'hémisynthèse des flavano-ellagitanins [50]. La purification des deux produits de synthèse, les dimères B2 et B5, a été développée sur une cartouche SPE C 18 en utilisant le gradient d'élution avec du méthanol. Une série de solvants d'élution possédant des pourcentages croissants allant de 10 % à 100 % de méthanol a été créée afin de séparer les dimères B2 et B5. Les fractions d'intérêt étaient la fraction à 20 % pour obtenir le B2 pur et 30 % pour obtenir le dimère B5 pur.

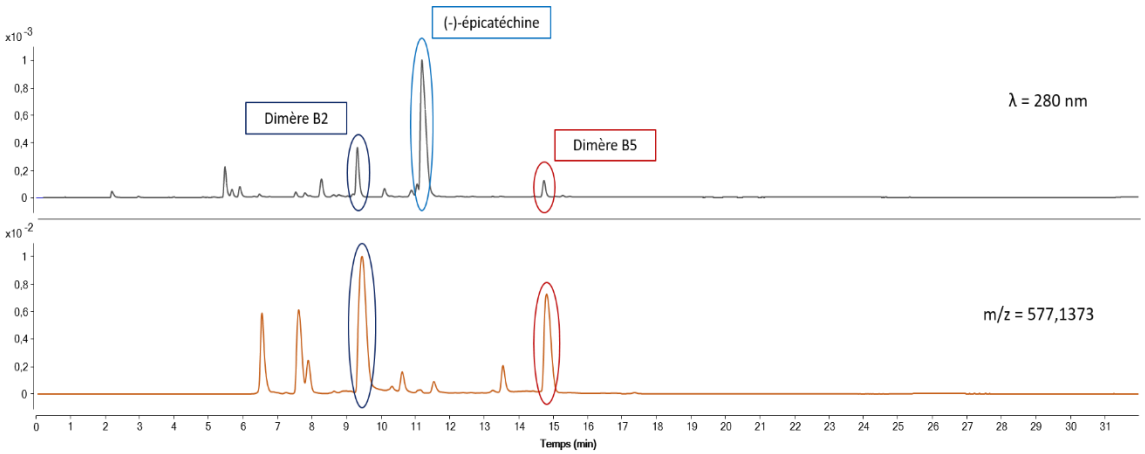


Figure 118 : Chromatogramme UV et de masse exacte m/z 577,1373 de la réaction de couplage entre l'épicatéchine activée par du phloroglucinol et de l'épicatéchine seule.

Afin de confirmer la structure de la molécule, les produits obtenus ont été injectés en UPLC-UV-ESI-QTOF. Les dimères B2 et B5 analysés en mode négatif possèdent une masse exacte calculée $[M-H]^-$ de m/z 577,1346. La masse exacte mesurée pour le dimère B2 était de m/z 577,1364 pour un δ ppm de 3,11 et de m/z 577,1373 pour le dimère B5 avec un δ ppm de 4,68 ce qui confirme que les deux composés ont bien la même formule brute $C_{30}H_{25}O_{12}$. En plus, les composés étant des produits commerciaux, leur identification a été confirmée par comparaison de leur temps de rétention et de leur masse avec les standards commerciaux.

Enfin, la structure des deux produits de réaction a également été confirmée par RMN. Les spectres protons, carbones, HMBC et HMQC ont été analysés pour chacun des deux dimères. Les spectres RMN obtenus sont cohérents avec les données spectrales déjà publiées. L'élément clé, permettant de différencier ces deux isomères, est la confirmation de la liaison interflavane reliant les deux unités entre elles, étant soit une liaison entre le carbone 4 et le carbone 8 pour le dimère B2 ou une liaison entre le carbone 4 et le carbone 6 pour le dimère B5. Seule l'analyse des corrélations en HMBC permet de faire cette différence. En effet, dans le cas du dimère B2, ce sont les corrélations du proton H4C (4,53 ppm) avec les carbones C8D, C7D et C8aD qui confirment la liaison carbone-carbone C4-C8. Le proton H4C étant lui confirmé par ces corrélations avec les carbones C3C et C2C de l'unité supérieure. Dans le cas du dimère B5, ce sont les corrélations du proton H4C (4,62 ppm) avec les carbones C6D, C5D et C8D qui confirment la liaison carbone-carbone C4-C6. Le proton H4C étant lui confirmé par ses corrélations avec les carbones C2C, C3C, C4aA et C8aA de l'unité supérieure. L'ensemble de ces analyses montre bien que dans nos conditions opératoires une liaison interflavane a été formée même si ces conditions expérimentales ne permettent pas le contrôle régio sélectif de l'attaque nucléophile.

C. Formation du dimère B5 sans protection et régiosélectif

Afin d'être plus sélectif et d'obtenir seulement le dimère B5, une voie alternative de synthèse a été développée. Celle-ci consiste à bloquer la position C8 du cycle A avec un halogène, ici un brome, afin d'obtenir uniquement le dimère B5 bromé. Tout le processus de synthèse de départ reste exactement le même que décrit plus haut, il y aura seulement l'étape de couplage qui change.

a. L'épicatéchine bromée en position 8

Dans notre stratégie alternative, l'unité nucléophile a été bromée en position 8 afin de pouvoir bloquer cette position et de rendre la position C6 comme étant le seul carbone nucléophile et donc pouvant attaquer le futur carbocation en C4. Dans la littérature, un grand nombre d'équipes utilise des halogènes comment groupement de protection pour bloquer les positions C6 ou C8 [210,241]. L'équipe de Suzuki a même fait une étude comparative afin de déterminer les meilleurs groupements

halogènes en fonction de leurs réactivités [234]. La réaction est une substitution nucléophile entrainant ainsi une protection de la position 8 par un brome avec comme réactif le N-bromosuccinimide (NBS) qui a été recristallisé juste avant la réaction (**Figure 119**). Le rendement de cette bromation régosélective a été de 78 %.

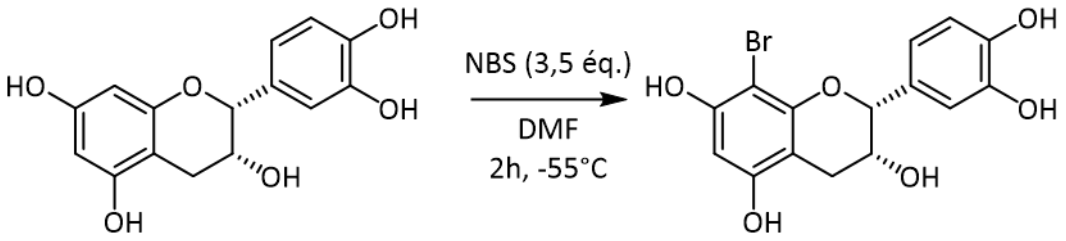


Figure 119 : Bromation de l'épicatéchine en position 8

Avant la purification, le milieu réactionnel a directement été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF et sur le chromatogramme sont apparus seulement trois pics (**Figure 120**). Le premier correspondait au produit de départ, l'épicatéchine, le second à une épicatéchine monobromée et le dernier à une épicatéchine dibromée. La purification des produits a été réalisée sur une cartouche SPE C18 en utilisant un gradient d'élution au méthanol. Une série de solvants possédant des pourcentages croissants allant de 10 % à 100 % de méthanol a été créée afin de séparer les trois composés présents dans notre milieu réactionnel. Les fractions d'intérêt étaient la fraction à 30 % pour obtenir le monobromé pur. À ce stade de cette étape de synthèse, la position du brome sur le carbone 8 ou le carbone 6 est encore inconnue. Cependant les analyses RMN montrent bien l'absence de proton en position 8 confirmant ainsi la position du brome sur l'unité flavanol.

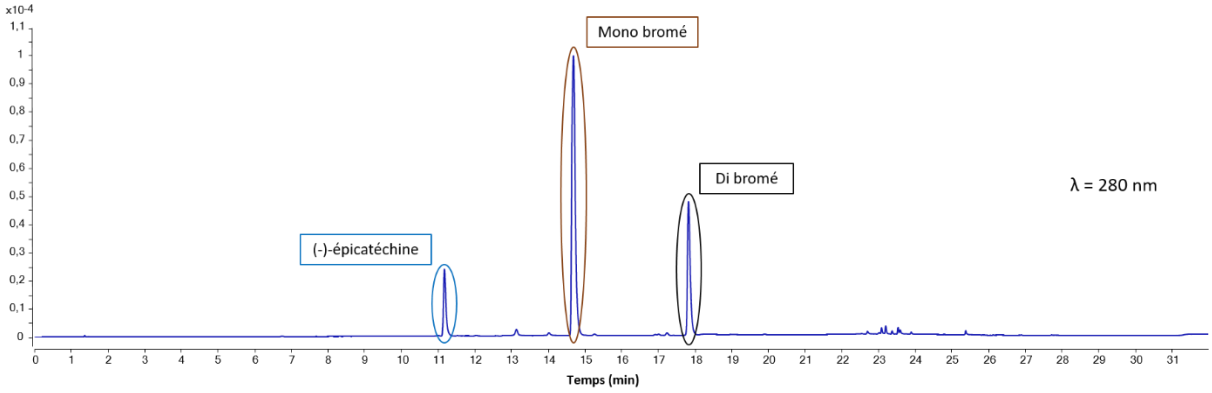


Figure 120 : Chromatogramme UV du milieu réactionnel de la bromation de l'épicatéchine

Afin de confirmer la structure de la molécule, le produit monobromé a été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF. L'épicatéchine bromée analysée en mode négatif possède une masse exacte calculée $[M-H]^-$ de m/z 367,9895 pour une masse exacte mesurée de m/z 367,9912 ce qui représente un δ ppm de 9

confirmant la formule brute $C_{15}H_{13}O_6Br$. De plus, la présence d'un seul atome de brome sur la molécule est également confirmée par la présence d'un ion à $[M-H+2]^-$ de même intensité que l'ion moléculaire à $[M-H]^-$.

Enfin, la position du brome sur la structure a été confirmée par RMN. Les spectres protons de l'épicatéchine et de l'épicatéchine bromée ont ainsi été comparés. La présence d'un singulet intégrant pour un seul proton dans la zone des protons H6 et H8 montre bien qu'un des deux protons du cycle A a été substitué. Il faudra attendre les informations des HMBC et HMQC pour pouvoir confirmer que le proton perdu était bien en position H8. En effet, le proton restant sur le cycle A montrait une corrélation avec le carbone C5 et C4aA.

b. Formation de la liaison interflavane avec une unité bromée

Le couplage a été mené dans les mêmes conditions que le couplage décrit précédemment, à la différence que l'unité inférieure était bromée en position C8 (**Figure 121**). En effet, sous l'action de l'acide, la liaison avec le phloroglucinol sera rompue et un carbocation se formera alors en position C4 du cycle C. L'unité inférieure nucléophile viendra alors se coupler par une substitution nucléophile à ce carbocation électrophile et ayant déjà bloqué la position C8, l'attaque ne pourra s'effectuer que par le carbone C6, habituellement la position minoritaire. Le rendement de cette réaction de couplage a été de 52 %.

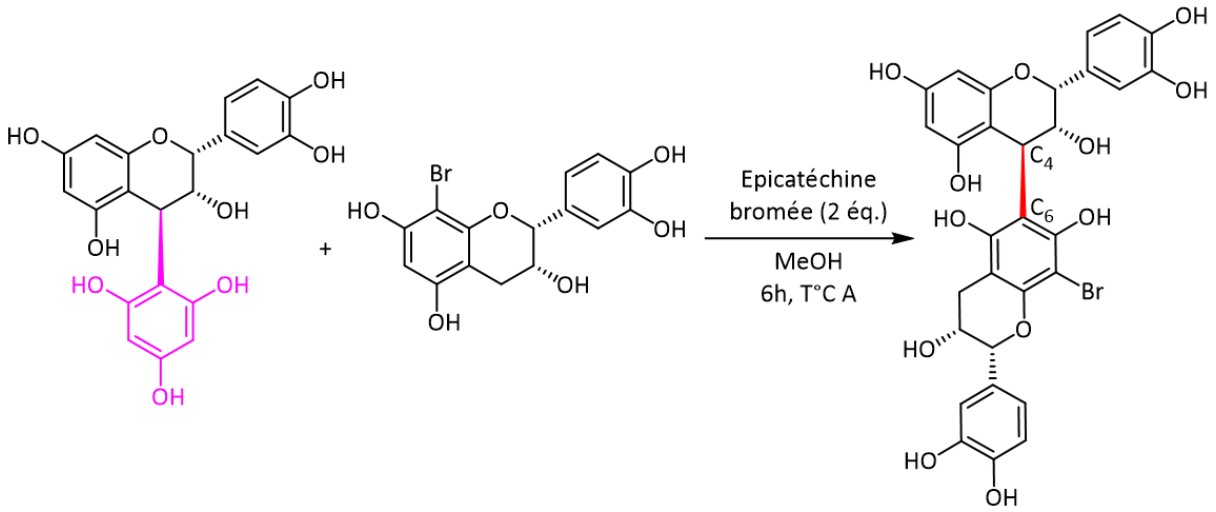


Figure 121 : Couplage de l'épicatéchine activée en position 4 par le phloroglucinol et de l'épicatéchine bromée en position 8

L'injection en UPLC-UV-ESI-QTOF a montré la présence d'épicatéchine monobromé comme attendu, puisqu'elle a été ajoutée en fort excès, mais également d'épicatéchine seule provenant

probablement de la décomposition de l'épicatéchine-phloroglucinol. La formation de l'épicatéchine a induit malheureusement la formation d'oligomères non souhaités.

Cependant, au vu du pic formé à 17 min sur le chromatogramme UV un unique dimère bromé a été obtenu pouvant correspondre à un dimère B5 bromé.

La purification du dimère B5 bromé a été réalisée sur une cartouche SPE C18 en construisant un gradient d'élution avec du méthanol. Une série de solvants possédant des pourcentages croissants allant de 10 % à 100 % de méthanol a été utilisée. Les fractions d'intérêt étaient la fraction à 30 % permettant d'obtenir notre dimère B5 bromé pur. Afin de confirmer la structure de la molécule, le milieu réactionnel a été injecté en UPLC-UV-ESI-QTOF. Le dimère B5 bromé devrait en mode négatif avoir une masse exacte calculée $[M-H]^-$ de m/z 656,0529 ce qui correspond à la masse exacte mesurée pour notre composé formé qui est de 656,0513 soit un δppm de 2,43 ce qui confirme la formule brute $C_{30}H_{25}O_{12}Br$. De plus, la présence d'un ion à $[M-H+2]^-$ de même intensité que l'ion moléculaire à $[M-H]^-$ confirme bien la présence un seul atone de brome sur la molécule.

Enfin, le dimère monobromé issu de cette réaction a été caractérisé par RMN pour confirmer sa structure. Afin de confirmer la structure de cette molécule, les spectres proton, carbone ainsi que les spectres 2D, HMBC et HMQC, ont été analysés. La structure n'étant pas décrite dans la littérature, les spectres du dimère B5 bromé ont ainsi été comparés aux spectres du dimère B5, décrits plus haut dans le texte. Dans le cas du dimère B5 décrit plus haut, la liaison C4-C6 est confirmée par les corrélations du proton H4C (4,60 ppm) avec les carbones C6D, C5D et C8D. Le proton H4C étant lui confirmé par ces corrélations avec les carbones C2C, C3C, C4aA et C8aA de l'unité supérieure. De plus, en comparaison au dimère B5, l'absence de proton H8D confirme bien que le brome est bien resté sur le carbone 8 comme il l'était sur la structure au début de la réaction.

D. Suite de la synthèse après la formation du dimère B5

La synthèse montrée précédemment permet d'obtenir un dimère B5, bromé ou non, dont les fonctions phénols sont non protégées. Malheureusement, la synthèse n'a pas pu être terminée bien que la suite de la synthèse soit déjà fixée. Ainsi, dans la partie qui suit, la présentation de la suite de la stratégie de synthèse ainsi que des limites rencontrées après la synthèse du dimère B5 seront abordées. Les mêmes stratégies que précédemment ont été utilisées et plus précisément l'activation avec le phloroglucinol et le jeu de benzylation/débenzylation permettant de pallier à l'encombrement stérique.

Tout d'abord, le dimère B5 devra être rebenzylé pour conduire à la formation des deux unités de départ pour obtenir le tétramère linéaire avant cyclisation. Après rebenzylation la position C4 de l'unité

inférieure sera fonctionnalisée avec du phloroglucinol. Par la suite, un couplage entre le dimère B5 benzylé activé en position C4 avec du phloroglucinol et un dimère B5 benzylé sera synthétisé. La liaison (4β→8) étant toujours majoritairement formée, un tétramère linéaire de type Unité 1-(4β→6)-Unité 2-(4β→8)-Unité 3-(4β→6)-Unité 4 sera obtenu (**Figure 122**). Une autre possibilité pour arriver au tétramère linéaire serait la stratégie de couplage utilisée dans les travaux menés par Suzuki et son équipe [242]. En effet, à la suite d'un enchainement de dimérisation du dimère, cette équipe a obtenu de nombreux oligomères allant jusqu'à une taille de 22 unités. La liaison formée dans leur cas entre les unités flavanols est toujours une liaison C4-C8 comme nous souhaitons faire à cette étape.

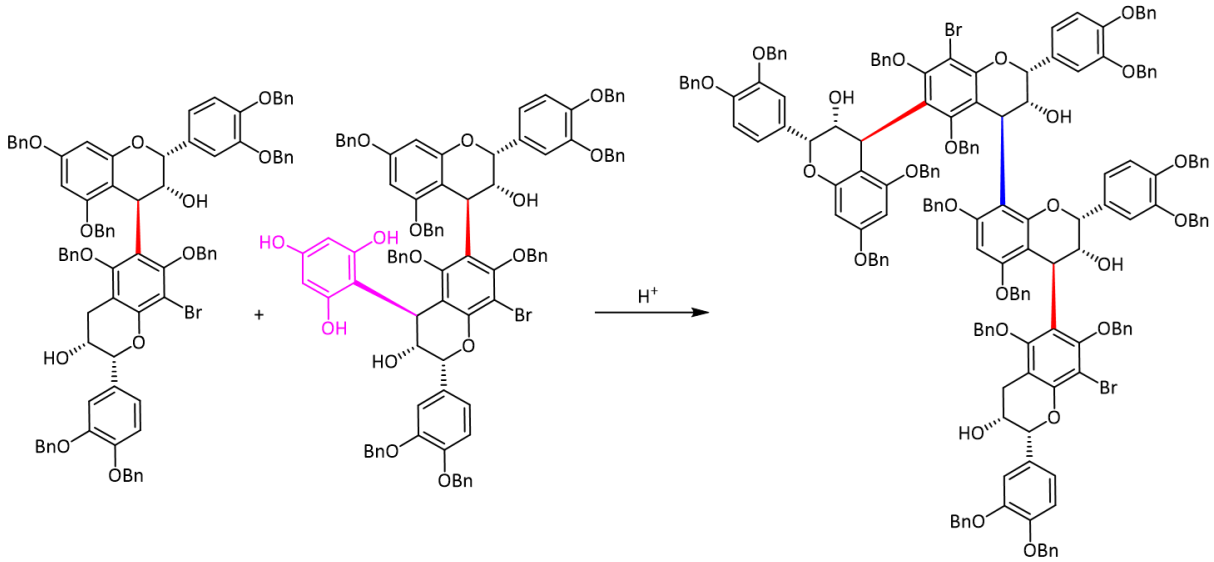


Figure 122 : Dimérisation du dimère B5

Enfin, après avoir obtenu notre tétramère possédant son enchainement de liaison bien particulier et indispensable à la formation des tanins couronnes, la dernière étape sera réalisée. Il s'agira de l'étape de cyclisation intramoléculaire de la molécule (**Figure 123**). Pour cela, le tétramère sera activé avec du phloroglucinol en position C4 du cycle C de l'unité terminale. Ce n'est qu'ensuite que ce même tétramère devra être totalement débenzylé. En effet, l'encombrement des benzyles sera un frein à la cyclisation. En condition légèrement acide identique à celle de la dimérisation qui a été validée plus haut, la liaison avec le phloroglucinol se brisera pour donner place à un carbocation qui grâce à l'enchainement de structure du tétramère très spécifique devrait s'auto cycliser. Cette étape peut paraitre la plus dure et celle qui risque d'induire le plus de problèmes expérimentaux à résoudre. Cependant c'est en fait probablement la plus simple à réaliser puisque sa faisabilité a déjà été montrée. En effet, Zeng [20] durant à thèse a montré qu'en plaçant une fraction d'oligomère de haut degré de polymérisation (supérieur à 4) en milieu acide concentré, il y avait la formation du tétramère couronne. Cette formation montre que dès lors que l'on a l'enchainement des liaisons C4-C8 et C4-C6 et que l'on

forme un carbocation sur la quatrième unité, il va y avoir cyclisation pour former le tétramère couronne.

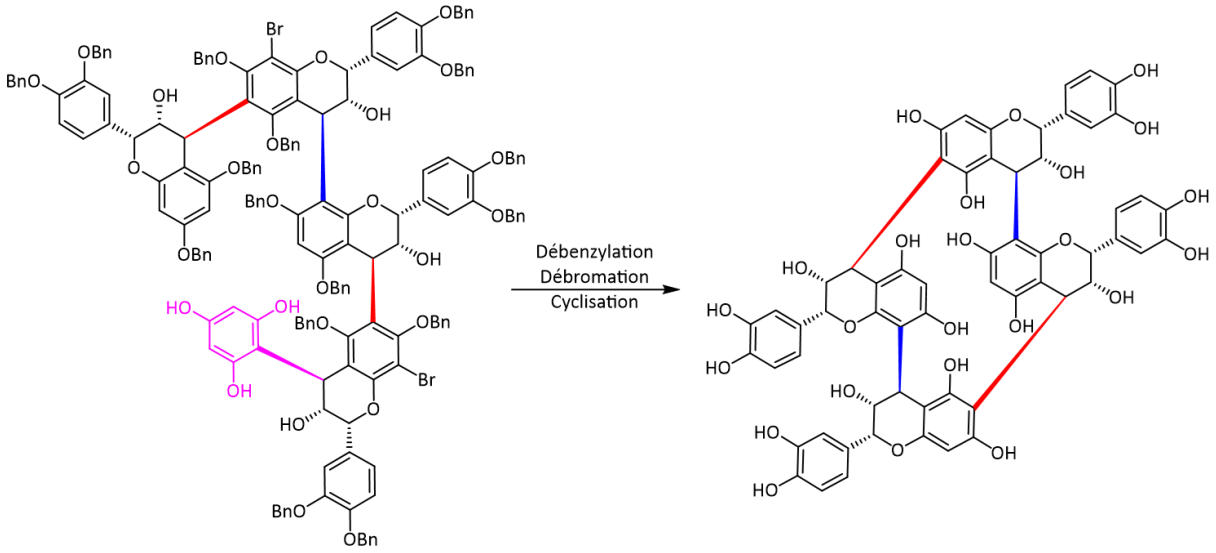


Figure 123 : Cyclisation du tétramère linéaire en tétramère couronne

Ces dernières étapes restent à mettre en œuvre et leur mise en pratique nous montrera si cette stratégie est payante. En effet, la dernière étape validée est la synthèse du dimère B5 qui était un de nos premiers objectifs avant la synthèse totale du tétramère couronne.

En effet, la benzylation directe à partir du dimère B5 non-benzylé s'est révélée chimiquement impossible. Le dimère devant posséder un total de 8 benzyles n'a finalement été benzylé que par 7 benzyles rendant la molécule inefficace pour les étapes suivantes. Cette benzylation non complète du dimère est due à l'encombrement stérique des benzyles surtout entre le cycle A de l'unité supérieure et le cycle D de l'unité inférieure. Nous nous sommes penchés vers la stratégie décrite par Suzuki et son équipe [234], et ainsi la synthèse du dimère B5 totalement benzylé est en cours.

III. Conclusions

En conclusion de cette partie, la purification des pentamères couronnes a été réalisée à partir du vin rouge. Une méthode de purification a été développée en utilisant un enchainement de techniques qui sont le passage du vin sur SPE C-18 suivie par un passage sur colonne TSK-40S pour enfin finir par une collecte des composés d'intérêt en HPLC-semi préparative. La structure des pentamères est en cours d'analyse par spectrométrie RMN.

La synthèse du tétramère couronne a été développée par une approche de synthèse organique multi-étape. Les intermédiaires réactionnels principaux étaient la réalisation du tétramère non cyclique de type Unité 1-(4β→6)-Unité 2-(4β→8)-Unité 3-(4β→6)-Unité 4 et la réalisation du dimère B5. À ce jour, la synthèse du dimère B5 a été un succès bien que la synthèse totale du tétramère couronne ne soit pas terminée. Cette synthèse permettra d'obtenir des quantités de tétramère couronne suffisante pour réaliser d'autres analyses telles que des analyses sensorielles de ces molécules cycliques ou encore des analyses de complexation entre la cavité des tanins couronnes et d'autres molécules présentes dans la matrice du vin rouge.

Conclusion

L'objectif de cette étude était de mettre en lumière la nouvelle classe de tanins condensés appelée les tanins couronnes. Le but était d'étudier l'évolution et l'impact de cette nouvelle sous-famille dans la vigne et par la suite dans le vin. Ces nouvelles molécules, possédant une structure cyclique avec une cavité assez importante au centre, ont été découvertes dans le vin rouge par Liming Zeng durant sa thèse [20]. Certaines propriétés de ces composés ont ainsi été déterminées comme leurs résistances à la phloroglucinolyse, leurs polarités plus élevées que les tanins non cycliques ou encore leurs activités neuro protectrices.

Dans ce travail de thèse, la localisation spécifique des tanins couronnes dans les différentes parties de la vigne, ainsi que leurs accumulations en fonction des cépages ont été étudiées. Ces résultats ont été enrichis par l'étude de l'évolution des tanins couronnes durant la vinification et le vieillissement en bouteille, ainsi l'étude de leur réactivité dans la matrice vin. En parallèle, une étude sur l'évolution des pigments polymérisés durant le vieillissement des vins en bouteille a été réalisée. Enfin, la famille des tanins ayant des liaisons de type A a fait l'objet d'une étude plus approfondie afin de déterminer leurs propriétés organoleptiques dans les vins rouges.

Pour commencer, les tanins couronnes ayant été découverts dans le vin rouge, leur localisation dans le raisin a fait l'objet de nos premières recherches. Étonnamment, malgré leurs structures composées uniquement d'épicatéchine, ceux-ci sont présents uniquement dans la pellicule de la baie de raisin. Une méthode d'extraction de la totalité des tanins couronnes présents dans les pellicules des baies de raisin a ainsi été développée et validée. Ainsi, par la suite, la concentration en tanins couronnes en fonction des cépages a été analysée et quantifiée sur trois millésimes différents. Cette étude a permis de mettre en avant un effet phénotypique sur la concentration en tanins couronnes pour les différents cépages, les cépages blancs étant les moins concentrés et les cépages dits « teinturier », les plus concentrés. L'effet millésime et la différence de type de sol, présents sur la région bordelaise, ont également un impact non négligeable sur la concentration en tanins couronnes accumulées dans la baie de raisin. Les vins correspondants aux cépages analysés ont également fait partie de l'étude prouvant ainsi l'effet phénotypique des différentes variétés et l'effet du millésime. En parallèle, une étude sur l'évolution des tanins couronnes durant la maturation du raisin a été mise en évidence. Il apparait que ces procyanidines couronnes s'accumulent tout au long de la maturation du raisin et les concentrations sont déjà très importantes au stade de la véraison. Enfin, l'étude sur la localisation des tanins couronnes dans la vigne, mais également dans d'autres végétaux riches en polyphénols a été élargie. Dans la vigne, ces nouvelles molécules cycliques ont ainsi été localisées dans les feuilles, les rameaux et les racines de vigne. Cette sous-famille de composés cycliques a également été localisée dans les pommes de la variété Grany Smith.

Après avoir étudié les tanins couronnes dans la vigne, les recherches se sont naturellement dirigées vers les vins. L'étude a porté sur l'extraction et l'évolution des tanins couronnes durant la vinification et vieillissement en bouteille. Durant le processus de vinification et en particulier durant la fermentation alcoolique, les tanins couronnes sont extraits en début de celle-ci, comme les anthocyanes, mais à l'inverse des tanins condensés non cycliques, cela montrant ainsi qu'ils sont plus hydrosolubles que les tanins non cycliques. L'étude s'est poursuivie sur l'intégralité de la vinification allant de l'encuvage jusqu'au début de l'élevage montrant ainsi que les tanins couronnes, après extraction, restent stables tout au long de la fin du processus de fabrication du vin. Par la suite, l'évolution des tanins couronnes a été étudiée durant le vieillissement en bouteille. Les résultats ont montré que la concentration en tanins couronnes était stable dans le temps. Ainsi, une étude basée sur la saturation des vins en oxygène a prouvé que ces nouvelles molécules cycliques sont bien résistantes à l'oxydation. Après ces observations, certains paramètres d'extraction des polyphénols durant la vinification ont été testés montrant ainsi qu'en fonction des techniques de vinification utilisées, la concentration en tanins couronnes est impactée. Ces analyses prouvent que les tanins couronnes sont une classe de tanins condensés avec des propriétés physicochimiques complètement différentes des tanins condensés non cycliques.

En parallèle, plusieurs autres travaux ont été menés toujours dans le but d'approfondir les connaissances sur les tanins couronnes. La purification du pentamère couronne majoritaire a été réalisée afin de confirmer la structure cyclique de celui-ci. Une méthode a été développée avec l'utilisation de cartouche SPE C18, d'une colonne TSK et enfin une double purification en HPLC-semi préparative. Une étude de fragmentation en MS-MS a mis évidence des fragments spécifiques des tanins ayant une liaison de type A permettant de différencier le tétramère couronne, des tétramères ayant une liaison de type A, ces deux molécules ayant une formule brute et une masse exacte identique. Ces fragments spécifiques des tanins ayant une liaison de type A, permettront ainsi l'assignation et l'identification plus rapide des nouveaux tanins couronnes en levant toute ambigüité possible avec les tanins ayant une liaison de type A. La synthèse chimique multi-étape du tétramère a également été entreprise, celle-ci permettant d'obtenir les tanins couronnes en grande quantité. Cette synthèse possède deux étapes cruciales qui sont l'obtention du dimère B5 (4β-6), jamais réalisé en synthèse organique multi-étape et l'obtention du tétramère couronne. Actuellement, le premier objectif a été rempli, le dimère B5 a été obtenu de façon régiosélective, la suite de la synthèse devant être développée. Enfin, pour finir sur l'étude sur ces tanins couronnes, une analyse sensorielle a été mise en place afin de confirmer, ou non, les conclusions sur la potentielle corrélation entre l'intensité d'astringence et le tétramère couronne. À la suite de ces analyses, aucune corrélation n'a été démontrée, remettant en cause les premiers résultats obtenus.

Ensuite, une petite étude sur les pigments polymérisés a été réalisée. Les grandes familles des pigments polymérisés ont ainsi été analysées et quantifiées afin de déterminer leurs évolutions durant le vieillissement et de trouver les déterminants moléculaires pouvant expliquer la couleur perçue. Les marqueurs spécifiques de chaque famille obtenus par phloroglucinolyse ont ainsi été utilisés. Les principales familles étaient : les formes A^+-T et T-A^+, les pigments polymérisés liés par une liaison éthylidène, les pyranoanthocyanes et les pigments polymérisés ayant une liaison de type A. Il a ainsi été confirmé que certaines formes de liaisons telles que les liaisons de type A ou les formes pyranoanthocyanes sont résistantes à l'oxydation et donc restent stables dans le temps. L'inverse a été observé pour les liaisons éthylidènes et les formes A^+-T qui elles diminuent au cours du temps se transformant par la suite en d'autres composés possédant des liaisons plus stables. Toutes ces formes participent ainsi à l'évolution de la couleur des vins rouges même si les variations de concentration ne permettent pas nécessairement d'expliquer les variations de couleur du vin en fonction des millésimes.

Une attention particulière a été portée à la famille des tanins possédant une liaison de type A. Actuellement, les seules études réalisées sur cette famille concernent leurs origines ainsi que leurs mécanismes de formation. Nous avons voulu pousser l'étude plus loin en mettant en évidence leurs impacts organoleptiques dans les vins rouges. Pour cela, l'hémisynthèse de ces composés a été le premier objectif, une optimisation de la méthode a ainsi été effectuée en testant les différents paramètres réactionnels. Par la suite, une recherche sur le marqueur spécifique de cette famille a été entreprise, mettant ainsi en lumière que les liaisons de type A formées sont régiospécifiques, ne se formant ainsi jamais en fin de chaine. Enfin, des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de déterminer les propriétés sensorielles ces tanins. La première partie *in vitro* consistait à évaluer les interactions tanins-protéines par turbidimétrie en les comparant avec la famille des tanins ayant uniquement des liaisons de type B. En parallèle, des analyses sensorielles *in vivo* ont été réalisées et tous les résultats tendent à décrire que les tanins ayant une liaison de type A sont moins astringents que les tanins ayant uniquement des liaisons de type B, de mêmes degrés de polymérisation.

Pour conclure, le principal objet de l'étude a été les nouveaux tanins condensés couronnes qui nous ont montrés des propriétés physicochimiques bien différentes des tanins non cycliques qu'ils soient présents dans la vigne ou dans le vin. Ces propriétés physicochimiques sont dues à leur conformation cyclique totalement unique conférant ainsi stabilité et robustesse aux molécules de cette famille. Ce travail a permis d'augmenter de façon très significative les connaissances sur les tanins couronnes et d'éclaircir un peu plus la composition polyphénolique des vins rouges.

Perspectives

Ce travail a permis d'ouvrir de nouveaux axes de recherche surtout sur la nouvelle famille de tanins condensés, les tanins couronnes.

Ces nouveaux tanins cycliques, composés uniquement d'unité épicatéchine, ont été localisés spécifiquement dans la pellicule de la baie de raisin. Au vues de leurs propriétés, plus polaire et plus hydrosoluble rendant ainsi leur extraction dans les vins plus rapides, les tanins couronnes sont ainsi très différents des tanins condensés non cycliques et se rapprochent plus des propriétés des anthocyanes. Deux hypothèses ont été induites. La première serait que les tanins couronnes possèdent une voie biosynthétique différente des tanins condensés classiques et que cette voie unique rendrait ainsi la molécule cyclique. La seconde hypothèse serait que les tanins couronnes possèdent la même voie de biosynthèse que les tanins non cycliques et seraient formés chimiquement ou enzymatiquement par dépolymérisation spécifique dans la pellicule de la baie de raisin. En poussant plus loin le résonnement, nous nous sommes demandé : pourquoi la plante synthétise ces molécules ? Et quelles sont leurs utilités ? En cherchant dans l'ensemble de la vigne, il a ainsi été découvert que ces tanins cycliques étaient présents dans les feuilles, dans les racines et dans les rameaux. La structure pentamérique couronne est majoritaire dans ces trois dernières parties de la plante, le tétramère couronne n'étant présent qu'en grande quantité dans la pellicule. En vue de la localisation de ces molécules, il serait possible que la plante forme cette molécule dans un but de protection vis-à-vis des agents pathogènes et que celles-ci soient transportées dans l'ensemble de la plante. Néanmoins, la localisation dans les racines et les rameaux restent à confirmer sur un set plus important d'échantillon.

La famille des tanins couronnes restent à caractériser structuralement parlant. Dans un futur proche, la structure du pentamère couronne sera élucidée afin de confirmer leur structure cyclique, les propriétés du tétramère et des pentamères étant identiques pour chaque étude développée (**Figure 124**).

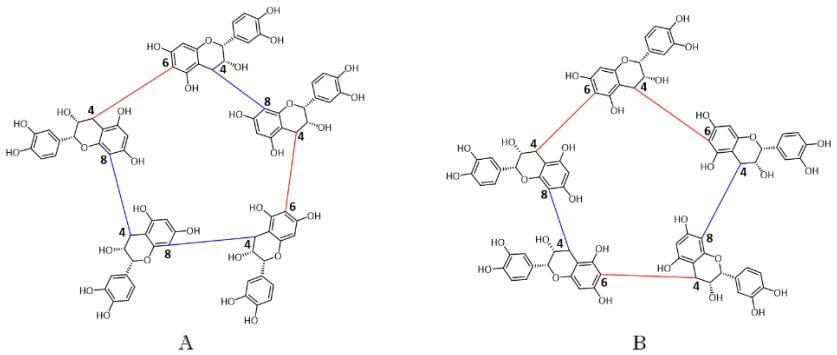


***Figure 124** : Structures hypothétiques du pentamère couronne majoritaire [20]*

La synthèse du tétramère couronne sera également à achever permettant d'obtenir cette molécule en quantité suffisante pour pouvoir étudier les propriétés de la cavité. En effet, la cavité fait une taille de 5,54 Å entre les cycles D des unités II et IV, de 4,97 Å entre les cycles A des unités I et III et enfin les phénols orientés dans la cavité étant distant de 2,59 Å. Au vu des mesures, le tétramère couronne pourrait faire un complexe avec d'autres petites molécules présentes dans le vin comme des métaux, mais également des arômes ainsi que d'une façon plus globale leurs implications dans la matrice colloïdale. Cette hypothèse serait probable en vue des études déjà publiées sur les éthers couronnes complexant avec des métaux [268]. En parallèle, les études préliminaires réalisées sur l'impact organoleptique des tanins couronnes dans le vin ont été mise en place avec des observations pour le moment non concluant. Une étude spécifique des interactions tanins couronnes-protéines ainsi qu'une estimation de leurs propriétés gustatives devra être réalisée à partir de tanins couronnes purifiés et en regardant également l'impact des conditions de la matrice telles que l'acidité, la teneur en éthanol ainsi que la force ionique du milieu. Ces résultats pourront être corrélés avec ceux obtenus pour des tanins condensés non cycliques de même degré de polymérisation. De plus, une étude approfondie des propriétés sensorielles perçues par le dégustateur sera également à réaliser.

Enfin, la petite étude réalisée sur les pigments polymérisés a permis de confirmer le comportement de chaque famille au cours du vieillissement. Ce travail doit continuer est être poussé plus en avant afin de pourvoir petit à petit comprendre l'évolution de la couleur durant le vieillissement des vins rouges et surtout trouver les déterminants moléculaires permettant d'expliquer les différences de couleurs observées durant le vieillissement en fonction des millésimes. De plus, l'étude détaillée sur la famille des tanins liés par une liaison de type A a permis d'éclairer l'impact organoleptique de cette famille dans les vins [26]. Dans le futur, l'impact organoleptique de chaque famille de pigments devrait être étudié permettant ainsi de compléter le puzzle qu'est le vin rouge.

Références Bibliographiques

1. Peynaud, É.; Blouin, J. *Le goût du vin: le grand livre de la dégustation*; Dunod: Paris, **2013**.
2. Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* **1992**, *339*, 1523–1526.
3. Ky, I.; Lorrain, B.; Kolbas, N.; Crozier, A.; Teissedre, P.-L. Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from sixdifferent french grape varieties. *Molecules* **2014**, *19*, 482–506.
4. Decendit, A.; Mamani-Matsuda, M.; Aumont, V.; Waffo-Teguo, P.; Moynet, D.; Boniface, K.; Richard, E.; Krisa, S.; Rambert, J.; Mérillon, J.-M.; Mossalayi, M.D. Malvidin-3-O-β glucoside, major grape anthocyanin, inhibits human macrophage-derived inflammatory mediators and decreases clinical scores in arthritic rats. *Biochemical Pharmacology* **2013**, *86*, 1461–1467.
5. Rodríguez-Morgado, B.; Candiracci, M.; Santa-María, C.; Revilla, E.; Gordillo, B.; Parrado, J.; Castaño, A. Obtaining from grape pomace an enzymatic extract with anti-inflammatory properties. *Plant Foods for Human Nutrition* **2015**, *70*, 42–49.
6. Rouanet, J.-M.; Teissédre, P.-L. Effects of wine consumption on cardiovascular diseases. *Journal of Wine Research* **2011**, *22*, 159–163.
7. Xu, Q.; Si, L.-Y. Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action. *Nutrition Research* **2012**, *32*, 648–658.
8. Richard, T.; Poupard, P.; Nassra, M.; Papastamoulis, Y.; Iglésias, M.-L.; Krisa, S.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J.-M.; Monti, J.-P. Protective effect of ε-viniferin on β-amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 3152–3155.
9. Rivière, C.; Richard, T.; Quentin, L.; Krisa, S.; Mérillon, J.-M.; Monti, J.-P. Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's β-amyloid fibrils in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 1160–1167.
10. Guyot, S.; Doco, T.; Souquet, J.-M.; Moutounet, M.; Drilleau, J.-F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (Malus sylvestris var. kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 351–357.
11. Kennedy, J.A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e investigación agraria* **2008**, *35,* 107-120.
12. Adams, D.O. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, 8, 249-256.
13. Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 507–521.
14. G. De revel, P. Darriet, D. Dubourdieu, A. Maujean, Y. Glories, P. Ribéreau-Gayon *Traité d'œnologie. Tome 2. Chimie du vin, stabilisation et traitements*; Pratiques vitivinicoles; 7ème édition.; Dunod, **2017**.
15. Kondo, K.; Kurihara, M.; Fukuhara, K.; Tanaka, T.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Toyoda, M. Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 485–488.
16. Glories, Y. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux II, **1978**.
17. Jurd, L. Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1969**, *20*, 191–195.
18. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 238–254.
19. Zeng, L.; Pons-Mercadé, P.; Richard, T.; Krisa, S.; Teissèdre, P.-L.; Jourdes, M. Crown procyanidin tetramer: A procyanidin with an unusual cyclic skeleton with a potent protective effect against amyloid-β-induced toxicity. *Molecules* **2019**, *24*, 1915.
20. Zeng, L. Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux, **2015**.

21. Sarni-Manchado, PascaleSarni-Manchado, Pascale; Cheynier, Véronique *Les polyphénols en agroalimentaire*; Sciences et techniques agroalimentaires; Lavoisier, **2006**.
22. Zeeb, D.J.; Nelson, B.C.; Albert, K.; Dalluge, J.J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 5020–5026.
23. Lorrain, B.; Ky, I.; Pechamat, L.; Teissedre, P.-L. Evolution of analysis of polyhenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules* **2013**, *18*, 1076–1100.
24. Noble, A.C. Bitterness in wine. *Physiology & Behavior* **1994**, *56*, 1251–1255.
25. Cliff, M.A.; Stanich, K.; Edwards, J.E.; Saucier, C.T. Adding grape seed extract to wine affects astringency and other sensory attributes. *Journal of Food Quality* **2012**, *35*, 263–271.
26. Paissoni, M.A.; Waffo-Teguo, P.; Ma, W.; Jourdes, M.; Rolle, L.; Teissedre, P.-L. Chemical and sensorial investigation of in-mouth sensory properties of grape anthocyanins. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 17098.
27. Teissedre, P.L.; Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L.; Peleg, H.; German, J.B. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1996**, *70*, 55–61.
28. Tournour, H.H.; Segundo, M.A.; Magalhães, L.M.; Barreiros, L.; Queiroz, J.; Cunha, L.M. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products* **2015**, *74*, 397–406.
29. Harborne, J.B. General procedures and measurement of total phenolics. In *Methods in Plant Biochemistry*; Elsevier, **1989**, 1, 1–28.
30. Macheix, J.-J.; Fleuriet, A. *Fruit Phenolics*; CRC Press, **1990**.
31. Galvin, C. Etude de certaines réactions de dégradation des anthocyanes et de leur condensation avec les flavanols: conséquences sur la couleur des vins. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux 2, **1993**.
32. Cheynier, V.; Basire, N.; Rigaud, J. Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1989**, *37*, 1069–1071.
33. Ribeiro de Lima, M.T.; Waffo-Téguo, P.; Teissedre, P.L.; Pujolas, A.; Vercauteren, J.; Cabanis, J.C.; Mérillon, J.M. Determination of stilbenes (*trans* -astringin, *cis* - and *trans* -piceid, and *cis* - and *trans* -resveratrol) in portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 2666–2670.
34. Carando, S.; Teissedre, P.-L.; Pascual-Martinez, L.; Cabanis, J.-C. Levels of flavan-3-ols in french wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 4161–4166.
35. Moreno-Labanda, J.F.; Mallavia, R.; Pérez-Fons, L.; Lizama, V.; Saura, D.; Micol, V. Determination of piceid and resveratrol in spanish wines deriving from *monastrell* (*Vitis vinifera L.*) grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 5396–5403.
36. Frankel, E.N.; German, J.B.; Kinsella, J.E.; Parks, E.; Kanner, J. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* **1993**, *341*, 454–457.
37. Jang, M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **1997**, *275*, 218–220.
38. Coombe, B.G. Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. **1987**, *38*, 8, 120-127.
39. Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 8461–8468.
40. Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2e partie : mesure, origine et interprétation. *Connaissance Vigne Vin* **1984**, *18*, 253–271.
41. Barbe, J.-C. La combinaison du dioxyde de soufre dans les moûts et vins issus de raisins botrytisés : rôle des bactéries acétiques. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux 2, **2000**.
42. Berké, B.; De Freitas, V. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chemistry* **2005**, *90*, 453–460.

43. Ribéreau-Gayon, P. *Composés phénoliques des végétaux*; Dunod, Paris, **1968**.
44. Bate-Smith, E.C.; Ribéreau-Gayon, P. Leuco-anthocyanins in seeds. *Plant Food for Human Nutrition* **1959**, *5*, 189–198.
45. Bate-Smith, E.C.; Westall, R.G. Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occuring phenolic substances. *Biochimica et Biophysica Acta* **1950**, *4*, 14.
46. Haslam, E.; Cai, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural Product Reports* **1994**, *11*, 41–66.
47. Quideau, S.; Feldman, K.S. Ellagitannin Chemistry. *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 475–504.
48. Keller, R. Les chênes dans le monde. Les chênes de tonnellerie en France: Quercus petraea et Quercus robur. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **1987**, 1–38.
49. Quideau, S.; Jourdes, M.; Saucier, C.; Glories, Y.; Pardon, P.; Baudry, C. DNA topoisomerase inhibitor acutissimin A and other flavano-ellagitannins in red wine. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 6012–6014.
50. Chassaing, S.; Lefeuvre, D.; Jacquet, R.; Jourdes, M.; Ducasse, L.; Galland, S.; Grelard, A.; Saucier, C.; Teissedre, P.-L.; Dangles, O.; Quideau, S. Physicochemical studies of new anthocyano-ellagitannin hybrid pigments: about the origin of the influence of oak C-glycosidic ellagitannins on wine color. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010*, 55–63.
51. Glabasnia, A.; Hofmann, T. Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in american (*Quercus alba* L.) and european Oak Wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 3380–3390.
52. Stark, T.; Wollmann, N.; Wenker, K.; Lösch, S.; Glabasnia, A.; Hofmann, T. Matrix-calibrated LC-MS/MS quantitation and sensory evaluation of oak ellagitannins and their transformation products in red wines. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 6360–6369.
53. Chira, K.; Zeng, L.; Le Floch, A.; Péchamat, L.; Jourdes, M.; Teissedre, P.-L. Compositional and sensory characterization of grape proanthocyanidins and oak wood ellagitannin. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 2999–3006.
54. González-Centeno, M.R.; Chira, K.; Teissedre, P.-L. Ellagitannin content, volatile composition and sensory profile of wines from different countries matured in oak barrels subjected to different toasting methods. *Food Chemistry* **2016**, *210*, 500–511.
55. Michel, J.; Jourdes, M.; Silva, M.A.; Giordanengo, T.; Mourey, N.; Teissedre, P.-L. Impact of concentration of ellagitannins in oak wood on their levels and organoleptic influence in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 5677–5683.
56. Heffernan, N.; Brunton, N.; FitzGerald, R.; Smyth, T. Profiling of the molecular weight and structural isomer abundance of macroalgae-derived phlorotannins. *Marine Drugs* **2015**, *13*, 509–528.
57. Thomas, N.V.; Kim, S.-K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2011**, *32*, 325–335.
58. Aron, P.M.; Kennedy, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* **2008**, *52*, 79–104.
59. Porter, L.J.; Hrstich, L.N.; Chan, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **1985**, *25*, 223–230.
60. Souquet, J.-M.; Labarbe, B.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 1076–1080.
61. Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 781–784.
62. Ricardo da Silva, J.M.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Cheminat, A.; Moutounet, M. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1259–1264.
63. Souquet, J.-M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 509–512.

64. Kennedy, J.A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E.J.; Jones, G.P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 5348–5355.
65. Geny, L.; Saucier, C.; Bracco, S.; Daviaud, F.; Glories, Y. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 8051–8054.
66. De Freitas, V. Recherches sur les tanins condensés : Application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux 2, **1995**.
67. Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *81*, 223–229.
68. Peyrot des Gachons, C.; Kennedy, J.A. Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 5877–5881.
69. Chira, K.; Schmauch, G.; Saucier, C.; Fabre, S.; Teissedre, P.-L. Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 545–553.
70. Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Trainotti, D. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2009**, *15*, 27–35.
71. Harbertson, J.F.; Kennedy, J.A.; Adams, D.O. Tannin in skins and seeds of cabernet sauvignon, syrah, and pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* **2002**, *53*, 54–59.
72. Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; Ros García, J.M.; Bautista-Ortín, A.B.; López-Roca, J.M.; Fernández-Fernández, J.I.; Gómez-Plaza, E. Anthocyanins and tannins in four grape varieties (Vitis vinifera L.). Evolution of their content and extractability. *Oeno One* **2008**, *42*, 147–156.
73. Romero-Cascales, I.; Ortega-Regules, A.; López, J.M.; Fernández-Fernández, J.I.; Gómez-Plaza, E. Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture* **2005**, *56*, 212–219.
74. Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.M.; Escribano-Bailón, M.T. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry* **1995**, *53*, 197–201.
75. Deloire, A.; Ojeda, H.; Zebic, O.; Bernard, N.; Hunter, J.J.; Carbonneau, A. Influence de l'état hydrique de la vigne sur le style de vin. *Revue Internet de Viticulture et Oenologie* **2006**, 12.
76. Ureta, F.; Yavar, L.O. Influence de quelques pratiques culturales sur la qualité des raisins. *Oeno One* **1982**, *16*, 187–193.
77. Lorrain, B.; Chira, K.; Teissedre, P.-L. Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1991–1999.
78. Van Leeuwen, C.; Seguin, G. The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research* **2006**, *17*, 1–10.
79. Van Leeuwen, C.; Friant, P.; Choné, X.; Tregoat, O.; Koundouras, S.; Dubourdieu, D. Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *American Journal of Enology and Viticulture* **2004**, *55*, 207–217.
80. Renouf, V.; Trégoat, O.; Roby, J.-P.; Van Leeuwen, C. Soils, rootstocks and grapevine varieties in prestigious Bordeaux vineyards and their impact on yield and quality. *Oeno One* **2010**, *44*, 127–134.
81. Nagel, C.W.; Baranowski, J.D.; Wulf, L.W.; Powers, J.R. The hydroxycinnamic acid tartaric acid ester content of musts and grape varieties grown in the pacific northwest. *American Journal of Enology and Viticulture* **1979**, *30*, 198–201.
82. Hidalgo-Arellano Evolution des composés phénoliques au cours de la vinification en rouge. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **1995**, *34*, 33–40.

83. Cheynier, V.; Prieur, C.; Guyot, S.; Rigaud, J.; Moutounet, M. The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. *American Chemical Society, Washington,* **1997**, *661*, 81–93.
84. Singleton, V.L.; Noble, A.C. Wine flavor and phenolic substances. In *Phenolic, Sulfur, and Nitrogen Compounds in Food Flavors*; *ACS Symposium Series American Chemical Society*, **1976**, *26*, 47–70.
85. Delcambre, A.; Saucier, C. High-throughput oenomics: shotgun polyphenomics of wines. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 9736–9741.
86. Somers, T.C.; Ziemelis, G. Flavanol haze in white wines. *Vitis* **1985**, *24*, 43-50.
87. Harbertson, J.F.; Parpinello, G.P.; Heymann, H.; Downey, M.O. Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry* **2012**, *131*, 999–1008.
88. Álvarez, I.; Aleixandre, J.L.; García, M.J.; Lizama, V. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 109–115.
89. Salinas, M.R.; Garijo, J.; Pardo, F.; Zalacain, A.; Alonso, G.L. Influence of prefermentative maceration temperature on the colour and the phenolic and volatile composition of rosé wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2005**, *85*, 1527–1536.
90. Baiano, A.; Terracone, C.; Longobardi, F.; Ventrella, A.; Agostiano, A.; Del Nobile, M.A. Effects of different vinification technologies on physical and chemical characteristics of Sauvignon blanc wines. *Food Chemistry* **2012**, *135*, 2694–2701.
91. Cheynier, V.; Rigaud, J.; Souquet, J.M.; Barillère, J.M.; Moutounet, M. Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1989**, *40*, 36–42.
92. Ricardo-da-Silva, J.M.; Cheynier, V.; Samsom, A.; Bourzeix, M. Effect of pomace contact, carbonic maceration, and hyperoxidation on the procyanidin composition of grenache blanc wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1993**, *44*, 168–172.
93. Piombino, P.; Genovese, A.; Gambuti, A.; Lamorte, S.A.; Lisanti, M.T.; Moio, L. Effects of off-vine bunches shading and cryomaceration on free and glycosilated flavours of Malvasia delle Lipari wine. *International Journal of Food Science & Technology* **2010**, *45*, 234–244.
94. Sacchi, K.L.; Bisson, L.F.; Adams, D.O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2005**, *56*, 197–206.
95. Puértolas, E.; López, N.; Saldaña, G.; Álvarez, I.; Raso, J. Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering* **2010**, *98*, 120–125.
96. Rouseff, R.L. Bitterness in food products: an overview. *Developments in food science* **1990**.
97. Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Quantitative econstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 9190–9199.
98. Sáenz-Navajas, M.-P.; Ferreira, V.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *673*, 151–159.
99. Peleg, H.; Noble, A.C. Perceptual Properties of Benzoic Acid Derivatives. *Chem Senses* **1995**, *20*, 393–400.
100. Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N. Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *Journal of Sensory Studies* **1997**, *12*, 25–37.
101. Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, *83*, 564–573.
102. Robichaud, J.L.; Noble, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, *53*, 343–353.

103. Maitrepierre, E.; Sigoillot, M.; Briand, L. Des saveurs aux récepteurs. *Biofutur* **2011**, 24.
104. Montmayeur, J. Receptors for bitter and sweet taste. *Current Opinion in Neurobiology* **2002**, *12*, 366–371.
105. Hanig, D.P. Zur Psychophysik des Geschmacksinnes. *Engelmann*, **1901**.
106. Boring, E.G. *Sensation and perception in the history of experimental psychology*; New York, **1942**.
107. B. Collings, V. Human taste response as a function of locus on the tongue and soft palate. *Perception & Psychophysics* **1974**, *16*, 169–174.
108. Soares, S.; Kohl, S.; Thalmann, S.; Mateus, N.; Meyerhof, W.; De Freitas, V. Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 1525–1533.
109. Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P.-L.; Glories, Y. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 286–291.
110. Lee, C.B.; Lawless, H.T. Time-course of astringent sensations. *Chem Senses* **1991**, *16*, 225–238.
111. Bajec, M.R.; Pickering, G.J. Astringency: mechanisms and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2008**, *48*, 858–875.
112. Haslam, E.; Lilley, T.H.; Butler, L.G. Natural astringency in foodstuffs — A molecular interpretation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1988**, *27*, 1–40.
113. Sáenz-Navajas, M.-P.; Avizcuri, J.-M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry* **2012**, *134*, 1484–1493.
114. Breslin, P.A.S.; Gilmore, M.M.; Beauchamp, G.K.; Green, B.G. Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses* **1993**, *18*, 405–417.
115. O'Mahony, M. Who told you the triangle test was simple? *Food Quality and Preference* **1995**, *6*, 227–238.
116. Hersleth, M.; Mevik, B.-H.; Næs, T.; Guinard, J.-X. Effect of contextual factors on liking for wine—use of robust design methodology. *Food Quality and Preference* **2003**, *14*, 615–622.
117. Lawless, H.T. Sensory interactions in mixtures. *Journal of Sensory Studies* **1986**, *1*, 259–274.
118. Charlton, A.J.; Baxter, N.J.; Khan, M.L.; Moir, A.J.G.; Haslam, E.; Davies, A.P.; Williamson, M.P. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 1593–1601.
119. Condelli, N.; Dinnella, C.; Cerone, A.; Monteleone, E.; Bertuccioli, M. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preference* **2006**, *17*, 96–107.
120. Guinard, J.-X.; Pangborn, R.M.; Lewis, M.J. The time-course of astringency in wine upon repeated ingestion. *American Journal of Enology and Viticulture* **1986**, *37*, 184–189.
121. Green, B.G. Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychologica* **1993**, *84*, 119–125.
122. Schmauch, G. Interactions tanins protéines en Oenologie. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux, **2010**.
123. Gibbins, H.L.; Carpenter, G.H. Alternative mechanisms of astringency – What is the role of saliva? *Journal of Texture Studies* **2013**, *44*, 364–375.
124. Ma, W.; Guo, A.; Zhang, Y.; Wang, H.; Liu, Y.; Li, H. A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science & Technology* **2014**, *40*, 6–19.
125. Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N.; Vallis, L. Correlations between saliva protein composition and some T–I parameters of astringency. *Food Quality and Preference* **2001**, *12*, 145–152.
126. Kennedy, J.A.; Ferrier, J.; Harbertson, J.F.; Gachons, C.P. Analysis of tannins in red wine using multiple methods: correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, *57*, 481–485.

127. Soares, S.; Mateus, N.; De Freitas, V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α-amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 6726–6735.
128. Ferrer-Gallego, R.; García-Marino, M.; Miguel Hernández-Hierro, J.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Teresa Escribano-Bailón, M. Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *660*, 22–28.
129. Schwarz, B.; Hofmann, T. Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology* **2008**, *227*, 1693–1698.
130. Harbertson, J.F.; Kilmister, R.L.; Kelm, M.A.; Downey, M.O. Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation. *Food Chemistry* **2014**, *160*, 16–21.
131. Demiglio, P.; Pickering, G.J. The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **2008**, *6*, 143–150.
132. Fischer, U.; Boulton, R.B.; Noble, A.C. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality and Preference* **1994**, *5*, 55–64.
133. Dangles, O.; Saito, N.; Brouillard, R. Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 119–124.
134. Scheffeldt, P.; Hrazdina, G. Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *Journal of Food Science* **1978**, *43*, 517–520.
135. Dimitrić Marković; Petranović, N.A.; Baranac, J.M. A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 5530–5536.
136. Lambert, S.G.; Asenstorfer, R.E.; Williamson, N.M.; Iland, P.G.; Jones, G.P. Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chemistry* **2011**, *125*, 106–115.
137. Brouillard, R.; Wigand, M.-C.; Dangles, O.; Cheminat, A. pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1991**, 1235–1241.
138. Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and Its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* **2001**, *52*, 67–87.
139. Geissman, T.A.; Dittmar, H.F.K. A proanthocyanidin from avocado seed. *Phytochemistry* **1965**, *4*, 359–368.
140. Weinges, K.; Freudenberg, K. Condensed proanthocyanidins from cranberries and cola nuts. *Chemical Communications* **1965**, 220–222.
141. Liu, C.; Wang, X.; Shulaev, V.; Dixon, R.A. A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins. *Nature Plants* **2016**, *2*, 1–7.
142. Bogs, J. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* **2005**, *139*, 652–663.
143. Fletcher, A.C. Plant Proanthocyanidins. Part 3.l Conformational and Configurational Studies of Natural Procyanidins. **1977**, 1628-1637.
144. Xie, D.-Y. Role of anthocyanidin reductase, encoded by banyuls in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **2003**, *299*, 396–399.
145. Dixon, R.A.; Xie, D.-Y.; Sharma, S.B. Proanthocyanidins: A final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* **2005**, *165*, 9–28.
146. Xie, D.-Y.; Dixon, R.A. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2127–2144.
147. Yu, K.; Jun, J.H.; Duan, C.; Dixon, R.A. VvLAR1 and VvLAR2 are bi-functional enzymes for proanthocyanidin biosynthesis in grapevine. *Plant Physiology* **2019**.
148. Haslam, E.; Opie, C.T.; Porter, L.J. Procyanidin metabolism—A hypothesis. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 99–102.

149. Edwin, H. In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2577–2582.
150. Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1279–1288.
151. Czochanska, Z.; Foo, L.Y.; Newman, R.H.; Porter, L.J. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1980**, 2278-2286.
152. Salas, E.; Dueñas, M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P.; Cheynier, V.; Fulcrand, H. Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4536–4546.
153. Santos-Buelga, C.; Bravo-Haro, S.; Rivas-Gonzalo, J.C. Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Zeitschrift for Lebensmittel-Untersuchung und - Forschung* **1995**, *201*, 269–274.
154. Jurd, L.; Somers, T.C. The formation of xanthylium salts from proanthocyanidins. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 419–427.
155. Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarbe, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, *80*, 745–751.
156. Salas, E.; Atanasova, V.; Poncet-Legrand, C.; Meudec, E.; Mazauric, J..; Cheynier, V. Demonstration of the occurrence of flavanol–anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 325–332.
157. Hayasaka, Y.; Kennedy, J.A. Mass spectrometric evidence for the formation of pigmented polymers in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2003**, *9*, 210–220.
158. Vidal, S.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Skouroumounis, G.; Hayasaka, Y. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 7144–7151.
159. Oliveira, J.; da Silva, M.A.; Jorge Parola, A.; Mateus, N.; Brás, N.F.; Ramos, M.J.; De Freitas, V. Structural characterization of a A-type linked trimeric anthocyanin derived pigment occurring in a young Port wine. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 1987–1996.
160. Mayer, W.; Goll, L.; Arndt, E.M. von; Mannschreck, A. Procyanidino-(-)-epicatechin, ein zweiarmig verknüpftes, kondensiertes proanthocyanidin aus aesculus hippocastanum. *Tetrahedron Letters* **1966**, *7*, 429–435.
161. Weinges, K.; Kaltenhäuser, W.; Marx, H.-D.; Nader, E.; Nader, F.; Perner, J.; Seiler, D. Zur kenntnis der proanthocyanidine, x procyanidine aus früchten. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1968**, *711*, 184–204.
162. Osman, A.M.; Wong, K.K.Y. Laccase (EC 1.10.3.2) catalyses the conversion of procyanidin B-2 (epicatechin dimer) to type A-2. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 1163–1167.
163. Chen, L.; Yuan, P.; Chen, K.; Jia, Q.; Li, Y. Oxidative conversion of B- to A-type procyanidin trimer: Evidence for quinone methide mechanism. *Food Chemistry* **2014**, *154*, 315–322.
164. Dong, X.; Zou, B.; Zhang, Y.; Ge, Z.; Du, J.; Li, C. Preparation of A-type proanthocyanidin dimers from peanut skins and persimmon pulp and comparison of the antioxidant activity of A-type and B-type dimers. *Fitoterapia* **2013**, *91*, 128–139.
165. Foo, L.Y.; Lu, Y.; Howell, A.B.; Vorsa, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated Escherichia coli in vitro. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 173–181.
166. Sánchez-Ilárduya, M.B.; Sánchez-Fernández, C.; Garmón-Lobato, S.; Abad-García, B.; Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F. Detection of non-coloured anthocyanin–flavanol derivatives in Rioja aged red wines by liquid chromatography–mass spectrometry. *Talanta* **2014**, *121*, 81–88.
167. Jouin, A. *Etude des propriétés organoleptiques des tanins de type A présents dans les vins rouges*; Rapport de Stage, ISVV-Université de Bordeaux, **2016**.

168. Oliveira, J.; Azevedo, J.; Silva, A.M.S.; Teixeira, N.; Cruz, L.; Mateus, N.; De Freitas, V. Pyranoanthocyanin dimers: A new family of turquoise blue anthocyanin-derived pigments found in Porto wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 5154–5159.
169. Drinkine, J.; Lopes, P.; Kennedy, J.A.; Teissedre, P.-L.; Saucier, C. Analysis of ethylidene-bridged flavan-3-ols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 1109–1116.
170. Romano, P. Acetaldehyde production in Saccharomyces cerevisiae wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **1994**, *118*, 213–218.
171. Li, E.; Mira de Orduña, R. Evaluation of the acetaldehyde production and degradation potential of 26 enological Saccharomyces and non-Saccharomyces yeast strains in a resting cell model system. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2011**, *38*, 1391–1398.
172. Wildenradt, H.L.; Singleton, V.L. The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds ans its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture* **1974**, *25*, 119–125.
173. Es-Safi, N.-E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Competition between (+)-catechin and (−)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 2088–2095.
174. Fulcrand, H.; Doco, T.; Es-Safi, N.-E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1996**, *752*, 85–91.
175. Drinkine, J.; Lopes, P.; Kennedy, J.A.; Teissedre, P.-L.; Saucier, C. Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 6292–6299.
176. Weber, F.; Winterhalter, P. Synthesis and structure elucidation of ethyliden-linked anthocyanin — Flavan-3-ol oligomers. *Food Research International* **2014**, *65*, 69–76.
177. Timberlake, C.F.; Bridle, P. Interaction between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1976**, *27*, 97–105.
178. Es-Safi, N.-E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *Journal of Food Composition and Analysis* **2003**, *16*, 535–553.
179. Saucier, C.; Bourgeois, G.; Vitry, C.; Roux, D.; Glories, Y. Characterization of (+)-catechin−acetaldehyde polymers: A model for colloidal state of wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 1045–1049.
180. Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 6151–6153.
181. Cruz, L.; Mateus, N.; Freitas, V. Identification by mass spectrometry of new compounds arising from the reactions involving malvidin-3-glucoside-(O)-catechin, catechin and malvidin-3-glucoside: LC-DAD/ESI-MS analysis of new methylmethine-linked adducts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *26*, 2123–2130.
182. De Freitas, V.; Mateus, N. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *401*, 1463–1473.
183. Bakker, J.; Timberlake, C.F. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 35–43.
184. Bakker, J.; Bridle, P.; Honda, T.; Kuwano, H.; Saito, N.; Terahara, N.; Timberlake, C.F. Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1375–1382.
185. Asenstorfer, R.E.; Hayasaka, Y.; Jones, G.P. Isolation and structures of oligomeric wine pigments by bisulfite-mediated ion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 5957–5963.

186. He, J.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; De Freitas, V. Isolation and structural characterization of new anthocyanin-derived yellow pigments in aged red wines. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 9598–9603.
187. Cruz, L.; Teixeira, N.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; Borges, J.; De Freitas, V. Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside−(+)-catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 10980–10987.
188. Fulcrand, H.; Santos, P.-J.C. dos; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Favre-Bonvin, J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1996**, *0*, 735–739.
189. He, J.; Oliveira, J.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; De Freitas, V. Oxovitisins: A new class of neutral pyranone-anthocyanin derivatives in red wines. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 8814–8819.
190. Mateus, N.; Silva, A.M.S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V. A New Class of Blue Anthocyanin-Derived Pigments Isolated from Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 1919–1923.
191. Francia-Aricha, E.M.; Guerra, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 2262–2266.
192. Mateus, N.; Silva, A.M.S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; De Freitas, V. Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 2110–2116.
193. Bindon, K.; Holt, H.; Williamson, P.O.; Varela, C.; Herderich, M.; Francis, I.L. Relationships between harvest time and wine composition in Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon 2. Wine sensory properties and consumer preference. *Food Chemistry* **2014**, *154*, 90–101.
194. Pechamat, L.; Zeng, L.; Jourdes, M.; Ghidossi, R.; Teissedre, P.-L. Occurrence and formation kinetics of pyranomalvidin-procyanidin dimer pigment in Merlot red wine: Impact of acidity and oxygen concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 1701–1705.
195. Bordignon-Luiz, M.T.; Gauche, C.; Gris, E.F.; Falcão, L.D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (Vitis labrusca L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology* **2007**, *40*, 594–599.
196. Hillmann, M.C.R.; Burin, V.M.; Bordignon-Luiz, M.T. Thermal degradation kinetics of anthocyanins in grape juice and concentrate: Thermal degradation kinetics of anthocyanins. *International Journal of Food Science & Technology* **2011**, *46*, 1997–2000.
197. Furtado, P.; Figueiredo, P.; Chaves das Neves, H.; Pina, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1993**, *75*, 113–118.
198. Piffaut, B.; Kader, F.; Girardin, M.; Metche, M. Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chemistry* **1994**, *50*, 115–120.
199. Lopes, P.; Richard, T.; Saucier, C.; Teissedre, P.-L.; Monti, J.-P.; Glories, Y. Anthocyanone A: A quinone methide derivative resulting from malvidin 3-O-glucoside degradation. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2698–2704.
200. Nagel, C.W.; Wulf, L.W. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **1979**, *30*, 111–116.
201. Eglinton, J.; Griesser, M.; Henschke, P.; Kwiatkowski, M.; Parker, M.; Herderich, M. Yeast-mediated formation of pigmented polymers in red wine. In; Waterhouse, A.L., Kennedy, J.A., Eds.; American Chemical Society: Washington, **2004**, 886, 7–21.
202. Kennedy, J.A.; Jones, G.P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 1740–1746.

203. Drinkine, J.; Glories, Y.; Saucier, C. (+)-Catechin−aldehyde condensations: Competition between acetaldehyde and glyoxylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 7552–7558.
204. Zeng, L.; Teissèdre, P.-L.; Jourdes, M. Structures of polymeric pigments in red wine and their derived quantification markers revealed by high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry: Identification of polymeric pigments and their quantification markers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2016**, *30*, 81–88.
205. Chira, K.; Pacella, N.; Jourdes, M.; Teissedre, P.-L. Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1971–1977.
206. McRae, J.M.; Dambergs, R.G.; Kassara, S.; Parker, M.; Jeffery, D.W.; Herderich, M.J.; Smith, P.A. Phenolic compositions of 50 and 30 year sequences of Australian red wines: The impact of wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 10093–10102.
207. Papastamoulis, Y.; Richard, T.; Nassra, M.; Badoc, A.; Krisa, S.; Harakat, D.; Monti, J.-P.; Mérillon, J.-M.; Waffo-Teguo, P. Viniphenol A, a complex resveratrol hexamer from vitis vinifera stalks: structural elucidation and protective effects against amyloid-β-induced toxicity in PC12 cells. *Journal of Natural Products* **2014**, *77*, 213–217.
208. Jang, J. Protective effect of resveratrol on β-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *34*, 1100–1110.
209. Tarozzi, A.; Morroni, F.; Merlicco, A.; Bolondi, C.; Teti, G.; Falconi, M.; Cantelli-Forti, G.; Hrelia, P. Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25–35) oligomer-induced toxicity. *Neuroscience Letters* **2010**, *473*, 72–76.
210. Tarascou, I.; Barathieu, K.; André, Y.; Pianet, I.; Dufourc, E.J.; Fouquet, E. An improved synthesis of procyanidin dimers: regio- and stereocontrol of the interflavan bond. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006*, 5367–5377.
211. Geissman, T.A.; Yoshimura, N.N. Synthetic proanthocyanidin. *Tetrahedron Letters* **1966**, *7*, 2669–2673.
212. Roux, D.G.; Ferreira, D. Structure and function in the biomimetic synthesis of linear, angular and branched condensed tannins. *Pure and Applied Chemistry* **1982**, *54*, 2465–2478.
213. Weinges, K.; Marx, H.-D.; Göritz, K. Zur kenntnis der proanthocyanidine, XV. Die rotationsbehinderung an der C(sp2)-C(sp3)-bindung der 4-arylsubstituierten polymethoxyflavane. *Chemische Berichte* **1970**, *103*, 2336–2343.
214. Jurd, L.; Lundin, R. Anthocyanidins and related compounds—XII: Tetramethylleucocyanidin-phloroglucinol and resorcinol condensation products. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2653–2661.
215. Thompson, R.S.; Jacques, D.; Haslam, E.; Tanner, R.J.N. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1972**, 1387–1399.
216. Delcour, J.A.; Ferreira, D.; Roux, D.G. Synthesis of condensed tannins. Part 9.t The condensation sequence of leucocyanidinwith (+)-catechin and with the resultant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1983**, 1711–1717.
217. Hemingway, R.W.; Foo, L.Y. Condensed tannins: quinone methide intermediates in procyanidin synthesis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1983**, 1035–1036.
218. Steynberg, P.L.; Nel, R.J.J.; van Rensburg, H.; Bezuidenhoudt, B.C.B. Oligomeric flavanoids. Part 27". Intedlavanyl bond formation in procyanidins under neutral conditions. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8153–8158.
219. Sears, K.D.; Casebier, R.L.; Hergert, H.L.; Stout, G.H.; McCandlish, L.E. Structure of catechinic acid. Base rearrangement product of catechin. *The Journal of Organic Chemistry* **1974**, *39*, 3244–3247.
220. Kiatgrajai, P.; Wellons, J.D.; Gollob, L.; White, J.D. Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, 2910–2912.
221. Slabbert, N.P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 821–824.

222. Kiehlmann, E.; Lehto, N.; Cherniwchan, D. Iodination and deuteration of catechin derivatives. *Canadian Journal of Chemistry* **1988**, *66*, 2431–2439.
223. Sweeny, J.G.; Iacobucci, G.A. Regiospecificity of (+)-catechin methylation. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44*, 2298–2299.
224. Mohri, Y.; Sagehashi, M.; Yamada, T.; Hattori, Y.; Morimura, K.; Kamo, T.; Hirota, M.; Makabe, H. An efficient synthesis of procyanidins. Rare earth metal Lewis acid catalyzed equimolar condensation of catechin and epicatechin. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 5891–5894.
225. Fabre, S. De la synthèse de procyanidines à leur quantification dans les baies de raisins et le vin *These de doctorat*, Université de Bordeaux, **2009**.
226. Tarascou, I. Synthèse et caractérisation de procyanidines oligomères pour l'identification de tanins du raisin et du vin. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux, **2005**.
227. Kiehlmann, E.; Tracey, A.S. Proton magnetic resonance spectra of catechin and bromocatechin derivatives: C_6 - vs. C_8 -substitution. *Canadian Journal of Chemistry* **1986**, *64*, 1998–2005.
228. Weinges, K.; Perner, J. The structure of a C30H26O12 procyanidin from cola nuts. *Chemical Communications (London)* **1967**, 351–352.
229. Kozikowski, A.P.; Tückmantel, W.; Hu, Y. Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 3. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 4, 1287-1296.
230. Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. Synthesis of Condensed Tannin Derivatives and their Protein-Precipitating Capacity. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **1990**, *10*, 59–74.
231. Arnaudinaud, V.; Nay, B.; Vergé, S.; Nuhrich, A.; Deffieux, G.; Mérillon, J.-M.; Monti, J.-P.; Vercauteren, J. Total synthesis of isotopically labelled flavonoids. Part 5: Gram-scale production of 13C-labelled (−)-procyanidin B3. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 5669–5671.
232. Tückmantel, W.; Kozikowski, A.P.; Romanczyk, L.J. Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 1. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 12073–12081.
233. Saito, A.; Nakajima, N.; Tanaka, A.; Ubukata, M. Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 2: Stereoselective gram-scale synthesis of procyanidin-B3q. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7829–7837.
234. Watanabe, G.; Ohmori, K.; Suzuki, K. First regiocontrolled synthesis of procyanidin B6, a catechin dimer with rare connectivity: a halo-capping strategy for formation of 4,6-interflavan bonds. *Chemical Communications* **2013**, *49*, 5210-5212.
235. Watanabe, G.; Ohmori, K.; Suzuki, K. A seco-catechin cyclization approach to 4→6-linked catechin dimers. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 14371–14373.
236. Higashino, Y.; Okamoto, T.; Mori, K.; Kawasaki, T.; Hamada, M.; Nakajima, N.; Saito, A. Regioselective synthesis of procyanidin B6, A 4-6-condensed (+)-catechin dimer, by intramolecular condensation. *Molecules* **2018**, *23*, 1–11.
237. Yoneda, S.; Kawamoto, H.; Nakatsubo, F. Synthesis of high molecular mass condensed tannin by cationic polymerization of flavan 3,4-carbonate. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1997**, *0*, 1025–1030.
238. Saito, A.; Doi, Y.; Tanaka, A.; Matsuura, N.; Ubukata, M.; Nakajima, N. Systematic synthesis of four epicatechin series procyanidin trimers and their inhibitory activity on the Maillard reaction and antioxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 4783–4790.
239. Saito, A.; Tanaka, A.; Ubukata, M.; Nakajima, N. Efficient stereoselective synthesis of proanthocyanidin trimers with -TMSOTf-catalyzed intermolecular condensation. *Synlett* **2004**, *2004*, 1069–1073.
240. Kozikowski, A.P.; Tückmantel, W.; Böttcher, G.; Romanczyk, L.J. Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 4. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 1641–1658.
241. Ohmori, K.; Ushimaru, N.; Suzuki, K. Oligomeric catechins: An enabling synthetic strategy by orthogonal activation and C(8) protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*, 12002–12007.
242. Ohmori, K.; Shono, T.; Hatakoshi, Y.; Yano, T.; Suzuki, K. Integrated synthetic strategy for higher catechin oligomers. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 4862–4867.

243. Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1279–1288.
244. Riveiro, M. Purification and structure elucidation of crown procyanidins. *Rapport de Stage,* ISVV-Université de Bordeaux, **2016**.
245. Baize, D.; Girard, M.-C.; Jabiol, B.; Rossignol, J.-P.; Eimberck, M.; Beaudou, A. *Référentiel pédologique*; Savoir faire; Quae.; **2008**.
246. Cebrián-Tarancón, C.; Sánchez-Gómez, R.; Gómez-Alonso, S.; Hermosín-Gutierrez, I.; Mena-Morales, A.; García-Romero, E.; Salinas, M.R.; Zalacain, A. Vine-shoot tannins: Effect of post-pruning storage and toasting treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 5556–5562.
247. Ishimaru, K.; Hirose, M.; Takahashi, K.; Koyama, K.; Shimomura, K. Tannin production in root culture of Sanguisorba officinalis. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3827–3830.
248. Ishimaru, K.; Shimomura, K. Tannin production in hairy root culture of Geranium thunbergii. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 825–828.
249. Kraus, T.E.C.; Zasoski, R.J.; Dahlgren, R.A. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil* **2004**, *262*, 95–109.
250. Somers, T.C. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2175–2186.
251. Mouls, L.; Fulcrand, H. UPLC-ESI-MS study of the oxidation markers released from tannin depolymerization: toward a better characterization of the tannin evolution over food and beverage processing: Oxidation markers released from tannin depolymerization. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47*, 1450–1457.
252. Mouls, L.; Fulcrand, H. Identification of new oxidation markers of grape-condensed tannins by UPLC–MS analysis after chemical depolymerization. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3012–3019.
253. Li, H.-J.; Deinzer, M.L. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 1739–1748.
254. Siebert, K.J. Effects of protein−polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 353–362.
255. De Freitas, V.; Mateus, N. Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 940–945.
256. Siebert, K.J.; Troukhanova, N.V.; Lynn, P.Y. Nature of polyphenol−protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 80–85.
257. Hagerman, A.E.; Butler, L.G. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1980**, *28*, 944–947.
258. Calderon, P.; Van Buren, J.; Robinson, W.B. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolyzable tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1968**, *16*, 479–482.
259. Spencer, C.M.; Cai, Y.; Martin, R.; Gaffney, S.H.; Goulding, P.N.; Magnolato, D.; Lilley, T.H.; Haslam, E. Polyphenol complexation—some thoughts and observations. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2397–2409.
260. Lee, C.T.; Smith, K.A.; Hatton, T.A. Photocontrol of protein folding: the interaction of photosensitive surfactants with bovine serum albumin. *Biochemistry* **2005**, *44*, 524–536.
261. Derdelinckx, G.; Jerumanis, J. Separation of malt and hop proanthocyanidins on Fractogel TSK HW-40 (S). *Journal of Chromatography A* **1984**, *285*, 231–234.
262. Tückmantel, W.; Kozikowski, A.P.; Romanczyk, L.J. Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 1. *Journal of the American Chemical Society,* **1999**, *121*, 51, 12073-12081.
263. Wuts, P.G.M. Protection for Phenols and Catechols. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, New Jersey, **2014**, 472–553.
264. Fabre, S. De la synthèse de procyanidines à leur quantification dans les baies de raisins et le vin, *Thèse de doctorat* ; Université de Bordeaux, **2009**.
265. Fletcher, A.C. Plant proanthocyanidins. Part 3.l Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1977**, 1628–1637.

266. Delcour, J.A.; Serneels, E.J.; Ferreira, D.; Roux, D.G. Synthesis of condensed tannins. Part 13. The first 2,3-trans-3,4-cis-procyanidins: sequence of units in a 'trimer' of mixed stereochemistry. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 669–676.
267. Foo, L.Y.; Hemingway, R.W. Condensed tannins: synthesis of the first 'branched' procyanidin trimer. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1984**, 85–86.
268. Inokuchi, Y.; Boyarkin, O.V.; Kusaka, R.; Haino, T.; Ebata, T.; Rizzo, T.R. Ion selectivity of crown ethers investigated by UV and IR spectroscopy in a cold ion trap. *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116*, 4057–4068.

Annexes

Annexe 1 : Protocole d'extraction des pellicules pour les tanins couronnes

Matériels : Pour un échantillon en triplicat

- 3 flacons à vis avec le bouchon en métal
- 9 tubes à vis avec le bouchon noir 15
- 3 ballons de 50 ou 100 mL (de préférence 100)
- 9 pipettes pasteurs en plastique
- 9 pipettes pasteurs en plastique coupées
- Agitateur magnétique prévue à cet effet

Protocoles :

Jour 1 : Mise en place de la 1 ére extraction entre 17h et 18h (idéal)

- Peser 500 mg de pellicule dans les flacons à vis
- Mettre les barreaux magnétiques
- Ajouter 5 mL de solvant (60 % Eau / 40 % Méthanol à 0,1% acide formique)
- Mettre en agitation à 660 pendant 16h

Jour 2 (matin): Mise en place de la 2 éme extraction à la fin des 16h (entre 9h et 10h idéal)

- Collecter le solvant de tous les échantillons avec les pipettes pasteurs en plastique coupées
- Mettre dans les tubes à vis pour le centrifuger
- Centrifugation pendant 3min à 4500 tour/min
- Collecter le solvant des tubes à vis centrifugés avec les pipettes pasteurs en plastique
- Mettre dans les ballons
- Remettre 5 mL de solvant dans chaque flacon
- Laisser agiter 8h

Jour 2 (soir): Mise en place de la 3 éme extraction à la fin des 8h (entre 17h et 18h idéal)

- Collecter le solvant de tous les échantillons avec les pipettes pasteurs en plastique coupées
- Mettre dans les tubes à vis pour le centrifuger
- Centrifugation pendant 3min à 4500 tour/min
- Collecter le solvant des tubes à vis centrifugés avec les pipettes pasteurs en plastique
- Mettre dans les mêmes ballons les échantillons correspondants
- Remettre 5 mL de solvant dans chaque flacon
- Laisser agiter 16h

Jour 3 : Mise en place de la 3éme extraction à la fin des 16h

- Collecter le solvant de tous les échantillons avec les pipettes pasteurs en plastique coupées
- Mettre dans les tubes à vis pour le centrifuger
- Centrifugation pendant 3min à 4500 tour/min
- Collecter le solvant des tubes à vis centrifugés avec les pipettes pasteurs en plastique
- Mettre dans les mêmes ballons les échantillons correspondants
- Evaporation de tous les ballons à sec
- Reprise dans 2 mL d'eau, filtrer avec des filtres 0,45 et mis dans un vial HPLC

Annexe 2 : Profil gustatif du vin de calage utilisé pour la dégustation verticale de vin de Pauillac

Nom du dégustateur : *Date :* 05/09/2019

Nom de l'échantillon : **Référence**

Profil gustatif

Vous allez assister à un profil **gustatif**. Veuillez déguster dans l'ordre des vins indiqués par les feuilles et noter l'intensité perçue pour chaque descripteur. Vous trouverez une feuille par vin.

	Faible							*Fort*
Acidité	0	1	2	3	(4)	5	6	7
Amertume	0	1	2	(3)	4	5	6	7
Intensité d'Astringence	0	1	2	3	(4)	5	6	7
Qualité tannique (fin à grossier)	0	1	2	(3)	4	5	6	7
Persistance d'Astringence	0	1	2	3	(4)	5	6	7
Volume (gras)	0	1	2	(3)	4	5	6	7

Annexe 3 : Profil gustatif des vins pour la dégustation verticale de vin de Pauillac

Nom du dégustateur : *Date :* 05/09/2019

Nom de l'échantillon : **383**

Profil gustatif

Vous allez assister à un profil **gustatif**. Veuillez déguster dans l'ordre des vins indiqués par les feuilles et noter l'intensité perçue pour chaque descripteur. Vous trouverez une feuille par vin.

	Faible							*Fort*
Acidité	0	1	2	3	4	5	6	7
Amertume	0	1	2	3	4	5	6	7
Intensité d'Astringence	0	1	2	3	4	5	6	7
Qualité tannique (fin à grossier)	0	1	2	3	4	5	6	7
Persistance d'Astringence	0	1	2	3	4	5	6	7
Volume (gras)	0	1	2	3	4	5	6	7

Annexe 4 : Feuille de dégustation pour les seuils des tanins de type A

Détermination de seuils organoleptiques

Nom du dégustateur:

Date:

- Pour chaque substance, vous disposez de **7 concentrations** différentes.
- Pour chaque concentration, vous disposez de **3 verres** dont **1 contient la substance** à reconnaître et les autres contiennent la solution témoin.
- Pour chaque concentration, noter un **X** pour le verres qui vous semblent avoir un gout.

1° concentration			2° concentration			3° concentration			4° concentration		
a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c

5° concentration			6° concentration			7° concentration		
a	b	c	a	b	c	a	b	c

Annexe 5 : Feuilles de dégustation pour les tests triangulaires des tanins de type A

Test triangulaire

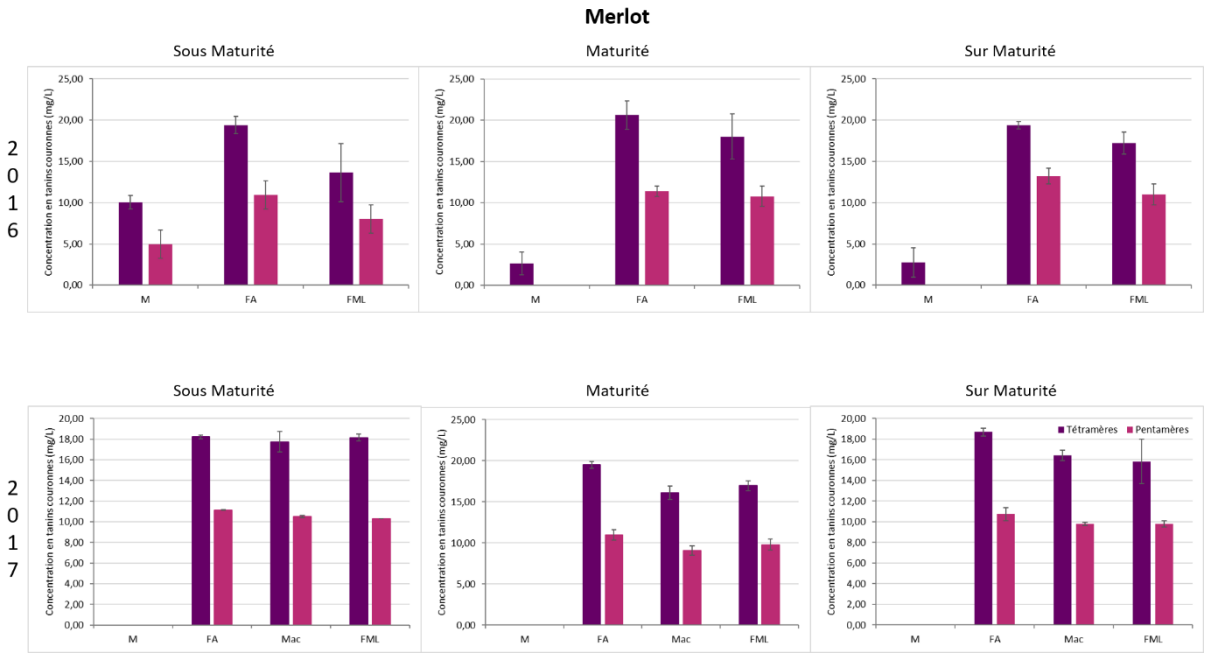
Nom du dégustateur :

Date :

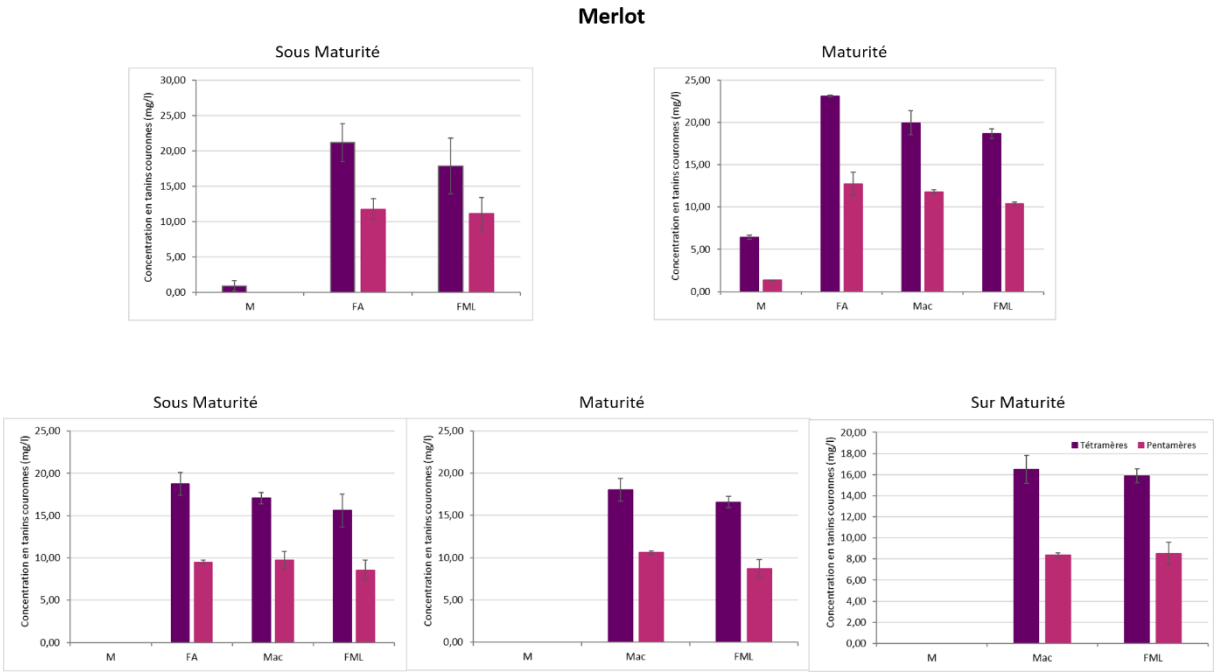
- Goûtez les 3 échantillons en commençant par celui de gauche.
- Mangez un morceau de pomme verte et rincez-vous avec de l'eau entre chaque échantillon.
- Cochez sur l'échantillon qui vous semble différent.

☐ 214 ☐ 101 ☐ 56

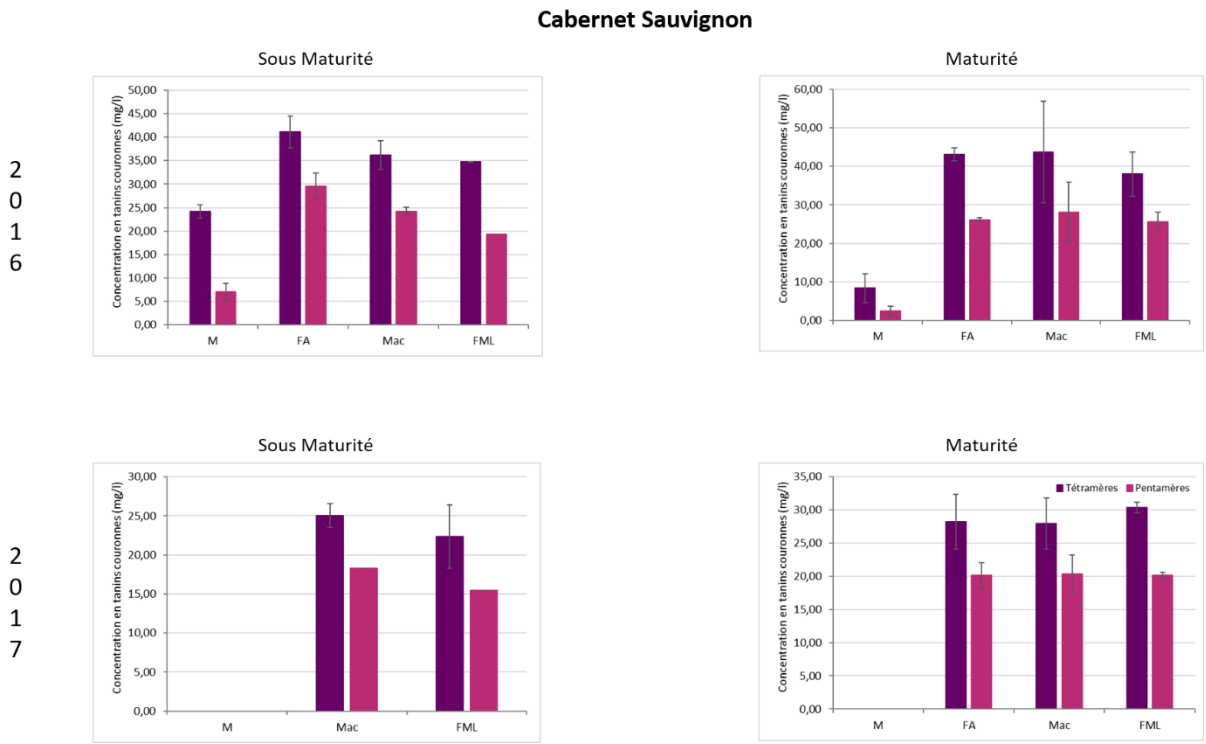
Annexe 6 : Evolution des tanins couronnes durant la vinification (Lafite, Merlot en 2016 et 2017)



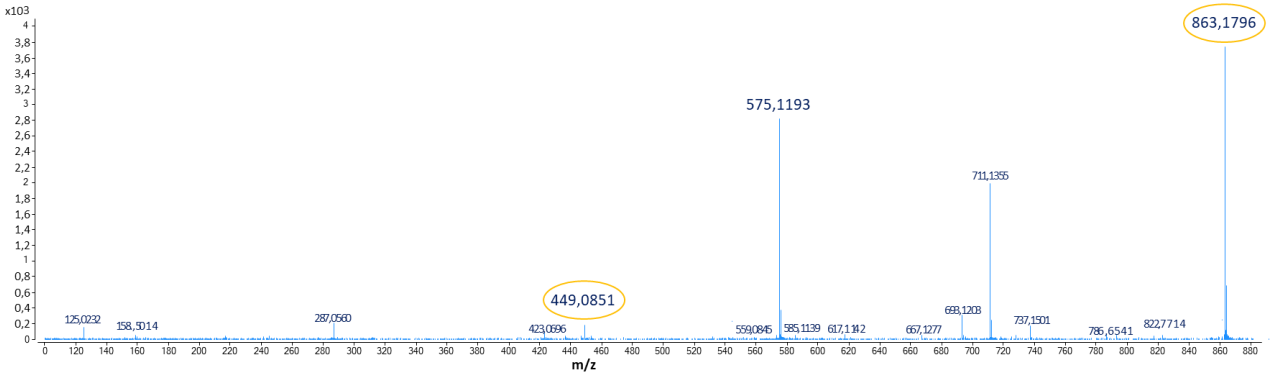
Annexe 7 : Evolution des tanins couronnes durant la vinification (Thieuley, Merlot en 2016 et 2017)



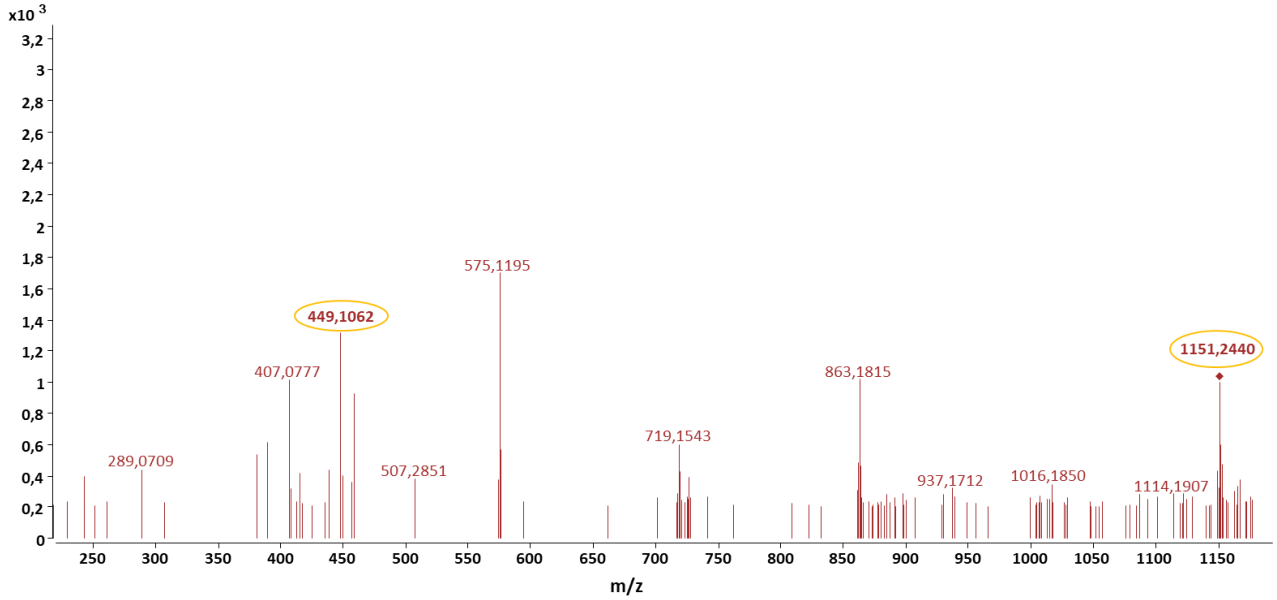
Annexe 8 : Evolution des tanins couronnes durant la vinification (Thieuley, Cabernet-Sauvignon en 2016 et 2017)



Annexe 9 : Spectre de fragmentation du trimère de type A (863,1796) en MS-MS



Annexe 10 : Spectre de fragmentation du tétramère de type A (1151,2440) en MS-MS



Evolution et caractérisation chimique des tanins couronnes du raisin au vin

Résumé : Les tanins condensés sont présents dans un grand nombre de boissons et d'aliments comme le raisin, le vin, le thé, les pommes ou même le chocolat. Dans le vin, ils contribuent à de nombreuses propriétés organoleptiques qu'elles soient visuelles ou gustatives. Récemment, une nouvelle sous-famille de tanins condensés possédant un squelette cyclique avec une cavité a été découverte et nommée les tanins couronnes. Le but de cette thèse est de déterminer la localisation des tanins couronnes dans la vigne, d'étudier leur cinétique d'évolution du raisin jusqu'au vin et de caractériser chimiquement cette nouvelle famille. Un volet de ce travail a été consacré aux pigments polymérisés ainsi qu'à la famille des tanins condensés ayant une liaison de type A. Les tanins couronnes ont été localisés spécifiquement dans la pellicule de la baie de raisin ainsi que dans les feuilles, les rameaux et les racines de la vigne. Leur concentration dans la pellicule est influencée par le type de sol et la nature du cépage. Durant la maturation du raisin, ces tanins s'accumulent dans les pellicules de la baie de raisin. Dans le vin, ces tanins cycliques sont extraits en tout début de fermentation alcoolique, restent stable durant le reste de la vinification et durant le vieillissement en bouteille. Il a ainsi été démontré que les tanins couronnes sont résistants à l'oxydation. En parallèle, la purification du pentamère couronne a été entreprise ainsi que la synthèse multi-étape du tétramère couronne. Une étude en fragmentation a permis de différencier les tétramères couronnes et des tanins de type A. Cette dernière famille a été analysée sensoriellement prouvant qu'ils sont plus astringents que les tanins de type B classique. Enfin, une étude sur l'évolution des familles de pigments polymérisés a été réalisée par dépolymérisation chimique permettant de mettre en lumière le comportement unique de chacune des familles en fonction de leur structure.

Mots clés : Vin rouge, Tanins condensés, Tanins couronnes, Tanins de type A, Vigne, Synthèse organique, UPLC-UV-ESI-QTOF.

Evolution and chemical characterisation of crown procyanidins from the vine to the wine

Resume: Condensed tannins are widely distributed in plant-derived foods and beverages like grape, red wine, tea, apples, or even chocolate. They contribute to many organoleptic properties such as color and taste. Recently, a new condensed tannin sub-family with a macrocyclic structure and with a cavity at the center has been reported, and named crown procyanidins. The aims of this PhD work were to determine the localization of crown tannin in the vine, to study their evolution kinetics from the grape to the wine and to characterize chemically these new compounds. Another part of the thesis has focalized on polymerized pigment as well as on the tannins with an A-type linkage. In the vine, crown procyanidins are specifically located in the grape skin as well as in the leaf, the vine branch and the vine roots. Their concentrations in the skin are impacted by the type of soil and by the grape varieties. In the grape skin, the crown tannins have been accumulated during all the ripening. These tannins are extracted at the beginning of the alcoholic fermentation and their concentrations remains stable during the rest of the winemaking process and also during the red wine aging in bottle. It has also been shown that the crown procyanidins appears to be resistant to oxidation. Moreover, at the same time, the purification of crown procyanidins pentamer has been undertaken as well as the multi-step synthesis of the crown tetramer. A comparative study of the fragmentation pathways of the crown tetramer and the non-cyclic tetramers having A-type linkages highlighted specific fragments from A-type the tannins. A sensory study on this tannin family was performed showing that tannins with A-type bonds are more astringent than tannins having only B-type bonds. Finally, a study on the evolution of polymerized pigments in red wine was carried by chemical depolymerization, which demonstrate that every class of pigments have a unique behavior.

Keys words: Red wine, Condensed tannins, Crown tannins, A-type of tannins, Vine, Organics Synthesis, UPLC-UV-ESI-QTOF.