

# Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n° 1779

## THÈSE

pour le

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Œnologie**

Présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2010

Par

**Axel MARCHAL**

*Né le 31 octobre 1983 à Remiremont (88)*

## **Recherches sur les bases moléculaires de la saveur sucrée des vins secs**

Approches analytique et sensorielle

### **Membres du Jury**

M. J.M. LEHN, Professeur au Collège de France, membre de l'Institut  
M. E.J. DUFOURC, Directeur de recherche, CNRS (Bordeaux)  
M. M. MOUTOUNET, Directeur de recherche, INRA (Montpellier)  
M. E. FREROT, Principal scientist, société Firmenich SA (Genève)  
M. P.WAFFO-TEGUO, Maître de conférences, Université Bordeaux 2  
M. D.DUBOURDIEU, Professeur, Université Bordeaux 2

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur  
Directeur de thèse



*A mes parents,*

*En remerciement de leur amour et de leur indéfectible soutien,  
En témoignage de ma reconnaissance pour le goût de la liberté qu'ils m'ont inculqué*



## Remerciements

Monsieur le professeur Denis Dubourdiou, directeur général de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, m'a confié ce sujet de recherche passionnant. Il m'a donné la possibilité de faire converger mon goût prononcé pour la chimie et ma passion du vin. Ses conseils avisés et précieux ont éclairé ces trois années de thèse. Il a laissé une libre part à mon initiative personnelle tout en m'offrant les moyens de cette liberté. Son soutien amical a été décisif dans la réalisation de ce travail. Qu'il soit assuré de mon entière reconnaissance.

Monsieur le professeur Jean-Marie Lehn m'a fait l'immense honneur de présider le jury de cette thèse. Les six mois que j'ai passés il y a quelques années sous sa direction, dans son laboratoire strasbourgeois, avaient constitué une expérience scientifique incomparable et forgé mon goût pour la recherche. Je lui témoigne ma très respectueuse gratitude.

Messieurs Erick Dufourc, directeur de recherche au CNRS, et Michel Moutounet, directeur de recherche à l'INRA, ont accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. J'en suis très honoré et les remercie vivement.

Monsieur Eric Frérot, de la société Firmenich, a montré un vif intérêt pour mon travail en m'accueillant quelques semaines dans son laboratoire et en m'apprenant les principes de l'étude des substances naturelles. Je suis heureux qu'il ait accepté de juger cette thèse.

Je remercie l'Ecole Normale Supérieure, qui a permis le financement de cette thèse, ainsi que le Conseil interprofessionnel des vins de Bordeaux et la société Laffort pour leur soutien matériel au projet.

Monsieur le professeur Bernard Donèche, doyen de la Faculté d'Œnologie de l'Université Bordeaux Segalen, a permis que je réalise ce travail au sein de la Faculté. Je lui exprime ma gratitude.

Monsieur le professeur Philippe Darriet m'a accueilli au sein du laboratoire d'œnologie générale. Monsieur le professeur Jean-Michel Mérillon, directeur du Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique, a permis une collaboration fructueuse. Je les remercie vivement de leur soutien et de leurs conseils.

Je remercie chaleureusement Pierre Waffo-Téguo, Maître de conférences à l'Université Bordeaux Segalen, qui m'a enseigné l'utilisation de la chromatographie de partage centrifuge et l'application de la résonance magnétique nucléaire à l'identification structurale. Au-delà de son incontestable maîtrise scientifique, je salue ses qualités humaines et plus particulièrement sa patience, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je suis très reconnaissant envers Valérie Lavigne-Cruège, chercheuse détachée à la Faculté d'Œnologie. Ses grandes compétences, tant œnologiques que scientifiques, m'ont guidé pendant ce travail, tout en attisant mon intérêt pour le monde du vin. Son amitié et nos nombreux échanges ont rendu cette thèse particulièrement agréable.

Eric Génin, responsable du laboratoire d'application de la société Thermo Fisher, m'a initié aux subtilités de la spectrométrie de masse à transformée de Fourier. Je salue sa grande rigueur scientifique et le remercie amicalement de son aide.

Je remercie également Virginie Moine et Philippe Marullo, de la société Laffort, pour leurs conseils et leur aide concernant les aspects biochimiques et biomoléculaires de la levure, ainsi qu'Alexandre Pons, de la tonnellerie Seguin-Moreau, pour son assistance dans le dosage des composés volatils du bois de chêne.

Moktar Akermi, Isabelle Santal et David Soverchia ont consacré un mois de leurs études à la purification « à grande échelle » des composés du bois, tout en conservant leur bonne humeur. Je leur en suis reconnaissant.

Je remercie également les propriétés ayant fourni des échantillons, notamment la maison Jaboulet, le château Reynon et la maison Rémy-Martin.

Ces trois années n'auraient indiscutablement pas eu la même saveur sans l'amitié et le soutien de Sophie Tempère. Au quotidien, nous avons partagé les heurts et les bonheurs de la thèse. Nos innombrables discussions, nos doutes et nos échanges ont été particulièrement enrichissants pour moi. Je la remercie très sincèrement.

Guillaume Antalick et Philippe Renault ont été les autres « coéquipiers » de cette thèse. Je leur suis très reconnaissant pour les éclats de rire et les prolixes débats qui ont émaillé ces trois ans.

Je n'oublie pas les dégustateurs, indispensables à la réalisation des études sensorielles. Je remercie chaleureusement Elodie Guittard pour l'organisation de ces dégustations, et plus généralement, pour son amitié et ses encouragements.

Je salue amicalement les membres de la Faculté d'Œnologie et du GESVAB qui m'ont accueilli au cours de ces trois années. S'ils sont trop nombreux pour que je les cite tous ici, je leur témoigne ma sympathie.

Enfin, je pense à mes connaissances et amis, œnologues, producteurs, critiques ou passionnés de vin. Les dégustations que nous avons partagées n'ont cessé d'entretenir ma fascination pour la beauté et la bonté du vin, motivant *a fortiori* mon travail de recherche. Je remercie notamment Michel Bettane, Pierre et Anne Morey, Véronique Sanders, Cyril, Antoine, Manon, Julien, Bastien, Jean-Philippe, Matthieu, Alessandro, Pierre, Maxime, Benoît, Alexandra, François..., ainsi que Céline pour son soutien et son réconfort.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : .....</b>	<b>2</b>
<b>ETUDE DE L'INFLUENCE DE PLUSIEURS FACTEURS SUR LA PERCEPTION SUCREE DES VINS SECS .....</b>	<b>2</b>
CHAPITRE 1 - LA PERCEPTION SUCREE DANS LES VINS SECS – ETUDE PARTICULIERE DU ROLE DE L'ETHANOL ET DU GLYCEROL .....	5
<i>Introduction .....</i>	5
I) <i>Les composés édulcorants .....</i>	5
A) Diversité moléculaire des édulcorants .....	5
B) Les composés à saveur sucrée dans les vins secs : état de l'art .....	8
II) <i>Perception de la sucrosité par les dégustateurs .....</i>	11
A) Diversité des perceptions sucrées .....	11
B) La perception de la saveur sucrée par les dégustateurs : étude dans quelques vins secs .....	15
III) <i>Etude de l'addition d'éthanol et de glycérol dans des vins (rouge et blanc) .....</i>	16
A) Méthodologie de l'analyse sensorielle .....	16
B) Résultats .....	18
C) Discussion .....	19
<i>Conclusion.....</i>	20
CHAPITRE 2 - EFFET DES MACROMOLECULES DE LEVURES SUR LA SUCROSITE DES VINS. MISE EN EVIDENCE DU ROLE DE LA PROTEINE HSP12 .....	21
<i>Introduction .....</i>	21
I) <i>Aperçu de l'importance œnologique des lies de levures et de l'autolyse .....</i>	21
A) Lies et autolyse .....	21
B) Effet de l'autolyse sur le goût du vin : approche empirique .....	23
II) <i>Etude de l'effet de l'autolyse des levures sur la sucrosité.....</i>	23
A) Matériels et méthodes .....	23
B) Résultats obtenus .....	26
C) Discussion .....	26
III) <i>Origine moléculaire de l'augmentation de la perception de sucrosité au cours de l'autolyse. Mise en évidence du rôle de la protéine Hsp12.....</i>	28
A) Purification et identification d'une fraction sapide à partir d'un autolysat de levures .....	28
B) Mise en évidence de l'effet de la protéine Hsp12 sur la sucrosité .....	30
<i>Conclusion.....</i>	34
CHAPITRE 3 - EFFET DE LA NATURE DU CONTENANT D'ELABORATION SUR LA PERCEPTION DE LA SUCROSITE DES VINS SECS. MISE EN EVIDENCE DU ROLE EDULCORANT DU BOIS DE CHENE .....	35
<i>Introduction .....</i>	35
I) <i>Quelques effets organoleptiques de l'élevage sous bois de chêne des vins et des eaux-de-vie. Molécules impliquées dans ces modifications. ....</i>	35
II) <i>Influence de la nature du contenant d'élaboration des vins secs sur la perception de la sucrosité .....</i>	39
A) Matériel et méthodes .....	39
B) Résultats .....	41
C) Discussion .....	43
III) <i>Incidence des composés volatils libérés par le bois de chêne sur la sucrosité .....</i>	44
A) Quelques illustrations des interactions odeur/goût .....	44
B) Ajout de vanilline, de whisky-lactone et d'eugénol dans les vins élaborés dans des contenants différents. Effet sur la perception de la sucrosité.....	46
C) Ajout de 2-furanemethanethiol et de vanilline dans des vins non boisés. Effet sur la perception de la sucrosité .....	50
<i>Conclusion.....</i>	53

<b>DEUXIEME PARTIE :</b> .....	<b>55</b>
<b>EXTRACTION ET IDENTIFICATION DE MOLECULES NON VOLATILES DU BOIS DE CHENE POSSEDANT DES PROPRIETES EDULCORANTES</b> .....	<b>55</b>
CHAPITRE 4 - DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION SOLIDE/LIQUIDE .....	56
<i>Introduction</i> .....	56
I) <i>Choix du matériel d'étude solide utilisé</i> .....	56
A) <i>Forme du bois de chêne utilisé</i> .....	56
B) <i>Nature des copeaux de chêne utilisés</i> .....	57
II) <i>Choix du solvant et des conditions d'extraction</i> .....	60
A) <i>Détermination de la phase liquide utilisée</i> .....	60
B) <i>Conditions d'extraction mises en œuvre</i> .....	61
III) <i>Protocole d'extraction choisi</i> .....	62
<i>Conclusion</i> .....	62
CHAPITRE 5 - MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE DE FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS DE BOIS DE CHENE GUIDE PAR LA DEGUSTATION .....	63
<i>Introduction</i> .....	63
I) <i>Description de la stratégie déployée – Estimation de la taille des composés</i> .....	63
A) <i>Principe et contraintes de la stratégie de fractionnement</i> .....	63
B) <i>Estimation de la taille des composés à saveur sucrée</i> .....	66
II) <i>Extractions liquide/liquide successives</i> .....	67
A) <i>Extraction de <b>CZNCA</b> à l'heptane</i> .....	67
B) <i>Extraction de <b>CZNCA-1Aq</b> à l'acétate d'éthyle</i> .....	70
C) <i>Extraction de <b>CZNCA-2Org</b> au méthyl <i>ter</i>-butyl éther (MtBE)</i> .....	70
III) <i>Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)</i> .....	73
A) <i>Principe et appareillage de la CPC</i> .....	73
B) <i>Matériel et méthodes</i> .....	79
C) <i>Résultats</i> .....	82
D) <i>Discussion</i> .....	87
IV) <i>Purification par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse</i> .....	88
A) <i>Matériel et méthodes</i> .....	88
B) <i>Résultats et discussion</i> .....	89
<i>Conclusion</i> .....	92
CHAPITRE 6 - DETERMINATION DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES QUATRE MOLECULES PRINCIPALES DE LA FRACTION CZNCA-X .....	94
<i>Introduction</i> .....	94
I) <i>Approche expérimentale de l'identification : techniques et méthodes utilisées</i> .....	94
A) <i>Spectrométrie de masse à transformée de Fourier : système Exactive™ (Thermo Fisher Scientific)</i> .....	95
B) <i>Résonance magnétique nucléaire</i> .....	105
C) <i>Données complémentaires</i> .....	110
II) <i>Identification du composé A</i> .....	111
A) <i>Résultats obtenus en FT/MS</i> .....	111
B) <i>Résultats obtenus en RMN</i> .....	119
C) <i>Données complémentaires</i> .....	120
D) <i>Discussion</i> .....	120
III) <i>Identification du composé B</i> .....	121
A) <i>Résultats obtenus en FT/MS</i> .....	121
B) <i>Résultats obtenus en RMN</i> .....	124
C) <i>Données complémentaires</i> .....	124
D) <i>Discussion</i> .....	124
IV) <i>Identification du composé C</i> .....	126
A) <i>Résultats obtenus en FT/MS</i> .....	127
B) <i>Résultats obtenus en RMN</i> .....	130
C) <i>Données complémentaires</i> .....	141
D) <i>Discussion</i> .....	141
V) <i>Identification du composé D</i> .....	143
A) <i>Résultats obtenus en FT/MS</i> .....	143
B) <i>Résultats obtenus en RMN</i> .....	145
C) <i>Discussion</i> .....	148
<i>Conclusion</i> .....	149

CHAPITRE 7 - INTERET DE L'UTILISATION DE LA LC-FT/MS EN VUE DE L'IDENTIFICATION DE NOUVEAUX TRITERPENOÏDES DANS LES EXTRAITS DE BOIS DE CHENE.....	150
<i>Introduction</i> .....	150
I) <i>Etude de la présence en LC-FT/MS d'isomères et de dérivés des quercotriterpénosides I et II dans un extrait de bois de chêne</i> .....	151
A) Méthode utilisée .....	151
B) Résultats.....	152
II) <i>Purification des composés E et F</i> .....	156
A) Purification du composé E.....	156
B) Purification du composé F.....	158
III) <i>Identification du composé E</i> .....	159
A) Résultats obtenus en FT/MS .....	159
B) Résultats obtenus en RMN .....	161
C) Données complémentaires .....	163
D) Discussion .....	163
IV) <i>Identification du composé F</i> .....	164
A) Résultats obtenus en FT/MS .....	164
B) Résultats obtenus en RMN .....	166
C) Discussion.....	168
<i>Conclusion</i> .....	169
<b>TROISIEME PARTIE : .....</b>	<b>172</b>
<b>CARACTERISATION SENSORIELLE DES COMPOSES PURIFIES. QUANTIFICATION ET IMPACT GUSTATIF DANS LES VINS ET LES EAUX-DE-VIE .....</b>	<b>172</b>
CHAPITRE 8 - ETUDE DES PROPRIETES GUSTATIVES DE MOLECULES IDENTIFIEES DANS UN EXTRAIT DE BOIS DE CHENE.	
DETERMINATION DE LEURS SEUILS DE PERCEPTION .....	172
<i>Introduction</i> .....	172
I) <i>Etude des propriétés gustatives de composés identifiés dans le bois de chêne</i> .....	173
A) Préparation des échantillons et conditions de dégustation.....	173
B) Résultats.....	174
C) Goût des composés en mélange .....	175
II) <i>Détermination des seuils de perception du lyonirésinol et du QTT I</i> .....	177
A) Matériel et méthodes .....	177
B) Résultats.....	180
C) Discussion.....	180
<i>Conclusion</i> .....	181
CHAPITRE 9 - QUANTIFICATION DU LYONIREBINOL ET DES QUERCOTRITERPENOSIDES I ET III DANS LES VINS ET LES EAUX-DE-VIE.	183
<i>Introduction</i> .....	183
I) <i>Développement d'une méthode de quantification du lyonirésinol et des quercotriterpénosides I et III</i> .....	183
A) Principe de la méthode. Composés quantifiés.....	184
B) Conditions chromatographiques.....	188
C) Paramètres de spectrométrie de masse .....	189
D) Traitement des résultats .....	193
E) Préparation des échantillons .....	194
F) Validation de la méthode de quantification .....	195
II) <i>Application à l'analyse des vins blancs</i> .....	200
A) Nature et origine des vins analysés.....	200
B) Résultats du dosage du lyonirésinol dans les vins blancs.....	201
C) Résultats du dosage des quercotriterpénosides I et III dans les vins blancs .....	204
III) <i>Application à l'analyse des eaux-de-vie</i> .....	208
A) Nature et origine des eaux-de-vie analysées .....	208
B) Résultats du dosage du lyonirésinol dans les eaux-de-vie .....	208
C) Résultats du dosage des quercotriterpénosides I et III dans les eaux-de-vie .....	211
<i>Conclusion</i> .....	214
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>216</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>220</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>238</b>

# Liste des abréviations

## Abréviations générales

$^1\text{H}$	Proton
$^{13}\text{C}$	Carbone 13
$[\alpha]^D$	Pouvoir rotatoire spécifique (en degrés)
$\delta$	Déplacement chimique (en ppm)
$\epsilon$	Coefficient d'extinction molaire (en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
$\lambda$	Longueur d'absorption (en nm)
$\mu\text{g}$ , mg, g	Microgramme, milligramme, gramme
$\mu\text{L}$ , mL, L	Microlitre, millilitre, litre
AFNOR	Agence Française de Normalisation
amu	Unité de masse
Da	Dalton
eV	Electron-volt
DO	Densité Optique
$J$	Constante de couplage (en Hz)
kV	Kilovolts
mmu	Milli-unité de masse
$m/z$	Rapport masse/charge
nm	Nanomètre
ppb	Partie par milliard
ppm	Partie par million
Th	Thomson
rpm	Rotations par minute
R	Résolution en spectrométrie de masse

## Abréviations des molécules et des solvants

AcOEt	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
Hept	<i>n</i> -Heptane
Hsp12	Heat Shock Protein 12
MeOH	Méthanol
MtBE	Méthyl <i>ter</i> -butyl éther
NHDC	Neohespéridine dihydrochalcone
QTT	Quercotriterpénoside
P-WL	Dérivé 6'- <i>O</i> -gallate de l'acide (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-4- $\beta$ -glucopyranosyloxy-3-méthyl octanoïque
TFA	Acide trifluoro-acétique

## Abréviations relatives aux techniques analytiques utilisées

C18	Silice à polarité de phase inversée (greffée C18)
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
COSY	CORrelated SpectroscopY
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
CPC-G	Chromatographie de partage centrifuge couplée à la gustatométrie
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CPG-O	Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie
ESI	Ionisation par électro-nébulisation
HCD	Dissociation induite par collision
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSQC-TOCSY	Heteronuclear Single Quantum Coherence – TOrtal Correlation SpectroscopY
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-FT/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à Transformée de Fourier
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
RMN 1D et 2D	Résonance magnétique nucléaire à une et deux dimensions
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY
SID	Dissociation induite dans la source
TIC	Chromatogramme des ions totaux
U-HPLC	Chromatographie liquide ultra haute performance
UV	Ultraviolet



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

La dégustation d'un vin est un acte complexe, impliquant des mécanismes physiques, physiologiques et cognitifs, au cours duquel le dégustateur construit une représentation d'objets chimiques dans son champ de conscience (Brochet & Dubourdiou, 2001). Cette représentation repose, d'un point de vue sensoriel, sur les paramètres visuels, tactiles, olfactifs et gustatifs du vin dégusté.

De nombreux travaux se sont attachés, depuis plusieurs années, à la caractérisation moléculaire des composés volatils intervenant dans l'olfaction ; il est désormais possible d'associer certains arômes du vin à une ou plusieurs molécules, parfois seulement présentes à l'état de traces dans les vins (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998a).

De la même façon, des études récentes, portant sur les interactions entre les polyphénols du vin et les protéines salivaires, permettent d'interpréter la sensation d'astringence (Simon *et al.*, 2003; Pianet *et al.*, 2009; Cala *et al.*, 2010).

Toutefois, l'équilibre gustatif d'un vin ne repose pas uniquement sur sa structure tannique ou son acidité, mais également sur sa douceur (Peynaud, 1980), le mot doux répondant à la définition suivante : « *qui procure une sensation agréable au goût, suave* » (Grand Larousse, 1988).

Le vocabulaire de la dégustation emprunte ainsi plusieurs mots au champ lexical de la douceur, et notamment le terme « sucrosité ». Ce néologisme, récurrent dans les commentaires de dégustation des professionnels du vin, décrit l'aptitude d'un vin à procurer une impression sucrée.

Cette sucrosité contribue à la complexité et à la typicité des vins, et plus particulièrement des grands vins. Elle est d'autant plus valorisée dans la gustation par l'attirance innée qu'elle exerce sur le dégustateur (cette valence attractive ou répulsive dépend de sa propre glycémie), alors que l'appréciation des saveurs acides ou amères nécessite un apprentissage culturel, même si la composante innée n'est pas négligeable.

Dans les vins moelleux et liquoreux, cette perception sucrée est directement liée à la présence de sucres résiduels (glucose et fructose), non transformés par les levures au cours de la fermentation alcoolique. Dans les vins secs, ces hydrates de carbone sont présents à des concentrations nettement inférieures à leur seuil de perception ; la douceur ressentie correspond donc à une « sucrosité sans sucre ».

Néanmoins, en dépit de l'évidence de leur importance sensorielle, les déterminants moléculaires de la saveur sucrée dans les vins secs n'ont pas encore été caractérisés. L'étude de certains d'entre eux constitue l'objet de notre travail.

Compte tenu de la nature du sujet d'étude et du manque de données le concernant, nous adopterons une double approche, utilisant conjointement des techniques analytiques et sensorielles.

Après avoir évoqué quelques aspects inhérents à la perception gustative et discuté du rôle de l'éthanol et du glycérol sur la saveur sucrée des vins secs, nous étudierons deux facteurs qui, d'après beaucoup de vinificateurs, pourraient concourir à l'augmentation de la sucrosité des vins secs au cours de leur élaboration : la macération post-fermentaire des vins rouges et l'élevage des vins dans des contenants de bois de chêne.

La macération post-fermentaire consiste à prolonger la cuvaison de la vendange rouge d'une à deux semaines après l'achèvement de la fermentation alcoolique, c'est-à-dire à maintenir le vin au contact des parties solides de la baie (pellicule, pépins) et les lies de levure (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998b). Cette phase n'entraîne pas une extraction accrue des anthocyanes et des tanins du raisin, dont les teneurs maximales dans les vins sont quasiment atteintes à l'issue de la fermentation alcoolique. L'accroissement de la saveur du vin, et notamment de sa sucrosité, constaté pendant cette opération, est concomitant à l'autolyse des levures. Nous pouvons donc imaginer que ces dernières libèrent des composés augmentant la saveur sucrée des vins.

Par ailleurs, les praticiens sont convaincus que l'élevage des vins sous bois de chêne a un effet édulcorant. Une bonification similaire semble également participer à la maturation des eaux-de-vie. Nous vérifierons l'influence effective de la nature du contenant d'élaboration sur la sucrosité des vins, en distinguant le rôle respectif des composés volatils et non-volatils.

Afin de déterminer l'origine moléculaire du gain de sucrosité consécutif à l'élevage en barrique, nous tenterons d'isoler puis de caractériser des molécules à saveur sucrée à partir d'un extrait de bois de chêne. A cette fin, une méthode de purification guidée par la dégustation sera mise au point, de façon similaire aux techniques d'étude des composés volatils utilisées par les aromaticiens. La partie analytique, correspondant à l'identification structurale des molécules, repose sur l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire ainsi que sur une technique récemment développée : la spectrométrie de masse à transformée de Fourier (analyseur Orbitrap).

A cette caractérisation structurale feront suite l'analyse sensorielle des molécules isolées et la détermination de leurs seuils de perception. La quantification des composés identifiés, dans les vins et les eaux-de-vie, permettra alors de discuter leur impact organoleptique réel, ainsi que certains paramètres pouvant influencer leurs teneurs.

Plusieurs nouvelles méthodes seront présentées dans ce travail. Leur développement constitue une partie intégrante de l'étude. Par conséquent, nous avons choisi de ne pas les regrouper dans un chapitre séparé, mais de les intégrer aux résultats qu'elles ont permis d'obtenir, afin de mettre en évidence leur intérêt ainsi que le raisonnement conduisant à leur mise au point.



## **Première partie :**

### **Etude de l'influence de plusieurs facteurs sur la perception sucrée des vins secs**



# Chapitre 1 - La perception sucrée dans les vins secs – Etude particulière du rôle de l'éthanol et du glycérol

## Introduction

La perception de la saveur sucrée, au même titre que les autres perceptions gustatives, implique des mécanismes complexes, tant au niveau physiologique que cognitif. Elle peut être générée par de nombreux stimuli et résulte d'interactions variées.

Après avoir rappelé quelques aspects relatifs à la perception sucrée de façon générale, nous présenterons l'état actuel des connaissances concernant les composés à saveur sucrée dans les vins, puis nous étudierons de façon plus approfondie le rôle gustatif de l'éthanol et du glycérol.

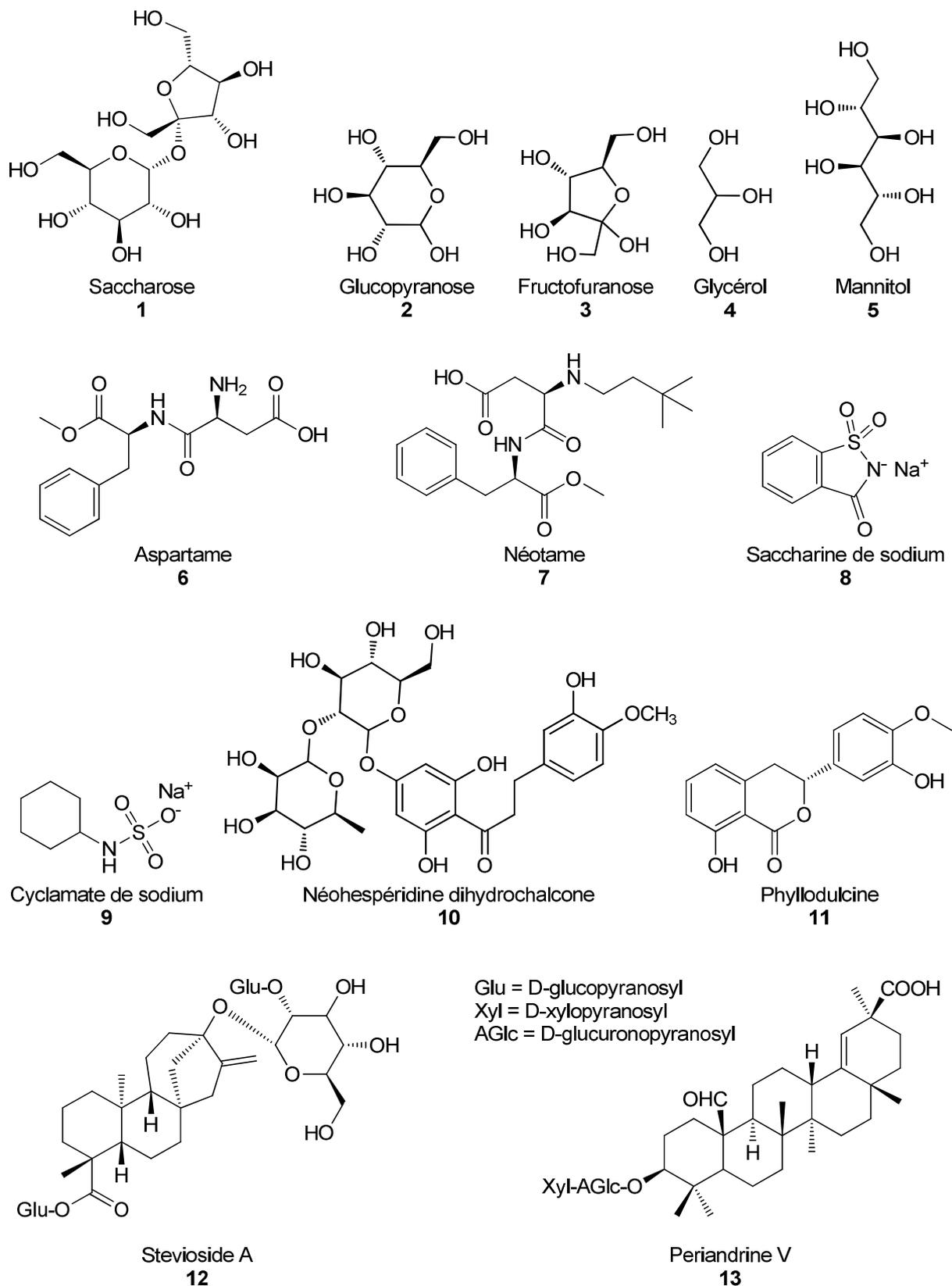
## I) Les composés édulcorants

### A) Diversité moléculaire des édulcorants

De nos jours, le composé de référence associé au descripteur « sucré » est le saccharose **1**, extrait essentiellement de la betterave et de la canne à sucre. Il s'agit d'un diholoside formé par la condensation d'une molécule de glucopyranose **2** et d'une molécule de fructofuranose **3**.

Le terme « sucre » désigne ainsi un objet concret, chimiquement pur, et l'adjectif « sucré » caractérise une perception gustative générée par cette substance.

De nombreux autres composés possèdent une saveur proche de celle du saccharose ; ils sont alors qualifiés d'édulcorants. Ces molécules appartiennent à des familles chimiques très diverses (figure 1). On trouve en effet des hydrates de carbone (**1, 2, 3**), des polyols (**4, 5**), des peptides (**6, 7**), des protéines (thaumatine), des flavonoïdes (**10, 11**), des diterpénoïdes (**12**), des triterpénoïdes dérivés de l'oléanane (**13**), des proanthocyanidines (selligueaine A), mais aussi des halogénoalcanes comme le chloroforme. (Schiffman & Gatlin, 1993; Kim & Kinghorn, 2002; Kinghorn & Soejarto, 2002).



**Figure 1** - Structure chimique de quelques composés possédant une saveur sucrée.

Ces composés peuvent être hiérarchisés en fonction de leur pouvoir sucrant. Cette grandeur adimensionnelle est obtenue par un quotient dont le dénominateur est une concentration massique de saccharose, et le numérateur la concentration de composé sucrant conduisant à une saveur sucrée de même intensité. Cette valeur varie considérablement d'un composé à un autre, comme entre le mannitol (0.6) et la thaumatococine (plus de 14 000) par exemple (Schiffman & Gatlin, 1993).

Les édulcorants se classent ainsi en deux groupes : les édulcorants de charge, possédant un pouvoir sucrant proche de 1 et les édulcorants intenses, présentant une activité gustative bien supérieure.

Les édulcorants non-glucidiques sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, en raison de leur faible pouvoir calorique et de leur pouvoir cariogène réduit. L'utilisation de tels composés constitue également un enjeu sanitaire majeur, dans le cadre de la lutte contre le diabète, ce qui explique les nombreuses recherches visant à l'obtention de nouveaux édulcorants utilisables dans l'alimentation.

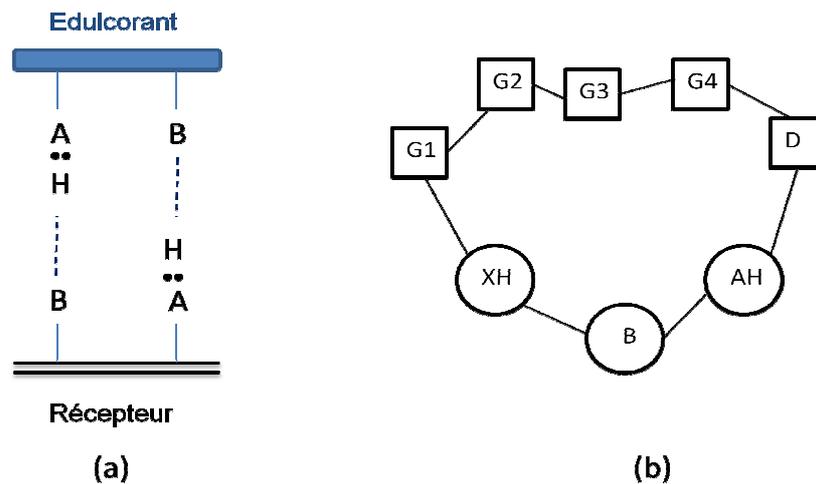
Certains édulcorants, comme les stéviolosides, provenant de plantes, sont naturels ; d'autres sont obtenus par synthèse chimique et n'ont jamais été identifiés dans la nature.

A titre d'exemple, l'aspartame **6** est un dipeptide qui a été synthétisé pour la première fois en 1965 comme intermédiaire d'une synthèse d'un médicament. Son goût sucré a été découvert de façon accidentelle et cette molécule a été mise sur le marché américain pour la première fois en 1974. Bien qu'il n'ait jamais été observé dans la nature, l'aspartame est actuellement utilisé dans plus de 5000 produits à travers le monde. Comme pour la plupart des autres édulcorants, de nombreux analogues à l'aspartame ont été synthétisés, en vue d'obtenir des composés présentant un goût sucré plus intense ou plus agréable, tels que l'alitame (Hendrick, 1991) ou le néotame **7** (Prakash *et al.*, 1999).

Il est intéressant de noter que de faibles modifications de la structure chimique peuvent engendrer des modifications considérables des propriétés gustatives. La néohesperidine dihydrochalcone **10** par exemple est un édulcorant puissant obtenu par hémisynthèse à partir de la néohesperidine, composé amer présent dans la peau de différents fruits du genre Citrus (DuBois *et al.*, 1977). De même, la stéréochimie des molécules influence considérablement leur activité gustative, au même titre que leurs propriétés biologiques.

Devant la versatilité apparente du caractère édulcorant des molécules, différents modèles prédictifs ont été successivement proposés afin de tenter de déterminer les conditions structurales du goût sucré (figure 2). Le plus ancien de ces modèles, appelé « AH-B », fut publié par Shallenberger et Acree (1967) ; il affirme qu'un édulcorant doit contenir un

donneur et un accepteur de liaison hydrogène. Ce modèle fut ensuite discuté ou révisé par de nombreux auteurs, parmi lesquels on peut citer Kier (1972), Temussi *et al.* (1978, 1984, 1991), Iwamura (1981), Nofre et Tinti (1996), Eggers *et al.* (2000), ou bien encore Goodman *et al.* (2002). Ces différents travaux ont en outre mis en avant les limites de l'approche prédictive ; l'existence d'un fort déterminisme moléculaire à la perception sensorielle nous apparaît en ce sens relativement incertaine.



**Figure 2** - Deux exemples de modèles du récepteur sucré.

Selon Shallenberger et Acree en 1967 (a), les interactions récepteur/soluté nécessitaient la présence d'un donneur et d'un accepteur de liaison hydrogène chez les deux partenaires. Pour Nofre et Tinti en 1996 (b), le récepteur est constitué de huit sites réactifs, pouvant interagir partiellement ou en totalité avec l'édulcorant par liaisons ionique, hydrogène et par interactions stériques.

## B) Les composés à saveur sucrée dans les vins secs : état de l'art

Parmi les centaines de composés du vin documentés dans la littérature, certains possèdent une saveur sucrée.

### 1) Oses

#### a) Hexoses

Les deux hexoses principaux des vins sont le D-glucopyranose et le D-fructofuranose. Présents dans les moûts à des concentrations usuelles variant de 160 à 350 g/L, ces sucres sont transformés en éthanol au cours de la fermentation alcoolique réalisée par les levures de vinification (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998b).

Dans le cas de l'élaboration des vins liquoreux, les concentrations élevées (plusieurs centaines de g/L) de glucose et de fructose dans le raisin ne sont que partiellement fermentées ; on trouve ainsi les deux hexoses à des concentrations pouvant varier de quelques

dizaines à quelques centaines de g/L. Ils sont majoritairement responsables du caractère sucré des vins moelleux ou liquoreux.

Dans le cas des vins secs, les teneurs en glucose et fructose en fin de fermentation alcoolique sont faibles, généralement inférieures à 1 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998a).

Les pouvoirs sucrants du glucose et du fructose sont respectivement de 0.7 et 1.4 et leurs seuils de perception dans les vins se situent aux alentours de 4 à 5 g/L. Ainsi, ces deux molécules sont présentes à des concentrations nettement inférieures à leur seuil de perception dans les vins secs. Les hexoses ne participent donc pas à la sucrosité des vins secs.

### *b) Autres sucres*

Divers autres sucres non fermentescibles sont présents dans les vins secs, particulièrement des pentoses (arabinose et xylose majoritairement) provenant de la dégradation des parois végétales, mais aussi des diholosides, comme le saccharose ou le tréhalose, provenant respectivement du raisin et des levures. L'ensemble de ces sucres sont présents en très faibles quantités, excédant rarement quelques centaines de mg/L. Compte tenu de leur faible pouvoir sucrant, leur impact sur la sucrosité des vins est considéré comme négligeable.

## **2) Ethanol et polyols**

### *a) Ethanol et glycérol*

Ces deux molécules sont, outre l'eau, les composés majoritaires des vins secs. Elles sont essentiellement formées au cours de la fermentation alcoolique des hexoses par *Saccharomyces cerevisiae*. L'éthanol est un métabolite primaire de la fermentation, présent à des teneurs comprises entre 12 et 14 % vol dans la plupart des vins secs. En moyenne, 16 à 18 g/L de sucre sont nécessaires pour augmenter le degré alcoolique de 1 % vol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998b).

Le glycérol est un métabolite secondaire, formé essentiellement au début de la fermentation alcoolique (voie glycéropyruvique). Sa concentration finale varie en fonction des conditions fermentaires ; elle est généralement comprise entre 5 et 10 g/L dans les vins secs.

Plusieurs auteurs ont décrit le goût sucré de l'éthanol et du glycérol en solution aqueuse (Berg *et al.*, 1955; Peynaud, 1980; Cardello *et al.*, 1984; Scinska *et al.*, 2000; Blizard, 2007), mais aussi l'amertume et le caractère brûlant associé à l'éthanol (Thorngate, 1997; Scinska *et al.*, 2000; Blizard, 2007).

On prête fréquemment à l'éthanol et au glycérol un rôle sur la sucrosité des vins secs. Néanmoins, les études sur ce sujet sont contradictoires.

Selon Peynaud (1980), seul l'éthanol aurait un effet significatif sur la saveur sucrée, sans toutefois que les conditions de l'expérimentation soient précisées. Noble et Bursick (1984) ont montré que le glycérol à hauteur de 10 g/L provoque une augmentation significative de sucrosité dans un vin blanc californien.

En revanche, des études plus récentes (Gawel *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008) montrent que l'éthanol et le glycérol n'influencent pas la sucrosité de vins modèles et de Riesling australiens.

Ainsi, l'impact sensoriel de ces composés n'est pas clairement établi.

#### *b) Autres polyols*

D'autres polyols en C4 (butanediol et érythritol), en C5 (arabitol) et en C6 (mannitol, sorbitol, *meso*-inositol) sont présents dans les vins, à faible concentration (de l'ordre de quelques dizaines de mg/L). Compte tenu de leur faible pouvoir sucrant, ces composés n'interviennent pas dans la sucrosité des vins secs.

### **3) Nucléotides**

Certains nucléotides, comme le guanosine monophosphate (5'-GMP) ou l'inosine monophosphate (5'-IMP) sont connus pour être de puissants exhausteurs de goût, notamment du sucré (Nagodawithana, 1992; Fuke & Ueda, 1996; Kawai *et al.*, 2002).

Ces composés peuvent être libérés dans le vin par dégradation de l'ARN au cours de l'autolyse des levures : leur présence a été établie dans divers vins de Champagne par (Aussenac *et al.* (2001). Charpentier *et al.* (2005) ont montré que les nucléotides étaient présents dans les vins à des concentrations au mieux 40 fois inférieures à leur seuil de perception. En outre, les auteurs ont montré que l'addition de 5'-IMP et de 5'-GMP au niveau de leur seuil de perception dans les vins n'engendrait pas de modification significative de la sucrosité.

Par conséquent, les nucléotides sont sans effet sur la saveur sucrée des vins secs.

### **4) Polysaccharides**

Les polysaccharides présents dans les vins secs proviennent du raisin et de l'autolyse des levures. Des propriétés édulcorantes ont parfois été prêtées à ces composés

macromoléculaires, sans argument scientifique. Des travaux ont certes montré que les polysaccharides pouvaient interagir avec les composés phénoliques et conduire à une diminution de la sensation d'astringence tout en augmentant la « rondeur » (Escot *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006; Guadalupe *et al.*, 2007). Néanmoins, une étude récente menée par Jones *et al.* (2008) affirme que les polysaccharides n'ont aucun effet sur la sucrosité d'un vin modèle, confirmant ainsi des études antérieures (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998a).

L'influence des polysaccharides sur la saveur sucrée et leur pouvoir édulcorant sont donc négligeables.

Ainsi, de nombreux composés à saveur sucrée sont présents dans les vins secs, mais leurs concentrations sont nettement inférieures à leur seuil de perception. A notre connaissance, aucun édulcorant (ou exhausteur de sucrosité) intense n'a à ce jour été identifié dans les vins secs.

## **II) Perception de la sucrosité par les dégustateurs**

### **A) Diversité des perceptions sucrées**

De nombreux composés possèdent un goût décrit comme sucré. Un seul descripteur est ainsi associé à des molécules de nature chimique très différente. Cette réduction sémantique ne traduit pas la diversité des perceptions sensorielles et la variabilité de la sensibilité des dégustateurs à ces divers édulcorants.

#### **1) Le langage du goût**

Alors que les dégustateurs ont à leur disposition un grand nombre de descripteurs associés aux sensations olfactives, le vocabulaire propre au goût se limite la plupart du temps aux quatre saveurs : acide, amer, sucré et salé. Pourtant, les hommes ne se sont pas toujours limités à ces quatre qualités gustatives : Aristote distinguait « *dans les saveurs comme dans les couleurs, d'une part les espèces simples qui sont les contraires, à savoir le doux et l'amer, d'autre part les espèces dérivées, soit du premier comme l'onctueux, soit du second comme le salé, enfin, l'intermédiaire entre ces dernières saveurs, l'aigre, l'âpre, l'astringent et l'acide* ». Au XVIII<sup>ème</sup> siècle, Linné décrivait quant à lui dix qualités gustatives. En 1825, dans son célèbre ouvrage Physiologie du goût, Brillat-Savarin affirmait encore davantage la

complexité des perceptions gustatives : « *Le nombre des saveurs est infini, car tout corps soluble a une saveur spéciale, qui ne ressemble entièrement à aucune autre* ».

Ce n'est qu'en 1864 que Fick proposa pour la première fois une classification du goût en quatre catégories, catégories que le chimiste Cohn considéra en 1914 comme des modalités isolées. Il fut contesté en 1916 par le psychologue Henning, qui affirma l'existence d'un continuum gustatif organisé entre les quatre saveurs fondamentales (Faurion, 1988).

Néanmoins, ce concept des quatre goûts élémentaires s'imposa dans le langage courant, même si une cinquième saveur, l'umami (représentée par le goût du monoglutamate de sodium), est aujourd'hui assez fréquemment reconnue.

Dans de nombreux travaux, Faurion et MacLeod (1980, 1982, 1988) ont mis en évidence plus récemment les limites de cette schématisation lexicale. Rejoignant en ce sens les observations de Brillat-Savarin, ils ont démontré l'existence d'une infinité de saveurs réparties dans un espace sensoriel pouvant être défini par les quatre goûts élémentaires. A titre d'exemple, le saccharose et l'aspartame, bien qu'étant décrits tous deux comme « sucrés », sont en effet différenciables et reconnaissables : leur goût est unique et ne saurait être confondu l'un avec l'autre. Il en va de même pour l'ensemble des édulcorants, regroupés sous la saveur élémentaire « sucrée », mais présentant tous un goût qui leur est propre. La réduction sémantique imputable en partie, comme évoqué plus haut, à une imprécision épistémologique est regrettable. En effet, sur la base des théories de certains penseurs (Hegel notamment) qui affirment que la complexité de la pensée augmente avec la richesse du langage, on peut imaginer qu'un vocabulaire étoffé permettrait une plus grande précision dans l'expression des ressentis, donc dans la perception gustative elle-même.

## **2) L'origine du goût : le récepteur du goût sucré**

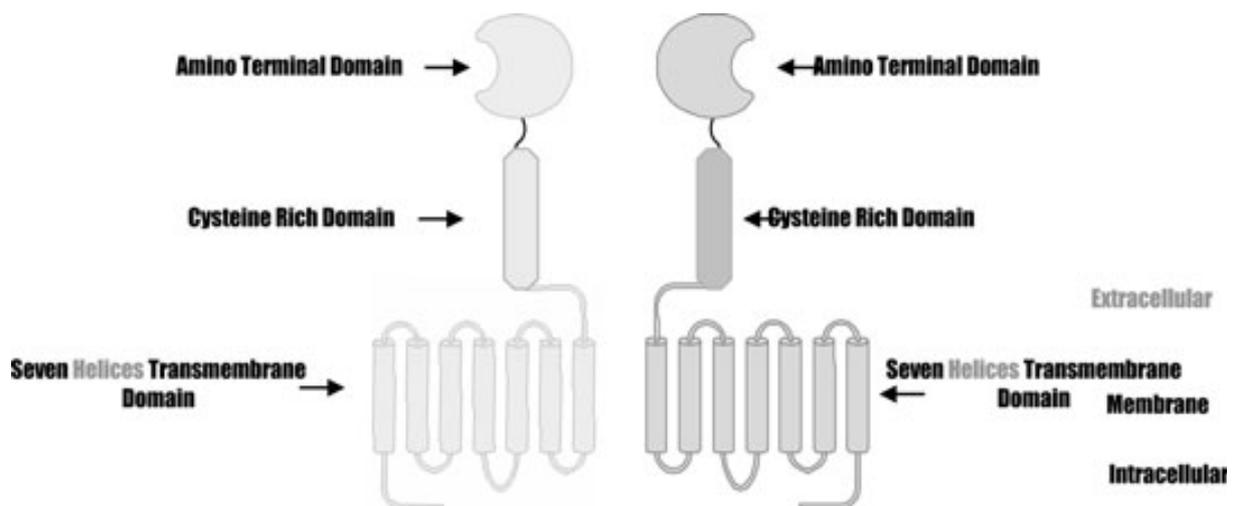
Préalablement à la découverte du récepteur du goût sucré, de nombreuses études se sont attachées à la modélisation de ce dernier ainsi qu'au mécanisme de la perception, à partir de l'analyse du comportement des dégustateurs face à divers édulcorants. Ces travaux physiologiques et psychophysiques ont suggéré l'existence de plusieurs types de récepteurs du sucré (Faurion *et al.*, 1980; Froloff *et al.*, 1996). Les composés sucrés présenteraient alors une faible spécificité et une faible affinité pour ces récepteurs, mais également pour les récepteurs aux autres saveurs élémentaires. La multitude des interactions supramoléculaires possibles entre ligands et récepteurs permettrait une grande combinatoire, à l'origine de l'infinité de l'espace sensoriel du goût et de la genèse d'une image gustative unique pour chaque composé.

Cette théorie expliquerait ainsi l'origine du continuum des saveurs, mais aussi la très grande disparité des édulcorants en termes de nature chimique et de taille moléculaire.

Le récepteur du goût sucré a été identifié en 2001 (Bachmanov *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Max *et al.*, 2001; Montmayeur *et al.*, 2001; Sainz *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Temussi, 2006).

Il s'agit d'un récepteur métabotrope couplé à une protéine G, constitué de deux hétérodimères appelés T1R2 et T1R3. De façon simplifiée, ces dimères existent sous deux formes, ouverte et fermée, et possèdent trois domaines (figure 3) : une vaste partie extracellulaire amino-terminale (notée ATD ou NTD), un domaine riche en cystéine (CRD) et un domaine transmembranaire formé de sept hélices (7TMD).

Ces récepteurs métabotropes possèdent ainsi plusieurs sites distincts permettant la fixation des différents types d'édulcorants (tableau 1). Ils semblent en outre présenter un comportement allostérique à l'origine de fortes synergies (Galindo-Cuspinera *et al.*, 2006; Meyers & Brewer, 2008)



**Figure 3** - Représentation schématique du récepteur au goût sucré T1R2-T1R3 incluant les domaines ATD, CRD et 7TMD (adapté de Cui *et al.*, 2006 et Meyers & Brewer, 2008).

Ainsi, il n'existerait pas plusieurs récepteurs du goût sucré, mais plusieurs sites de fixation sur le même récepteur, impliquant des voies transcriptionnelles différentes.

Des mécanismes moléculaires sophistiqués semblent en effet à l'origine de la grande complexité de la perception gustative de chaque individu.

**Tableau 1** - Modalités de fixation de quelques édulcorants non protéiques usuels avec le récepteur au goût sucré (adapté de Meyers et Brewer, 2006)  
Les sites préférentiels sont mentionnés en gras.

Edulcorant	Site(s) de fixation
Saccharose	T1R2 NTD, <b>T1R3 NTD</b>
Glucose	<b>T1R2 NTD</b> , T1R3 NTD
Acesulfame-K	T1R2 NTD, T1R3 NTD
Cyclamate	<b>T1R3 7TMD</b>
Néohesperidine dihydrochalcone	T1R3 7TMD
Aspartame	T1R2 NTD
Néotame	T1R2 NTD

### 3) Etude des sensibilités croisées

Nous avons vu que différents types d'interactions supramoléculaires entre ligands et récepteurs gustatifs génèrent une image sensorielle unique pour chaque composé. Il nous a semblé intéressant d'étudier les sensibilités individuelles d'un panel entraîné à la dégustation œnologique vis à vis d'édulcorants de nature différente.

Le panel est constitué de 41 étudiants en fin de deuxième année du diplôme national d'œnologue. Leur sensibilité a été établie pour 3 composés sucrés : le saccharose, l'aspartame et la néohesperidine dihydrochalcone (NHDC), présentés chacun dans l'eau à 4 concentrations différentes suivant une croissance géométrique (saccharose : 1, 2, 4, 8 g/L ; aspartame : 5, 10, 20 40 mg/L ; NHDC : 0.25, 0.5, 1 et 2 mg/L). Pour chaque concentration, un test à choix forcé de 1 parmi 3 (**ISO 13301:2002**) est proposé aux dégustateurs. Le traitement des résultats se fait par concentrations décroissantes ; dès qu'une erreur est notée, le niveau de sensibilité attribué est le rang de la dernière concentration correctement trouvée. Par la suite, une analyse par corrélation de Spearman est effectuée entre les rangs attribués par les différents dégustateurs aux trois molécules.

Les résultats montrent qu'aucun coefficient de corrélation ne dépasse 0.3 entre deux molécules différentes. Cela signifie qu'il n'existe pas de corrélation de sensibilité : les dégustateurs les plus sensibles à un édulcorant ne sont pas forcément les plus sensibles à un autre. Ces résultats confirment ceux obtenus par Faurion *et al.* (1980) sur un panel non entraîné à la dégustation de vin : on ne peut prévoir la sensibilité d'un individu à un composé sucré sur la base de sa sensibilité à un autre édulcorant.

Cette absence de sensibilité croisée nécessite donc une approche de la perception de la sucrosité molécule par molécule, et laisse envisager une forte variabilité interindividuelle.

## B) La perception de la saveur sucrée par les dégustateurs : étude dans quelques vins secs

En marge des différences interindividuelles prévisibles, nous avons voulu étudier de façon préliminaire la perception de la sucrosité de quelques vins par les dégustateurs.

Le panel est constitué de 35 étudiants en fin de scolarité du diplôme national d'œnologie. Il leur a été demandé de noter, sur une échelle discrète de 1 à 7, la sucrosité de 6 vins rouges, de l'appellation Saint-Julien. Il s'agissait de 3 cuvées : les châteaux Ducru-Beaucaillou et Lagrange, ainsi que les Fiefs de Lagrange, second vin du château Lagrange. Ces vins étaient présentés sur 2 millésimes : 2002 et 2003. Les teneurs en glucose+fructose des six vins sont inférieures à 500 mg/L.

Le traitement statistique des résultats a été effectué par analyse de variance à 2 variables, complétée par un test post-hoc de Duncan.

Les résultats montrent un effet *vin* largement significatif ( $P=10^{-23}$ ) et un effet *sujet* négligeable ( $P=0.2$ ). Cela signifie d'une part que les dégustateurs détectent des différences nettes de sucrosité entre les différents vins, et d'autre part que le jugement interindividuel est cohérent : sur cette expérience, un consensus se dégage entre les individus quant au jugement de la sucrosité.

En outre, le test post-hoc de Duncan permet de montrer que les deux millésimes de Fiefs de Lagrange constituent un groupe indépendant : leur sucrosité est jugée significativement inférieure ( $P<0.05$ ) à celle de tous les autres vins, mais ils ne sont pas distingués entre eux.

Ces données, qui mériteraient d'être étoffées dans le cadre d'une étude statistique de plus grande ampleur, mettent en évidence que ce panel de dégustateurs a été capable de hiérarchiser de façon cohérente les vins proposés en fonction du critère « sucrosité ». Une étude plus approfondie pourrait montrer une éventuelle influence du degré d'expertise du panel sur la cohérence de son jugement, mais aussi l'incidence du type de vin sur la capacité de hiérarchisation des dégustateurs.

Néanmoins, les résultats obtenus au cours de cette étude préliminaire suggèrent que la saveur sucrée des vins secs constitue une réalité sensorielle objective pour des dégustateurs expérimentés. L'origine moléculaire de cette sensation demeure pour autant inconnue dans les

vins secs. Nous avons vu précédemment que le rôle organoleptique imputé à l'éthanol et au glycérol dans la littérature demeurait fort contesté.

### **III) Etude de l'addition d'éthanol et de glycérol dans des vins (rouge et blanc)**

Afin d'étudier le rôle de l'éthanol et du glycérol sur la perception de la sucrosité, des quantités connues de ces composés ont été additionnées à un vin blanc et à un vin rouge. Les modalités obtenues ont été proposées à un panel de dégustateurs dans le cadre d'un test de classement.

#### **A) Méthodologie de l'analyse sensorielle**

##### **1) Test de classement par rangs**

Ce protocole d'analyse sensorielle, correspondant à la norme AFNOR **ISO 8587:2006**, repose sur la présentation simultanée de plusieurs échantillons anonymes et codés à un panel. Il est demandé aux sujets de classer les échantillons par ordre croissant d'intensité d'un critère spécifié. Tous les échantillons doivent être ordonnés strictement.

Le traitement statistique utilisé dépend de la nature des échantillons. Le test de Page est préconisé (Page, 1963) lorsqu'il existe entre les modalités un ordre *a priori* prévisible, comme c'est le cas lors de l'ajout de quantités différentes mais connues d'un composé à un même vin de base.

Il s'agit d'un test non paramétrique.  $p$  modalités sont classées par ordre croissant d'intensité par les  $n$  sujets. Pour chacun d'entre eux, un chiffre de 1 à  $p$  est attribué aux différentes modalités, dans l'ordre de leur classement (1 à la modalité jugée comme la moins intense,  $p$  à la plus intense).

Les sommes de rangs sont ensuite calculées pour chaque échantillon à partir des notes attribuées par les  $n$  dégustateurs. On les note  $R_1, R_2...R_p$ , sachant que l'ordre est déterminé par la hiérarchie supposée entre les modalités et non par le classement réel ( $R_1$  est définie comme la somme des rangs de la modalité considérée comme la moins intense a priori,  $R_2$  la deuxième moins intense, etc...). On calcule ensuite les variables  $L$  et  $L'$ , définies ci-dessous.

$$L = \sum_{i=1}^p i.R_i$$

La notion d'ordre prédéterminé est en effet prise en compte dans le calcul de  $L$  (pondération de  $R_i$  par  $i$ )

$$L' = \frac{12L - 3n.p.(p + 1)^2}{p.(p + 1).\sqrt{n.(p - 1)}}$$

La significativité du test est déterminée par la valeur de  $L'$

Le test est ainsi considéré comme significatif (c'est-à-dire que les modalités sont jugées globalement différentes par les dégustateurs)

- au risque de 5 % si  $L' \geq 1.645$
- au risque de 1 % si  $L' \geq 2.326$

## 2) Conditions et modalités de l'analyse sensorielle

Deux sessions distinctes ont été organisées.

La session 1, en avril 2009, rassemblait 38 étudiants du Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation, tous professionnels du vin. Le vin de base était un Bordeaux rouge 2007, élevé en cuve en inox.

La session 2, en mai 2010, rassemblait 47 étudiants en seconde année du Diplôme National d'œnologie. Le vin de base était un Bordeaux blanc 2008, élaboré en cuve en inox.

Dans les deux cas, les dégustateurs étaient formés et entraînés à la dégustation du vin.

Les caractéristiques analytiques des vins utilisés sont mentionnées dans le tableau 2.

**Tableau 2** - Caractéristiques analytiques des vins de base utilisés pour l'analyse sensorielle.

Session	Session 1	Session 2
Type de vin	Bordeaux rouge 2007	Bordeaux blanc 2008
Titre alcoométrique volumique (à 20°C)	12.2 %	12.0 %
Concentration en glycérol	6.9 g/L	5.8 g/L
Concentration en D-glucose + D-fructose	0.37 g/L	0.54 g/L

Pour chaque session, deux séries ont été proposées aux dégustateurs : l'une consistant en des ajouts d'éthanol, l'autre en des ajouts de glycérol. Ces composés ont été ajoutés dans les vins de base, une heure avant la dégustation (voir tableau 3). Les modalités obtenues pour chaque série ont été rendues anonymes par un code à 3 chiffres, puis proposées simultanément aux dégustateurs dans un ordre aléatoire et variable en fonction des postes, afin d'éviter

d'éventuels artefacts liés à l'ordre de la dégustation. La dégustation s'est déroulée dans la salle d'analyse sensorielle de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, climatisée à 20°C et équipée de postes individuels. Les deux séries (éthanol et glycérol) ont été dégustées successivement dans des verres AFNOR en verre blanc, une pause de 10 minutes séparant les deux tests. La fiche de dégustation type utilisée est reportée en annexe.

**Tableau 3** - Modalités préparées pour l'analyse sensorielle de l'influence de l'éthanol et du glycérol sur la perception de la sucrosité.

	Modalité	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Session 1	Quantité d'éthanol ajoutée (teneur finale)	Témoin (12.2 %)	+ 0.5 % (12.7 %)	+ 1 % (13.2 %)	+ 1.5 % (13.7 %)
	Quantité de glycérol ajoutée (teneur finale)	Témoin (6.9 g/L)	+ 1 g/L (7.9 g/L)	+ 3 g/L (9.9 g/L)	+ 5 g/L (11.9 g/L)
Session 2	Quantité d'éthanol ajoutée (teneur finale)	Témoin (12.0 %)	+ 0.5 % (12.5 %)	+ 1 % (13.0 %)	+ 1.5 % (13.5 %)
	Quantité de glycérol ajoutée (teneur finale)	Témoin (5.8 g/L)	+ 1 g/L (6.9 g/L)	+ 3 g/L (8.8 g/L)	+ 5 g/L (10.8 g/L)

## B) Résultats

### 1) Effet de l'éthanol et du glycérol sur la sucrosité des vins rouges

La dégustation des vins rouges correspond à la session 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4** - Résultats de la session 1 interprétée par le test de Page.

Facteur étudié	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$L$	$L'$	Résultat
Ethanol	98	88	94	100	956	0.34	Non significatif
Glycérol	89	93	99	99	968	1.01	Non significatif

La statistique de Page permet de conclure que le test n'est pas significatif, au risque de 5 %, pour chacun des deux composés. Pour l'éthanol, on voit que les sommes des rangs ne sont pas croissantes de  $R_1$  à  $R_4$ . On observe bien cette évolution dans le cas du glycérol, mais les écarts sont très faibles. Les valeurs de  $L'$ , nettement inférieures à la valeur critique (1.645) indiquent que les dégustateurs n'ont pas été capables de classer les vins de façon significative en fonction de leur sucrosité.

## 2) Effet de l'éthanol et du glycérol sur la sucrosité des vins blancs

La dégustation dans les vins blancs correspond à la session 2. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5** - Résultats de la session 2 interprétée par le test de Page.

Facteur étudié	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$L$	$L'$	Résultat
Ethanol	104	123	117	126	1205	1.52	Non significatif
Glycérol	118	106	119	127	1195	1,01	Non significatif

De façon similaire à la session 1, le test réalisé n'est significatif ni pour l'éthanol ni pour le glycérol. Certes, la valeur de  $L'$  est assez proche du seuil dans le cas de l'éthanol, mais on voit également que la croissance des sommes de rangs est en désaccord avec un effet de ce composé sur la sucrosité :  $R_3$  est inférieure à  $R_2$ . Les dégustateurs n'ont donc pas pu classer de façon significative les différentes modalités de vin blanc en fonction de leur sucrosité.

## C) Discussion

Cette étude apporte de nouveaux résultats concernant l'influence de l'éthanol et du glycérol sur la perception de la sucrosité dans les vins secs.

Les vins de base utilisés présentent des concentrations faibles en glucose+fructose, bien inférieures aux seuils de perception ; il s'agit bien de vins secs. Les ajouts d'éthanol et de glycérol impliquent une dilution maximale de 1.5 % : elle est considérée comme négligeable.

Les quantités ajoutées aux différentes modalités leur confèrent des concentrations en éthanol allant de 12.2 % à 13.7 % pour le vin rouge et de 12 % à 13.5 % pour les vins blancs. Ces valeurs couvrent une gamme de degrés alcooliques qui inclut la plupart des vins français (notamment des grands vins) dans les millésimes classiques. Les concentrations de glycérol des modalités 4 (11.9 et 10.8 g/L) peuvent être considérées comme des majorants des valeurs rencontrées dans la quasi-totalité des vins secs. Les modalités choisies permettent donc d'étudier l'influence des deux composés dans la limite des variations de concentration observées dans les vins secs.

Les panels utilisés sont entraînés à la dégustation des vins et leur jugement peut être considéré comme robuste. La fiabilité de leur réponse avait toutefois été préalablement évaluée à l'aide d'un test de classement par ajout d'un édulcorant (NHDC) dans un vin blanc,

à des teneurs de 1, 2 et 4 mg/L. Pour les deux panels, le résultat est très nettement significatif au seuil de 1 % ( $L' > 4$ ).

Les tests effectués après addition d'éthanol et de glycérol montrent que les dégustateurs n'ont pas pu classer les différentes modalités de façon significative, ni pour le vin rouge, ni pour le vin blanc. Ainsi, l'ajout de ces deux molécules n'a impliqué aucune modification nette de la sucrosité perçue dans les vins utilisés.

Cette étude corrobore les résultats de travaux publiés précédemment (Gawel *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008). Néanmoins, on peut noter que, dans le cas du vin blanc, un écart important est noté entre les modalités « éthanol » 1 et 2. Le passage du titre alcoolimétrique de 12 % à 12.5 % semble s'accompagner d'une augmentation de la saveur sucrée. Toutefois, le test n'est pas statistiquement significatif dans son ensemble et il apparaît délicat de tirer des conclusions sur la base de cette seule observation, qui n'est d'ailleurs pas répétée dans le cas du vin rouge. En outre, il est possible que le glycérol développe une saveur sucrée à des concentrations plus élevées (15 à 20 g/L), mais ces teneurs ne sont rencontrées que dans les vins liquoreux, dans lesquels la sucrosité possède des déterminants moléculaires clairs et bien définis : le glucose et le fructose.

En conclusion, l'analyse sensorielle a permis de montrer que l'éthanol et le glycérol ne possèdent pas d'impact sur la sucrosité dans les conditions décrites. Il est possible qu'un effet matrice existe et que ces résultats puissent être légèrement modifiés en utilisant des vins de base différents. Toutefois, au regard des faibles variations de concentrations fréquemment observées dans des vins présentant des écarts nets de saveur sucrée, le rôle de l'éthanol et du glycérol sur la sucrosité des vins secs nous semble très limité.

## **Conclusion**

Ce premier chapitre a permis d'exposer quelques aspects sensoriels de la perception sucrée qui constitue une sensation gustative particulièrement complexe. En dépit de la réalité sensorielle du concept de sucrosité dans les vins secs, les déterminants moléculaires de cette saveur n'ont jamais été identifiés. Nous avons montré que le rôle sucrant de l'éthanol et du glycérol était fort limité et ne permettait pas d'expliquer des différences de perception nettes et bien décrites par les dégustateurs. Ces observations suggèrent l'existence dans les vins de composés augmentant la sucrosité. La détermination de leur origine constitue un des enjeux de cette thèse.

## Chapitre 2 - Effet des macromolécules de levures sur la sucrosité des vins. Mise en évidence du rôle de la protéine Hsp12

### **Introduction**

Au cours de l'autolyse des levures, diverses modifications organoleptiques sont observées dans les vins. Lors de l'élaboration des vins rouges, l'autolyse correspond à la phase de macération post-fermentaire, durant laquelle les praticiens constatent une nette augmentation de la sucrosité.

En utilisant une approche basée sur des techniques sensorielles et biomoléculaires, nous étudierons dans un premier temps l'effet des lies de levures sur la perception de la sucrosité des vins, puis nous tenterons de comprendre ce phénomène en mettant en évidence le rôle clé d'une protéine de la levure.

### **I) Aperçu de l'importance œnologique des lies de levures et de l'autolyse**

#### **A) Lies et autolyse**

La plupart des boissons fermentées, en particulier le vin, subissent une période de contact avec les lies de levures à la fin du processus fermentaire. Les lies sont constituées en majeure partie de microorganismes (essentiellement les levures de fermentation alcoolique) ainsi que de résidus organiques provenant du raisin. Sous l'effet d'enzymes endogènes, des substances cellulaires sont solubilisées après la mort des levures. Il s'agit de l'autolyse des levures (Arnold, 1981).

On distingue trois modalités principales d'autolyse des levures.

Dans le cas des vins blancs conservés sur lies, elle se déroule au cours de l'élevage, sur une durée longue (plusieurs mois), à température basse (variable en fonction des caves, de 10 à 18-20°C).

Dans le cas des vins rouges, l'autolyse correspond dans la plupart des cas à la macération post-fermentaire. Elle a lieu en cuve, pendant une durée courte (de 5 à 15 jours environ, selon le type de vin) et à température plus élevée (de 25 à 30°C voire davantage).

Enfin, pour les vins effervescents, l'autolyse se déroule essentiellement en bouteille, après la seconde fermentation. La température est basse et la durée variable, pouvant aller jusqu'à plusieurs années (dégorgement tardif).

Le contact avec les lies ainsi que la libération de substances de la levure engendrent de nombreuses modifications physico-chimiques et organoleptiques du vin. Ces modifications ont fait l'objet de nombreuses études (Pérez-Serradilla & de Castro, 2008) et nous pouvons en citer quelques exemples.

Les mannoprotéines libérées au cours de l'autolyse inhibent la cristallisation de l'hydrogénéotartrate de potassium et augmentent ainsi la stabilité tartrique des vins (Moine-Ledoux *et al.*, 1997). Ces macromolécules améliorent également la stabilité protéique (Moine-Ledoux & Dubourdieu, 1999), diminuent la sensibilité des vins au rosissement oxydatif ou « pinking » (Dubourdieu, 1995; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998) et ralentissent l'agrégation des tanins (Riou *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'élevage sur lies des vins blancs modifie l'expression aromatique, notamment l'arôme boisé, en réduisant les teneurs de vanilline (Chatonnet *et al.*, 1992) et en favorisant la formation de furanemethanethiol (Tominaga *et al.*, 2000).

Les lies peuvent également conduire à l'apparition d'odeurs de réduction, via l'activité sulfite réductase résiduelle des levures (Lavigne, 1998) ou au contraire à leur élimination en raison de l'aptitude des mannoprotéines pariétales à fixer les composés soufrés par liaisons disulfures (Lavigne & Dubourdieu, 1996).

Parallèlement, on observe que les lies préservent l'arôme fruité des vins et préviennent en partie les risques d'oxydation. Cet effet protecteur est vraisemblablement lié à leur capacité à fixer l'oxygène dissous (Fornairon *et al.*, 1999) et à libérer du glutathion au cours de l'autolyse (Lavigne-Cruège & Dubourdieu, 2002; Lavigne *et al.*, 2007).

Certains peptides présents dans le vin à l'issue de l'autolyse des levures possèdent des propriétés biologiques remarquables. Des composés inhibant la formation d'un puissant vasoconstricteur ont été identifiés et jouent ainsi un rôle dans la diminution de l'hypertension (Takayanagi & Yokotsuka, 1999; Alcaide-Hidalgo *et al.*, 2007; Pozo-Bayon *et al.*, 2007).

Yiannikouris *et al.* (2003) ont également montré que les lies étaient capables d'adsorber l'ochratoxine A, une mycotoxine cancérigène produite par divers champignons microscopiques (*Aspergillus* et *Penicillium*). Cette propriété conduit à une diminution très nette des quantités de ce composé indésirable dans les vins.

## B) Effet de l'autolyse sur le goût du vin : approche empirique

Les modifications de l'arôme du vin au contact des lies ont été largement étudiées, comme rapporté ci-dessus. En revanche, peu d'études se sont intéressées au changement gustatif se déroulant au cours de l'autolyse ; celles d'Escott *et al.* (2001) et Vidal *et al.* (2004) ont néanmoins montré une diminution de l'astringence des vins rouges, imputable aux polysaccharides libérés.

Toutefois, les praticiens observent un gain de sucrosité au cours de la macération post-fermentaire des vins rouges et au cours de l'élevage sur lies des vins blancs.

Le rôle éventuel des lies de levures dans ce phénomène et son interprétation moléculaire n'ont jamais été étudiés.

## II) Etude de l'effet de l'autolyse des levures sur la sucrosité

Afin d'étudier le rôle éventuel des lies sur la sucrosité, des quantités différentes de levures sont additionnées dans un même vin de base placé ensuite dans les conditions d'autolyse caractéristiques des vins rouges. Les différentes modalités sont proposées à un panel de dégustateurs sous forme d'un test de classement.

### A) Matériels et méthodes

#### 1) Culture des levures

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour cette étude est la Zymaflore Fx10 (société Laffort, France). Il s'agit d'une souche homothallique, homozygote, référencée comme H4-1D (Marullo *et al.*, 2009), utilisée essentiellement dans le cadre de la vinification des vins rouges en raison de sa bonne tolérance à la température.

Les levures sont déposées sur une boîte de Pétri contenant du milieu YPD (1% d'extrait de levures, 2% de peptone, 2% de D-glucose) solidifié avec 2 % d'agar. La boîte est conservée pendant 2 jours à 30°C, puis est utilisée afin d'inoculer 2 erlenmeyers contenant 20 mL de milieu YPD. Ce levain est agité à 28°C pendant 2 jours puis est additionné dans 2 litres de YPD répartis en 2 erlenmeyers. La culture des levures s'effectue sous agitation pendant 4 jours à 30°C afin d'obtenir une production maximale de biomasse. L'ensemble de la verrerie et les milieux utilisés ont été préalablement stérilisés à l'aide d'un autoclave (120°C, 20 min). A l'issue de la période de culture, le milieu est centrifugé à 4000 rpm pendant 15 minutes. Le

surnageant est éliminé et le culot, constitué des levures, est rincé par 400 mL d'eau milliQ, centrifugé dans les mêmes conditions puis repris dans 400 mL d'eau milliQ. Le nombre total de levures est déterminé par mesure de l'absorbance à 600 nm, en considérant qu'une unité d'absorbance équivaut à  $2.410^7$  cellule/ml.

Les volumes correspondant aux quantités de levures souhaitées sont prélevés et centrifugés à 4000 rpm pendant 15 minutes puis le surnageant est éliminé.

## 2) Autolyse dans un vin rouge

Le vin rouge utilisé pour cette étude est le Bordeaux rouge 2007 décrit au chapitre I, paragraphe III.A.2. Les culots de levures obtenus après centrifugation des volumes correspondant aux quantités souhaitées sont suspendus dans un litre de vin. Un flacon en verre de contenance adaptée, préalablement saturé en dioxyde de carbone, est rempli à l'aide de chaque modalité de vin ainsi obtenue. La variable de cette expérience est la quantité de levures. Les flacons sont placés dans une étuve à 32°C pendant 10 jours. Quatre modalités sont préparées : une modalité témoin, et trois modalités correspondant à des ajouts de levures à hauteur de  $2.10^8$ ,  $4.10^8$  et  $8.10^8$  cellules/mL respectivement.

Les levures sont remises en suspension une fois, après 5 jours.

A l'issue de cette période, les échantillons sont centrifugés à 4000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant (vin) est récupéré et conservé à 10°C sous atmosphère de dioxyde de carbone jusqu'à la dégustation, prévue le lendemain.

## 3) Analyse sensorielle

Deux expériences sont menées à partir d'échantillons préparés de façon similaire.

- Expérience 1 : test triangulaire

Le panel utilisé pour ce test est constitué de 25 dégustateurs travaillant dans les laboratoires de la Faculté d'œnologie et entraînés à la dégustation œnologique. La fiche de dégustation utilisée est présentée en annexe.

Deux modalités sont utilisées : le vin témoin et le vin +  $2.10^8$  cellules/mL.

Un test triangulaire (norme **ISO 4120 :2004**) est utilisé : les modalités sont servies à 16°C dans trois verres, l'une d'entre elles étant dupliquée. Des verres noirs de type AFNOR sont utilisés. L'ordre de présentation des verres est équilibré sur l'ensemble des individus. Il est demandé aux dégustateurs de préciser l'échantillon différent parmi les trois verres présentés.

Le traitement statistique est basé sur la loi binomiale : l'hypothèse initiale est l'identité entre les deux produits (hypothèse nulle nommée  $H_0$ , probabilité de réponse correcte  $p=1/3$ ). La probabilité de réalité de l'hypothèse initiale, notée  $P$ , est calculée comme suit :

$$P = \sum_{i=r}^n C_n^k p^k q^{(n-k)}$$

Avec  $r$  = nombre de réponses correctes  
 $n$  = nombre de sujets  
 $q = 1-p = 2/3$

Plus  $P$  est faible, moins l'hypothèse d'identité des modalités est vraisemblable. Les valeurs limites de significativité généralement adoptées sont 0.05 ; 0.01 et 0.001. Lorsque  $P$  est inférieure à ces valeurs, les échantillons sont considérés comme différents aux risques respectifs de 5 %, 1 % et 0.1 %.

- Expérience 2 : test de classement par rangs.

Le panel utilisé est constitué de 38 étudiants au Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation de l'Université Bordeaux 2.

Quatre modalités sont utilisées :

- Modalité 1 : vin témoin
- Modalité 2 : vin +  $2.10^8$  cellules/mL
- Modalité 3 : vin +  $4.10^8$  cellules/mL
- Modalité 4 : vin +  $8.10^8$  cellules/mL

Ces modalités sont présentées aux dégustateurs sous forme d'un test de classement par rangs, selon le critère de sucrosité. La méthodologie de l'analyse sensorielle est identique à celle décrite au chapitre 1, paragraphe III.A. Des verres AFNOR noirs sont utilisés.

L'existence d'une hiérarchie supposée entre les échantillons conduit à l'utilisation du test de Page pour l'interprétation statistique. Pour chaque dégustateur, la modalité perçue comme étant la moins sucrée est affectée du rang 1, la plus sucrée du rang 4. On calcule alors la somme des rangs (notées  $R1...R4$ ) pour les quatre modalités d'ajout de levures.

## B) Résultats obtenus

### 1) Test triangulaire

Au cours de l'expérience 1, quinze bonnes réponses ont été obtenues.

On calcule alors  $P = 0.006$ . On en déduit qu'au risque de 0.1 %, les échantillons ont été jugés comme significativement différents.

Par ailleurs, il a été demandé aux dégustateurs d'indiquer quel(s) échantillon(s) leur semblai(en)t posséder la sucrosité la plus intense. Sur les 15 personnes ayant trouvé la bonne réponse, 14 ont désigné la modalité correspondant à l'ajout de levures.

### 2) Test de classement par rangs

Les résultats obtenus au cours de l'expérience 2 sont rapportés dans le tableau 6 ci-dessous.

**Tableau 6** - Résultats de l'expérience 2 interprétée par le test de Page.

Facteur étudié	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$L$	$L'$	Résultat
Lies de levures	67	71	106	123	1019	3.87	Significatif à 0.1 %

La statistique de Page permet de conclure que le test est significatif au risque de 1 % : les échantillons ont été jugés globalement différents par les dégustateurs. On voit que les sommes de rangs augmentent avec les modalités, c'est-à-dire que la sucrosité perçue par les dégustateurs augmente avec la quantité de levures introduite.

Afin d'étudier la significativité entre les différentes modalités deux à deux, un test de Mann-Whitney a été appliqué (Siegel, 1956). Ce test non paramétrique nous indique que les modalités **1** et **2** ne sont pas distinguées entre elles au seuil de 0.1 %, de même que les modalités **3** et **4**. En revanche, ces deux groupes sont statistiquement distincts.

## C) Discussion

La culture des levures a été réalisée sur milieu YPD afin d'obtenir rapidement une quantité de biomasse importante. Les levures sont ajoutées dans des vins secs ; comme elles ne disposent pas de nutriments dans le milieu, elles n'ont aucune activité fermentaire et elles vont donc subir une autolyse. Après ajout des levures, les vins sont conservés à 32°C pendant

10 jours. Ces conditions reproduisent celles de la macération post-fermentaire de la vinification en rouge, favorables à l'autolyse des levures.

Par ailleurs,  $2.10^8$  cellules/mL est une teneur en levures qui peut être atteinte au cours d'une fermentation alcoolique se déroulant dans de bonnes conditions. Nous avons choisi d'ajouter cette quantité au cours de l'expérience 1 afin de reproduire les phénomènes se déroulant dans la pratique. La centrifugation des échantillons permet leur clarification et l'élimination des levures. Toutefois, afin d'éviter d'éventuels artefacts visuels, les verres noirs ont été utilisés pour la dégustation.

Les résultats du test triangulaire montrent une différence significative entre les échantillons : l'autolyse des levures modifie la perception organoleptique des vins. En outre, les dégustateurs ont perçu une sucrosité plus intense dans l'échantillon supplémenté en levures.

Le test de classement par rangs est également significatif au seuil de 0.1 % et montre que la sucrosité augmente avec la quantité de levures présente au cours de l'autolyse. Toutefois, l'utilisation du test de Mann Whitney montre que les modalités **1** et **2** n'ont pas été distinguées par les dégustateurs, contrairement au test triangulaire. Au-delà des différences de sensibilité pouvant exister entre les deux panels, le nombre d'échantillons dans le test de classement engendre probablement une certaine diminution des performances des dégustateurs.

Par ailleurs, il faut noter que l'autolyse s'est déroulée dans des vins ayant déjà subi une phase d'autolyse au cours de leur élaboration. En réalité, les modalités **1** et **2** comparent respectivement un vin témoin, ayant déjà subi une phase d'autolyse avant l'expérience, au même cru modifié par une deuxième autolyse réalisée au laboratoire. On peut imaginer que les différences gustatives entre les modalités **1** et **2** s'en trouvent limitées.

Ces deux expériences ont permis de relier de façon rigoureuse l'augmentation de sucrosité observée dans les vins au cours de la phase post-fermentaire avec l'autolyse des levures. Il apparaît en effet que la saveur sucrée des vins rouges augmente de façon significative avec la quantité de lies de levures présentes au cours de l'autolyse.

Ces résultats nouveaux suggèrent la libération de composés de la levure au cours de la phase d'autolyse, modifiant la perception gustative des vins secs.

### **III) Origine moléculaire de l'augmentation de la perception de sucrosité au cours de l'autolyse. Mise en évidence du rôle de la protéine Hsp12**

#### **A) Purification et identification d'une fraction sapide à partir d'un autolysat de levures**

L'étude présentée dans cette sous-partie a été réalisée par le Docteur Virginie Moine-Ledoux, directrice scientifique de la société Laffort (Moine, 2006; Marchal *et al.*, 2011). Par conséquent, nous ne décrirons pas en détail le matériel et les méthodes employés. En revanche, nous résumerons les principaux résultats obtenus, nécessaires à la compréhension des travaux que nous avons effectués par la suite.

##### **1) Isolation et purification d'une fraction peptidique sapide**

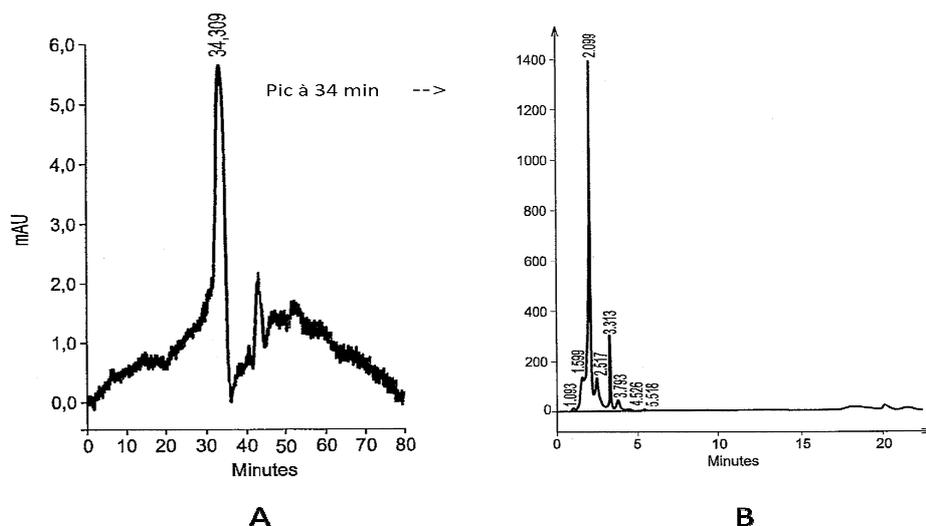
A partir d'un autolysat de levures obtenu en solution modèle hydro-alcoolique, des ultrafiltrations successives ont été effectuées, avec des seuils de coupure de 10, 3 et 0.5 kDa.

Les filtrats et rétentats obtenus ont été dégustés. La seule fraction sapide obtenue est celle comprise entre 0.5 et 3 kDa, décrite comme « douce » par les dégustateurs (Humbert, 2003).

La digestion protéique de cette fraction par action de la protéinase K conduit à une perte de ses propriétés gustatives. Ces résultats montrent ainsi qu'une fraction sapide est libérée au cours de l'autolyse des levures ; elle contient des composés de nature peptidique, dont la masse moléculaire est comprise entre 0.5 et 3 kDa.

##### **2) Caractérisation de la fraction sapide par LC-MS**

La fraction sapide obtenue par ultrafiltration a été purifiée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en utilisant successivement une colonne de tamisage moléculaire et une colonne de type C18 (figure 4). A chaque étape, le pic décrit comme « doux » a été collecté.



**Figure 4** - Chromatogrammes HPLC avec détection UV à 220 nm. A) fraction sapide 0.5 – 3 kDa sur colonne Superdex Peptide HR et b) pic collecté à 34 min injecté sur une colonne C18.

De nombreuses injections ont permis d'obtenir un échantillon sapide, qui a été lyophilisé puis repris dans un mélange eau/acétonitrile. Le surnageant a été prélevé (échantillon 1), puis le culot a été solubilisé dans une solution aqueuse d'acide formique à 0.1 % (échantillon 2). Ces deux échantillons ont été analysés en CLHP capillaire couplée à un spectromètre de masse de type trappe ionique (LC-MS/MS). Les données enregistrées ont été soumises à une base de données protéique restreinte à *Saccharomyces cerevisiae*. Les peptides observés et les protéines correspondantes sont mentionnés dans le tableau 7.

**Tableau 7** - Peptides observés en LC-MS/MS dans la fraction sapide et protéines associées.

Echantillon	Protéine	Peptide
Echantillon 1	Heat Shock Protein 12 kDa (Hsp12)	K.ASEALKPDSQKSYAEQGK.E
		K.ADKVAGKVQPEDNKGVFQGVHD.S
	Phosphoglycérate mutase 1 (Gpm1)	D.PEAAAAGAAAVANQGKK.-
		D.PEAAAAGAAAVANQGKK.-
		D.PEAAAAGAAAVANQGKK.-
	Facteur d'élongation alpha-1 (Tef1)	D.PEAAAAGAAAVANQGKK.-
		Y.YLDPEAAAAGAAAVANQGKK.-
Echantillon 2	Heat Shock Protein 12 kDa (Hsp12)	K.AGVVKGKTLLEA.I
		Y.KIGGIGTVPVGR.V
		K.ADKVAGKVQPEDNK.G
		K.ASEALKPDSQK.S
		K.ASEALKPDSQKSYAEQGK.E
		D.AVEYVSGRVHGEED.P

Des peptides issus de trois protéines de *S cerevisiae* ont donc été détectés en LC-MS/MS. Seule la protéine Hsp12 possède des fragments visibles dans les deux échantillons. *HSP12* est un gène de résistance au choc thermique de *Saccharomyces cerevisiae* (Praekelt & Meacock, 1990). Il code pour Hsp12, une protéine membranaire de 12 kDa (Sales *et al.*, 2000). Le gène *HSP12* est significativement surexprimé sous l'effet de la température, du stress oxydatif et de fortes concentrations d'éthanol et de glycérol (Varela *et al.*, 1995), ce qui correspond aux conditions usuelles de la vinification. Une étude récente a identifié Hsp12 parmi les protéines libérées dans le vin par les lies (Rowe *et al.*, 2010).

Par ailleurs, il est important de noter que l'analyse en spectrométrie de masse donne un aperçu non exhaustif des peptides présents dans les fractions analysées ; il est tout à fait possible que des peptides ne soient pas visibles en LC-MS/MS (suppression d'ions). Néanmoins, cette technique puissante fournit des résultats intéressants concernant l'origine moléculaire probable des composés sapides provenant de l'autolyse des levures. L'hypothèse qui avait été émise à la fin de ce travail était une contribution à la saveur sucrée de la protéine Hsp12 par l'intermédiaire de peptides issus de sa dégradation sous l'effet des enzymes endogènes de la levure. Nous avons étudié la validité de cette hypothèse en croisant des méthodes de biologie moléculaire et d'analyse sensorielle.

## B) Mise en évidence de l'effet de la protéine Hsp12 sur la sucrosité

Contrairement à la sous-partie précédente, les travaux présentés ici ont été réalisés dans le cadre de cette thèse, en collaboration avec le Docteur Philippe Marullo pour les aspects relatifs à la biologie moléculaire (Marchal *et al.*, 2011).

### 1) Matériel et méthodes

#### a) Souches et conditions de culture utilisées

Pour les expériences de clonage, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  a été utilisé et développé selon les conditions décrites par Sambrook *et al.* (1989). Les souches de levures utilisées, rappelées dans le tableau 8, ont été cultivées sur le milieu YPD solidifié décrit précédemment dans ce chapitre, au paragraphe II.A.1. Dans le cadre de la sélection des marqueurs génétiques KANM $x$ , BLER, et HYGR, les antibiotiques G418, phléomycine et hygromycine B (Sigma,

France) ont été utilisés aux concentrations finales respectives de 1 µg/mL, 1 µg/mL et 50 µg/mL.

**Tableau 8 - Souches de levures et plasmides utilisés**

Matériel biologique	Description	Origine
<b>Souches de levures</b>		
Fx10	Levure commerciale <i>HO/HO</i> entièrement homozygote (Zymaflore Fx10, Laffort)	Référencé comme H4-1D
RG1	F10 <i>HO::HYG<sup>R</sup></i> , <i>Mat a</i>	Aimablement fourni par le Pr. Richard Gardner
YPM32	Dérivé haploïde de Fx10, <i>HO::HYG<sup>R</sup></i> , <i>MATa</i>	Cette étude
YPM33	YPM32, <i>HSP12::LoxP::KANMX::LoxP</i> , <i>HO::HYG<sup>R</sup></i> , <i>MATa</i>	Cette étude
YPM34	YPM33, $\Delta^{\circ}HSP12$ , <i>HO::HYG<sup>R</sup></i> , <i>MATa</i>	Cette étude
YPM35	YPM33 x Fx10 spore, <i>HO/HO::HYG<sup>R</sup></i> , <i>HSP12</i> / $\Delta^{\circ}HSP12$	Cette étude
$\Delta^{\circ}hsp12$	Segregant méiotique de YPM35, <i>HO/HO</i> , $\Delta^{\circ}HSP12$ / $\Delta^{\circ}HSP12$	Cette étude
<b>Plasmides</b>		
pUG6		Aimablement fourni par le Pr. Bruno Blondin
pZEO		Aimablement fourni par le Pr. Bruno Blondin

Les transformations des levures ont été réalisées en utilisant la méthode de perméabilisation chimique décrite par Gietz *et al.* (1992). La souche « mutant zéro »  $\Delta^{\circ}hsp12$  a été construite en utilisant la technique de « short-flanking homology » développée par Güldener *et al.* (1996). Cette stratégie permet la délétion du gène *HSP12* en utilisant la cassette *loxP::kanMX::loxP*, qui peut être excisée sous l'effet de la recombinaise Cre.

La souche Fx10 étant diploïde, un dérivé haploïde (YPM32) a été construit afin de faciliter la mise en œuvre du système *loxP::kanMX::loxP*/recombinaise Cre. La cassette *HO::HYG<sup>R</sup>* a été amplifiée par PCR à partir des oligonucléotides p26: 5'AAATCGAAGACCCATCTGCT et p36: 5'GTCACGAAAAGTGATGTAAC ainsi qu'en utilisant l'ADN génomique de la souche RG1 comme matrice.

La souche YPM33 a été obtenue en transformant YPM32 avec la cassette *loxP::kanMX::loxP* contenant les séquences adjacentes du gène *HSP12*. Cette cassette a été amplifiée à partir du plasmide pUG6 et des oligonucléotides suivants :

p484 **gataatctcaaacaaacaactcaaaacaaaaaaaactaaatacaacaGCATAGGCCACTAGTGGATCTG;**

p485 **tcacacatcataaagaaaaaacatgtaactacaagagtccgaaagatCAGCTGAAGCTTCGTACGC.**

La transformation de YPM33 avec pZEO, avec excision de la cassette *loxP::kanMX::loxP* au niveau du locus de *HSP12*, conduit à la souche YPM34.

Enfin, le « mutant zéro »  $\Delta^{\circ}hsp12$  est obtenu par sélection du ségrégant méiotique approprié de YPM35. YPM35 provient du croisement de YPM34 et de spores de H4-1D en utilisant un micromanipulateur.

La construction génétique de toutes les souches a été vérifiée par PCR.

### b) Préparation des échantillons : autolyses parallèles

Les deux souches de levures Fx10 et  $\Delta^{\circ}hsp12$  sont cultivées séparément sur milieu YPD selon la méthode décrite au chapitre 2, paragraphe II.A.2. Chacune de ces deux souches est ensuite additionnée dans 1 litre de vin rouge de Bordeaux 2007 à hauteur de  $2.10^8$  cellules/mL et placée dans les conditions d'autolyse décrites précédemment.

Après dix jours d'incubation, les deux modalités sont centrifugées à 4000 rpm pendant 15 minutes et conservées à 10°C dans un récipient hermétique saturé en dioxyde de carbone.

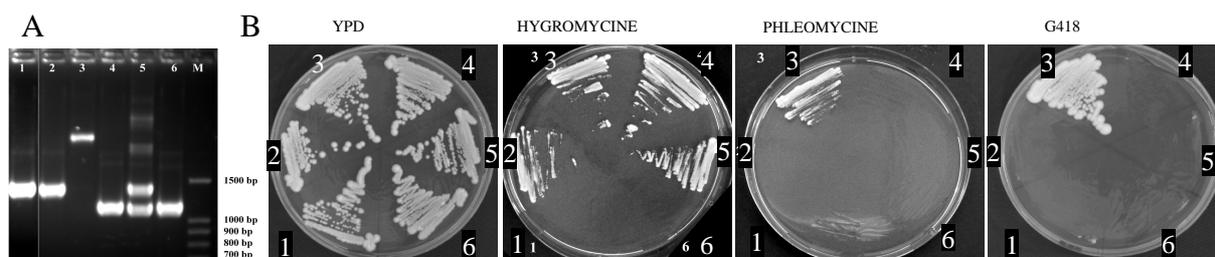
### c) Analyse sensorielle

Les deux modalités obtenues sont servies dans des verres noirs à un panel de 23 dégustateurs travaillant dans les laboratoires de la Faculté d'œnologie, entraînés à la dégustation œnologique et avertis de la nature de l'expérimentation.

Les échantillons sont présentés à 16°C sous forme d'un test triangulaire, comme décrit au chapitre 2, paragraphe II.A.3.

## 2) Résultats

L'utilisation de différentes techniques de biologie moléculaire a permis la construction d'un mutant ne présentant pas de protéines recombinantes d'origine bactérienne, comme le prouvent la PCR et les analyses de résistance aux antibiotiques (figure 5).



**Figure 5** - PCR et test de résistance aux antibiotiques de la construction de  $\Delta^{\circ}hsp12$ .

**Panel A : PCR.** La région du génome contenant le gène *HSP12* a été amplifiée par PCR avec des amorces encadrant 500 paires de base (pdb) en amont et en aval du gène *HSP12*. L'ADN génomique de Fx10 (1) et YPM32 (2) a amplifié une bande de 1316 pdb. L'ADN génomique de YPM33 (3) contenant la cassette loxP::kanMX::loxP au niveau du locus de *HSP12* a amplifié une bande de 2014 pdb. Après transformation par pZEO, YPM34 (4) correspond à une souche dont la cassette a été excisée et a fourni un fragment PCR ne contenant ni le gène *HSP12* ni la cassette de résistance KanMx4. YPM34 a été alors croisée avec Fx10 afin d'obtenir une souche diploïde YPM35 (5).  $\Delta^{\circ}hsp12$  (6) a été ensuite obtenue par ségrégation méiotique et constitue une souche diploïde homothallique délétée du gène *HSP12*. **Panel B : résistance antibiotique des souches.** La résistance des souches Fx10 (1), YPM32 (2), YPM33 (3), YPM34 (4), YPM35 (5), and  $\Delta^{\circ}hsp12$  (6) a été testée pour les antibiotiques Hygromycine, Phleomycine et G418 respectivement. Leurs résistance/sensibilité vis à vis de ces antibiotiques confirment les résultats obtenus par PCR

Au cours du test triangulaire, 13 dégustateurs ont répondu correctement, ce qui correspond à  $P = 0.019$ . Les deux modalités ont donc été jugées différentes par le panel au seuil de 5 %.

En outre, tous les dégustateurs ayant répondu correctement ont jugé la modalité provenant de l'autolyse de la souche Fx10 plus douce que celle provenant de  $\Delta^{\circ}hsp12$ .

### 3) Discussion

Afin d'étudier l'hypothèse d'une contribution de la protéine Hsp12 au gain de sucrosité consécutif à l'autolyse, nous avons comparé, dans un vin rouge, l'impact organoleptique de levures capables ou non de synthétiser cette protéine.

Pour des raisons sanitaires, l'analyse sensorielle a été effectuée à partir de levures ne possédant pas de protéines recombinantes d'origine bactérienne. Un « mutant zéro »  $\Delta^{\circ}hsp12$  a ainsi été construit et comparé à la levure œnologique Fx10. Ces deux souches sont diploïdes et homothalliques, elles diffèrent uniquement par la présence du gène *HSP12* dans leur génome.

Les levures ont été introduites dans un vin sec à des concentrations identiques et cohérentes avec la réalité œnologique. Les conditions utilisées sont celles de la macération post-fermentaire des vins rouges, favorisant le déroulement de l'autolyse. Un contrôle de viabilité effectué après 10 jours d'incubation a montré qu'il ne subsistait pas de levures vivantes dans les deux modalités, ce qui constitue une garantie supplémentaire de la salubrité de cette expérience.

Le test triangulaire effectué permet de montrer qu'une différence organoleptique significative est perceptible dans un vin rouge ayant subi l'autolyse de levures ne possédant pas la protéine Hsp12. Selon les dégustateurs, la présence de cette protéine est associée à une augmentation de la sucrosité.

Toutefois, en considérant uniquement ces résultats, la nature exacte du rôle gustatif de Hsp12 demeure incertaine. Ce rôle pourrait en effet être indirect, car l'absence de la protéine est susceptible d'engendrer diverses modifications de la composition moléculaire et du métabolisme de la levure.

Néanmoins, le fait que des peptides issus de Hsp12 aient été identifiés dans la fraction sapide corrobore les résultats d'analyse sensorielle après modification génétique. Cette convergence suggère vivement l'existence d'un rôle direct de la protéine Hsp12 dans la sucrosité.

## Conclusion

Le contact du vin avec ses lies de levures à l'issue du processus fermentaire engendre diverses modifications physico-chimiques, aromatiques et gustatives. Nous avons notamment montré que la sucrosité des vins secs augmente significativement avec la quantité de levures au cours de l'autolyse. Ces résultats suggèrent l'existence de molécules non-volatiles libérées dans le vin pendant cette phase.

Des travaux s'attachant à la purification d'autolysats de levures ont permis d'isoler une fraction sapide de nature peptidique et de masse moléculaire comprise entre 0.5 et 3 kDa. L'analyse en LC-MS/MS de cette fraction a permis d'identifier des peptides issus de la protéine membranaire de choc thermique membranaire Hsp12. L'hypothèse de la contribution de cette protéine au gain de saveur sucrée des vins secs associé aux levures a ainsi été émise.

Nous nous sommes attachés à vérifier cette hypothèse en développant une stratégie basée à la fois sur la biologie moléculaire et l'analyse sensorielle. Ainsi, la construction d'une souche de levure ne différant de la souche œnologique Fx10 que par l'absence du gène *HSP12* a été réalisée. Des expériences d'autolyses parallèles de ces deux souches dans un vin rouge ont été suivies d'une dégustation comparée des modalités. Le traitement statistique montre que l'autolyse de ces deux souches dans un vin rouge lui confère des propriétés gustatives différentes. La présence de la protéine Hsp12 s'accompagne, directement ou indirectement, d'une augmentation de la sucrosité du vin.

A notre connaissance, ces résultats constituent le premier exemple d'un lien entre une protéine de la levure et un caractère gustatif du vin.

En raison de la masse moléculaire de la fraction sapide, il est vraisemblable que le gain de sucrosité soit imputable à des peptides issus de Hsp12 et libérés au cours de l'autolyse sous l'action d'enzymes endogènes.

L'expression du gène *HSP12* étant notamment régulée par la température, le stress oxydatif ou bien encore la concentration en éthanol et en glycérol, de nombreuses applications œnologiques sont envisageables. Dans cette optique, la détermination de la structure moléculaire exacte des peptides impliqués ainsi que l'étude des mécanismes de leur formation devront faire l'objet d'études ultérieures.

## Chapitre 3 - Effet de la nature du contenant d'élaboration sur la perception de la sucrosité des vins secs. Mise en évidence du rôle édulcorant du bois de chêne

### **Introduction**

L'élevage des vins et des eaux-de-vie en barrique de chêne influence de façon déterminante leur qualité finale. En effet, leur composition chimique et leurs propriétés sensorielles évoluent au cours de cette étape. Les praticiens constatent notamment que le contact avec le bois de chêne augmente la sucrosité des vins et des spiritueux.

Nous évaluerons dans un premier temps l'effet de la nature du contenant d'élaboration sur la sucrosité des vins secs, puis nous étudierons le rôle éventuel des composés volatils libérés par le bois de chêne sur la modification de la perception gustative.

### **I) Quelques effets organoleptiques de l'élevage sous bois de chêne des vins et des eaux-de-vie. Molécules impliquées dans ces modifications.**

L'élaboration des grands vins et de nombreux spiritueux tels que le cognac, l'armagnac, le whisky ou encore certains rhums fait généralement intervenir une période de maturation en barrique de bois. Le contact avec le bois peut se faire au cours de l'élevage (vins rouges, eaux-de-vie) ou de la vinification et de l'élevage (vin blanc). Le terme « élaboration » permet ainsi d'inclure ces deux cas de figure.

Différentes essences de bois peuvent être utilisées, mais la plus prisée est le chêne, en particulier le chêne sessile (*Quercus petraea* L.), le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) et le chêne américain (*Quercus alba* L.).

Au cours de ce vieillissement, les vins et les alcools subissent différentes modifications physico-chimiques se traduisant par une évolution de leur composition, de leur couleur, de leur stabilité et de leurs caractéristiques organoleptiques (Singleton, 1974; Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2006). En pratique, on observe à la fois un apport de composés d'arômes et un gain de saveur, notamment de sucrosité. Ainsi, la durée de maturation constitue un facteur clé de la qualité des eaux-de-vie ; elle intervient dans leur classification et participe à leur valeur commerciale.

Les modifications organoleptiques perçues sont liées notamment à des phénomènes d'oxydoréduction, le bois étant un matériau partiellement perméable à l'oxygène, permettant

de fait des échanges avec l'atmosphère environnante (Ribéreau-Gayon, 1933). Dans le cas des vins blancs élevés sur lies par exemple, un gradient du potentiel d'oxydoréduction se crée du fond vers le haut de la barrique. La remise en suspension régulière des lies (batonnage) s'oppose à la mise en place de ce gradient et prévient ainsi la réduction du vin au contact des lies et l'oxydation du vin à l'interface avec l'air.

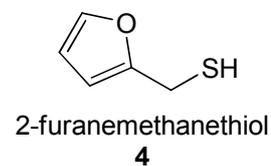
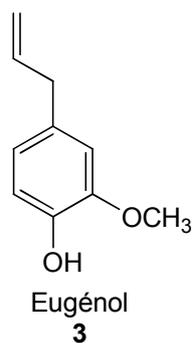
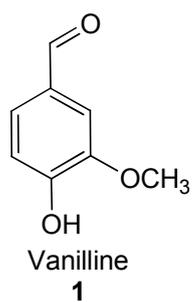
En outre, l'élevage en barrique conduit à l'extraction de composés volatils et non-volatils présents dans le bois de chêne (figure 6). Ces molécules, appartenant à des familles chimiques très différentes, peuvent être présentes dans le bois de cœur à l'état natif ou résulter des transformations du bois au cours de la fabrication de la barrique (maturation du bois, chauffe des douelles). Certaines d'entre elles possèdent des propriétés olfactives et gustatives particulières, susceptibles de modifier l'arôme et le goût du vin.

De nombreux travaux se sont attachés à l'identification et au dosage des substances aromatiques apportées par l'élevage en barrique, que ce soit dans les vins ou les alcools. La vanilline **1**, la  $\beta$ -méthyl- $\gamma$ -octalactone **2** (nommée whisky-lactone), des phénols volatils comme l'eugénol **3**, et le 2-furanemethanethiol **4** (ou furfurylthiol), sont considérés comme les composés aromatiques clés apportés par cet élevage sous bois (Chatonnet, 1995; Tominaga *et al.*, 2000). Ils sont respectivement responsables des notes de vanille, de noix de coco, épicées et grillées, caractéristiques des vins boisés. Leurs teneurs dans les vins sont largement influencées par les origines botanique et régionale du chêne ainsi que par les conditions de maturation (séchage) du bois et le type de chauffe utilisé (durée, intensité).

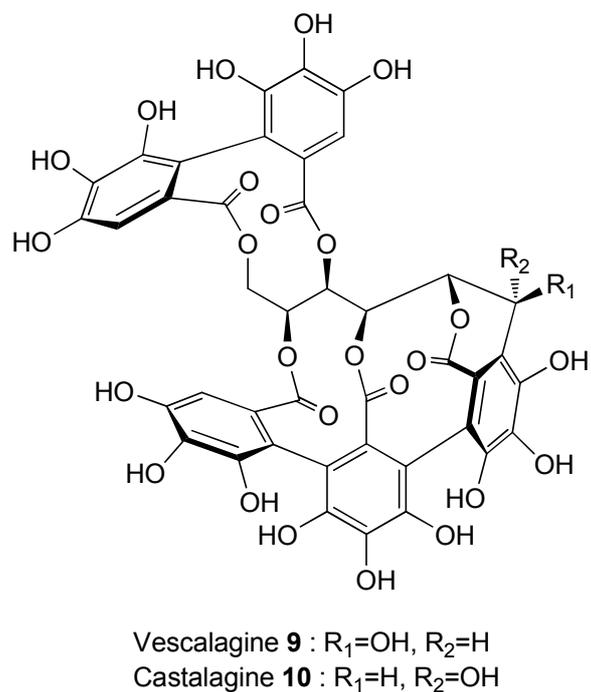
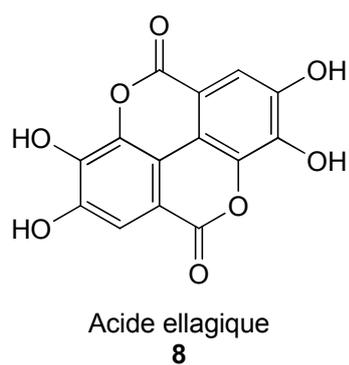
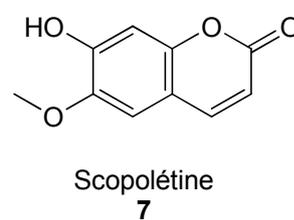
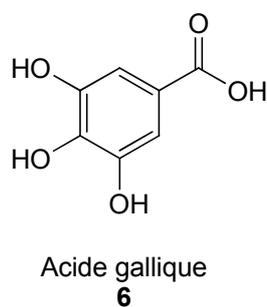
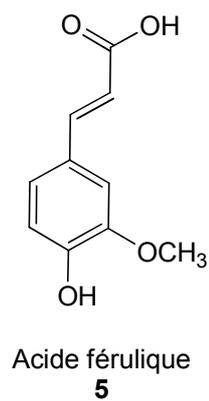
Par ailleurs, les travaux concernant les composés non volatils libérés par le bois dans les vins ont permis de distinguer (figure 6) :

- les composés polymériques de haut poids moléculaires, parmi lesquels on trouve des polysaccharides et des composés phénoliques (lignines, tanins polymérisés) (Lapierre *et al.*, 1983)
- les composés monomériques ou oligomériques, couvrant une grande variété de classes chimiques. On peut par exemple citer des acides phénols, tels que l'acide férulique **5**, l'acide gallique **6** ou l'acide sinapique, des coumarines, comme la scopolétine **7** et l'umbelliferone, des lignanes, comme le lyoniresinol, et des ellagitanins, constitués d'une unité de base (par exemple le D-glucose) dont les groupes hydroxyle ont été estérifiés par l'acide hexahydroxydiphenique (Moutounet *et al.*, 1989; Moutounet *et al.*, 1992; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

A



B



**Figure 6** - Quelques molécules volatiles (A) et non-volatiles (B) extraites du bois de chêne.

Parmi ces molécules, les ellagitanins ont fait l'objet de nombreuses études. Il s'agit de tanins dits hydrolysables : ils forment de l'acide ellagique **8** après hydrolyse. Les deux ellagitanins les plus courants dans le bois sont en effet la vescalagine **9** et la castalagine **10**. Six composés supplémentaires (roburine A-E et granidine) ont été ensuite identifiés comme produits de dimérisation de la vescalagine et de la castalagine. Glabasia et Hofmann (2006) ont en outre isolé un dérivé de la vescalagine : le 33-deoxy-33-carboxyvescalagine.

Ces composés sont présents dans les vins et sont susceptibles de réagir avec certains composés originaires du raisin (Quideau *et al.*, 2003).

Toutefois, en dépit des nombreuses études portant sur la caractérisation moléculaire des ellagitanins, peu de travaux se sont consacrés à la détermination de leur impact gustatif.

Selon Quinn et Singleton (1985), ces molécules pourraient participer à l'amertume et l'astringence des vins, mais d'autres travaux tendent à montrer que la contribution gustative directe des ellagitanins demeure faible (Hervé Du Penhoat *et al.*, 1991; Masson *et al.*, 1995; Puech *et al.*, 1999).

Plus récemment, après avoir observé des propriétés d'astringence et d'amertume des divers ellagitanins dans des extraits de bois, Glabasia et Hofmann (2006) ont établi leurs seuils de perception dans le vin et dans le whisky. Ce travail révèle que l'ensemble des ellagitanins se trouvent en dessous de leur seuil de perception dans le whisky et dans un vin rouge élevé sous bois, à l'exception de la roburine E, de la granidine, de la vescalagine et de la castalagine, qui se situent à des valeurs légèrement supérieures à leurs seuils respectifs dans le vin rouge. La présence de la castalagine à des concentrations supérieures à son seuil dans le vin a été confirmée ultérieurement (Stark *et al.*, 2010).

De la même façon, l'impact gustatif des coumarines est sujet à controverse. Ces composés présentent certes des propriétés amères intenses (Vivas, 1997) mais leurs concentrations dans les vins sont très faibles (Chatonnet *et al.*, 1994).

Ainsi, des composés amers et astringents issus du bois de chêne ont été identifiés, même si leur rôle gustatif dans les vins demeure incertain.

Par ailleurs, les praticiens sont convaincus que l'élevage des vins et des eaux-de-vie sous bois de chêne s'accompagne d'une augmentation de sucrosité.

A notre connaissance, cette opinion n'a jamais été confirmée par l'analyse sensorielle, ni, *a fortiori*, interprétée au niveau moléculaire.

## **II) Influence de la nature du contenant d'élaboration des vins secs sur la perception de la sucrosité**

Différents types de contenants ont été utilisés pour l'élaboration d'un vin blanc et d'un vin rouge afin d'évaluer l'effet de ce paramètre sur la saveur sucrée par l'intermédiaire d'un test sensoriel.

### **A) Matériel et méthodes**

#### **1) Essais mis en place**

##### *a) Expérimentation 1 : vins blancs*

L'expérimentation a été menée à partir d'un vin blanc de Bordeaux du millésime 2007, issu du cépage Sauvignon blanc et provenant de sols argilo-calcaires. Le moût obtenu après le pressurage (63 hL) est débourbé à 200 NTU et ensemencé à l'aide de la levure Zymaflore X5 de la société Laffort à 10 g/hL. Le taux d'azote assimilable est amené à 200 mg/L par ajout de sulfate d'ammonium. Le début de la fermentation alcoolique est effectué dans une cuve en béton. Après une baisse de densité de 0.02, le moût est aéré et distribué dans 4 types de contenants différents (série 1) :

- Modalité 1 : cuve en inox de 4 hL
- Modalité 2 : 1 cuve tronconique neuve en bois de chêne sessile de 50hL
- Modalité 3 : 2 barriques usagées (1 an) de 2.25 hL en bois de chêne sessile
- Modalité 4 : 2 barriques neuves de 2.25 hL en bois de chêne sessile

A l'issue de la fermentation alcoolique, les vins sont conservés sur lies totales et le prélèvement des échantillons a eu lieu après cinq mois d'élevage. Pour les modalités dupliquées (barriques), l'échantillon est prélevé en utilisant les deux barriques de chaque lot à part égale.

##### *b) Expérimentation 2 : vins rouges*

L'expérimentation a été menée à partir d'un vin rouge de Crozes-Hermitage du millésime 2008, issu du cépage Syrah et provenant de sols argileux et caillouteux. La vinification s'est déroulée en cuve inox, et à l'issue de la fermentation malo-lactique, le vin a été distribué dans 4 types de contenants (série 2) :

- Modalité 1 : 1 cuve tronconique usagée (1 an) en bois de chêne sessile de 85 hL
- Modalité 2 : 2 barriques usagées (2 ans) de 2.25 hL en bois de chêne sessile

- Modalité 3 : 2 barriques usagées (1 an) de 2.25 hL en bois de chêne sessile
- Modalité 4 : 2 barriques neuves de 2.25 hL en bois de chêne sessile

Le prélèvement des échantillons est réalisé après 12 mois d'élevage. Pour les modalités dupliquées (barriques), l'échantillon est prélevé en utilisant les deux barriques de chaque lot à part égale.

## 2) Analyse sensorielle

### a) Test de classement par rangs - Test de Friedman

Le test sensoriel utilisé pour ces essais est le test de classement par rangs, dont le principe a été décrit au chapitre 1. En revanche, le traitement statistique appliqué diffère. Le but de cette expérimentation est d'étudier l'influence de la nature du contenant sur la perception de la sucrosité, il n'existe donc pas clairement de hiérarchie supposée entre les modalités. L'AFNOR préconise l'utilisation du test de Friedman pour l'analyse des résultats.

A l'instar du test de Page, il s'agit d'un test non paramétrique largement utilisé en analyse sensorielle. Les  $p$  modalités sont classées par ordre croissant par les  $n$  sujets et les sommes de rangs  $R_1, R_2 \dots R_p$ , sont déterminées. On calcule la valeur  $F$ :

$$F = \frac{12 \sum_{i=1}^p R_i^2}{n \cdot p \cdot (p + 1)} - 3 \cdot n \cdot (p + 1)$$

On compare alors  $F$  à la valeur  $\Lambda$  lue dans la table du  $\chi^2$  à  $(p - 1)$  degrés de liberté.

- Si  $F > \Lambda$ , les produits sont considérés comme étant significativement différents.
- Si  $F \leq \Lambda$ , les produits sont considérés comme n'étant pas différenciables.

Si le test est globalement significatif, il est alors possible d'effectuer une comparaison multiple des sommes de rangs afin de déterminer la différence éventuelle des échantillons deux à deux. On compare en effet la valeur absolue de la différence entre les sommes de rangs de deux produits à la valeur  $\delta$  calculée comme suit :

$$\delta = 1.96 \sqrt{n \cdot p \cdot (p + 1) / 6}$$

- Si  $|R_i - R_j| > \delta$ , les modalités  $i$  et  $j$  sont considérées comme différentes au risque de 5 %.
- Si  $|R_i - R_j| < \delta$ , les modalités  $i$  et  $j$  sont considérées comme non différenciables.

### *b) Conditions et panels utilisés*

Dans le cadre de l'expérimentation 1 (vins blancs), le panel utilisé est constitué de 32 dégustateurs du Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation (DUAD).

Pour l'expérimentation 2 (vins rouges), le panel est constitué de 28 dégustateurs travaillant dans les laboratoires de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV).

Les vins sont présentés dans des verres noirs de type AFNOR, à 12°C pour les vins blancs et à 16°C pour les vins rouges. Les dégustations ont lieu dans la salle de dégustation de la Faculté d'œnologie, climatisée à 20°C.

**Tableau 9** - Panels et modalités utilisés pour l'analyse sensorielle de l'influence du contenant sur la sucrosité.

Vin	Panel	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Bordeaux blanc 2007 (série 1)	32 dégustateurs DUAD	Cuve inox 4 hL	Cuve bois 50hL	Barriques 1 an	Barriques neuves
Crozes-Hermitage rouge 2008 (série 2)	28 dégustateurs ISVV	Cuve bois 85 hL	Barriques 2 ans	Barriques 1 an	Barriques neuves

## B) Résultats

### 1) Dans les vins blancs (expérimentation 1)

L'homogénéisation du moût au cours du remplissage des différents contenants permet d'obtenir une turbidité similaire pour les quatre modalités. Par conséquent, les cinétiques de fermentation observées sont très proches pour les différents lots. Les données analytiques de base sont similaires pour chacun des échantillons (12.3 % d'éthanol, 5.9 g/L de glycérol, environ 170 mg/L de glucose+fructose).

En outre, l'utilisation d'une cuve inox de petit volume permet de conserver les vins sur lies totales pendant l'élevage sans noter l'apparition des notes de réduction rencontrées généralement pour les grandes cuves en inox.

La seule différence entre les modalités porte donc sur la nature du contenant d'élaboration.

Les résultats de la dégustation sont présentés au tableau 10 ci-dessous :

**Tableau 10** - Résultats du test de classement par rangs pour les expérimentations 1 et 2.

Vin	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$F$	$\Lambda$ à 5 %	$\Lambda$ à 1 %	Résultat
Bordeaux blanc 2007	52	73	90	105	30.63	7.81	11.34	Significatif à 1 %
Crozes-Hermitage rouge 2008	52	71	74	83	10.93	7.81	11.34	Significatif à 5 %

Les résultats obtenus montrent que le test est significatif au seuil de 1 % : les dégustateurs ont été capables de distinguer les différentes modalités et de les classer selon l'intensité de leur sucrosité. La somme des rangs la plus importante a été attribuée à la modalité « barriques neuves ».

En outre, on calcule  $\delta = 20.24$ .

On en déduit que :

- la modalité 1 est distinguée de toutes les autres modalités
- la modalité 2 est également distinguée de la modalité 4, mais pas de la 3
- la modalité 3 n'est pas distinguée de la modalité 4

## 2) Dans les vins rouges (expérimentation 2)

Les différentes modalités ont été créées à l'issue des processus fermentaires. Par conséquent, les données analytiques de base sont également très proches (13.1 % d'éthanol, 6.9 g/L de glycérol, environ 220 mg/L de glucose+fructose).

Par ailleurs, les vins ont été soutirés une fois au cours de leur élevage, et remis dans leur contenant initial.

Les échantillons ne diffèrent donc que par la nature de leur contenant d'élevage.

Cette expérimentation ne comporte pas de modalité élevée uniquement en inox car cette cuvée est traditionnellement élaborée sous bois.

Le test de Friedman appliqué aux résultats présentés dans le tableau 10 permet de montrer que les échantillons ont été différenciés au seuil de 5 % par les dégustateurs. Le test est donc statistiquement significatif : un classement de la sucrosité perçue s'établit entre les modalités. L'échantillon possédant la somme des rangs la plus élevée correspond aux barriques neuves.

Par ailleurs, on calcule  $\delta = 18.94$ .

On en déduit que seule la modalité 1 (cuve bois) est différenciée nettement des trois autres (barriques).

### C) Discussion

Pour les deux expériences, les échantillons ont été distingués et classés de façon statistiquement significative par les dégustateurs. Les résultats obtenus mettent en évidence une influence de la nature du contenant d'élaboration sur la perception de la sucrosité des vins blancs comme des vins rouges.

Le seuil de significativité est de 1 % dans le cas des vins blancs et de 5 % dans le cas des vins rouges. Cette différence peut être liée à un effet matrice : l'équilibre gustatif des vins rouges fait intervenir de nombreux composés amers et astringents. Il est en ce sens plus complexe que celui des vins blancs. En outre, 2008 est considéré comme un millésime de qualité passable dans l'appellation Crozes-Hermitage, et les vins dégustés présentaient tous une certaine astringence en bouche qui a pu gêner les dégustateurs. Par ailleurs, le panel de l'expérimentation 1, plus habitué à la dégustation, est plus fiable.

Toutefois, l'intérêt de ces essais réside essentiellement dans la comparaison des échantillons au sein d'une même expérimentation. Il apparaît qu'à l'instar des lies de levures, la nature du contenant d'élaboration influence notablement la sucrosité des vins.

Dans l'expérimentation 1, le vin élaboré en cuve inox est perçu comme significativement moins sucré que tous les autres. Les deux modalités « barriques » sont au contraire décrites comme étant les plus intenses. La modalité « cuve en chêne de 50hL » n'est pas différenciée de la modalité « barriques usagées », bien qu'étant moins sucrée que les modalités « barriques neuves » selon les dégustateurs. Il faut noter toutefois que le test de classement par rangs n'a pas pour finalité première la différenciation des échantillons deux à deux, car le nombre des modalités tend à compliquer la dégustation et ainsi à diminuer le contraste entre ces dernières. Le test triangulaire aurait été mieux adapté si l'objectif de l'étude avait été d'évaluer la différence éventuelle entre deux échantillons.

De la même façon, pour l'expérimentation 2, la différence entre les vins élevés en barrique n'atteint pas le seuil de significativité, bien que la somme des rangs diminue lorsque l'âge des barriques augmente. La modalité « cuve bois » présente une sucrosité moindre selon les dégustateurs.

De façon générale, ces résultats montrent que la sucrosité des vins augmente au contact du bois ; elle est plus intense en barrique qu'en cuve et tend à décroître avec l'âge du contenant.

Ces conclusions suggèrent ainsi l'existence de composés provenant du bois de chêne et participant à la saveur sucrée des vins secs. Ces molécules sont vraisemblablement extraites par le vin au cours de l'élevage. Leur nature et leur structure moléculaire n'ont jamais été établies.

Or, l'élaboration des vins sous bois conduit à la libération de molécules volatiles telles que la vanilline ou la whisky-lactone, dont les descripteurs aromatiques sont généralement associés à des goûts sucrés dans l'alimentation. Ces composés pourraient alors contribuer non au goût, au strict sens physiologique du terme, mais à la « représentation sucrée » construite dans le cerveau du dégustateur. L'étude d'éventuelles interactions entre ces arômes et le goût du vin permettra d'appréhender la nature volatile ou non-volatile des déterminants moléculaires de l'édulcoration conférée par le bois de chêne.

### **III) Incidence des composés volatils libérés par le bois de chêne sur la sucrosité**

L'étude de l'effet des composés volatils associés à l'élevage en barrique sur la sucrosité est justifiée par les nombreux cas d'interactions odeur/goût rapportés dans la littérature. La stratégie mise en place pour cette étude est double. Elle repose d'une part sur l'addition de ces composés dans un vin non boisé. Parallèlement, leur dosage dans les vins issus de contenants différents est réalisé, puis ils sont ajoutés aux différentes modalités de façon à obtenir des concentrations identiques d'un échantillon à l'autre.

#### **A) Quelques illustrations des interactions odeur/goût**

Le goût, dans son acception physiologique, n'est quasiment jamais perçu de façon isolée mais très généralement associé à des stimulations olfactives (rétro-olfaction), trigéminales ou tactiles (Schiffman, 2000).

Ces associations sensorielles sont à l'origine de diverses interactions perceptives, notamment entre les odeurs et les saveurs. D'un point de vue phénoménologique, il est très fréquent d'entendre des dégustateurs utiliser le terme « sucré » comme descripteur d'une sensation olfactive (Dravnieks, 1985). Néanmoins, la sensation sucrée perçue ne semble pas

résulter d'une stimulation des récepteurs gustatifs par le composé aromatique (Labbe *et al.*, 2006). Si son fondement physiologique apparaît alors discutable, l'expression « odeur sucrée » semble toutefois trouver une réalité sensorielle : le fait de sentir, en ortho-olfaction, un arôme généralement associé à un goût sucré évoque le goût lui-même au dégustateur (Stevenson *et al.*, 1998). C'est le cas de nombreuses odeurs fruitées comme la fraise par exemple (Bate-Smith, 1968).

En outre, la présence de composés volatils est susceptible de modifier la perception gustative de molécules non-volatiles. Stevenson *et al.* (1999) ont montré que l'intensité d'une solution de saccharose est augmentée en présence d'arôme de fraise ou de caramel et diminuée par ajout de maltol. Un tel phénomène synergique a également été observé entre la vanilline et le saccharose (Clark & Lawless, 1994; Small *et al.*, 2004).

Ces interactions perceptives semblent être, dans une certaine mesure, spécifiques : l'arôme de fraise, contrairement à l'arôme « beurre de cacahuète », augmente l'intensité sucrée d'une solution de saccharose mais n'a pas d'influence sur la saveur salée (Frank & Byram, 1988). Il semblerait que les liens entre odeurs et goûts se développent de façon précoce au cours du processus d'intégration sensorielle, dans des zones du cerveau dédiées usuellement aux phénomènes d'apprentissage et de traitement émotionnel (Mesulam, 1998; Small & Prescott, 2005). Cela expliquerait la forte influence de l'expérience et du conditionnement des dégustateurs sur ces interactions, ainsi que la spécificité de ces dernières.

Par ailleurs, des études complémentaires ont mis en évidence les mêmes types d'interactions à des niveaux de concentration inférieurs aux seuils de perception des odorants et des édulcorants. Par exemple, une solution de saccharine additionnée de benzaldéhyde (arôme de cerise, de noyau) est perçue comme sucrée par les dégustateurs alors que les deux molécules sont présentées à des concentrations situées à environ 60 % de leur seuil de perception respectif (Dalton *et al.*, 2000; Hort & Hollowood, 2004). Contrairement aux mécanismes cognitifs avancés pour les teneurs supraliminaires, ces résultats suggèrent une intégration neuronale directe des stimuli.

Ces phénomènes d'intégration mettent en lumière le fait qu'un édulcorant peut être perçu par les dégustateurs alors qu'il se trouve à des concentrations inférieures à son seuil de perception.

Une étude récente (Sáenz-Navajas *et al.*, 2010) s'est intéressée à l'effet des volatils du vin sur la perception du goût. Ce travail montre, à l'aide d'expériences de reconstitution, que l'addition d'extraits fruités issus d'un vin blanc augmente la sucrosité perçue.

De façon générale, les nombreuses interactions décrites entre les arômes et les molécules sapides justifient l'étude de l'influence des composés volatils du bois de chêne sur la perception de la sucrosité. Comme les synergies semblent reposer essentiellement sur l'expérience et le conditionnement, la vanilline, qui parfume le plus souvent des mets sucrés, semble être *a priori* le composé du bois le plus susceptible de générer de telles interactions. Les arômes associés à l'eugénol, au 2-furanemethanethiol, et dans une moindre mesure à la whisky-lactone, peuvent apparaître en effet « culturellement » moins liés à la saveur sucrée.

## B) Ajout de vanilline, de whisky-lactone et d'eugénol dans les vins élaborés dans des contenants différents. Effet sur la perception de la sucrosité

La nature du contenant d'élaboration influence la perception de la saveur sucrée des vins blancs et rouges. Afin d'étudier le rôle d'éventuelles interactions odeurs/goût dans ce phénomène, trois composés volatils clés de l'arôme boisé ont été dosés dans les modalités provenant des différents contenants. Ils ont ensuite été additionnés dans ces vins afin d'obtenir des concentrations identiques et ainsi de niveler l'impact aromatique du bois.

### 1) Matériels et méthodes

#### a) Dosage des composés volatils

La méthode utilisée, dite des « ajouts dosés », a été décrite par Chatonnet *et al.* (1992).

Une gamme étalon est réalisée par ajout des 3 molécules (vanilline, whisky-lactone – isomères *cis* et *trans*-, eugénol) à des concentrations connues. Le protocole décrit ci-dessous est appliqué à un vin blanc et un vin rouge non boisés.

100 mL de vins sont additionnés de 100 µL d'étalon interne (octan-3-ol à 100 mg/L dans l'éthanol absolu) et des composés aromatiques aux concentrations définies dans le tableau 11.

**Tableau 11** - Concentrations en vanilline, whisky-lactone et eugénol des différents points de la gamme-étalon (Témoin, G1...G4).

Molécule	G0	G1	G2	G3	G4
Vanilline	0 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	400 µg/L
Whisky-lactone	0 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	300 µg/L	600 µg/L
Eugénol	0 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L

On procède ensuite à trois extractions successives de chaque échantillon de la gamme par 10, 5 et 5 mL de dichlorométhane par agitation à 800 rpm pendant 10, 5 et 5 minutes. Les phases organiques, séparées par décantation statique, sont assemblées, séchées au sulfate de sodium et lentement concentrées à froid sous flux d'azote (100 mL/min) jusqu'à 500 µL environ.

Les vins provenant des différents contenants sont également additionnés de 100 µL d'étalon interne puis extraits de la même façon.

Les extraits sont alors analysés par un chromatographe en phase gazeuse (CPG) TRACE GC ULTRA couplé à un spectromètre de masse (SM) DSQ II, de la société Thermo Fisher Scientific, USA.

Chromatographie en phase gazeuse : l'injection (2 µl) est effectuée en mode split/splitless. Le temps d'ouverture de la vanne est de 0.8 minute et la pression en tête de colonne de 20 psi. La programmation du four est la suivante : isotherme initiale de 5 minutes à 45°C, puis 3°C/minute jusqu'à 230°C, isotherme finale de 20 minutes à 230°C.

On utilise une colonne BP20 polaire (50 m de longueur, 0.22 mm de diamètre interne, 0.25 µm d'épaisseur de film, SGE, France).

La programmation de l'injecteur est de 180°C à 230°C à la vitesse de 150°C/min avec une isotherme initiale de 0.1 minute et une isotherme finale de 30 minutes.

Le gaz utilisé est l'hélium.

Spectrométrie de masse : la température de la ligne de transfert est de 210°C. L'acquisition des spectres de masse est en mode impact électronique (mode SIM, énergie d'ionisation : 70 eV).

### *b) Analyse sensorielle*

A la suite de leur dosage dans les vins issus des divers contenants, vanilline, whisky-lactone et eugénol sont additionnés dans les différentes modalités jusqu'à obtenir une concentration égale à celle de l'échantillon le plus intense.

Ainsi modifiés, tous les vins de la même expérience, contenant la même quantité de composés volatils, sont alors soumis à l'analyse sensorielle en utilisant exactement les mêmes conditions et les mêmes panels que ceux décrits dans ce chapitre, au paragraphe II.A.1.

## **2) Résultats**

Cette étude porte sur la quantification de trois composés-clés responsables de l'arôme caractéristique conféré au vin par le bois de chêne.

L'analyse par CPG/SM des composés volatils du bois dans les vins est effectuée en mode « Selected Ion Monitoring » (SIM). Les ions choisis pour la quantification sont présentés dans le tableau 12 ci-dessous.

**Tableau 12** - Rapports m/z et temps de rétention des ions utilisés pour la quantification des composés volatils du bois.

	Etalon interne	Vanilline	Whisky-lactone (trans - cis)	Eugénol
m/z (en Thomson)	83	151	99	164
Temps de rétention (en min)	22.5	61.9	41.6 - 44	50.6

La validation de cette méthode a été décrite précédemment (Chatonnet *et al.*, 1992). Les trois composés volatils sont ainsi quantifiés dans les différentes modalités décrites dans ce chapitre au paragraphe II.A.1 et présentées dans le tableau 13.

**Tableau 13** - Concentrations en vanilline, whisky-lactone et eugénol observées dans les modalités provenant des différents contenants.

Vin	Modalité	[vanilline]	[whisky-lactone] (en µg/L)		[eugénol]
		(en µg/L)	<i>trans</i>	<i>cis</i>	(en µg/L)
Bordeaux blanc 2007 (série 1)	Modalité 1 (cuve inox)	Traces	Traces	Traces	Traces
	Modalité 2 (cuve bois)	28.4	58.2	82.9	5.5
	Modalité 3 (barr. 1 an)	120.5	122.8	210.3	15.2
	Modalité 4 (barr. neuves)	148.7	143.6	268.6	20.1
Crozes- Hermitage rouge 2008 (série 2)	Modalité 1 (cuve bois)	91	Traces	84.2	7.8
	Modalité 2 (barr.2 ans)	92.2	36.1	178.3	9
	Modalité 3 (barr. 1 an)	214.3	116.9	226.2	22.4
	Modalité 4 (barr. neuves)	348.5	181.3	463.1	24

Le but de cette expérimentation n'est pas d'étudier la libération des composés volatils par les différents contenants. Par conséquent, nous n'analyserons pas en détail les valeurs obtenues : de nombreux travaux préalables ont décrit les facteurs influençant la quantité des arômes du bois dans les vins (Boidron *et al.*, 1988; Chatonnet *et al.*, 1992). Ces valeurs permettent en revanche de déterminer précisément les ajouts à effectuer afin d'égaliser les teneurs des trois molécules volatiles dans les divers échantillons.

Dans chaque série, la modalité présentant les concentrations les plus élevées en vanilline, en *trans* et *cis* whisky-lactone et en eugénol correspond aux barriques neuves. Ainsi, ces concentrations sont respectivement ajustées à 148.7, 143.6, 268.6 et 20.1 µg/L dans tous les vins blancs de la série 1 et à 348.5, 181.3, 463.1 et 24 µg/L dans les vins rouges de la série 2.

Les ajouts de composés volatils sont effectués à partir de solutions à 1 g/L dans l'éthanol absolu. Les volumes additionnés sont très faibles et n'engendrent pas de modifications de la composition des vins autres qu'aromatiques.

Le traitement statistique repose sur un test de Friedman, dont les résultats sont présentés dans le tableau 14.

**Tableau 14** - Résultats du test de classement par rangs obtenus après ajout de vanilline, whisky-lactone et 2-furanéméthanthiol.

Vin	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$F$	$\Lambda$ à 5 %	$\Lambda$ à 1 %	Résultat
Bordeaux blanc 2007	57	66	89	108	29.81	7.81	11.34	Significatif à 1 %
Crozes-Hermitage rouge 2008	54	69	74	83	9.47	7.81	11.34	Significatif à 5 %

Pour les vins blancs :

Les résultats montrent que le test est significatif à 1 %. Les dégustateurs ont donc été capables de classer les modalités selon l'intensité de leur saveur sucrée, après ajout des composés volatils.

En outre, deux groupes se distinguent de façon statistique ( $\delta = 20.24$ ) : d'une part les modalités 1 et 2 (cuves inox et bois) ; d'autre part les modalités 3 et 4 (barriques usagées et neuves).

Pour les vins rouges :

Le test est significatif au seuil de 5 %. L'échantillon provenant de la cuve en bois est différencié ( $\delta = 18.94$ ) des échantillons issus des barriques neuves et d'un an.

Les modalités 2, 3 et 4 ne sont pas significativement distinguées.

### 3) Discussion

Le dosage de la vanilline, de la whisky-lactone et de l'eugénol dans les vins issus de différentes modalités a permis de quantifier les différences de leurs concentrations.

Celles-ci ont été ajustées par ajout aux valeurs les plus élevées (modalité « barriques neuves »).

Les conditions de la dégustation et le panel utilisé pour chaque série (vins blancs et vins rouges) sont identiques. Par conséquent, les résultats de cette expérimentation peuvent être comparés à ceux rapportés au paragraphe II.B. afin d'étudier l'impact des composés volatils sur la sucrosité.

L'analyse sensorielle des échantillons indique que, pour les vins blancs comme pour les vins rouges, les dégustateurs ont hiérarchisé de façon significative les différentes modalités en fonction de leur sucrosité. Les échantillons perçus comme les plus sucrés proviennent des barriques neuves dans les deux séries.

Même si les valeurs du test de Friedman diffèrent légèrement par rapport aux résultats obtenus avant l'ajout de vanilline, whisky-lactone et eugénol, le seuil de significativité est conservé pour chaque série.

Ainsi, le classement de la sucrosité des échantillons apparaît invariant après ajout des composés volatils. Par conséquent, ces résultats montrent que les écarts de saveur sucrée perçus entre des vins provenant de différents types de contenants (paragraphe II) ne sont pas imputables aux seules molécules volatiles étudiées (vanilline, whisky-lactone et l'eugénol). Ces conclusions s'appliquent à la fois aux vins blancs et aux vins rouges étudiés.

L'ajout de volatils dans un vin non boisé constitue une approche complémentaire pour l'étude de leur impact sur la sucrosité. Elle pourrait être mise en œuvre avec le 2-furanemethanethiol, autre composé clé associé à l'arôme « boisé » des vins, qui n'a pas été quantifié dans cette expérimentation.

#### C) Ajout de 2-furanemethanethiol et de vanilline dans des vins non boisés. Effet sur la perception de la sucrosité

Les expériences précédentes n'excluent pas la participation des composés volatils du bois à la représentation sucrée du vin par le dégustateur.

Plusieurs études ont en effet mis en évidence des interactions entre le goût sucré et la vanilline. Par ailleurs, le 2-furanemethanethiol n'a pas été étudié dans l'expérimentation précédente. Aussi, afin d'évaluer leur impact sur la saveur sucrée des vins secs, ces deux

molécules ont été séparément ajoutées à diverses concentrations dans des vins non boisés et les modalités ainsi obtenues ont été soumises à un test d'analyse sensorielle.

### **1) Matériel et méthodes**

Les deux vins utilisés pour cette étude ont été décrits au chapitre 1: un Bordeaux blanc 2008 et un Bordeaux rouge 2007. Ces deux vins, élevés en cuve inox, n'ont jamais été au contact du bois de chêne.

Le 2-furanemethanethiol et la vanilline sont additionnés dans les vins à partir de solutions éthanoliques à 100 µg/L et 1 g/L respectivement. Les quantités introduites suivent une loi géométrique de raison 3.

Pour le 2-furanemethanethiol, les quatre modalités préparées sont les suivantes :

- Modalité 1 : vin de base (témoin)
- Modalité 2 : vin de base + 5 ng/L
- Modalité 3 : vin de base + 15 ng/L
- Modalité 4 : vin de base + 45 ng/L

Pour la vanilline, les quatre modalités préparées sont les suivantes :

- Modalité 1 : vin de base (témoin)
- Modalité 2 : vin de base + 100 µg/L
- Modalité 3 : vin de base + 300 µg/L
- Modalité 4 : vin de base + 900 µg/L

Le panel utilisé est constitué de 38 dégustateurs du Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation (DUAD). Les vins sont servis dans des verres noirs de type AFNOR, à 12°C pour les vins blancs et à 16°C pour les vins rouges.

Deux sessions sont organisées en mai 2009 :

- Une session portant sur l'étude du 2-furanemethanethiol, dans les vins blancs et rouges
- Une session portant sur l'étude de la vanilline, dans les vins blancs et rouges

La dégustation se présente sous forme d'un test de classement : il est demandé aux dégustateurs de classer les vins selon l'intensité de la sucrosité, et non de la perception aromatique.

Les modalités contiennent des concentrations croissantes et connues de 2-furanemethanethiol et de vanilline : il existe une hiérarchie supposée entre eux. Par conséquent, le test de Page est utilisé pour le traitement des résultats.

## 2) Résultats

### a) Participation du 2-furanemethanethiol à la représentation sucrée des vins

**Tableau 15** - Résultats du test de Page pour les vins additionnés de 2-furanemethanethiol.

Vin	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$L$	$L'$	Résultat
Bordeaux blanc	93	90	97	100	964	0.79	Non significatif
Bordeaux rouge	91	97	99	93	954	0.22	Non significatif

Les résultats montrent que le test de Page n'est pas significatif au seuil de 5 % : aucun ordre entre les échantillons n'a été établi par les dégustateurs en relation avec la saveur sucrée, tant pour les vins blancs que pour les vins rouges.

### b) Participation de la vanilline à la représentation sucrée des vins

**Tableau 16** - Résultats du test de Page pour les vins additionnés de vanilline.

Vin	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$L$	$L'$	Résultat
Bordeaux blanc	89	93	96	102	971	1.18	Non significatif
Bordeaux rouge	90	96	96	98	962	0.67	Non significatif

Les résultats obtenus pour la vanilline indiquent également que les dégustateurs n'ont pas pu classer les vins en fonction de l'intensité de leur sucrosité. Les valeurs de  $L'$  obtenues sont inférieures au seuil critique à 5 % pour les deux types de vin.

## 3) Discussion

Les teneurs en 2-furanemethanethiol et en vanilline rencontrées usuellement dans les vins élevés sous bois de chêne se situent dans la gamme des concentrations testées dans cette étude. Les modalités préparées permettent donc d'étudier l'impact éventuel de ces deux molécules sur la perception de la saveur sucrée.

Les résultats du test de classement montrent que ni le 2-furanemethanethiol ni la vanilline n'engendrent une augmentation significative de sucrosité perçue par les dégustateurs dans les vins blancs comme dans les vins rouges.

Les résultats concernant le 2-furanemethanethiol complètent les données obtenues précédemment pour les autres composés clés de l'arôme caractéristique de l'élevage en bois

de chêne. L'ajout de cette molécule, à l'arôme de café torréfié très intense, n'a pas d'effet significatif sur la saveur sucrée des vins présentés aux dégustateurs.

Les données relatives à la vanilline confirment les conclusions du paragraphe précédent : ce composé volatil ne semble pas augmenter la perception de la saveur sucrée dans les vins. Même les échantillons possédant des concentrations supérieures aux valeurs rencontrées usuellement dans les vins ne sont pas jugés comme plus sucrés que le témoin par les dégustateurs.

Ces conclusions s'appliquent à des vins secs au sens analytique du terme et présentant une acidité élevée. L'effet de la matrice sur les éventuelles interactions entre la vanilline et le goût n'a pas été déterminé. Il est dès lors possible que les résultats de ce test diffèrent en fonction du type de vin utilisé, notamment en présence de quelques g/L de glucose+fructose, comme peuvent le suggérer les interactions décrites dans l'eau entre vanilline et hydrates de carbone.

## **Conclusion**

Diverses molécules volatiles et non-volatiles sont libérées au cours de l'élaboration sous bois de chêne des vins et des eaux-de-vie. Certains de ces composés sont à l'origine de modifications organoleptiques majeures.

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié en particulier l'impact de la nature du contenant d'élaboration sur la sucrosité des vins secs. Il apparaît ainsi que l'élevage au contact du bois de chêne augmente de façon significative la saveur sucrée.

Or, de nombreux exemples d'effets synergiques entre arômes et goûts ont été rapportés dans la littérature. Nous avons donc évalué le rôle des principaux composés volatils extraits du bois sur la sucrosité selon deux stratégies : par ajout direct dans des vins non boisés et en corrigeant les concentrations de ces molécules dans des vins issus de divers contenants afin d'obtenir des teneurs identiques.

L'addition de vanilline et de 2-furanemethanethiol dans les vins n'a pas d'influence sur la perception de la sucrosité. La correction des concentrations en vanilline, whisky-lactone et eugénol dans les vins provenant de différents contenants ne modifie pas le classement établi par les dégustateurs.

Ces résultats montrent que les principales molécules volatiles libérées par le bois de chêne n'ont pas d'effet direct sur la saveur sucrée des vins secs.

Par conséquent, le gain de sucrosité conféré par l'élevage en barrique ne résulte pas d'interactions cognitives à l'origine de la construction d'une *représentation sucrée* mais bien de la perception d'une *saveur sucrée*.

Ainsi, de même que l'autolyse des levures engendre la libération de peptides augmentant la saveur sucrée (chapitre 2), il apparaît, au terme de cette partie, que l'élaboration sous bois participe à une édulcoration des vins, qui ne peut être attribuée aux composés volatils clés issus du bois de chêne.

Dès lors, nous pouvons conjecturer l'existence de molécules non-volatiles, libérées par le bois de chêne et participant à la saveur sucrée des vins secs.

L'étude de la validité de cette hypothèse, par l'intermédiaire de l'identification de composés du chêne modifiant la perception gustative, constitue l'objectif majeur de notre travail.

En raison de la grande diversité chimique des molécules possédant des propriétés édulcorantes (chapitre 1, paragraphe I.A), la stratégie développée dans cette thèse repose essentiellement sur une démarche inductive, basée sur la purification d'extraits de bois.

## **Deuxième partie :**

### **Extraction et identification de molécules non volatiles du bois de chêne possédant des propriétés édulcorantes**



## Chapitre 4 - Développement d'une technique d'extraction solide/liquide

### **Introduction**

Afin d'étudier les composés non-volatils du bois de chêne possédant des propriétés édulcorantes, un protocole de fractionnement et de purification guidé par la dégustation est développé. L'étape préliminaire à la mise en place de ce protocole consiste à extraire des molécules par macération du bois de chêne dans un milieu liquide.

La nature du bois (espèce, origine, traitement), ainsi que la forme sous laquelle il est extrait (copeaux, poudre) doivent être déterminées. En outre, il est nécessaire de choisir un solvant d'extraction adapté.

Les composés d'intérêt sont recherchés sur la base de leurs propriétés gustatives, dont la nature moléculaire est *a priori* inconnue. Par conséquent, le choix des divers paramètres de la macération ne peut être fait au vu d'analyses chimiques des extraits. A titre d'exemple, la mesure de l'extrait sec, généralement utilisée, tient compte de l'ensemble des composés non-volatils extractibles ; aucune corrélation n'existe *a priori* entre cette valeur et la quantité de composés édulcorants extraits. Dans notre étude, cet indice n'apparaît pas pertinent pour la détermination des conditions d'extraction. Il apparaît préférable d'adopter une approche sensorielle, basée sur la dégustation des extraits, comparable à l'olfaction des extraits odorants pour optimiser les méthodes d'extraction en parfumerie.

### **I) Choix du matériel d'étude solide utilisé**

Dans le cadre de cette extraction, la phase solide est constituée par du bois de chêne, plus précisément du bois de cœur, qui est la partie de l'arbre utilisée pour la fabrication des barriques, des cuves, et des produits alternatifs autorisés en œnologie depuis quelques années (copeaux, staves, douelles...) afin de boiser les vins à moindre coût.

#### **A) Forme du bois de chêne utilisé**

Tout procédé de chimie extractive repose sur un compromis entre efficacité et fidélité de l'extraction. Dans le cas présent, le but n'est pas d'extraire toutes les molécules du bois,

mais seulement celles qui sont libérées par les contenants en chêne au cours de l'élaboration des vins et des eaux-de-vie.

Par conséquent, la forme sous laquelle le bois est utilisé pour les macérations se révèle déterminante.

Différentes études (Scalbert *et al.*, 1990; Arramon, 2001; Quideau *et al.*, 2004; Nonier *et al.*, 2005) utilisent le bois sous forme de sciures tamisées à 60 mesh. L'intérêt de cette méthode tient à l'importance de la surface de contact entre le solide et la phase liquide. Or, le bois étant un matériau relativement peu perméable aux solvants, ces conditions permettent d'obtenir un rendement d'extraction élevé. Un autre avantage concerne la reproductibilité de l'échantillonnage, permettant le développement d'analyses quantitatives.

Néanmoins, l'utilisation de sciures ne permet pas, en pratique, de reproduire de façon satisfaisante l'effet organoleptique de l'élevage en barrique de chêne sur le vin.

A l'opposé, l'utilisation de barriques pour l'extraction offre évidemment une très bonne fidélité mais le rapport entre la surface de contact et le volume de phase liquide est réduit. Par conséquent, la macération dans des barriques conduirait à un rendement d'extraction très faible. Or, le développement d'un protocole de purification impliquant diverses étapes successives nécessite des quantités initiales importantes. La macération en barrique ne semble donc pas compatible avec ces exigences.

En revanche, les copeaux de chêne constituent un produit alternatif aux barriques. L'addition de copeaux au cours de l'élaboration des vins permet de simuler une part des modifications organoleptiques conférées aux vins par les contenants en bois. En outre, la surface de contact des copeaux peut être suffisamment élevée pour que l'extraction soit efficace.

Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons donc le bois de chêne sous forme de copeaux de dimension 30x20x5mm. Ces copeaux sont identiques à ceux utilisés pour l'élaboration des vins. La concentration massique mise en œuvre dépend de la nature de l'expérimentation, elle sera donc précisée pour chaque macération.

## B) Nature des copeaux de chêne utilisés

Des études menées précédemment sur les composés volatils et les ellagitanins ont montré qu'il existait des différences notables de composition du chêne en fonction de l'origine botanique et géographique (Chatonnet & Dubourdieu, 1998; Pérez-Prieto *et al.*, 2002; Prida & Puech, 2006). Ces différences sont davantage quantitatives que qualitatives.

Elles tiennent essentiellement aux quantités relatives des molécules d'intérêt dans les différents bois : les mêmes composés sont globalement retrouvés, mais leurs teneurs varient d'un échantillon à l'autre. Le traitement du bois effectué (séchage, chauffe) a également une influence sur la composition des bois et, par voie de conséquence, des vins. Le choix de la nature des copeaux utilisé est basé sur la dégustation des extraits

### 1) Conditions des macérations mises en œuvre

La détermination des conditions de l'extraction solide/liquide consiste à choisir deux variables : l'échantillon solide et le solvant. Afin d'étudier de façon indépendante l'influence de la nature des copeaux, des macérations sont effectuées dans un même solvant, proche du vin : une solution eau/éthanol à 12 % (v/v).

Les copeaux sont macérés à 15 g/L, dans un litre de phase liquide, pendant 20 jours, à température ambiante, sans agitation. A l'issue de cette période, le macérat est filtré sous vide à l'aide d'un filtre en papier, de rétention 30 µm.

Le filtrat est dilué au demi avec de l'eau osmosée puis dégusté par 4 personnes entraînées à la dégustation œnologique, afin d'atténuer le caractère brûlant de l'éthanol.

### 2) Choix de l'espèce et de l'origine géographique des copeaux

Trois types de copeaux, n'ayant pas subi de traitement thermique, sont macérés. Ils proviennent de :

- Chênes sessiles (*Quercus petraea*) français issus des forêts de l'Allier (notés **FR**)
- Chênes sessiles (*Quercus petraea*) du Caucase en République d'Adygué (notés **CZ**)
- Chênes blancs d'Amérique (*Quercus alba*) issus des forêts du Midwest et des Appalaches (notés **US**)

Le chêne pédonculé (*Quercus robur*) n'est quasiment pas utilisé pour l'élaboration des vins (il est réservé à l'élevage des eaux-de-vie) ; nous avons donc choisi de ne pas l'inclure dans cette étude.

Ces différents copeaux sont macérés puis dégustés dans les conditions décrites plus haut.

Dans l'ensemble, les extraits sont marqués par une amertume et une astringence intenses, mais également une sensation de sucrosité sous-jacente. Il est fort probable que des molécules possédant une saveur amère coexistent en solution avec des composés édulcorants. Toutefois, la modalité **US** apparaît nettement plus amère que les deux autres. Les sensations sont proches pour les échantillons **CZ** et **FR**, avec un très léger supplément de sucrosité pour le premier. Ils peuvent donc être utilisés pour les macérations, avec un léger avantage pour le **CZ**.

### 3) Choix du type de traitement des copeaux

Lors de la fabrication d'une barrique, les merrains de chêne subissent une phase de maturation, appelée séchage, pendant 2 à 3 ans. Diverses modifications de la composition du bois sont observées au cours de cette période (Chatonnet, 1995; Cadahía *et al.*, 2001; Spillman *et al.*, 2004). Ensuite, les douelles obtenues sont chauffées à une température et un temps variables, afin de cintrer la barrique et de conférer au bois les propriétés olfactives et gustatives désirées. Par ailleurs, les copeaux utilisés en vinification peuvent être issus de bois seulement séchés (ils sont alors dits « frais ») ou de bois séchés puis chauffés.

Des macérations ont donc été effectuées à partir de copeaux de chêne du Caucase ayant subi trois types de traitements :

- Bois brut, avant séchage (**BR**)
- Bois séché pendant 3 ans (**NC**)
- Bois séché pendant 3 ans puis ayant subi une chauffe moyenne (**CM**)

A la dégustation, la modalité **BR** apparaît nettement amère. La sucrosité est plus intense dans la modalité **CM** et *a fortiori* dans la modalité **NC**, même si l'écart entre ces deux derniers échantillons est plus faible.

La même expérimentation a été effectuée à l'aide de copeaux de chêne de l'Allier, et les résultats obtenus sont similaires.

Ainsi, au terme de ces expérimentations préliminaires, les copeaux de chêne sessile du Caucase non chauffés (**CZNC**) apparaissent les mieux adaptés en vue de l'extraction liquide/solide.

## II) Choix du solvant et des conditions d'extraction

### A) Détermination de la phase liquide utilisée

La phase liquide constitue la seconde variable majeure d'une extraction et son choix doit répondre aux mêmes exigences d'efficacité et de fidélité.

Généralement, les protocoles de chimie extractive utilisent des mélanges eau/acétone et eau/méthanol. Néanmoins, le risque d'extraire des composés qui ne sont pas libérés au cours de l'élaboration des vins et des eaux-de-vie est non négligeable. Il est préférable d'utiliser une phase liquide se rapprochant davantage des conditions œnologiques : un mélange eau/éthanol.

Dès lors, deux constitutions de ce mélange sont envisageables :

- Une solution à 50 % (v/v) d'éthanol, se rapprochant d'un modèle « eau-de-vie » (notée **A**)
- Une solution à 12 % (v/v) d'éthanol, se rapprochant d'un modèle « vin » (notée **B**).

Une étude récente (Karvela *et al.*, 2008) a montré que la cinétique et le pouvoir d'extraction des composés polyphénoliques totaux du bois de chêne étaient plus élevés en solution hydro-alcoolique à 50 % plutôt qu'à 12 %.

Ces résultats, au même titre que la mesure de l'extrait sec, donnent une indication sur le pouvoir extracteur global d'un solvant. Toutefois, l'existence d'une corrélation entre ces indices et la quantité de composés édulcorants extraits demeure hautement hypothétique puisque la nature moléculaire de ces derniers est inconnue.

Dans le cadre spécifique de notre étude, l'extrait sec ou la teneur en polyphénols totaux ne peuvent donc pas guider le choix du solvant. Celui-ci sera déterminé par la dégustation.

Des copeaux du Caucase non chauffés sont macérés à 80 g/L pendant 20 jours à température ambiante sans agitation. Deux modalités sont préparées, l'une en utilisant un litre de solution **A**, l'autre à partir d'un litre de solution **B**.

50 mL de chaque macérat sont ensuite filtrés comme décrit au paragraphe I.B.1, puis dilués au dixième avec de l'eau osmosée afin d'atténuer le caractère brûlant de l'éthanol. Le taux d'alcool volumique de la modalité **B** est ajusté à 5 % par ajout d'éthanol absolu et les deux échantillons sont dégustés.

Les profils gustatifs sont relativement similaires, même si une plus forte sensation de douceur est perceptible pour la modalité **A**. La saveur est également plus intense dans cet échantillon.

Par conséquent, les macérations des copeaux de bois de chêne se dérouleront dans une solution hydro-alcoolique à 50 % (v/v).

## B) Conditions d'extraction mises en œuvre

La surface de contact importante offerte par les copeaux permet une diffusion relativement rapide des composés extractibles du chêne dans le solvant. En pratique, les copeaux de chêne « frais » sont fréquemment utilisés pendant la cuvaison des vins rouges, durant 2 à 3 semaines.

Les macérations des copeaux seront donc effectuées pendant 20 jours dans le cadre de notre étude.

Des températures élevées peuvent favoriser l'extraction, mais également engendrer certaines modifications structurales non souhaitées des composés extraits. Les extractions seront donc réalisées à température ambiante (soit aux environs de 22°C).

Une étude menée par Kadim et Mannheim (1999) a montré qu'après deux semaines de macération, il n'existe pas de gradient de concentration des composés extractibles dans la phase liquide. Le phénomène d'extraction est ainsi limité par le transfert des molécules à l'interface entre le solide et la phase liquide, et non par leur vitesse de diffusion dans le solvant. Par conséquent, il ne semble pas nécessaire d'agiter le système pendant la phase de macération.

Afin d'éviter une éventuelle dégradation des molécules extractibles du bois de chêne, les extractions sont réalisées à l'abri de la lumière, dans un récipient en verre hermétique et préalablement saturé en dioxyde de carbone, ce qui se rapproche des conditions de la vinification.

A l'issue de la phase de macération, la phase liquide est séparée par filtration sous vide, sur un filtre en papier Whatman, présentant un diamètre moyen des pores de 30 µm. La réalisation de cette étape ne pose pas de problème majeur, l'échantillon n'entraînant pas de colmatage du filtre. Le filtrat recueilli est stocké dans un récipient en verre saturé en dioxyde de carbone, et conservé à l'abri de la lumière.

### **III) Protocole d'extraction choisi**

Les résultats obtenus au cours de ces expériences ont permis de déterminer le protocole d'extraction solide/liquide utilisé dans notre travail.

1 kg de copeaux de bois de cœur de chêne sessile du Caucase mûré à l'air libre pendant 3 ans sont placés dans un récipient en verre contenant 4 L d'un mélange eau/éthanol 50/50 (soit une concentration massique en bois de 250 g/L). Le récipient, préalablement saturé en dioxyde de carbone, est fermé de façon hermétique et maintenu à l'obscurité pendant 20 jours à 22°C environ.

A l'issue de cette période, le macérat obtenu (environ 3 L) est filtré sur un papier-filtre de un diamètre moyen des pores 30 µm, puis stocké sous dioxyde de carbone. Il est noté **CZNCA**.

### **Conclusion**

L'objectif des différentes études préliminaires décrites dans ce chapitre était la mise au point d'une méthode de chimie extractive adaptée à la thématique suivie. L'extraction de composés naturels met en jeu de multiples paramètres souvent liés, ce qui rend impossible leur optimisation de façon strictement indépendante. Le choix de la méthode requiert un compromis entre l'efficacité quantitative de l'extraction et la similitude avec les conditions « naturelles ».

Toutefois, le recours à la dégustation a permis d'appréhender séparément l'influence de différents facteurs tels que la nature, l'état, ou encore le traitement du bois de chêne utilisé, mais également le type de solvant mis en œuvre et les conditions opératoires.

Par analogie avec l'utilisation du bois de chêne pour l'élaboration des vins et des eaux-de-vie, nous avons défini un protocole d'extraction des composés à saveur sucrée.

Ce protocole peut être reproduit plusieurs fois afin d'obtenir une quantité suffisante d'extrait brut initial.

Les étapes d'extraction liquide/liquide du filtrat seront décrites dans le chapitre suivant car nous estimons qu'elles participent du protocole de fractionnement.



## Chapitre 5 - Mise en place d'un protocole de fractionnement des extraits de bois de chêne guidé par la dégustation

### **Introduction**

Afin d'étudier les composés non-volatils à saveur sucrée dans le bois de chêne, une démarche inductive est adoptée. Elle repose sur la mise en place d'un protocole de fractionnement basé sur la dégustation et impliquant diverses techniques séparatives. L'objectif de cette étude est la purification d'une ou de plusieurs molécules sapides en quantité suffisante, en vue de leur caractérisation structurale et gustative.

Compte tenu de l'originalité de cette démarche, nous avons choisi d'intégrer les parties expérimentales (matériels et méthodes) dans la description du protocole, étape après étape, plutôt que de les regrouper et de les juxtaposer dans une section spécifique.

Les travaux de cette partie ont été effectués en collaboration avec le Docteur Pierre Waffo-Teguo, du laboratoire GESVAB (Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique), situé dans l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, et dirigé par le professeur Mérillon.

### **I) Description de la stratégie déployée – Estimation de la taille des composés**

#### **A) Principe et contraintes de la stratégie de fractionnement**

##### **1) Principe**

La démarche mise en œuvre ici se rapproche du couplage chromatographie en phase gazeuse - olfactométrie (CPG-O), utilisé par les aromaticiens pour isoler, en vue d'identification, les composés odorants d'intérêt d'un extrait complexe (Delahunty *et al.*, 2006). Contrairement à d'autres stratégies de fractionnement (Arramon, 2001; Vitrac *et al.*, 2001; Zga *et al.*, 2009), la purification n'est pas ici guidée par la nature chimique des molécules ou par leurs activités biologiques, mais par leurs propriétés gustatives. En effet, le protocole développé met en jeu plusieurs étapes faisant intervenir des techniques séparatives complémentaires. A l'issue de chaque étape, les différentes fractions obtenues sont dégustées et la fraction jugée la plus intéressante est alors conservée pour l'étape ultérieure.

Trois techniques de fractionnement sont utilisées : l'extraction liquide/liquide, la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) et la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) sur silice à polarité de phase inversée (C18).

## 2) Suivi de la purification : matériel et méthodes

A l'issue de chaque étape, les fractions sont évaporées, reprises dans l'eau milliQ et lyophilisées. On renouvelle la reprise dans l'eau et la lyophilisation afin d'éliminer les éventuelles traces de solvants.

Sauf indication contraire, les conditions de dégustation utilisées dans ce protocole sont les suivantes : 3 mg de chaque fraction sont repris dans 600 µL d'éthanol. 60 mL d'eau osmosée sont ensuite additionnés, de façon à obtenir une solution à 1 % d'éthanol et de concentration 50 mg/L en composés du chêne. La dégustation est réalisée par quatre personnes entraînées, dans des verres AFNOR.

Un suivi analytique des fractions peut également être effectué par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse. Les conditions expérimentales sont résumées ci-dessous.

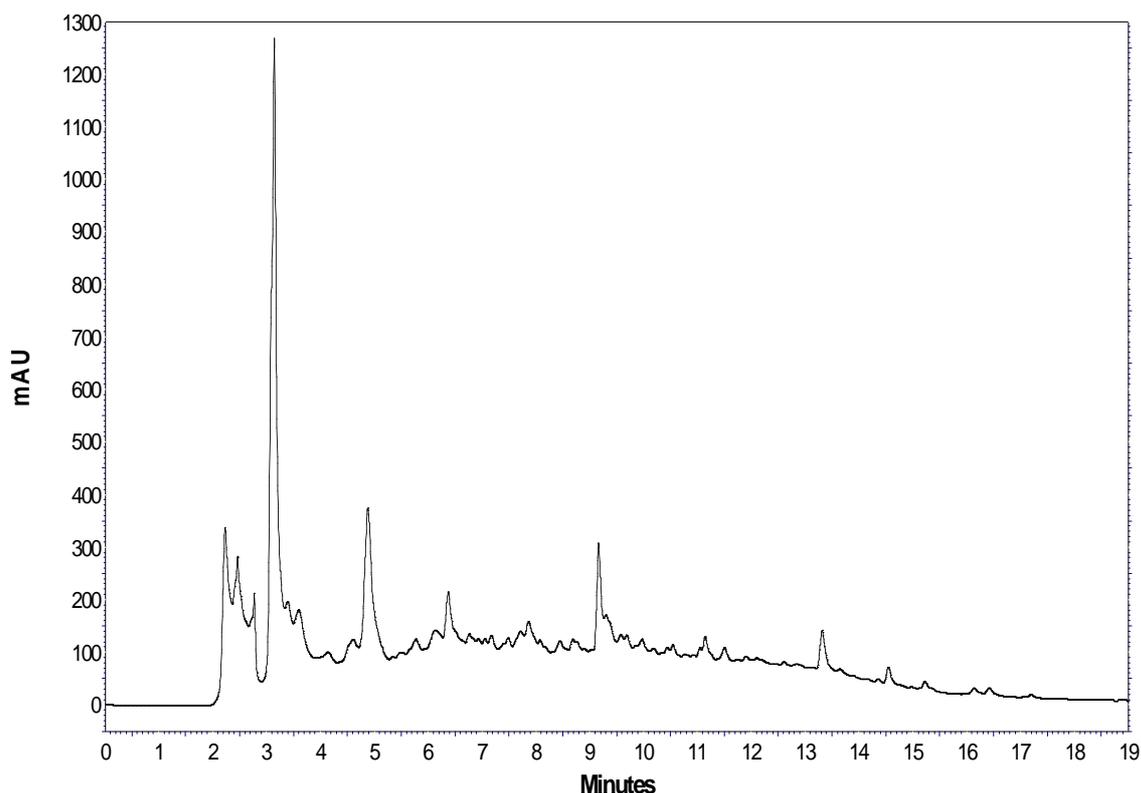
**Tableau 17** - Conditions expérimentales de la CLHP analytique.

Appareil :							
Spectra System (Thermo Fisher Scientific)							
Logiciel :							
ChromQuest 4.2							
Détecteur :							
UV à barrette de diodes Spectra System UV 1000 (Thermo Fisher Scientific)							
La longueur d'onde utilisée est 280 nm.							
Colonne :							
Beckman Coulter Ultrasphere ODS (C18)							
250 x 4.6 mm							
Porosité 5 µm							
Phase mobile :							
Solvant A : eau milliQ + 0.1 % d'acide formique							
Solvant B : acétonitrile CLHP + 0.1 % d'acide formique							
Gradient :							
Temps (min)	0	2	19	20	23	24	27
% de B	10	10	70	95	95	10	10
Débit : 1 mL/min							
Injection :							
10 µL, à l'aide d'un injecteur automatique							

### 3) Enjeux et exigences de la purification

Le chromatogramme CLHP d'un extrait de bois **CZNCA**, préparé comme décrit au chapitre 4 (ramené à 50 mg/L par dilution), est présenté à la figure 7.

La multitude des pics présents traduit la complexité moléculaire des extraits de bois. En outre, de nombreuses co-élutions sont prévisibles sur ce chromatogramme. L'utilisation de plusieurs techniques complémentaires semble nécessaire en vue d'obtenir des composés purs.



**Figure 7** - Chromatogramme CLHP à 280 nm d'un extrait de bois **CZNCA**.

Par ailleurs, l'objectif final de cette partie est l'obtention de composés purs en quantité suffisante pour leur caractérisation structurale et gustative (quelques mg). Or, la mise en place d'un long protocole basé sur la dégustation requiert des quantités d'extrait importantes, puisque, à chaque étape, une partie est consommée par l'analyse sensorielle. Les techniques employées doivent donc être applicables à l'échelle préparative et assez faciles à mettre en œuvre.

La lyophilisation des fractions est primordiale, pour des raisons de sécurité évidentes ; les solvants fortement volatils sont privilégiés.

## B) Estimation de la taille des composés à saveur sucrée

De façon préliminaire à la cascade de purification des extraits de bois de chêne, des expérimentations d'ultrafiltrations successives ont été réalisées.

### 1) Matériel et méthodes

L'ultrafiltration est effectuée à l'aide d'une cellule Amicon de 50 mL, sous agitation. La cellule est maintenue sous 5 bars de pression de diazote. Des membranes Omega™ en polyethersulfone avec des seuils de coupure de 10, 5 et 1 kDa sont utilisées. Un extrait **CZNCA** est préparé, dilué par 10 puis filtré à 0.45 µm. 50 mL de ce liquide sont ultrafiltrés de façon successive sur les différentes membranes, par seuil de coupure décroissant. A chaque étape, le rétentat est repris dans 50 mL de solution eau/éthanol 95/5 et le filtrat est soumis à l'étape suivante.

### 2) Résultats et discussion

A l'issue des différentes étapes d'ultrafiltration, on obtient quatre fractions qui sont dégustées dans les conditions décrites précédemment (tableau 18).

**Tableau 18** - Description gustative des différentes fractions d'ultrafiltration.

Fraction	> 10 kDa	5-10 kDa	1-5kDa	< 1 kDa
Description gustative	Très amer et astringent	Très amer et astringent	Amer et astringent	Légèrement amer, sucrosité en finale

Ces résultats montrent que la sucrosité est essentiellement perceptible dans la fraction de plus faible masse moléculaire (< 1 kDa), tandis que l'astringence y est beaucoup moins intense. La fraction polymérique extractible semble être essentiellement associée à des saveurs amères et à de l'astringence. Ces résultats rejoignent en partie ceux obtenus par Hufnagel et Hofmann (2008) : ils ont montré que la fraction de haut poids moléculaire (> 5 kDa) d'un vin élevé en barriques de chêne était intensément amère et astringente.

Toutefois, il ne s'agit là que d'une première estimation de la taille, compte tenu de la précision des seuils de coupure de l'ultrafiltration.

Par ailleurs, il est possible que des composés à saveur sucrée existent dans les autres fractions de l'extrait étudié, mais que leur goût y soit masqué par des composés amers et astringents.

Le fractionnement et la purification des extraits, puis l'identification des molécules isolées, sont nécessaires à une éventuelle confirmation de ces observations.

L'ultrafiltration constitue une méthode intéressante de séparation en fonction de la taille des composés. Néanmoins, son inconvénient majeur tient à sa lenteur : plusieurs heures sont nécessaires afin d'ultrafiltrer 50 mL.

Cette technique fournit quelques indications quant à la taille des composés recherchés, mais elle ne peut raisonnablement être utilisée dans le protocole de fractionnement développé en raison de sa faible efficacité à l'échelle préparative.

## **II) Extractions liquide/liquide successives**

Cette technique élémentaire de fractionnement consiste en un transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles. Les molécules d'un extrait se partagent entre les deux phases en fonction de leur affinité pour chacune d'elles. Généralement, l'une des phases est aqueuse, l'autre est constitué d'un (ou plusieurs) solvant(s) organique(s). Il est nécessaire que les deux liquides forment un système binaire stable. Une différence de densité entre les deux phases permet leur séparation par décantation, dans une ampoule.

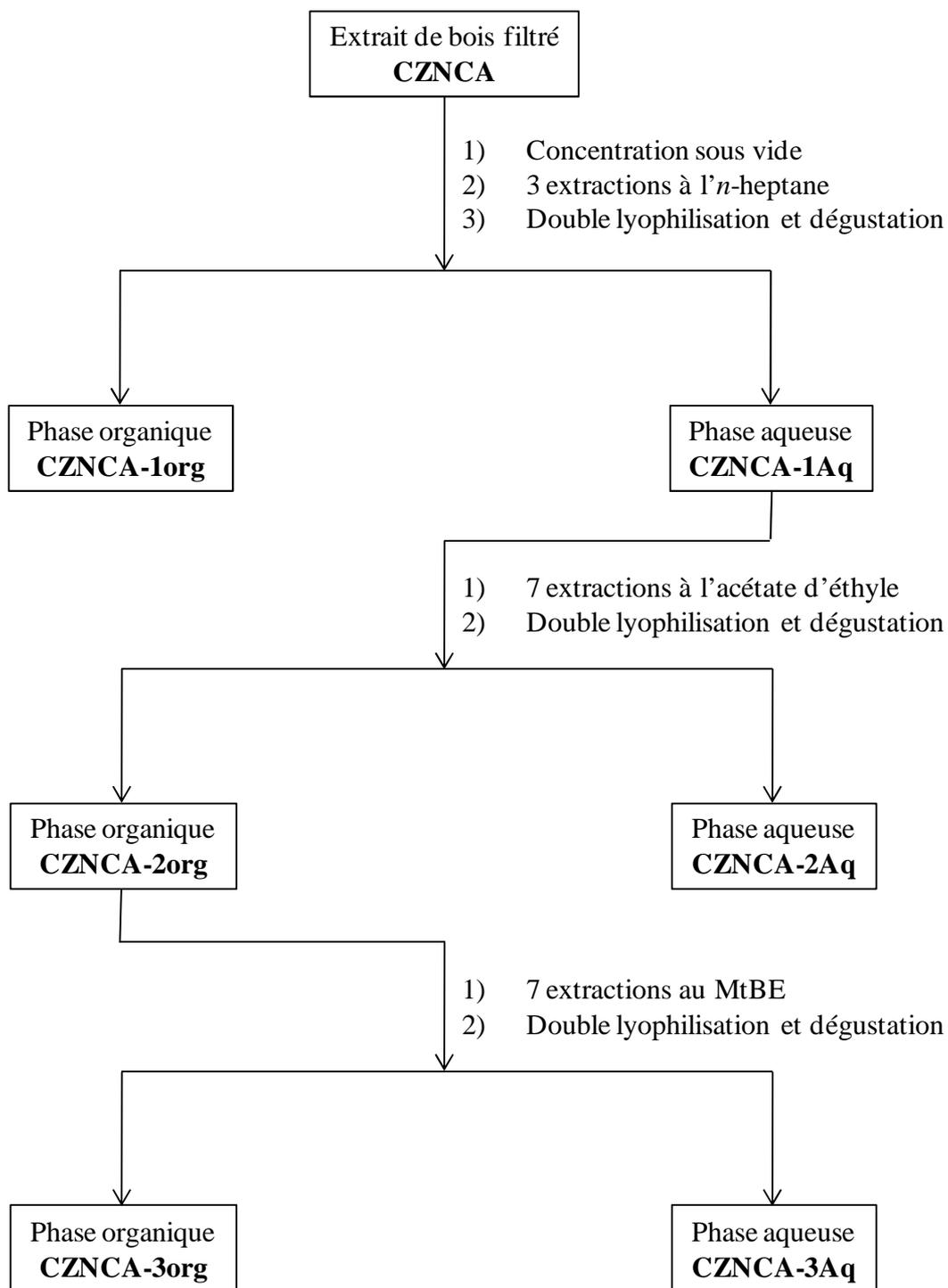
Une extraction liquide/liquide conduit à deux fractions différentes. Il est par conséquent intéressant de choisir divers solvants, possédant des polarités différentes, afin d'orienter la sélectivité du fractionnement. La figure 8 schématise le protocole d'extractions liquide/liquide mis en œuvre.

### **A) Extraction de **CZNCA** à l'heptane**

#### **1) Mise en œuvre expérimentale**

Une macération de copeaux est réalisée selon la procédure décrite au chapitre 4. 3 L de filtrat **CZNCA** sont récupérés et concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide (la température du bain ne dépassant pas 35°C) jusqu'à obtenir un volume de 1 litre environ. Une suspension de couleur brune est obtenue : elle constitue la phase aqueuse. Une ampoule à décanter de 1 litre est remplie avec 500 mL de phase aqueuse et de 100 mL de *n*-heptane de qualité CLHP. Après agitation manuelle, les deux phases sont séparées par décantation.

La séparation est aisée et rapide.



**Figure 8** - Protocole d'extractions liquide/liquide successives.  
Application au fractionnement guidé par la dégustation.

La phase supérieure (organique) est isolée, et la phase inférieure (aqueuse) est réintroduite dans l'ampoule à décanter. Deux extractions supplémentaires sont réalisées de la même façon. Les phases organiques sont assemblées puis évaporées sous vide. La phase aqueuse est également concentrée sous vide.

L'ensemble de cette extraction est réalisée de la même façon avec les 500 mL de phase aqueuse restants.

La fraction organique est reprise dans quelques gouttes d'éthanol, puis complétée avec 100 mL d'eau milliQ. Les deux fractions obtenues sont alors lyophilisées deux fois. Le lyophilisat de la phase aqueuse se présente sous forme d'une poudre brun foncé. La phase organique conduit à une très faible quantité (quelques milligrammes) de solide jaunâtre.

## 2) Résultats et discussion

L'heptane est un solvant aprotique, de très faible polarité et très peu dissociant. Le but de cette extraction est essentiellement d'éliminer d'éventuels corps gras de la phase aqueuse, afin de faciliter la purification ultérieure.

L'étape préliminaire de concentration de l'extrait a essentiellement deux objectifs :

- Eliminer l'éthanol afin qu'il ne perturbe pas le système biphasique eau/heptane au cours de l'extraction
- Réduire le volume initial de la phase aqueuse, ce qui permet de réduire les quantités de solvant nécessaires pour les différentes extractions.

Cette étape indispensable présente toutefois des inconvénients ; elle exige un temps important et certaines précautions pour éviter les projections du liquide à évaporer dans le ballon de concentration, en particulier au début de l'évaporation. La température du bain est limitée à 35°C afin d'éviter d'éventuelles modifications (dégradations) des composés extraits.

Les deux fractions obtenues sont dégustées dans les conditions décrites au paragraphe I.A.2 La phase aqueuse possède un goût intense, très proche de celui de l'extrait de bois initial : amer, astringent, avec une perception de sucrosité sous-jacente. A la concentration dégustée, la phase organique ne développe pas de goût particulier.

Par conséquent, le lyophilisat de phase aqueuse, noté **CZNCA-1Aq** est conservé pour l'extraction suivante.

## B) Extraction de **CZNCA-1Aq** à l'acétate d'éthyle

### 1) Mise en œuvre expérimentale

Le lyophilisat de la fraction **CZNCA-1Aq** obtenu précédemment est solubilisé dans 500 mL d'eau milliQ, dans un bain à ultrasons. La suspension obtenue constitue la phase aqueuse qui est extraite 7 fois par 100 mL d'acétate d'éthyle (agitation manuelle).

La décantation est délicate au cours des deux ou trois premières extractions, puisqu'un précipité marron foncé se forme et tend à gêner l'écoulement du liquide dans l'ampoule. Ce précipité est toutefois conservé au cours des extractions successives car il est susceptible de se solubiliser partiellement.

Les phases organiques (phases supérieures) sont assemblées puis évaporées sous vide. Le résidu solide est repris dans 2 mL d'éthanol et complété par 200 mL d'eau milliQ. La phase aqueuse est concentrée sous vide.

Les fractions obtenues sont alors lyophilisées deux fois. Les lyophilisats se présentent sous forme de poudres de couleur marron foncé pour la phase aqueuse et marron-orangé pour la phase organique.

### 2) Résultats et discussion

L'acétate d'éthyle est un solvant aprotique, relativement polaire (même s'il l'est significativement moins que l'eau). La phase organique possède une densité inférieure à celle de la phase aqueuse. Il s'agit d'un solvant volatil, marqué par une odeur intense.

Les deux fractions sont dégustées : la partie aqueuse est perçue comme amère et astringente. La fraction issue de la phase organique ne présente aucune odeur d'acétate d'éthyle, ce qui confirme l'efficacité de l'évaporation des solvants par lyophilisation. Son goût est décrit comme nettement plus doux et moins amer.

La fraction organique, notée **CZNCA-2Org**, est donc conservée pour l'étape suivante.

## C) Extraction de **CZNCA-2Org** au méthyl *ter*-butyl éther (MtBE)

### 1) Mise en œuvre expérimentale

Le lyophilisat de **CZNCA-2Org** est solubilisé par sonication dans 5 mL d'éthanol puis repris dans 500 mL d'eau milliQ. La phase aqueuse ainsi obtenue est extraite 7 fois par 100 mL de MtBE dans une ampoule à décanter de 1 L, par agitation manuelle.

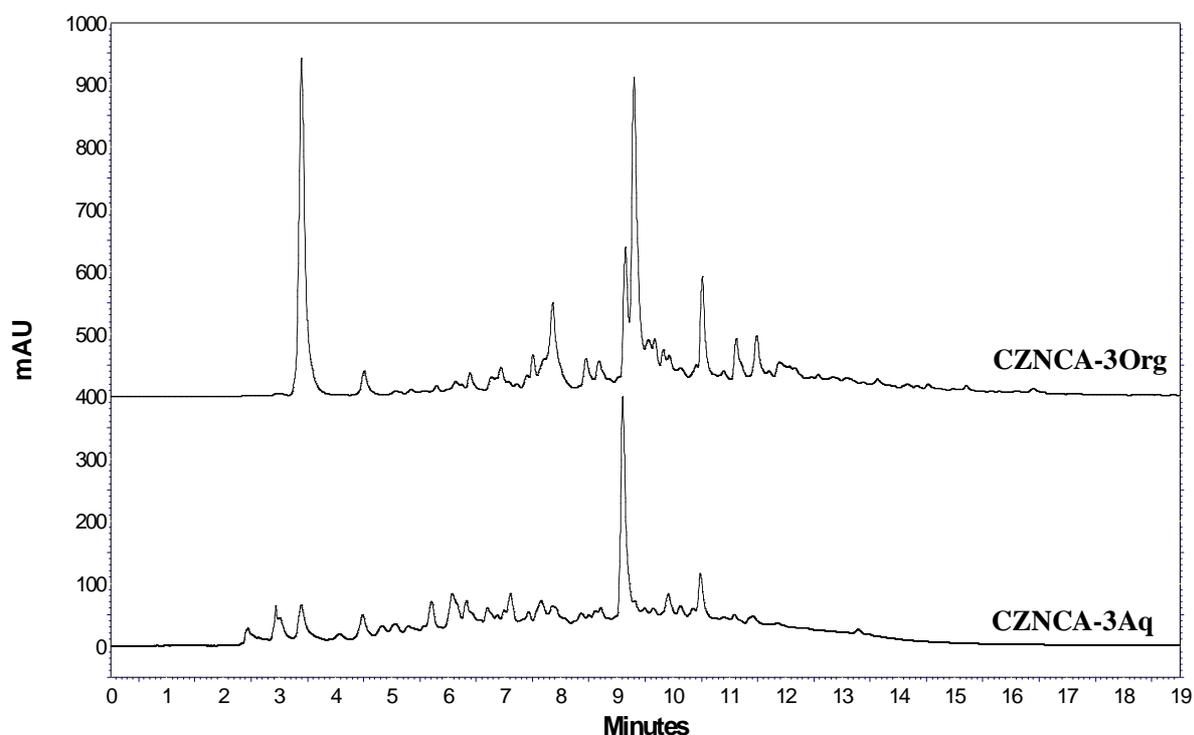
La séparation entre les deux phases est rapide et la décantation ne pose pas de problème majeur. Le solvant organique, constituant la phase supérieure, se colore rapidement en jaune foncé.

Les phases organiques recueillies sont assemblées et évaporées sous vide. Le résidu solide est repris dans 3 mL d'éthanol et complété par 200 mL d'eau milliQ. La phase aqueuse est concentrée sous vide.

Les fractions provenant de cette extraction sont lyophilisées deux fois puis dégustées. Les phases organique et aqueuse se présentent sous forme de poudres respectivement marron-orange et marron foncé.

## 2) Résultats et discussion

Le méthyl *ter*-butyl éther (MtBE), ou 2-méthoxy-2-méthylpropane, est un solvant aprotique, de densité 0.74. Sa polarité est proche de celle de l'acétate d'éthyle, toutefois sa sélectivité est différente. Il permet d'extraire des composés de nature variable, ce que confirment les différences entre les profils chromatographiques des deux phases (figure 9). A ce titre, l'extraction au MtBE peut s'avérer intéressante car elle permet un nouveau fractionnement.



**Figure 9** - Chromatogrammes CLHP à 280 nm de la phase aqueuse (en bas) et de la phase organique (en haut) d'une extraction au MtBE de **CZNCA-2Org**.

Les deux fractions sont dégustées. Leur goût est assez similaire, marqué par une complexité de la perception, associant des saveurs amères et sucrées ainsi que de l'astringence.

Toutefois, la fraction issue de la phase organique, notée **CZNCA-3Org**, apparaît plus douce et la persistance de la sucrosité est plus intense. Il est possible que la phase organique soit plus riche en composés édulcorants ou au contraire que la phase aqueuse contienne davantage de molécules amères et astringentes, ce qui diminue la perception de sa sucrosité.

Quoiqu'il en soit, la fraction **CZNCA-3Org** est conservée pour la poursuite du protocole de fractionnement.

Les extractions liquide/liquide mises successivement en œuvre et impliquant divers solvants ont permis un premier fractionnement des extraits de bois.

L'heptane, l'acétate d'éthyle et le MtBE ont été classés en 2001 dans la Pharmacopée Européenne comme solvants de classe 3, c'est-à-dire de moindre toxicité et ne présentant que peu de dangers pour la santé dans le cas d'exposition aiguë. En outre, la double lyophilisation des extraits permet d'éliminer leurs traces éventuelles, garantissant ainsi la non-contamination des échantillons dégustés. Néanmoins, le manque de données relatives à leur toxicité à long terme nous a conduits à effectuer ces extractions sous une hotte aspirante.

L'analyse des fractions par la dégustation, dont les résultats sont résumés dans le tableau 19, a conduit à l'obtention d'une fraction **CZNCA-3Org** dont l'équilibre gustatif est davantage déplacé vers les saveurs sucrées. Son profil chromatographique apparaît également simplifié.

**Tableau 19** - Description gustative des différentes phases obtenues à l'issue des extractions liquide/liquide. Les fractions conservées à chaque étape sont en gras.

Solvant	Phase organique	Phase aqueuse
<i>n</i> -Heptane	Pas de goût	<b>Amère, astringente, sucrosité sous-jacente</b>
Acétate d'éthyle	<b>Amère, douce en finale</b>	Très amère et astringente
MtBE	<b>Légère amertume, sucrosité</b>	Amère, légère douceur

### **III) Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)**

L'extrait **CZNCA-3Org**, obtenu à l'issue des diverses extractions liquide/liquide est ensuite soumis à une technique de fractionnement puissante : la chromatographie de partage centrifuge.

#### **A) Principe et appareillage de la CPC**

Cette partie vise à une description rapide et générale du principe de la CPC, de son instrumentation ainsi que de ses avantages, mais nous ne décrirons pas la théorie détaillée de son fonctionnement ni la diversité des systèmes proposés.

##### **1) Principe**

La CPC est une méthode de chromatographie liquide/liquide sans support solide, mise au point par Nunogaki (Murayama *et al.*, 1982).

Elle est basée sur les différences de partage de divers solutés entre deux phases liquides non miscibles préparées par mélange de 2 solvants ou plus.

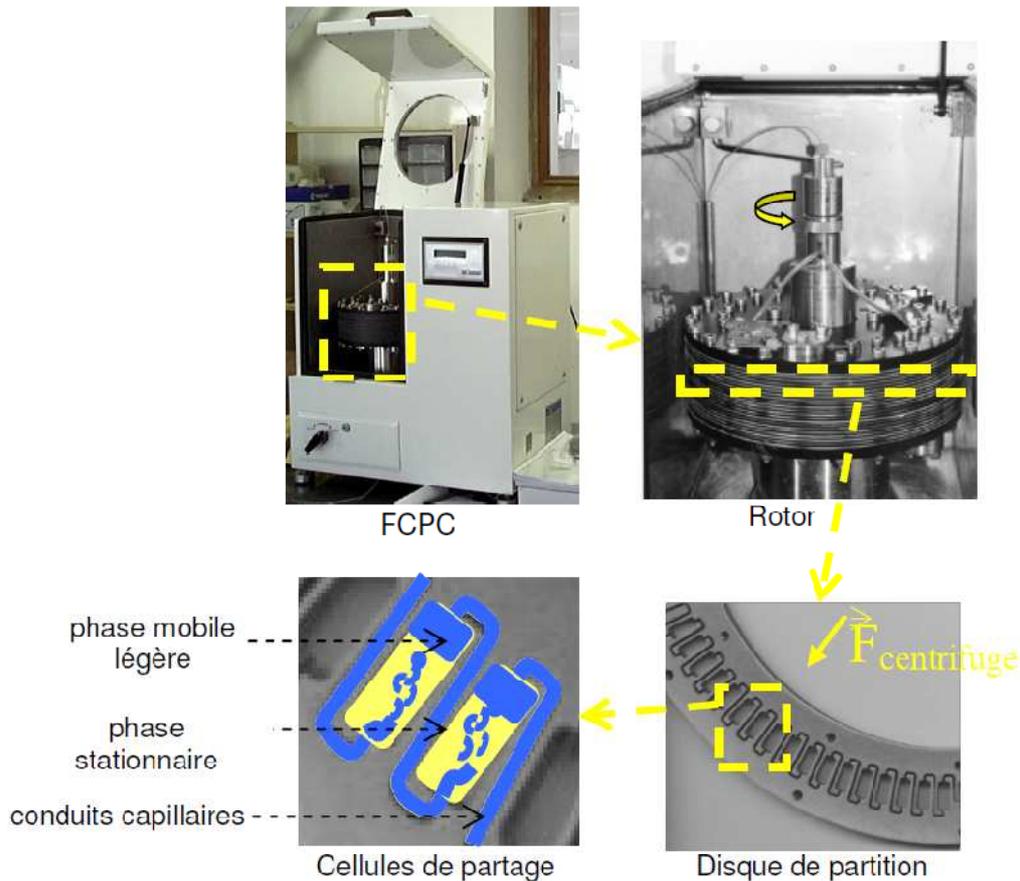
L'appareil est généralement constitué d'une colonne (rotor) formée de nombreuses cellules disposées radialement, interconnectées et gravées dans un disque (figure 10).

Cette colonne est mise en rotation autour d'un axe fixe. Un champ de force centrifuge constant est ainsi généré.

Une première phase liquide est pompée : elle remplit les cellules puis est maintenue stationnaire sous l'action du champ de force centrifuge.

La seconde phase liquide (mobile) est pompée au travers jusqu'à ce qu'un équilibre stable soit atteint entre les volumes de phase stationnaire  $V_{stat}$  et de phase mobile  $V_{mob}$  dans la colonne.

Les solutés du mélange à fractionner sont alors distribués dans les deux phases en fonction de leur affinité pour chacune d'entre elles. La différence de partage entre les divers composés est à l'origine de leur séparation.



**Figure 10** - Description de l'appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge et schématisation de son fonctionnement (d'après Toribio, 2007).

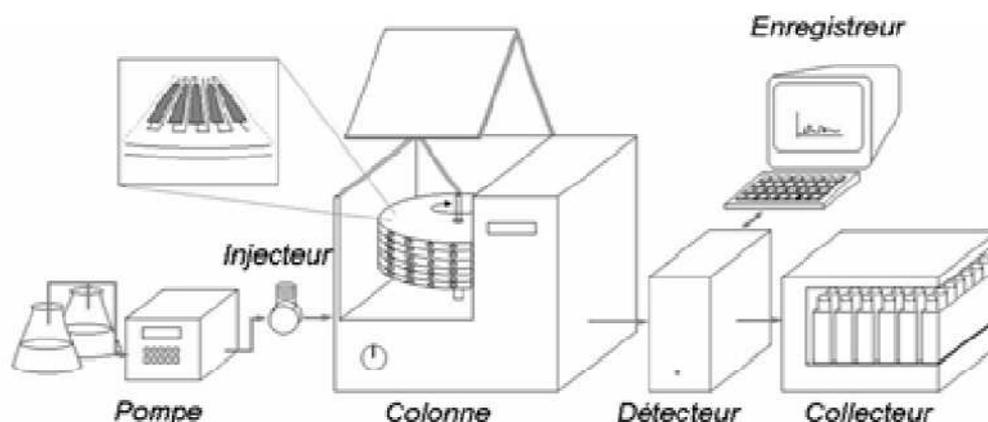
## 2) Appareillage et utilisation

### a) Appareillage : constitution d'une chaîne CPC

Une chaîne chromatographique utilisée en CPC est composée des éléments usuels d'une chaîne de chromatographie préparative (figure 11) :

- Une pompe, permettant d'introduire les deux phases dans la colonne
- Un injecteur, afin d'introduire l'échantillon dans le système
- Une colonne chromatographique, qui est un rotor formé de plusieurs disques de partage superposés, chacun contenant un grand nombre de cellules interconnectées (il s'agit de l'élément assurant la séparation des solutés)
- Un détecteur, permettant d'analyser l'efficacité de la séparation ainsi que les molécules présentes. Il s'agit généralement d'un détecteur UV, mais d'autres types de détecteurs peuvent être utilisés (spectromètre de masse notamment)
- Un enregistreur, qui réalise le traitement des informations

- Un collecteur de fractions, afin de récupérer les solutés séparés



**Figure 11** - Schéma d'une chaîne CPC (d'après Toribio, 2007).

Les différents éléments utilisés dans le cadre de cette thèse seront décrits ultérieurement.

### *b) Utilisation de la CPC*

La CPC repose sur l'utilisation exclusive de liquides au sein d'un rotor. Il est par conséquent nécessaire que la colonne soit parfaitement étanche. Afin de garantir la robustesse des joints, elle doit être remplie d'un solvant inerte entre les expérimentations et ne doit jamais être mise en rotation à vide.

En cours d'utilisation, la colonne, de volume total  $V_{tot}$ , est remplie de phase stationnaire, maintenue dans les cellules sous l'effet du champ de force centrifuge généré par la rotation. La phase mobile est alors pompée au travers des cellules, jusqu'à un état d'équilibre entre les volumes des deux phases. La pression augmente alors dans le système (quelques dizaines de bars). On a, par définition :

$$V_{tot} = V_{mob} + V_{stat}$$

L'échantillon à fractionner est dissous dans un mélange des deux phases puis injecté dans le système. Les solutés se répartissent alors dans les deux phases et se séparent en fonction de la différence de leur affinité pour chacune de ces phases. Lorsque la séparation des molécules est essentiellement dirigée par les phénomènes de partage, chaque composé  $X$  est éjecté de la colonne après un volume de rétention  $V_{rX}$  caractéristique et défini par l'équation suivante :

$$V_{rX} = V_{mob} + K_{DX} \cdot V_{stat}$$

Avec  $K_{DX}$ , constante de distribution d'un soluté  $X$  dans le système de solvant utilisé :

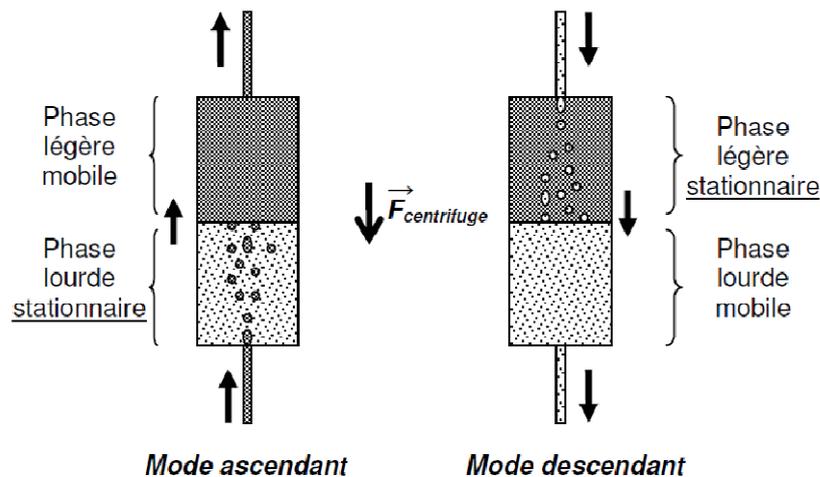
$$K_{Dx} = \frac{[X]_{\text{stat}}}{[X]_{\text{mob}}}$$

où  $[X]_{\text{stat}}$  et  $[X]_{\text{mob}}$  désignent les concentrations de X respectivement dans la phase stationnaire et la phase mobile.

Aussi, plus le volume de la phase mobile est grand, plus l'écart entre les volumes de rétention des divers solutés est réduit, donc moins bonne est la séparation.

Il est ainsi important d'utiliser un système de solvants permettant d'obtenir un équilibre stable entre les deux phases, et ne conduisant pas à un volume de phase stationnaire éjectée trop élevé.

L'appareil de CPC est équipé d'une vanne de commutation permettant de modifier le sens d'introduction des solvants dans la colonne. Lorsque la phase mobile est introduite dans la cellule en sens inverse de la force centrifuge, le mode est dit ascendant. Dans le cas opposé, le mode est descendant (figure 12).



**Figure 12** - Schématisation des deux modes d'introduction des solvants dans la colonne (d'après Toribio, 2007).

Afin d'optimiser le contact entre les deux phases et ainsi la séparation des solutés, on débute le fractionnement en :

- Mode ascendant lorsque la phase stationnaire est plus dense que la phase mobile
- Mode descendant lorsque la phase stationnaire est moins dense

Il est possible de commuter la vanne en cours de manipulation. Par exemple, à la fin d'une expérimentation réalisée en mode ascendant, le système peut être basculé en mode descendant

afin d'éjecter de la colonne les composés ayant une très forte affinité pour la phase stationnaire.

### *c) Système de solvants*

Le choix des solvants utilisés est un facteur déterminant de la qualité de la séparation en CPC. La polarité des phases influence notablement la distribution des molécules.

Le système choisi doit être stable, solubiliser correctement l'échantillon injecté et ne doit pas être déstabilisé par celui-ci, car l'injection entraînerait alors une déstabilisation du système nuisible à la séparation.

Les phases liquides et stationnaires utilisées en CPC sont constituées de systèmes biphasiques pouvant contenir 2, 3 ou davantage de solvants. La construction et l'analyse de diagrammes de phase permet de prévoir le comportement des systèmes et de définir ceux qui peuvent être utilisés en CPC

L'étude des mélanges de solvants et leur caractérisation ne constitue pas l'objet de ce travail, nous en citerons deux exemples fréquemment utilisés.

Les systèmes « pont », formés de trois solvants, par exemple eau/isopropanol/acétate d'éthyle. Deux solvants ne sont pas miscibles tandis que le troisième est miscible avec les deux autres : il se répartit dans les deux phases et assure le transfert des molécules de l'une vers l'autre.

Les systèmes de la gamme Arizona (Renault *et al.*, 2002; Maciuk, 2005), formés par 4 solvants (eau, méthanol, acétate d'éthyle, *n*-heptane). Les proportions relatives de ces solvants définissent différents systèmes biphasiques stables au sein de cette gamme et déterminent la polarité des deux phases.

Les deux phases peuvent être préparées dans une ampoule à décanter avant le fractionnement : le mélange des solvants conduit à un état d'équilibre thermodynamique, chaque phase étant saturée l'une en l'autre.

### **3) Avantages**

La CPC présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques chromatographiques préparatives, et notamment la CLHP.

La quantité d'échantillon injectée dépend du volume de la colonne et de la solubilité dans le système de solvants, mais sur une colonne de 1 L par exemple, on peut injecter

jusqu'à 10 grammes de produit brut. Elle est par conséquent tout à fait adaptée à un protocole de fractionnement à l'échelle préparative.

L'absence de support solide permet de récupérer intégralement et de façon aisée l'échantillon injecté, en évitant les phénomènes d'adsorption irréversible rencontrés en CLHP.

Le temps de manipulation est assez réduit : une séparation par CPC dure généralement de 1 à 3 heures.

La quantité de solvant ramenée à la masse d'échantillon injectée est 5 à 10 fois plus faible qu'en CLHP (Maciuk, 2005), ce qui constitue des enjeux économique et environnemental non négligeables.

Un nombre quasi infini de systèmes de solvants peuvent être générés : on dispose ainsi d'une variabilité de la phase stationnaire largement supérieure à celle disponible en CLHP

Le principe de la CPC, bien que reposant sur des phénomènes d'interactions moléculaires, est différent de la CLHP et conduit à une séparation différente des solutés : il s'agit d'une technique complémentaire

En contre partie, l'utilisation de la CPC nécessite une optimisation importante, relative notamment au choix des solvants, afin d'obtenir une séparation maximale des solutés.

Malgré ces limitations, cette technique constitue, en raison de ses performances à l'échelle préparative, un outil particulièrement intéressant dans le cadre du développement d'un protocole de fractionnement et de purification d'extraits végétaux (Marston & Hostettmann, 2006; Pauli *et al.*, 2008).

Les résultats de différentes études tendent à confirmer l'intérêt de la CPC, par exemple dans le cadre de purifications bio-guidées (Himbert *et al.*, 2004; Pinel *et al.*, 2007; Toribio *et al.*, 2007; Zga *et al.*, 2009).

Par conséquent, il nous a semblé intéressant de fractionner l'extrait **CZNCA-3Org** obtenu précédemment à l'aide de cette technique.

Notre laboratoire ne disposant pas de cet équipement, nous avons effectué ces travaux au sein du laboratoire GESVAB.

## B) Matériel et méthodes

Cette partie décrit de façon plus spécifique l'appareillage utilisé dans cette étude, ainsi que la mise en œuvre de la CPC en tant que technique de fractionnement des composés non volatils d'un extrait de bois.

### 1) Appareillage

Le laboratoire GESVAB dispose de deux appareils de CPC : l'un équipé avec une colonne de volume 1 L, l'autre de volume 200 mL. C'est ce dernier appareil qui est utilisé pour la mise au point de la méthode de fractionnement.

Il s'agit d'un appareil FCPC 200 de la firme Kromaton® (Angers, France), constitué de 20 disques de partition, contenant au total 1320 cellules de volume 0.13 mL. La capacité totale de la colonne est de 204 mL, avec un volume mort de 32.3 mL. Une distance de 105 mm sépare chaque cellule du centre du rotor. La vitesse de rotation peut varier de 0 à 2000 rpm.

L'alimentation de la colonne en solvants est assurée par une pompe binaire CLHP modèle 321-H12 de marque Gilson.

L'injection de l'échantillon dans le système se fait par l'intermédiaire d'une valve haute pression (3725(i)038 Rhéodyne), équipée d'une boucle d'injection de 10 mL.

Un détecteur Varian UV Prostar 325 est utilisé.

En sortie de colonne, les fractions sont récupérées à l'aide d'un collecteur Gilson FC 204, dans des tubes en verre de 12 mL.

### 2) Système de solvants

Le choix du système de solvants est basé sur l'étude de la partition des composés de l'échantillon dans les deux phases.

En pratique, divers systèmes sont préparés en faible quantité (quelques mL) à partir des solvants considérés. Parallèlement, des piluliers sont remplis avec chacun 1 mg de l'échantillon à fractionner. Chaque pilulier est complété avec 1 mL de phase supérieure et 1 mL de phase inférieure d'un système donné. Après agitation, 100 µL de chaque phase sont prélevés, évaporés à l'aide d'un évaporateur sous vide RapidVap, repris dans 1 mL de solution méthanol/eau 50/50. Les divers échantillons sont alors injectés en CLHP analytique. La partition des composés dans les deux phases est estimée à l'aide des chromatogrammes enregistrés.

Les systèmes B, C, D, F, G, H, J, K, L et M de la gamme Arizona (Foucault & Chevolut, 1998) ont été testés de cette façon.

En mode élution, on estime que le meilleur système pour le fractionnement d'un extrait complexe est celui dont les solutés se répartissent entre les deux phases avec un coefficient de partage proche de 1 (Maciuk, 2005).

Le système G de la gamme Arizona a été choisi sur cette base.

Il s'agit d'un système biphasique quaternaire, dont les solvants sont le *n*-heptane (Hept), l'acétate d'éthyle (AcOEt), le méthanol (MeOH) et l'eau (H<sub>2</sub>O).

Les proportions sont les suivantes : Hept / AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O      1 / 4 / 1 / 4

On remplit une ampoule à décanter de deux litres avec :

- 200 mL de *n*-heptane de qualité CLHP
- 800 mL d'acétate d'éthyle de qualité CLHP
- 200 mL de méthanol de qualité CLHP
- 800 mL d'eau milliQ

Après agitation manuelle, les deux phases obtenues (environ un litre de chaque) sont séparées par décantation puis placées dans un bain à ultrasons pendant une heure afin de les dégazer.

### 3) Mise en œuvre de la séparation

La CPC est utilisée en mode élution. La phase inférieure (composée essentiellement de méthanol et d'eau milliQ) constitue la phase stationnaire, notée **A**, et la phase supérieure (composée essentiellement de *n*-heptane et d'acétate d'éthyle) constitue la phase mobile, notée **B**.

Dans un premier temps, la colonne est remplie à l'aide de la phase stationnaire **A**, par pompage de 500 mL à un débit de 10 mL/min.

La rotation de la colonne est fixée à 1200 rpm.

L'élution se fait ensuite selon un mode isocratique, avec un débit de 10 mL/min de phase **B**.

Dans ces conditions, la pression de remplissage est de 28 bars et le volume de phase stationnaire éjecté, correspondant au volume de phase mobile dans la colonne, est de 72 mL (le pourcentage de rétention de la phase stationnaire est donc de 62.5 %).

L'élution est effectuée en mode ascendant.

700 mg d'extrait **CZNCA-3Org** sont solubilisés dans 2 mL de phase mobile et 4 mL de phase stationnaire. Une émulsion orange est obtenue, elle est filtrée à l'aide d'un filtre-

seringue en téflon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Le filtrat se présente sous forme d'un système biphasique stable.

L'échantillon est alors injecté dans le système par l'intermédiaire de la vanne Rhéodyne.

L'acquisition débute au moment de l'injection, et la détection UV se fait à 254 et 280 nm.

Le collecteur de fraction est réglé à 1 tube/min.

Le système est basculé en mode descendant au tube 68. L'élution se fait alors à partir de la phase A avec un débit de 10 mL/min.

L'ensemble de l'expérience est effectuée à température ambiante (environ 20°C).

La durée totale de la manipulation est de 90 minutes. A l'issue de cette période, 200 mL de phase A, puis 500 mL de méthanol sont pompés, afin de nettoyer la colonne.

#### **4) Constitution des fractions et dégustation**

L'expérience a permis de collecter 90 tubes, contenant chacun 10 mL de liquide.

Afin de réduire le nombre d'échantillons à déguster, il faut regrouper certains tubes pour constituer un nombre limité de fractions.

Le regroupement des tubes a été effectué sur la base d'analyses en CLHP et en particulier des profils chromatographiques.

Dans un premier temps, 100  $\mu\text{L}$  ont été prélevés tous les cinq tubes. Ils ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur sous vide RapidVap (bloc chauffant de 110 tubes de contenance) puis repris dans 500  $\mu\text{L}$  d'un mélange eau/méthanol 50/50.

10  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon ont été injectés en CLHP analytique, selon les conditions décrites précédemment.

Le regroupement des tubes est basé sur l'allure générale des chromatogrammes : les échantillons successifs présentant les mêmes pics majeurs et un profil chromatographique similaire sont considérés comme appartenant à une même fraction.

Des prélèvements et des analyses CLHP supplémentaires ont été effectués sur d'autres tubes, afin d'affiner le regroupement des tubes.

Chaque fraction est alors constituée par assemblage des tubes, puis elle est évaporée à l'aide de l'évaporateur rotatif, reprise dans de l'eau milliQ puis lyophilisée deux fois.

Les différentes fractions, numérotées en chiffres romains, sont alors dégustées selon le protocole décrit au paragraphe I.A.2.

## C) Résultats

### 1) Séparation chromatographique

#### *a) Choix du mode d'éluion*

La quantité maximale d'échantillon que l'on peut injecter en CPC dépend du volume de la colonne : elle est respectivement de 2 et de 10 grammes sur les colonnes de 200 mL et de 1 litre. Or, la CPC est une méthode correctement reproductible d'une colonne à l'autre. Par conséquent, la CPC de 200 mL est utilisée dans un premier temps pour le développement de la méthode de fractionnement, qui peut ensuite être transposée sur la CPC de 1 litre afin d'augmenter la quantité d'extrait purifiée.

Les tubes collectés en sortie de colonne contiennent des solutions de couleur variable, allant du brun foncé au jaune très pâle. On note très peu de phase stationnaire dans les premiers tubes de l'expérience, ce qui signifie que l'injection de l'échantillon n'a pas engendré de déstabilisation majeure du système. Cela constitue une condition favorable à la séparation.

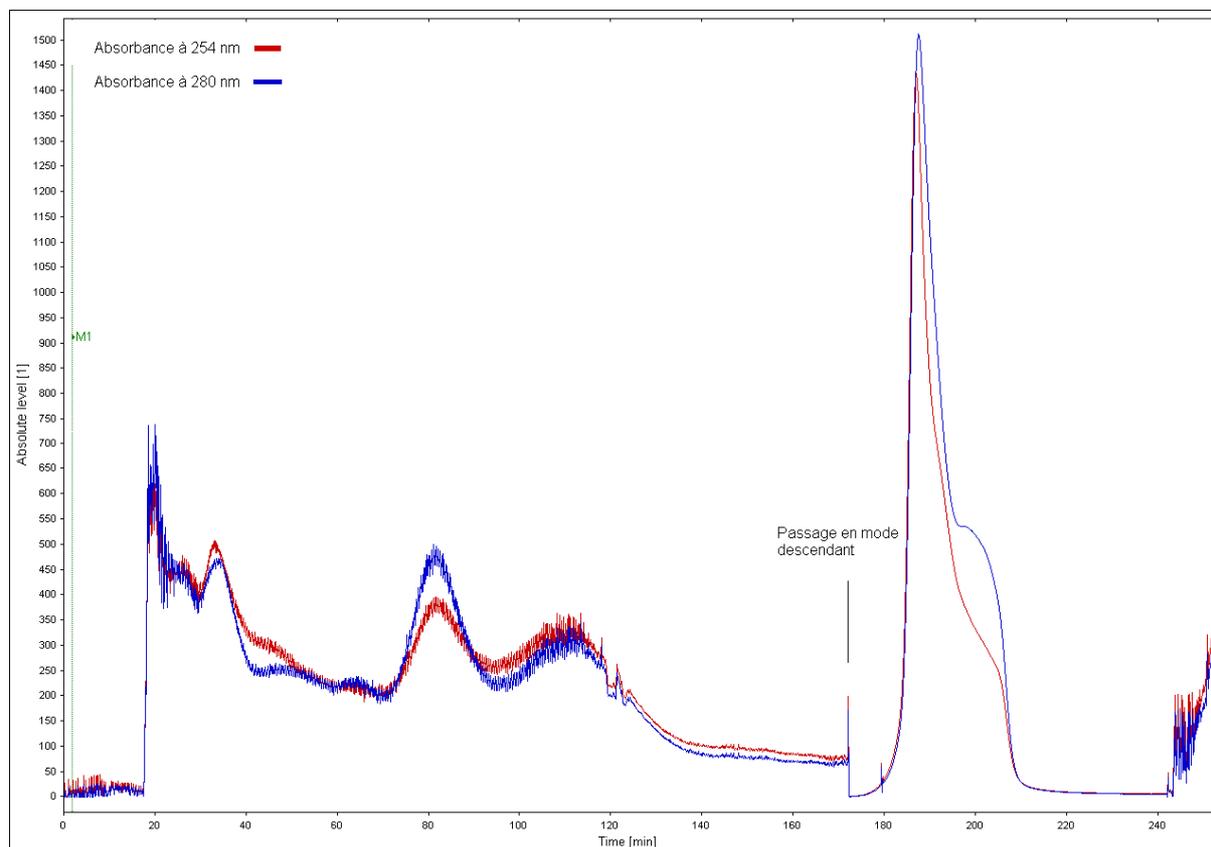
#### *b) Profil chromatographique de la séparation en CPC*

Dans le système utilisé, la phase stationnaire est plus dense que la phase mobile, aussi l'appareil a été utilisé en mode ascendant dans la première partie de la purification. Toutefois, à partir du tube 64, aucun signal n'était détecté en UV. Le mode descendant a alors été enclenché après le tube 68, et la phase A a été pompée avec un débit de 10 mL/min. Ceci a permis de vider la colonne des molécules fortement polaires, qui demeuraient de façon préférentielle dans la phase A.

Le détecteur UV, équipé d'une cellule préparative, permet de suivre l'évolution de l'absorption à 254 et 280 nm au cours de la séparation. On obtient alors un profil chromatographique du fractionnement en CPC (figure 13). Ce profil est quasi identique d'une injection à l'autre, pour un même échantillon et des conditions similaires.

Bien que le développement de la méthode et la dégustation des fractions aient été effectuées à partir d'un fractionnement réalisé sur la CPC de 200 mL, une perte de données informatiques sur l'ordinateur la pilotant ne nous permet pas de présenter le chromatogramme originel. Aussi, la figure 13 montre un profil chromatographique obtenu à partir d'un échantillon de type CZNCA-3Org sur la CPC de 1 litre, dans des conditions similaires à celles décrites précédemment, à l'exception du débit réglé à 20 mL/min. La transposition exacte de la

méthode nécessiterait d'utiliser un débit de 50 mL/min, ce qui poserait des problèmes matériels concernant la collection des fractions. La différence des débits entraîne un décalage au niveau des tubes, avec un rapport théorique de 2.5 (le tube 20 de l'expérience sur la CPC 200mL correspondrait au tube 50 sur la CPC 1L). Des analyses CLHP confirment ce rapport d'environ 2.5 et valident de fait la transposition de la méthode.



**Figure 13** - Chromatogramme de la séparation de l'extrait CZNCA-3Org sur la CPC 1 L, avec une détection UV à 254 nm (en rouge) et 280 nm (en bleu).

Le chromatogramme CPC montre plusieurs zones distinctes, illustrant le fractionnement effectué. Les analyses en CLHP des différents tubes confirment l'efficacité de la séparation : les profils CLHP varient fortement en fonction des tubes.

Le regroupement des tubes, qui a pour but une diminution du nombre d'échantillons à déguster, est guidé par les résultats obtenus en CLHP analytique.

Les tubes 1 à 7 ne contiennent aucun soluté. Le volume associé à ces tubes correspond en effet au volume de phase mobile  $V_m$ , volume nécessaire pour que les composés non retenus par la phase stationnaire sortent de la colonne. Les tubes 1 à 7 ne sont donc pas utilisés.

A l'issue du regroupement, 15 fractions sont obtenues. Leurs profils en CLHP peuvent être très différents ; on imagine donc que ces fractions comportent un nombre variable de

composés. Après lyophilisation, tous les échantillons se présentent sous forme de poudres, de couleur variable (de jaune à marron foncé).

La masse de solide récupérée varie considérablement d'une fraction à l'autre. Au total, la quantité récupérée est de 622 mg, ce qui correspond à une perte de 78 mg par rapport à la quantité introduite. Le rendement (89 %) demeure très élevé, et l'essentiel de la perte est vraisemblablement liée à l'étape d'injection (perte de produit pendant la filtration, dans la seringue, ou encore dans la boucle d'injection).

539 mg ont été récoltés en phase ascendante, 93 mg en phase descendante.

Aucune fraction n'apparaît formée d'un seul composé, chromatographiquement pur, ce qui était prévisible au regard de la complexité de l'échantillon injecté et de la démarche qui a guidé le choix du solvant.

L'utilisation de la CPC a permis un fractionnement important de l'extrait injecté. Les différentes fractions résultant ont ensuite été dégustées.

## **2) Gustation des fractions**

A l'issue d'une double lyophilisation, les diverses fractions obtenues en CPC ont été présentées à quatre dégustateurs entraînés, dans les conditions décrites plus haut.

Ils ont tenté de caractériser la perception gustative associée à chaque échantillon, et d'en évaluer l'intensité sur une échelle de 0 à 5 (tableau 20).

Les aromaticiens couplant la chromatographie en phase gazeuse et l'olfaction emploient les termes d'olfactométrie et d'olfactogramme. Par analogie, nous convenons d'utiliser les termes de gustatométrie et de gustatogramme dans le cadre de la gustation des fractions issues d'une séparation.

Divers descripteurs sensoriels ont été utilisés au cours de cette étude. Ils correspondent à des saveurs fondamentales comme l'amertume ou la sucrosité (douceur), à des sensations tactiles et somesthésiques (astringence, sensation « anesthésiante ») ainsi qu'à des perceptions multimodales (« goût de planche », « goût de coco »). Ces termes appartiennent au vocabulaire de la dégustation œnologique, ils correspondent à des sensations fréquemment perçues dans les vins.

**Tableau 20** - Gustatogramme obtenu à partir du fractionnement  
en CPC de l'extrait de bois **CZNCA-3Org**

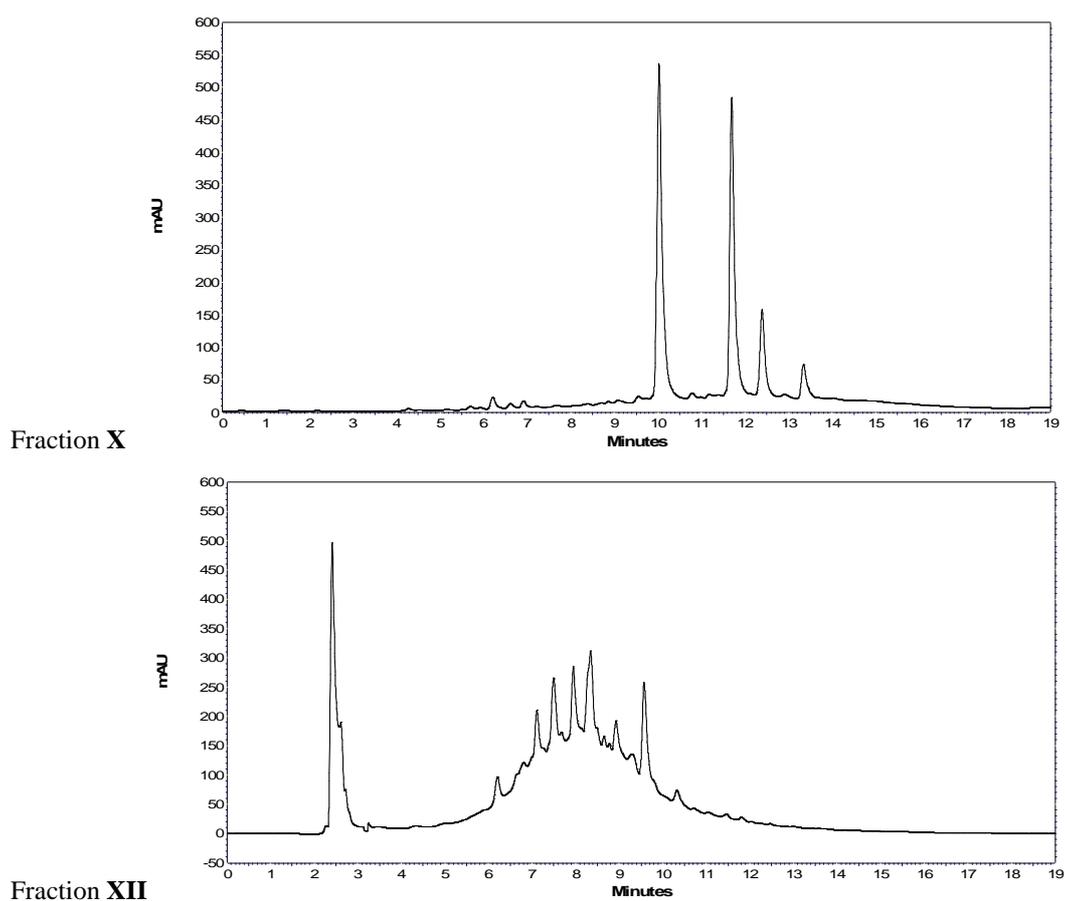
Fraction	Tubes	Description sensorielle	Masse obtenue
<b>I</b>	8 à 13	Attaque amère, sécheresse, "goût de planche"	148 mg
<b>II</b>	14 et 15	Amertume intense, "goût de coco", caractère amer persistant et dérangeant en finale	64 mg
<b>III</b>	16 à 19	Légèrement doux (intensité 2), puis pâteux en finale	53 mg
<b>IV</b>	20	Légère amertume	17 mg
<b>V</b>	21 à 24	Légèrement doux en attaque (intensité 1), astringent et amer	43 mg
<b>VI</b>	25 à 31	Douceur en attaque (intensité 2). Amertume très intense et persistante, légère astringence	57 mg
<b>VII</b>	32 à 36	Peu sapide, amer en finale	44 mg
<b>VIII</b>	37 à 39	Astringence intense, finale amère	15 mg
<b>IX</b>	40 à 47	Astringence plus faible, douceur en finale (intensité 2)	28 mg
<b>X</b>	48 à 63	Goût intense de façon générale, douceur importante (intensité 4), grande persistance.	59 mg
<b>XI</b>	64 à 68	Faible amertume, légère douceur (intensité 2)	11 mg
<b>XII</b>	69 à 73	Douceur intense en attaque (intensité 4), sensation persistante sur le bout de la langue	27 mg
<b>XIII</b>	74 à 78	Sensation "anesthésiante", douceur en finale (intensité 2), légère amertume	57 mg
<b>XIV</b>	79 à 81	Douceur (intensité 3)	7 mg
<b>XV</b>	82 à 90	Pas de goût	2 mg

Beaucoup de fractions possèdent par ailleurs un goût complexe, associant plusieurs saveurs et sensations. Ce constat est à relier aux profils CLHP, qui traduisent le nombre élevé de composés présents dans la plupart des fractions.

L'objectif de la gustation des fractions est d'y détecter la saveur sucrée et d'en noter l'intensité. Cette notation est un facteur participant au choix de la fraction utilisée pour la poursuite du protocole de purification.

Les résultats, présentés dans le tableau 19, montrent que 8 fractions présentent une saveur douce. Deux d'entre elles (**X** et **XII**) ont été considérées comme les plus sucrées (intensité 4). La sensation de douceur de ces échantillons est toutefois assez différente : elle est perçue essentiellement en attaque pour la fraction **XII** alors qu'elle est persistante pour la fraction **X**, dont le goût apparaît de façon générale plus complexe.

La figure 14 présente les chromatogrammes CLHP obtenus pour ces deux fractions douces.



**Figure 14** - Chromatogrammes CLHP à 280 nm de la fraction **X** (en haut) et de la fraction **XII** (en bas).

## D) Discussion

L'objectif initial de cette expérience était la mise en place d'une méthode de fractionnement de l'extrait **CZNCA-3Org** par CPC, afin d'obtenir une (ou plusieurs) fraction(s) possédant une saveur sucrée et composée(s) d'un nombre de molécules réduit par rapport à l'extrait original.

Aucun composé chimiquement pur n'a d'ailleurs été isolé, ce qui était prévisible au regard de la complexité de l'extrait injecté et de la stratégie mise en place pour le choix du système de séparation. Les solvants utilisés appartiennent à la classe 3 de la Pharmacopée Européenne de 2001, à l'exception du méthanol, de classe 2 : leur toxicité est modérée. Toutefois, la double lyophilisation des extraits permet de garantir l'élimination des solvants, ce qui rend plus sûre la dégustation des fractions.

Les différences conséquentes observables entre les chromatogrammes CLHP des différents tubes traduisent une certaine efficacité du fractionnement.

Le regroupement des tubes résulte d'une nécessité pratique : réduire le nombre d'échantillons à déguster. Néanmoins, cette opération ne doit pas être réalisée de façon totalement arbitraire, mais être effectuée en respectant le fractionnement préalablement réalisé. Nous avons décidé d'utiliser pour cela les chromatogrammes CLHP des différents tubes. Divers facteurs ont été pris en compte : la complexité de l'extrait (traduite par le nombre de pics), le profil général, et également l'intensité relative des principaux pics, ceci afin d'obtenir des fractions les plus homogènes possibles.

A notre connaissance, le couplage Chromatographie de Partage Centrifuge – Gustatométrie (CPC – G) n'a jamais été utilisé.

Cette technique a permis d'isoler deux fractions possédant une saveur sucrée notable (**X** et **XII**), dont l'une est particulièrement intense : la fraction **X**.

L'étude des chromatogrammes CLHP correspondant à ces échantillons montre que la fraction **X** apparaît d'une composition plus simple que la fraction **XII** : les pics la constituant sont moins nombreux et mieux séparés.

En outre, la masse obtenue pour la fraction **X** est relativement conséquente (59 mg) : il s'agit de la deuxième fraction en terme de quantité obtenue après lyophilisation, ce qui permet d'envisager des étapes de purification ultérieures.

Par conséquent, nous avons décidé de poursuivre le protocole de purification à partir de la fraction **X**, constituée des tubes 48 à 63 et caractérisée par une douceur importante et persistante.

Cet échantillon, noté **CZNCA-X** nous semble en effet être le plus pertinent, même si le gustatogramme obtenu laisse supposer que d'autres fractions comportent des composés à saveur douce. En outre, il est envisageable que la perception de tels composés dans les fractions ait été masquée par des molécules amères. C'est la limite et l'inconvénient de notre méthode.

#### **IV) Purification par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse**

La fraction CZNCA-X, obtenue à l'issue du fractionnement en CPC, possède quatre pics principaux. Afin d'étudier leur structure moléculaire et de caractériser leur activité gustative, il apparaît nécessaire de purifier les composés à l'origine de ces pics. Au regard du profil chromatographique présenté à la figure 17 et notamment de la bonne séparation observée, l'utilisation de la CLHP en phase inverse à l'échelle préparative semble constituer une méthode de purification adaptée.

##### **A) Matériel et méthodes**

La CLHP en phase inverse est utilisée à l'échelle préparative, afin de purifier les molécules principales de la fraction **CZNCA-X**, issue du fractionnement en CPC.

La mise au point de la méthode expérimentale, en particulier du gradient d'éluion, est réalisée en injectant de faibles quantités (1 mg) de l'échantillon initial.

La purification effective de la fraction est permise par trois injections successives de 17 mg d'échantillon, qui a été préalablement dissous dans 160  $\mu\text{L}$  de méthanol de qualité CLHP, puis filtré à 0.45  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un filtre seringue.

Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode choisie sont résumées dans le tableau 21.

Au cours de la séparation, la pression du système se situe entre 180 et 200 bars. Les différents pics sont collectés manuellement à la sortie du détecteur UV, dans des tubes en verres. Généralement, l'acquisition est stoppée après l'éluion du dernier pic : la colonne est alors lavée puis équilibrée avant une nouvelle injection.

**Tableau 21** - Conditions expérimentales de la CLHP préparative.

Appareil :	Varian
Pompes haute pression :	modèle Prostar 218
Logiciel :	Prostar Dynamax 24 (Varian)
Détecteur :	UV à barrette de diodes Prostar 345 (Varian) Les longueurs d'onde utilisées sont 254 et 280 nm.
Colonne :	Microsorb 100-5 C <sub>18</sub> (Varian Dynamax) 250 x 21.4 mm Porosité 5 µm
Pré-colonne :	Prontosil C <sub>18</sub> 6 µm 50 x 20 mm (Bischoff chromatography)
Phase mobile :	Solvant A : eau milliQ + 0.05 % d'acide trifluoroacétique Solvant B : acétonitrile CLHP + 0.05 % d'acide trifluoroacétique
Gradient :	
	Temps (min)    0    5    13    26    35    50    52    24    27
	% de B        8    18    18    26    36    50    100    92    92
Débit :	20 mL/min
Injection :	Manuelle, à l'aide d'une boucle d'injection de 5 mL

Trois injections de **CZNCA-X** ont été effectuées, soit une quantité totale de 52 mg. Un aliquot (50 µL) de chaque tube collecté est prélevé, dilué 10 fois avec de l'eau milliQ, et injecté en CLHP analytique afin de vérifier la pureté obtenue.

## B) Résultats et discussion

La chromatographie liquide haute performance présente un nombre élevé de plateaux théoriques, ce qui lui confère un grand pouvoir de séparation, et une bonne résolution. Cette technique est ainsi généralement utilisée à l'échelle préparative ou semi-préparative pour la purification de molécules d'intérêt.

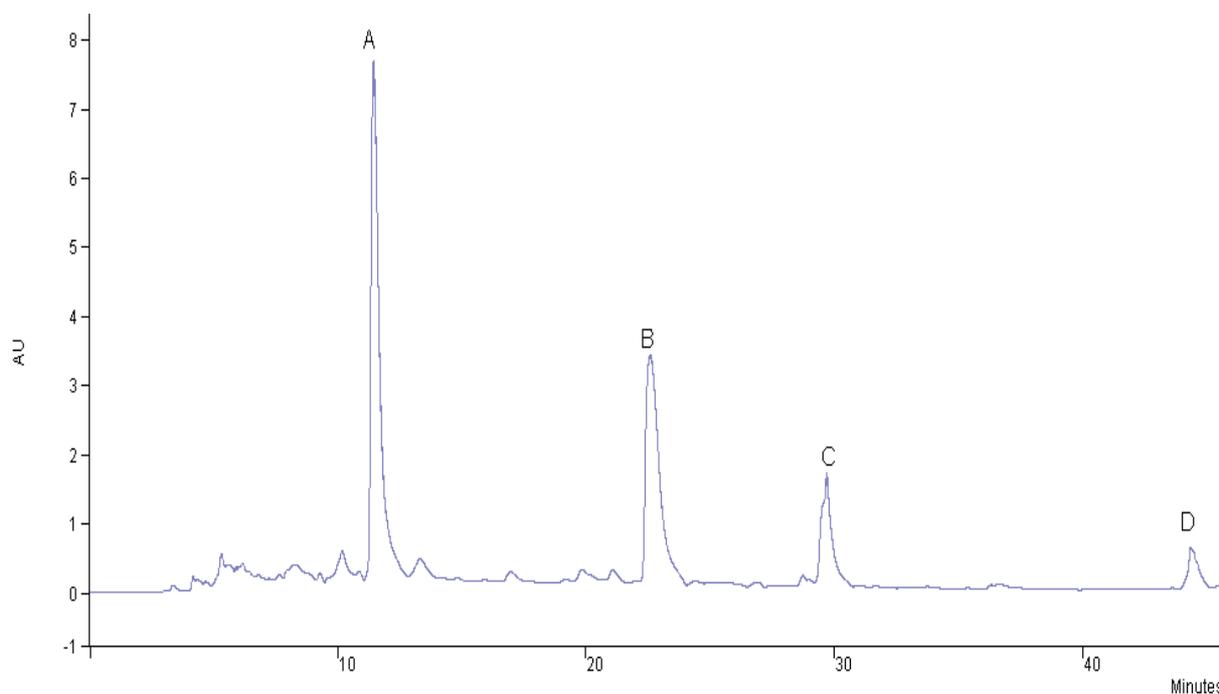
L'échantillon injecté provient initialement de la phase organique d'une extraction au MtBE ; par conséquent, une colonne en phase inverse (silice greffée C18) est choisie car elle retient correctement les composés de faible polarité.

Les solvants utilisés (eau milliQ et acétonitrile) sont complétés par 0.05 % (v/v) d'acide trifluoroacétique. Cet acide permet d'améliorer la résolution chromatographique et il peut être facilement éliminé par évaporation.

L'échantillon injecté est facilement soluble dans le méthanol. On obtient une solution de couleur jaune.

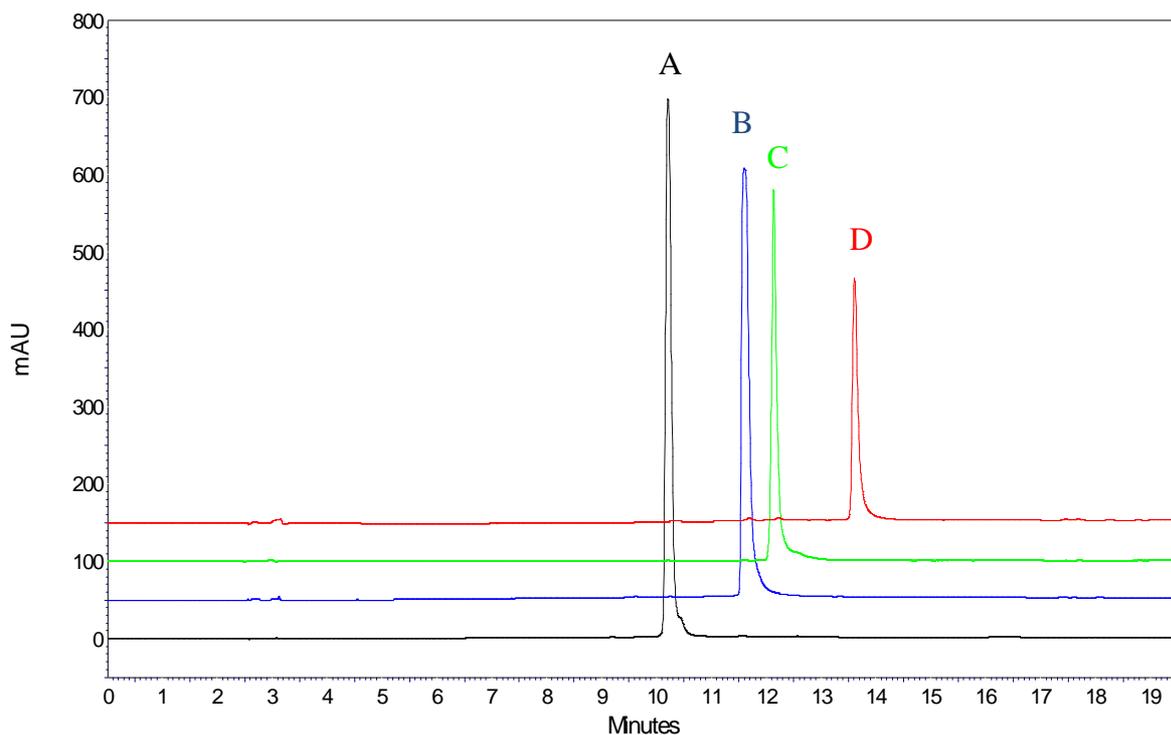
La méthode d'élution est déterminée à l'aide d'injections préalables de faibles quantités d'échantillon. Le gradient choisi permet une bonne séparation des quatre pics principaux, comme le montre la figure 15. Ces composés sont notés **A**, **B**, **C** et **D** dans l'ordre de leur temps de rétention.

Le profil général de la fraction est semblable à celui obtenu en CLHP analytique et présenté à la figure 14.



**Figure 15** - Chromatogramme d'une injection de **CZNCA-X** en CLHP préparative, avec une détection UV à 280 nm.

Les pics sont collectés manuellement à la sortie du détecteur UV. Une grande attention doit être portée à cette opération, car la pureté et la quantité des composés récupérés en dépendent. Les tubes correspondant aux quatre molécules contiennent une solution incolore. Leur pureté est vérifiée en CLHP analytique selon les conditions décrites au paragraphe I.A.2. et les résultats sont présentés à la figure 16.



**Figure 16** - Superposition des chromatogrammes obtenus en CLHP analytique à 280 nm pour les composés **A**, **B**, **C** et **D**.

Les chromatogrammes obtenus montrent que les composés **A**, **B**, **C** et **D** apparaissent chromatographiquement purs à 280 nm. A 220 nm, la ligne de base n'est pas totalement linéaire en raison de l'absorbance de l'acétonitrile à cette longueur d'onde. Toutefois, aucun pic supplémentaire n'est observé pour les quatre molécules, ce qui confirme la réussite de la purification.

Après vérification de la pureté de chacun des tubes, ces derniers sont regroupés par composé. En vue de la lyophilisation de l'extrait, la teneur en acétonitrile des échantillons est réduite par évaporation et addition d'eau milliQ.

Les quantités et l'aspect de chaque composé à l'issue de la lyophilisation sont résumés dans le tableau 22.

**Tableau 22** - Aspect et masse des composés **A**, **B**, **C** et **D** après lyophilisation

Composé	Aspect	Masse obtenue
A	Poudre blanche	16 mg
B	Poudre blanchâtre	4.9 mg
C	Poudre blanche	1.2 mg
D	Poudre blanche	0.3 mg

La masse totale récupérée est de 22.4 mg, ce qui correspond à un rendement global de 44 %. Au regard de la valeur obtenue pour le fractionnement en CPC, ce résultat semble faible mais explicable par des pertes liées à l'injection, à la collecte des échantillons, et aux phénomènes d'adsorption irréversible, inhérents à la CLHP. En outre, bien que les quatre pics collectés apparaissent majoritaires, l'échantillon initial contient d'autres molécules.

L'utilisation de la CLHP préparative a permis d'isoler les quatre composés **A**, **B**, **C** et **D**, constituants principaux de la fraction **CZNCA-X**.

En dépit d'un rendement global assez faible, cette technique constitue une méthode de purification efficace. Néanmoins, son efficacité dépend considérablement de la complexité de l'échantillon initial, et nécessite des étapes de fractionnement préalables. La CLHP préparative apparaît donc comme une technique puissante pouvant être utilisée en tant qu'étape ultime d'un protocole de purification.

## **Conclusion**

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté la mise en place d'un protocole de fractionnement des extraits de bois de chêne. Ce protocole implique différentes techniques séparatives successives, et son déroulement est guidé par la dégustation, ce qui constitue une approche originale de l'étude des composés non-volatils.

Dans un premier temps, plusieurs extractions liquide-liquide, utilisant divers solvants organiques, ont été mises en œuvre. Le fractionnement est basé sur l'affinité différentielle des solutés de l'extrait pour les divers types de phases. Sa réalisation pratique est facile et rapide.

La deuxième étape fait intervenir une séparation par chromatographie de partage centrifuge, dont le principe est également fondé sur la répartition des molécules dans un système de solvants. Cette technique a permis d'obtenir 15 groupes distincts de composés. Le faible temps nécessaire à la séparation, l'économie de solvants réalisée par rapport à d'autres techniques préparatives, et la valeur élevée du rendement global de cette étape constituent des avantages majeurs de la CPC.

Le développement d'une nouvelle technique de couplage, appelée CPC-G, permet de dresser le gustatogramme d'un extrait de bois, de façon comparable en quelque sorte à l'établissement d'un olfactogramme en CPG-O.

A l'issue de ce couplage CPC-G, la fraction **CZNCA-X** est apparue particulièrement intéressante en raison de sa douceur intense et de son abondance relative. Cette fraction est constituée de quatre composés majoritaires.

L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance préparative a permis de purifier les quatre molécules **A**, **B**, **C** et **D** de la fraction **CZNCA-X**. Le rendement de cette technique est moyen, mais les molécules isolées semblent chromatographiquement pures.

L'obtention des composés **A**, **B**, **C** et **D** conclut ainsi la purification de l'extrait de bois mise au point dans ce chapitre. La répétition de ces différentes étapes conduit à l'obtention de quantités plus importantes de ces composés, permettant d'envisager leur caractérisation structurale et gustative dans les chapitres suivants.



## Chapitre 6 - Détermination de la structure chimique des quatre molécules principales de la fraction CZNCA-X

### Introduction

Le développement d'un protocole de fractionnement guidé par la dégustation nous a permis d'isoler la fraction **CZNCA-X** à partir d'un extrait de bois de chêne. Cette fraction, associée à une perception gustative douce, est essentiellement constituée de quatre composés, notés **A**, **B**, **C** et **D**. Leur purification a ensuite été réalisée à l'aide de la CLHP préparative.

A ce stade, leur structure moléculaire demeure inconnue, et il n'est donc pas possible de préciser si certains de ces composés ont préalablement été identifiés dans le bois de chêne ou s'il s'agit de nouvelles molécules. En effet, le suivi analytique du fractionnement a été assuré par CLHP analytique couplée à un détecteur à barrettes de diodes : le seul renseignement disponible est le spectre d'absorbance UV. Le fait que les quatre composés présentent un maximum local à 280 nm suggère l'existence, pour chacun d'eux, d'au moins un groupement chromatophore de type aromatique.

Afin d'étudier de façon plus précise la structure chimique des molécules purifiées et d'envisager leur identification, deux techniques analytiques sont principalement utilisées : la Spectrométrie de Masse à Transformée de Fourier (FT/MS), et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton  $^1\text{H}$  et du carbone  $^{13}\text{C}$ , à une et à deux dimensions. Par ailleurs, la caractérisation des molécules identifiées a ensuite été complétée par diverses analyses (polarimétrie et spectrophotométrie UV).

Nous évoquerons dans un premier temps les performances de la FT/MS et son intérêt pour l'identification structurale. Nous préciserons également les conditions expérimentales mises en œuvre pour les autres techniques, puis présenterons, molécule par molécule, les résultats obtenus et la démarche conduisant à l'identification des composés **A**, **B**, **C** et **D**.

### I) Approche expérimentale de l'identification : techniques et méthodes utilisées

L'objet de cette thèse n'est pas l'étude approfondie des techniques d'identification structurale. En outre, la plupart d'entre elles sont utilisées depuis de nombreuses années de façon courante pour caractériser des molécules isolées. Par conséquent, nous avons choisi de

présenter l'appareillage utilisé pour la RMN, la polarimétrie et la spectrophotométrie UV de façon succincte, mais de ne pas détailler systématiquement la théorie de leur fonctionnement. En revanche, la FT/MS a fait l'objet de nombreux développements récents. Parmi ceux-ci, la découverte d'un nouvel analyseur de masse, l'Orbitrap, est particulièrement emblématique. En raison de l'intérêt scientifique de cette technique, de son aspect novateur et de son actuelle expansion, il nous a semblé intéressant de décrire de façon plus approfondie son principe général ainsi que les principales caractéristiques de l'instrument utilisé dans cette étude.

## A) Spectrométrie de masse à transformée de Fourier : système Exactive<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific)

En janvier 2010, notre laboratoire s'est équipé d'un spectromètre de masse à transformée de Fourier Exactive. Cet appareil, commercialisé par la société Thermo Fisher Scientific (Brême, Allemagne) depuis juin 2008, est équipé d'un analyseur de masse Orbitrap.

### 1) Caractéristiques générales du spectromètre Exactive

#### a) Principe de l'Orbitrap

Le rôle d'un analyseur de masse est de mesurer le rapport masse/charge ( $m/z$ ) des ions en les séparant soit dans l'espace soit dans le temps. Différents principes physiques peuvent être utilisés à cette fin, qui caractérisent par exemple les spectromètres de masse à secteur magnétique, à temps de vol, à trappe ionique, à résonance ionique cyclotronique, ou encore à filtres quadripolaires (Hoffmann & Stroobant, 2005; Hu *et al.*, 2005). Ces analyseurs se différencient notamment par leur gamme de masse, leur vitesse de balayage, leur transmission, mais aussi par leur pouvoir de résolution (définie par  $m/\delta_m$  et décrivant la capacité à distinguer deux ions de  $m/z$  proche) ainsi que leur précision de mesure de masse.

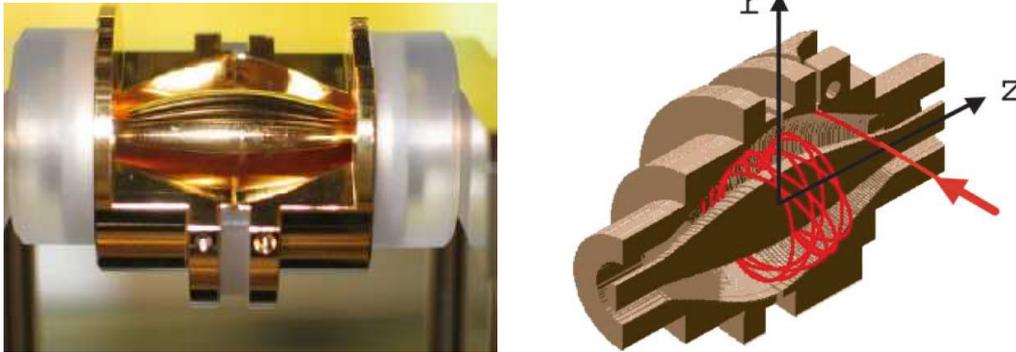
L'analyseur Orbitrap (figure 17) a été inventé par Makarov (Makarov, 1999, 2000; Hardman & Makarov, 2003), sur la base de la théorie développée par Kingdon en 1923 décrivant un piégeage électronique induit uniquement par un champ électrostatique (Kingdon, 1923).

Il est constitué d'une électrode interne, en forme de fuseau, contenue dans une électrode externe coaxiale, en forme de tonneau, comme représenté sur la figure 17.

La disposition de ces électrodes et leur forme particulière génèrent un champ électrostatique fixe possédant une composante logarithmique et une composante quadripolaire.

Les ions sont introduits perpendiculairement à l'axe principal des électrodes (axe z). L'attraction électrostatique compense alors la force centrifuge induite par la vitesse d'injection.

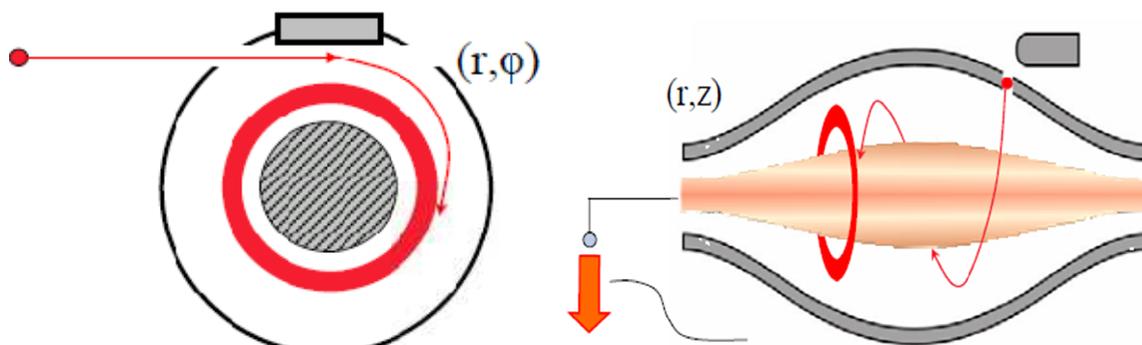
Les ions sont ainsi piégés autour de l'électrode centrale par un champ électrostatique, et non par une radiofréquence comme c'est le cas pour une trappe ionique classique.



**Figure 17** - Vue externe d'un analyseur Orbitrap (à gauche) et coupe schématique d'un analyseur Orbitrap (à droite), décrivant le mouvement des ions autour de l'électrode centrale (d'après Hu *et al.*, 2005).

En raison de leur vitesse initiale, les ions entrent en mouvement autour de l'électrode centrale. Ce mouvement peut être décrit comme la composée d'une trajectoire circulaire dans le plan radial et d'un mouvement oscillatoire de va-et-vient le long de l'axe z (figure 18). Les lignes de champ étant plus serrées aux deux extrémités du piège qu'en son centre, la vitesse initiale et l'emplacement de l'injection des ions sont suffisants pour les mettre en mouvement. Les ions se déplacent ainsi dans un premier temps de la partie la plus serrée vers la partie la plus large de l'espace séparant les électrodes. Un mouvement oscillatoire harmonique auto-entretenu est ainsi initié (le point d'injection des ions correspond au point hors-équilibre où un pendule est relâché).

Afin d'éviter des collisions pouvant perturber le système, l'analyseur Orbitrap est maintenu sous un vide poussé, inférieur à  $10^{-9}$  mbar.



**Figure 18** - Mouvement des ions autour de l'électrode centrale, en projection dans le plan radial (à gauche) et selon l'axe z (à droite). D'après Makarov (2006).

Un paquet d'ions de même rapport  $m/z$  constitue un anneau se déplaçant le long de l'électrode centrale. Les fréquences de rotation des ions dépendent de l'énergie interne, des angles de l'injection, et de la diffusion spatiale ; ces fréquences ne peuvent donc pas être utilisées pour la détermination du rapport  $m/z$ .

En revanche, la fréquence d'oscillation axiale  $\omega_z$ , définie par :

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

$\omega_z$  ne dépend que du rapport  $m/z$  des ions ( $k$  étant une constante instrumentale).

La mesure du courant induit par les oscillations permet, après application d'une opération de transformée de Fourier (Makarov, 2000), d'obtenir les rapports  $m/z$  caractéristiques des différents ions.

Avec un analyseur Orbitrap, la détection du signal ne repose pas sur un multiplicateur d'électrons ou un photomultiplicateur, comme dans le cas, par exemple, d'un quadropôle ou d'une trappe ionique, mais sur l'analyse du « courant-image » par transformée de Fourier.

L'indépendance des oscillations axiales vis-à-vis de l'énergie des ions constitue l'élément clé de l'analyseur Orbitrap : elle permet une mesure très précise des fréquences, à l'origine d'une haute résolution (supérieure à 100 000 pour un rapport  $m/z=400$  Th ; ce pouvoir résolutif est proportionnel au temps de mesure des fréquences dans l'analyseur), couplée à une grande précision de mesure masse (<5 ppm).

Ces deux éléments, inhérents au principe de l'Orbitrap, constituent des caractéristiques majeures de ce nouveau type d'analyseur.

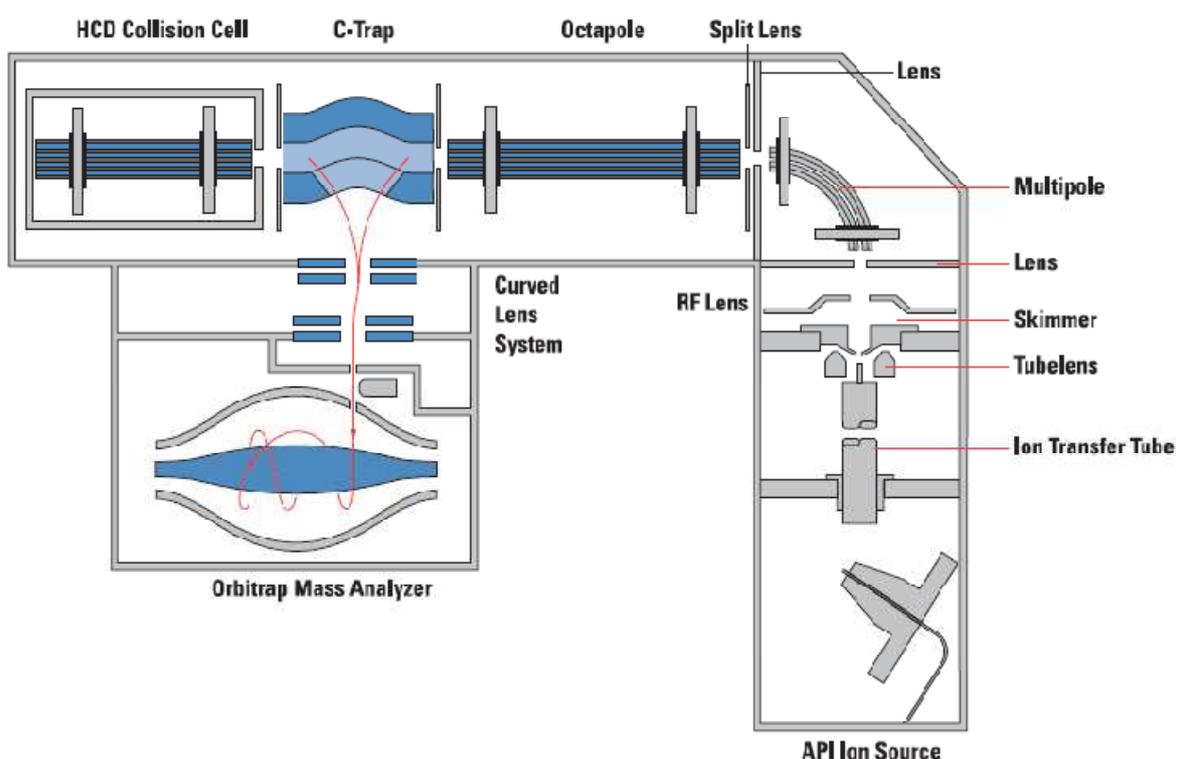
Par ailleurs, l'Orbitrap se distingue par la conservation de la précision de mesure de masse sur une vaste gamme dynamique intrascan (supérieure à 3 décades) et pour une large gamme de rapports  $m/z$  (50 à 4000 Th).

La société Thermo Fisher Scientific a d'abord mis en application la technologie Orbitrap, avec l'arrivée sur le marché de spectromètres de masse de nouvelle génération nommés LTQ-Orbitrap, depuis juin 2005. Il s'agit d'appareils hybrides, combinant l'analyseur Orbitrap avec une trappe linéaire, ce qui permet de réaliser une analyse  $MS^n$  en masse exacte.

### b) Description de l'Exactive™

L'Exactive est un spectromètre de masse non-hybride, équipé d'un analyseur Orbitrap. Cet appareil a été mis sur le marché récemment, en juin 2008, par la société Thermo Fisher Scientific.

De façon générale, ce spectromètre se compose, comme indiqué figure 19, d'une source d'ionisation à pression atmosphérique, d'une optique de transfert d'ions, d'un analyseur Orbitrap et d'une cellule de collision HCD (Higher Energy Collision Induced Dissociation).



**Figure 19** - Présentation schématique de la géométrie du spectromètre de masse Exactive (d'après Wieghaus *et al.*, 2006).

On note ainsi la présence de plusieurs éléments principaux :

La source d'ionisation à pression atmosphérique permet d'introduire l'échantillon dans l'appareil, en assurant le transfert des molécules de la phase liquide (système de chromatographie liquide, ou perfusion via un pousse-seringue) vers une phase gazeuse constituée d'ions chargés positivement ou négativement. Cette étape peut être réalisée par exemple à l'aide d'une source d'ionisation par électro-nébulisation (Electrospray, ESI) ou d'une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

Une optique de transfert, constituée de lentilles et guides quadrupolaires, permet d'assurer la transmission des ions vers la C-trap. Au cours du transfert, les ions traversent

différents compartiments présentant des niveaux de vide croissants. Le vide est assuré par une pompe mécanique primaire ainsi que par un ensemble de pompage turbo-moléculaire.

La C-trap est un quadrupôle courbe, dont la forme rappelle la lettre C. Le piégeage des ions y est assuré par un champ radio-fréquence et une pressurisation à l'azote ( $10^{-5}$  mbar). Le faisceau d'ions est comprimé axialement grâce à des potentiels appliqués sur les électrodes d'entrée et de sortie de la C-trap. La forme de cette C-trap permet alors de focaliser et d'assurer un transfert rapide du faisceau d'ions, au travers du système de lentilles courbes, vers l'Orbitrap.

Comme pour tout système à piégeage d'ions, les performances instrumentales dépendent du contrôle précis de la population des ions piégés. Quel que soit le nombre d'ions créés au niveau de la source d'ionisation, il est important que la quantité d'ions effectivement piégés dans l'Orbitrap soit constante. Le système de contrôle automatique du gain (AGC) permet de réguler cette quantité fixe d'ions à une valeur préalablement définie par l'utilisateur ( $5 \cdot 10^5$ ,  $10^6$  ou  $3 \cdot 10^6$ ). Cette régulation est assurée par la modulation du temps d'injection des ions dans l'Orbitrap. La précision de ce contrôle conditionne notamment les performances de l'appareil dans le cadre d'analyses quantitatives.

L'analyseur Orbitrap, dont le principe a été détaillé au paragraphe précédent, est maintenu à un niveau de vide très élevé (de l'ordre de  $10^{-10}$  mbar). Un temps de pompage important (plusieurs heures) est nécessaire pour atteindre cette valeur, ce qui engendre certaines contraintes pratiques.

La cellule HCD, optionnelle, permet d'effectuer une fragmentation ionique. Au cours d'une expérience HCD, les ions provenant de la C-trap sont accélérés vers une cellule de collision octapolaire. Ils sont alors fragmentés via un processus de dissociation induite par collision (CID) sur des atomes d'azote présents dans la cellule. Les ions sont alors repiégés dans la C-trap, puis mesurés dans l'Orbitrap. Ce processus est nommé fragmentation des ions totaux, dans la mesure où l'ion précurseur n'est pas préalablement sélectionné comme dans une expérience de MS/MS vraie. Dans le cas d'un mélange complexe, les fragments obtenus ne peuvent pas être reliés de façon systématique et certaine aux ions parents. En revanche, les spectres de fragmentation HCD sont parfaitement interprétables pour des composés purs (échantillon purifié, ou pic chromatographique résolu).

### *c) Performances du système FT/MS Exactive*

Les propriétés de l'analyseur Orbitrap, et de façon générale la technologie FT/MS, sont à l'origine de performances techniques remarquables. Nous avons choisi d'en présenter quelques unes dans ce chapitre, afin de justifier l'utilisation de cet appareil pour l'identification des composés **A, B, C, D**, et d'en préciser le champ d'application.

La gamme de masse de l'appareil couvre un large domaine ; elle s'étend de 50 à 4000 Thomson (Th).

Le fonctionnement de l'Orbitrap permet d'atteindre des valeurs élevées de résolution en masse. En effet, quatre gammes de résolution (pour un rapport  $m/z$  200 Th) sont disponibles : 10 000, 25 000, 50 000 et 100 000. A titre de comparaison, un analyseur à temps-de-vol (TOF) possède une résolution de l'ordre de 15 000. Les performances de l'Orbitrap en termes de résolution autorisent la séparation de composés de formules brutes différentes et de rapport  $m/z$  très proches (composés isobares), ce qui garantit la précision de mesure masse, notamment dans le cas de l'analyse de mélanges complexes.

Les spécifications de l'appareil indiquent une précision de masse inférieure à 5 ppm en calibrage externe (réalisé de façon hebdomadaire à partir d'une solution de composés de référence) et à 2 ppm en calibrage interne (en utilisant un ion présent à tout moment au cours de l'acquisition). En pratique, on observe la plupart du temps une précision inférieure à 3 ppm en calibrage externe et 1 ppm en interne.

Nous verrons que cette grande précision de mesure de masse est un élément déterminant dans le processus d'identification de nouveaux composés ; elle participe, avec la mesure des ratios isotopiques et les informations de fragmentation HCD, à la détermination des formules brutes.

La vitesse de balayage dépend de la résolution  $R$  choisie : elle est de 10 Hz (10 scans/sec) à  $R=10\,000$ , mais chute à 1 Hz à  $R=100\,000$ , ce qui est relativement lent. Par conséquent, il est préférable de travailler à des niveaux de résolution modérés lors d'analyses quantitatives, en particulier dans le cadre d'un couplage avec un système de chromatographie liquide très rapide, tel que l'UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography). Contrairement à un analyseur quadrupolaire, la vitesse d'acquisition ne dépend pas de la gamme de balayage, point important pour une utilisation en « screening » sur une vaste plage de masses.

La sensibilité de l'appareil dépend évidemment de divers facteurs tels que la molécule, le type d'ionisation, ou bien encore les conditions chromatographiques. Toutefois, des limites de détection de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$  (ppb), voire en deçà, sont fréquemment obtenues.

La gamme dynamique « intra-scan » de l'instrument est également variable, mais elle couvre en général 3 à 4 ordres de grandeur, tout en conservant une précision de masse élevée. La grande sensibilité observée et l'étendue de la gamme dynamique constituent de nets avantages pour la recherche et le dosage de composés présents à l'état de traces dans une matrice complexe comme le vin.

Enfin, la possibilité d'inverser rapidement la polarité de détection des ions (d'un balayage à l'autre et sans diminution de la précision de la mesure de masse) sera utilisée pour une recherche qualitative de nouvelles molécules.

Les performances du système FT/MS Exactive utiles pour l'identification de nouveaux composés sont résumées dans le tableau 23 ci-dessous.

**Tableau 23** - Quelques performances du spectromètre Exactive et leur application à l'identification structurale.

Critère	Performances observées	Applications à l'identification structurale
Résolution en masse	De 10 000 à 100 000 (à m/z 200 Th)	<b>Détermination de la formule brute</b>
Précision de la mesure de masse	< 1 ppm (calibrage interne)	
Gamme de masse	Jusqu'à 4000 Th	<b>Utilisation par « screening » sur une vaste gamme de masses. Analyse qualitative rétrospective</b>
Changement de polarité	Alternance possible modes positif/négatif	
Vitesse de balayage	1 à 10 Hz, indépendante de la gamme de masses	
Fragmentation HCD	Résolution et précision identiques au « Full scan »	<b>Informations structurales spécifiques de certains groupements fonctionnels présents</b>

Sur la base de ces différentes observations, ce spectromètre de masse apparaît comme un outil de choix en vue de l'identification de nouvelles molécules. Notre laboratoire a eu la possibilité de s'équiper de cet appareil au courant du mois de janvier 2010. Il a donc été utilisé pour la caractérisation structurale des composés **A**, **B**, **C** et **D**.

## 2) Utilisation de l'Exactive pour l'identification des molécules de la fraction CZNCA-X

Le spectromètre FT/MS Exactive acquis par le laboratoire est couplé à un système de Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (système LC-FT/MS, figure 20).

Dans le cadre de l'identification structurale décrite dans ce chapitre, la LC-FT/MS est essentiellement utilisée pour la détermination de la formule brute des composés, ainsi que pour la caractérisation des principaux fragments.

Les molécules étudiées ayant été purifiées, elles pourraient être introduites directement dans le spectromètre, soit par perfusion à l'aide d'un pousse-seringue, soit à l'issue d'une séparation chromatographique. Afin de confirmer la pureté des composés et pour des raisons pratiques liées au traitement informatique, nous avons choisi d'utiliser le couplage LC-FT/MS.



**Figure 20** - Photographie du système LC-FT/MS utilisé.

### *a) Descriptif du système et conditions chromatographiques*

La partie chromatographique est constituée de la chaîne U-HPLC Accela de Thermo Fisher Scientific. Elle comporte une pompe quaternaire, pouvant supporter des pressions de 15000 psi (plus de 1000 bar), et dont le volume mort est de 65  $\mu$ L, ce qui permet d'obtenir des séparations très fines et à vitesse élevée, sur des colonnes de faible granulométrie (inférieure à 2  $\mu$ m). Cette pompe est associée à un passeur automatique, dont une partie est isotherme afin de garantir l'intégrité des échantillons, et à un détecteur UV à barrette de diodes.

Le descriptif technique du système et les conditions chromatographiques utilisées sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 24** - Conditions opératoires utilisées pour l'analyse qualitative en LC-FT/MS.

Appareil :	
Accela (Thermo Fisher Scientific)	
Pompes U-HPLC	
Logiciel :	
Xcalibur 2.1 pour Exactive	
Détecteur UV :	
Accela PDA 1cm LightPipe Flow cell	
Colonne :	
Hypersil GOLD C18 (Thermo Fisher Scientific)	
50 x 2.1 mm	
Porosité 1.9 $\mu\text{m}$	
Phase mobile :	
Solvant A : eau LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % d'acide formique + 5 mmol/L de formate d'ammonium	
Solvant B : acétonitrile LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % d'acide formique	
Gradient :	
Temps (min)	0 0,5 4 4,2 5,4 5,5 6,5
% de B	18 18 45 98 98 18 18
Débit : 600 $\mu\text{L}/\text{min}$	
Injection :	
10 $\mu\text{L}$ à l'aide d'un passeur automatique HTC0 Pal équipé de « racks » réfrigérés	

L'acide formique est utilisé dans les deux solvants de la phase mobile, en remplacement de l'acide trifluoroacétique (TFA) décrit dans les conditions de la CLHP analytique au chapitre 5. En effet, le TFA à concentration élevée est connu pour diminuer très fortement le signal observé en spectrométrie de masse. Le formate d'ammonium permet de favoriser l'ionisation de certaines molécules via la formation d'adduits ammonium en ionisation positive. En outre, la présence de tels adduits peut favoriser le repérage de l'ion moléculaire dans le spectre de masse.

Une attention toute particulière doit être portée à la qualité des solvants, afin d'éviter une pollution des spectres de masse et un éventuel endommagement du système après de nombreuses utilisations.

Les pressions observées en cours d'analyse se situent entre 400 et 500 bar. Le nombre très élevé de plateaux théoriques conférés par la colonne choisie et les conditions d'élution autorisent une réduction considérable de la durée des analyses chromatographiques.

Le détecteur UV n'est pas indispensable dans cette étude, son utilisation permet de relier les résultats observables en LC-MS avec les données enregistrées précédemment et ainsi de vérifier que les composés **A, B, C, D**, qui absorbent à 280 nm, soient visibles en spectrométrie de masse.

*b) Conditions de spectrométrie de masse*

Le système est équipé d'une vanne à trois voies en aval de la colonne chromatographique. Au cours d'une analyse, la phase mobile est envoyée vers le spectromètre de 0.5 à 4 min, et vers la poubelle en dehors de cette période, afin de ne pas encrasser le système avec d'éventuels composés non retenus (0-0.5 min) ou libérés pendant le lavage de la colonne (après 4 min).

Le spectromètre Exactive est connecté à un générateur d'azote produisant un flux de 30 L/min à 7 bar.

Une source d'ionisation à électrospray chauffée (H-ESI) est utilisée, avec une alternance entre le mode positif et le mode négatif entre chaque scan. Le chauffage de la sonde permet de favoriser l'élimination de la phase mobile : on peut travailler avec des débits chromatographiques relativement élevés sans utiliser une déviation vers la poubelle (split). Les conditions d'ionisation (« tune ») associées aux deux modes sont présentées dans le tableau 25.

**Tableau 25** - Conditions d'ionisation utilisées en mode positif et en mode négatif.

Paramètre	Mode positif	Mode négatif
Débit du « sheath gas »	80	80
Débit du gaz auxiliaire	15	15
Débit du « sweep gas »	0	0
Tension du spray	3.5 kV	-3.5 kV
Température du capillaire	350 °C	350 °C
Tension du capillaire	35 V	-35 V
Tension du tube lens	120 V	-120 V
Tension du skimmer	18 V	-18 V
Température de la source	320 °C	320 °C

Dans ces conditions d'ionisation et d'élution, la valeur de l'intensité du courant de spray demeure modérée (inférieure à 20  $\mu\text{A}$ ).

Le vide observé dans l'analyseur Orbitrap est de l'ordre de  $2,5 \cdot 10^{-10}$  mbar.

Dans le cadre de l'identification des composés étudiés, la LC-FT/MS est utilisée dans la configuration suivante :

- Une gamme de masse allant de 110 à 1200 Th est choisie
- L'alternance entre mode positif et mode négatif entre chaque scan est sélectionnée
- La gamme de résolution de masse est « Ultra high », ce qui correspond à une valeur de 100 000 pour un rapport  $m/z$  200 Th
- Le calibrage est interne, en utilisant l'ion trifluoroacétate ( $m/z$  112.98450 Th) en négatif et l'ion di-éthylhexyl phtalate ( $m/z$  391.28429 Th) en positif. Ces deux ions sont présents en permanence à l'état de traces dans la phase mobile
- Les acquisitions sont effectuées sans fragmentation HCD pour la détermination de la masse exacte, puis avec une énergie HCD de 80 eV afin d'obtenir des spectres de fragmentation
- Le contrôle automatique du gain est utilisé en mode « Ultimate mass accuracy », ce qui correspond à l'introduction de  $5 \cdot 10^5$  ions dans l'Orbitrap
- Le temps d'injection maximum (IT) est fixé à 100 ms
- Le traitement des résultats et la proposition de formules brutes sont réalisés à l'aide du logiciel Xcalibur 2.0

## B) Résonance magnétique nucléaire

L'utilisation de la spectrométrie de masse à transformée de Fourier fournit des éléments importants pour l'identification de nouvelles molécules. Toutefois, utilisée seule, cette technique n'est pas suffisante pour la caractérisation structurale de composés non-volatils. Contrairement à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, le spectre d'une molécule en LC-MS varie considérablement en fonction des conditions expérimentales ; il n'existe pas de banque de données permettant d'identifier sans ambiguïté un composé non-volatil sur l'unique base de son spectre de masse.

Différentes techniques complémentaires peuvent être utilisées par l'analyste pour la détermination de la structure des molécules. Parmi celles-ci, la résonance magnétique nucléaire tient une place de choix, car elle fournit des renseignements sur la succession des

atomes d'un composé organique, ainsi que, dans une certaine mesure, sur leur stéréochimie relative.

Seuls les éléments dont le noyau possède un moment magnétique de spin non nul peuvent être aimantés et sont par conséquent visibles en RMN. Il s'agit par exemple du proton  $^1\text{H}$ , du carbone  $^{13}\text{C}$ , de l'azote  $^{15}\text{N}$ , du fluor  $^{19}\text{F}$  ou bien encore du phosphore  $^{31}\text{P}$ . Généralement, dans le cadre de l'étude de composés organiques naturels, l'analyse en RMN concerne le proton  $^1\text{H}$  et le carbone  $^{13}\text{C}$ .

L'introduction de la spectroscopie RMN à deux dimensions (2D) (Jeener, 1971; Jeener *et al.*, 1979) est une innovation majeure dans le domaine de l'analyse structurale. Dans cette technique, chacune des deux dimensions correspond au spectre RMN monodimensionnel (1D) d'un type de noyau. Certains de ces noyaux peuvent interagir (on parle alors de couplage), en raison de leur proximité dans le squelette de la molécule ou dans l'espace. Ce phénomène donne lieu à une corrélation matérialisée par une tache sur le spectre 2D, à l'intersection des projections correspondant, sur les spectres 1D, aux signaux des noyaux impliqués.

Lorsque le couplage concerne deux atomes de même nature, on parle de corrélation homonucléaire. Lorsque les deux atomes sont différents, on parle de corrélation hétéronucléaire.

Contrairement à la FT/MS, dont l'aspect novateur justifiait une description plus approfondie, le fondement théorique et le principe de la RMN ne seront pas détaillés dans ce travail.

Nous présenterons de façon succincte les différentes expériences réalisées en insistant sur leur intérêt et sur les informations qu'elles fournissent en vue de la détermination de la structure des molécules. Puis, nous décrirons le matériel utilisé ainsi que les paramètres expérimentaux appliqués.

## **1) Présentation et intérêt des expériences réalisées**

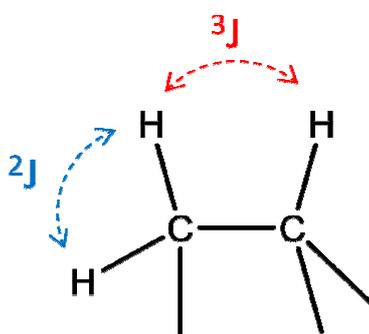
### *a) Expériences monodimensionnelles*

Les spectres 1D du proton  $^1\text{H}$  et du carbone  $^{13}\text{C}$  permettent d'estimer le nombre de ces atomes dans la molécule, mais ils renseignent surtout sur le nombre de groupes d'atomes chimiquement équivalents et sur leur environnement chimique, traduit par le déplacement chimique (noté  $\delta$  et exprimé en ppm). Contrairement au proton  $^1\text{H}$ , le carbone  $^{13}\text{C}$  n'est pas l'isotope le plus abondant de l'élément carbone, aussi l'enregistrement des spectres  $^{13}\text{C}$  exige un temps parfois très important lorsque la quantité de produit disponible est faible. La valeur

des déplacements chimiques des signaux du carbone peut être obtenue sur certains spectres 2D, par conséquent l'enregistrement spécifique des spectres  $^{13}\text{C}$  n'est pas nécessaire à l'identification ; il n'a pas été réalisé de façon systématique sur les molécules étudiées.

*b) Corrélations homonucléaires  $^1\text{H} - ^1\text{H}$*

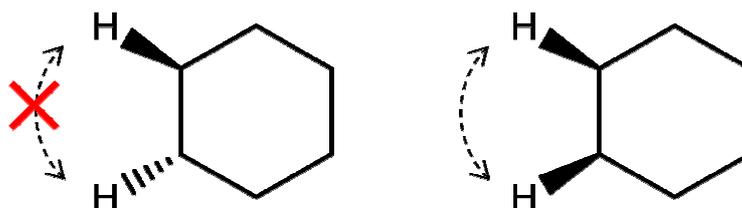
L'expérience COSY (CORrelated SpectroscopY) est basée sur l'étude des corrélations homonucléaires entre protons voisins dans le squelette de la molécule (Nagayama *et al.*, 1980). Elle permet ainsi de traduire le couplage scalaire entre protons d'un même système de spin, comme illustré sur la figure 21.



**Figure 21** - Corrélations observées entre protons en COSY.

Sur la projection de chaque signal  $^1\text{H}$ , les tâches observées correspondent à des corrélations avec le noyau lui-même (sur la diagonale), et avec les protons situés en  $^2\text{J}$  et en  $^3\text{J}$ . Ce sont donc les taches hors diagonales qui sont utiles pour la résolution de la structure : elles renseignent sur l'enchaînement des protons dans le squelette de la molécule.

L'expérience ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY) est basée sur l'étude des corrélations homonucléaires entre protons voisins dans l'espace (Bothner-By *et al.*, 1984). Elle met en évidence l'interaction dipolaire entre protons, donc leur proximité spatiale (figure 22).

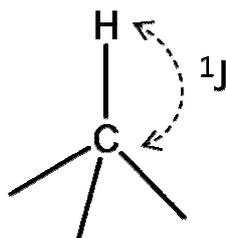


**Figure 22** - Exemples d'une corrélation ROESY (à droite) et d'une absence de corrélation (à gauche).

La ROESY donne ainsi des renseignements sur la stéréochimie relative de la molécule, ainsi que sur sa forme dans l'espace (structure tertiaire des protéines par exemple).

*c) Corrélations hétéronucléaires  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$*

L'expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) est basée sur l'étude des corrélations hétéronucléaires entre un hydrogène  $^1\text{H}$  et le carbone  $^{13}\text{C}$  auquel il est directement lié (Bodenhausen & Ruben, 1980).

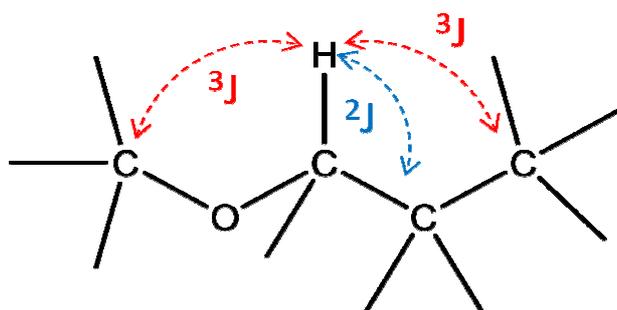


**Figure 23** - Corrélation hétéronucléaire observée en HSQC.

Les taches observées sur le spectre HSQC correspondent au couplage  $^1\text{J}$  entre proton et  $^{13}\text{C}$ . Cette expérience permet donc d'associer chaque proton au carbone qui les porte.

Si deux taches sont visibles sur la projection du signal d'un même carbone, cela traduit la présence de protons géminés. A l'opposé, si aucune tache n'est visible en face d'un signal  $^{13}\text{C}$ , le carbone est alors quaternaire.

L'expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) est basée sur l'étude des corrélations hétéronucléaires entre un proton et les carbones  $^{13}\text{C}$  voisins de celui auquel il est lié (Bax & Summers, 1986).



**Figure 24** - Corrélations hétéronucléaires observées en HMBC (en bleu, couplage  $^2\text{J}$  ; en rouge, couplage  $^3\text{J}$ ).

Les taches observées sur le spectre HMBC correspondent aux couplages  $^2\text{J}$  et  $^3\text{J}$  entre proton et  $^{13}\text{C}$ . Cette expérience permet de renseigner sur l'environnement chimique immédiat de

chaque proton. Grâce au spectre HMBC, il est possible de positionner précisément les divers groupements fonctionnels comme par exemple le point d'attache d'un ose sur une aglycone.

L'expérience HSQC-TOCSY (Heteronuclear Single Quantum Coherence – Total Correlation Spectroscopy) est basée sur l'étude des corrélations hétéronucléaires entre un proton et les carbones situés dans le même système de spin (Kövéř *et al.*, 1997).

Les taches observées sur la projection d'un proton correspondent à des corrélations avec les carbones portant des protons situés dans le même système de spin. La superposition du spectre HSQC permet de déterminer les déplacements  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  exacts de ces différents atomes.

Cette expérience est particulièrement utile pour des molécules présentant des systèmes de spin de taille assez importante (longs squelettes carbonés aliphatiques, ou sucres par exemple).

L'utilisation des spectres enregistrés pour ces différentes expériences permet de reconstituer la structure de molécule de proche en proche, à la manière d'un puzzle. Ces techniques sont d'une grande utilité pour l'identification de nouvelles molécules naturelles (Shoolery, 1984).

## **2) Données expérimentales**

### *a) Matériel utilisé*

Les analyses ont été effectuées sur deux types de spectromètres.

Un spectromètre Bruker AVANCE 3, de champ magnétique 14,1 T, opérant à 600,27 MHz en proton et équipé d'une sonde 5 mm TXI (triple détection inverse noyaux X)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  et d'une sonde 5 mm BBO  $^1\text{H}$ -X, à 300 K.

Un spectromètre Bruker AVANCE DMX 500 de champ magnétique 11,5 T, opérant à 500,12 en proton et équipé d'une cryo-sonde 5 mm TXI. Ce spectromètre est situé au sein du laboratoire RMN-ILP (RMN et Interactions Lipides-Protéines), rattaché à l'UMR CNRS 6026 (Université de Rennes 1), avec lequel le GESVAB développe une collaboration.

Les échantillons sont dissous dans du méthanol deutéré (CD<sub>3</sub>OD) puis placés dans des tubes NMR 3x100 mm de Bruker ou des tubes NMR 5x200 mm 509-UP-QTZ de Norell en fonction de la quantité d'échantillon.

### *b) Paramètres d'acquisition*

Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) des protons ( $^1\text{H}$ ) et carbones ( $^{13}\text{C}$ ) ont été calibrés par rapport au signal de résonance du méthanol. Ils sont exprimés en ppm. Les constantes de couplage, notées  $J$ , sont exprimées en Hz.

Les principaux paramètres d'acquisition relatifs aux expériences réalisées sont résumés dans le tableau 26.

Les spectres enregistrés ont été traités avec le logiciel Topspin version 3.0

**Tableau 26** - Principaux paramètres d'acquisition des séquences RMN mono- et bidimensionnelle.

Expérience	Proton $^1\text{H}$	COSY	ROESY	HSQC	HMBC	HSQC-TOCSY
Nombre de points en F1	32768	256	256	256	256	256
Nombre de scans	16	32	32	64	128	48
Largeur spectrale	8417 Hz	5411 Hz	7203 Hz	7211 / 31700 Hz	7812 / 33526 Hz	7211 / 31700 Hz
Délai de relaxation D1	1.5 s	1.799 s	1.5 s	1.5 s	1.5 s	1.799 s
Durée de spin-lock			400 ms			150 ms

La quantité de solide dissoute dans le méthanol varie entre 1 et 5 mg, en fonction de la masse de composé pur disponible.

### C) Données complémentaires

#### 1) Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des composés a été mesuré sur un polarimètre Perkin-Elmer 241, et le pouvoir rotatoire spécifique a été calculé en utilisant la loi de Biot. Les mesures ont été effectuées dans le méthanol, à 25°C.

#### 2) Coefficient d'extinction molaire

L'absorbance des molécules a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Cary 300 Bio de Varian dans des cuves de 1 cm, à partir de solutions de concentration précise.

La gamme de longueurs d'onde analysée est 400-190 nm. Le coefficient d'extinction molaire a été calculé en utilisant la loi de Beer-Lambert. Les mesures ont été effectuées dans le méthanol, à 25°C.

Chacun des quatre composés purifiés a ainsi été analysé à l'aide de ces diverses techniques afin d'en déterminer la structure moléculaire. Les résultats sont présentés molécule par molécule.

## II) Identification du composé A

Le composé **A** est l'espèce majoritaire dans la fraction **CZNCA-X** comme en témoignent les profils CLHP enregistrés et les quantités récoltées à l'issue de l'étape de lyophilisation.

### A) Résultats obtenus en FT/MS

#### 1) Expérience en « Full scan »

La détermination de la formule brute de composés inconnus doit s'appuyer sur les étapes suivantes (Kind & Fiehn, 2007) :

- 1) identification des espèces majoritaires des spectres source : ions quasi-moléculaires, adduits, dimères, fragments, etc...
- 2) utilisation des mesures précises de masses
- 3) interprétation des rapports isotopiques pour construire des hypothèses de formules brutes
- 4) analyse des spectres de fragmentation pour confirmer ces hypothèses

Nous présenterons en détail la méthode utilisée et le raisonnement suivi à partir de l'exemple du composé **A**.

Pour les autres molécules, les résultats obtenus seront décrits plus brièvement.

Pour tout ce qui suit, on appellera ion quasi-moléculaire l'espèce monoisotopique protonée en détection des ions positifs et l'espèce monoisotopique déprotonnée en détection des ions négatifs.

Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer avec certitude les ions quasi-moléculaires ( $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$ ) et/ou des adduits clairement identifiés. La mesure précise des écarts entre les rapports  $m/z$  de ces espèces est utilisée à cette fin.

Le tableau 27 résume les principaux ions observés en ESI positive et négative (Hoffmann & Stroobant, 2005).

Pour des raisons pratiques, les ions seront désignés par leur masse unitaire dans l'ensemble de ce travail, sauf exception justifiée par l'existence de plusieurs ions possédant la même masse unitaire (composés isobares). Les écarts précis de masse correspondant à des adduits de natures différentes et à des pertes de neutres en mode HCD seront toutefois indiqués lorsque jugé utile.

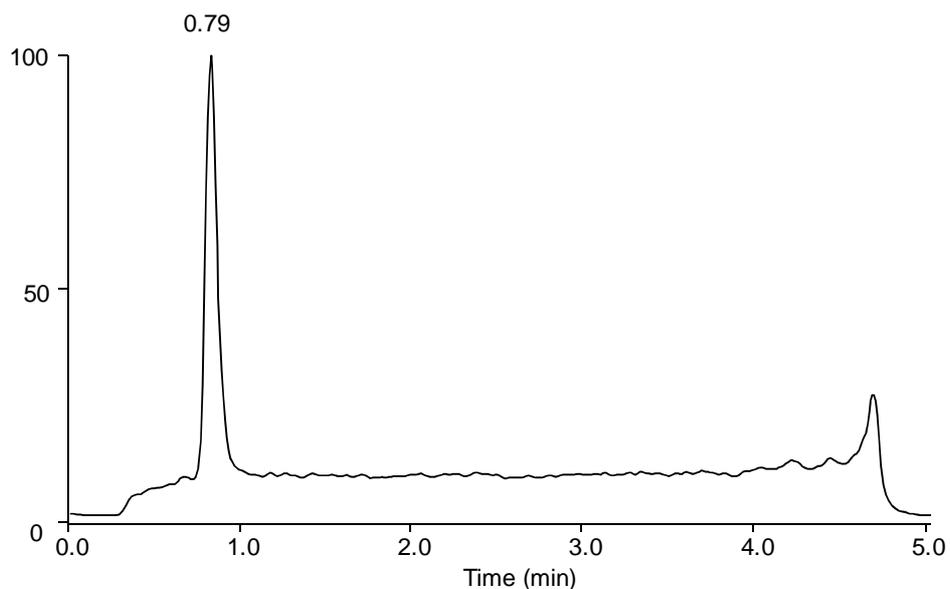
**Tableau 27** - Principaux ions pouvant être observés en ESI et écarts à la masse monoisotopique\* (M).

Mode d'ionisation	Espèce	Ecart (en Th) à la masse monoisotopique (M)
<b>Positif</b>	$[M+H]^+$	+ 1.00728
	$[M+NH_4]^+$	+ 18.03383
	$[M+Na]^+$	+ 22.98922
	$[M+K]^+$	+ 38.96316
	$[2M+H]^+$	M + 1.00728
	$[2M+NH_4]^+$	M + 18.03383
	$[2M+Na]^+$	M + 22.98922
<b>Négatif</b>	$[M-H]^-$	- 1.00728
	$[M+Cl]^-$	+ 34.96940
	$[M+HCOO]^-$	+ 44.99820
	$[M+CF_3COO]^-$	+ 112.98559
	$[2M-H]^-$	M-1.00728

\* masse calculée sur la base de la masse des isotopes majoritaires des différents éléments constitutifs de la molécule

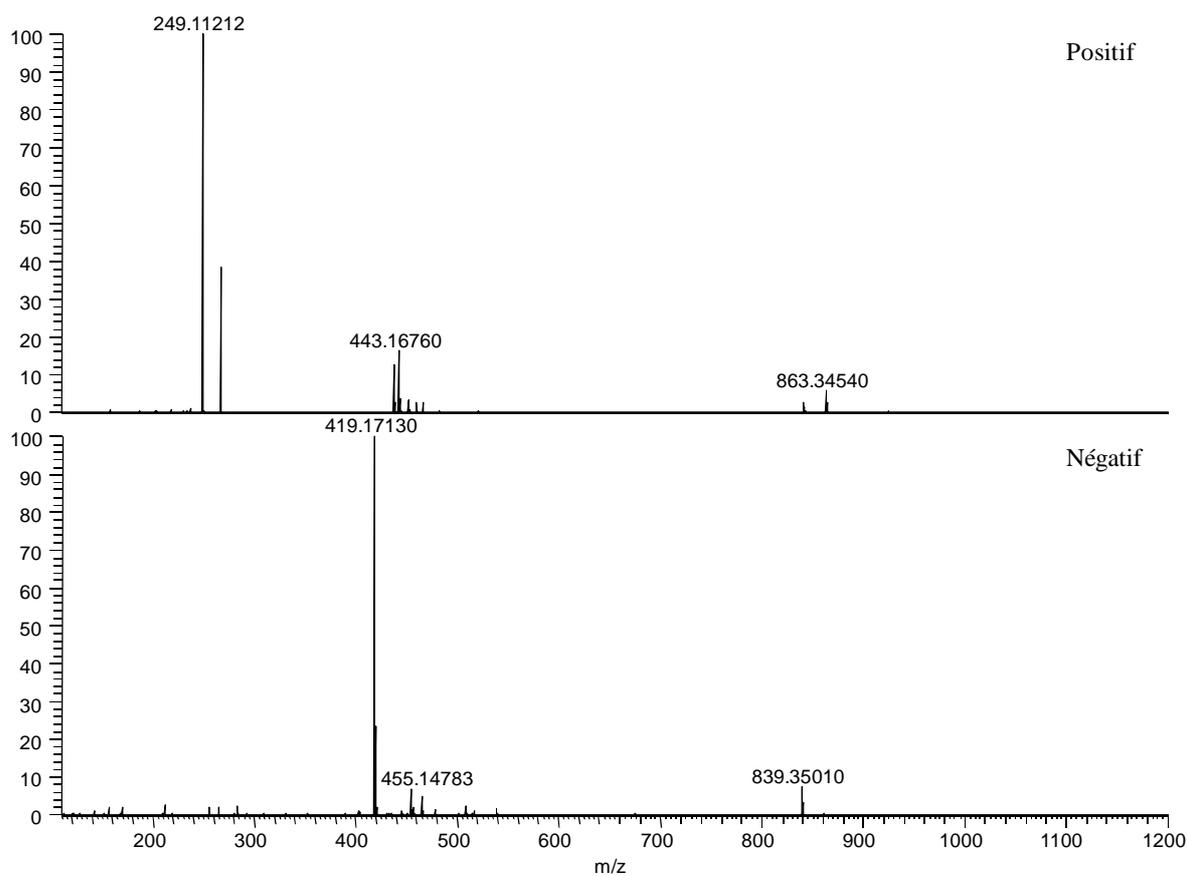
10  $\mu$ L d'une solution acétonitrile/eau à 10 % v/v de concentration en molécule **A** égale à 5mg/L sont injectés en LC-FT/MS (ce qui correspond à 50 ng injectés sur la colonne chromatographique).

Le chromatogramme des ions totaux obtenu pour le composé **A** présente un seul pic (au temps de rétention 0.8 min environ), ce qui semble confirmer la pureté de la molécule (figure 25).



**Figure 25** - Chromatogramme des ions totaux enregistré pour le composé A (0.79 min).

Les signaux obtenus en ionisations positive et négative présentent des rapports signal/bruit suffisants pour permettre leur interprétation (figure 26).



**Figure 26** - Spectre de masse FT/MS du composé A en mode positif (en haut) et en mode négatif (en bas).

En mode positif, les ions majoritaires sont de rapports  $m/z$  249, 267, 443, 841 et 863 Th. Un ion  $m/z$  438 est également visible.

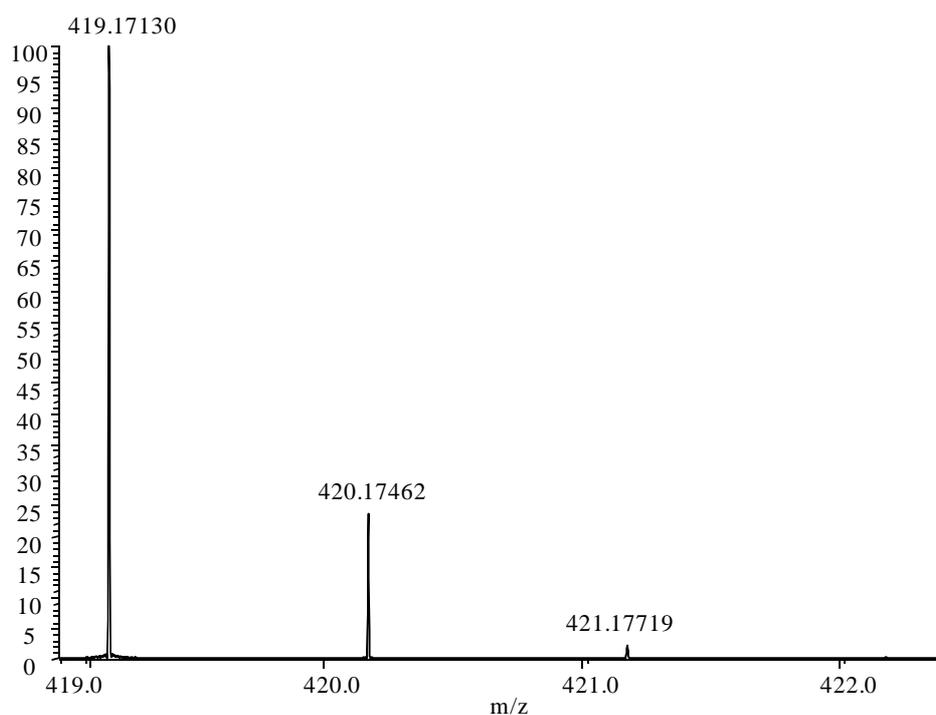
En mode négatif, on observe essentiellement les ions de rapports  $m/z$  419, 455, 465 et 839 Th. Les écarts de masse précise enregistrés permettent d'identifier ces différentes espèces, sur la base des valeurs théoriques présentées dans le tableau 27.

L'ion quasi-moléculaire en mode négatif est de rapport  $m/z$  419. L'ion quasi-moléculaire en ionisation positive ( $m/z$  421) est visible, mais de très faible intensité.

La figure 27 présente la distribution isotopique de l'ion quasi-moléculaire en ionisation négative.

Un écart d'environ 1.003 Th est visible entre les espèces. Cela correspond à la substitution d'un carbone 12 par un carbone 13. Cette distribution démontre que l'espèce  $m/z$  419 est monochargée ( $z = -1$ ).

Le composé **A** possède donc une masse unitaire de 420 g/mol.



**Figure 27** - Distribution isotopique de l'ion quasi-moléculaire  $m/z$  419 en mode négatif.

En ionisation négative, les espèces de rapports  $m/z$  455, 465 et 839 Th correspondent respectivement aux adduits chlorure ( $[M+Cl]^-$ ), formate ( $[M+HCOO]^-$ ) et le dimère ( $[2M-H]^-$ ).

En ionisation positive, les ions de rapports  $m/z$  438, 443, 841 et 863 Th correspondent aux adduits ammonium ( $[M+NH_4]^+$ ), sodium ( $[M+Na]^+$ ) ainsi qu'aux pseudo-dimères  $[2M+H]^+$  et  $[2M+Na]^+$ . Les ions de rapports  $m/z$  249 et 267 sont des fragments.

La présence des ions  $NH_4^+$  et  $HCOO^-$  s'explique par l'utilisation du formate d'ammonium dans la phase mobile, tandis que le chlorure et le sodium proviennent de la verrerie utilisée.

L'ion quasi-moléculaire étant peu visible en mode positif, nous détaillerons la détermination de la formule brute du composé **A** à partir du signal en ionisation négative (espèce  $[M-H]^-$ ).

L'interprétation de la masse expérimentale constitue l'étape suivante de cette détermination. En effet, l'application QualBrowser du logiciel Xcalibur permet de générer des formules brutes dont la masse théorique est proche de la masse mesurée. Pour cela, nous devons appliquer différentes contraintes au logiciel.

Le composé **A** est une molécule naturelle. Qui plus est, le rapport d'intensité des ions à  $m/z$  419 et 421 en ionisation négative permet d'exclure toute présence de Chlore (l'abondance isotopique naturelle du  $^{37}Cl$  est de 32,5%) ou de Brome (l'abondance isotopique naturelle du  $^{81}Br$  est de 98%). Nous limitons donc l'étude aux éléments C, H, O, N, P et S. Compte tenu de la masse molaire de la molécule, le nombre maximum des différents atomes est fixé respectivement à 35, 70, 20, 10, 10 et 10.

Un calibrage interne ayant été effectué, la précision de mesure de masse en LC-FT/MS est inférieure à 1 ppm dans ces conditions. Nous éliminerons donc toutes les molécules pour lesquelles l'écart entre la masse théorique et la valeur du rapport  $m/z$  de l'ion quasi-moléculaire enregistré est supérieur à 1 ppm.

Comme décrit ci-dessus, l'ion de rapport  $m/z$  419 est un ion quasi-moléculaire  $(M-H)^-$ ; il possède donc un nombre pair d'électrons, contrairement par exemple à des espèces anioniques radicalaires pouvant être générées aussi par ionisation électrospray. A ce niveau de précision, la masse de l'électron (environ  $5.10^{-4}$  uma) doit impérativement être prise en compte sous peine de compromettre les identifications de compositions élémentaires. Une consigne sur la parité du nombre d'électrons sera donc intégrée au calcul qui suit.

Les formules brutes générées par le logiciel Xcalibur sur ces bases sont présentées dans le tableau 28.

**Tableau 28** - Formules brutes proposées pour l'ion quasi-moléculaire du composé **A**.

Espèces proposées	Ecart avec la valeur mesurée (en ppm)
$C_{15}H_{35}O_5N_2S_3$	-0.233
$C_{22}H_{27}O_8$	0.284
$C_{17}H_{24}O_3N_8P$	-0.445
$C_{17}H_{32}O_2N_4P$	0.674
$C_{16}H_{38}O_4P_3S$	0.827
$C_{25}H_{28}N_2PS$	-0.881
$C_{10}H_{32}N_{10}PS_3$	-0.961

La troisième étape vers la détermination de la formule brute s'appuie sur les mesures de rapports isotopiques. Le rapport isotopique naturel  $C^{13}/C^{12}$  est d'environ 1.1 %. Le rapport d'intensité entre le pic monoisotopique (M) et le pic monoisotopique + 1 (M+1, correspondant à la substitution d'un  $^{12}C$  par un  $^{13}C$ ) permet donc d'estimer le nombre de carbones dans une molécule organique (McLafferty & Turecek, 1993).

A titre d'exemple, la molécule de décane  $C_{10}H_{22}$ , possédant 10 atomes de carbone, présente un rapport  $(M+1)/M = 10 \times 1.1 = 11$  % environ.

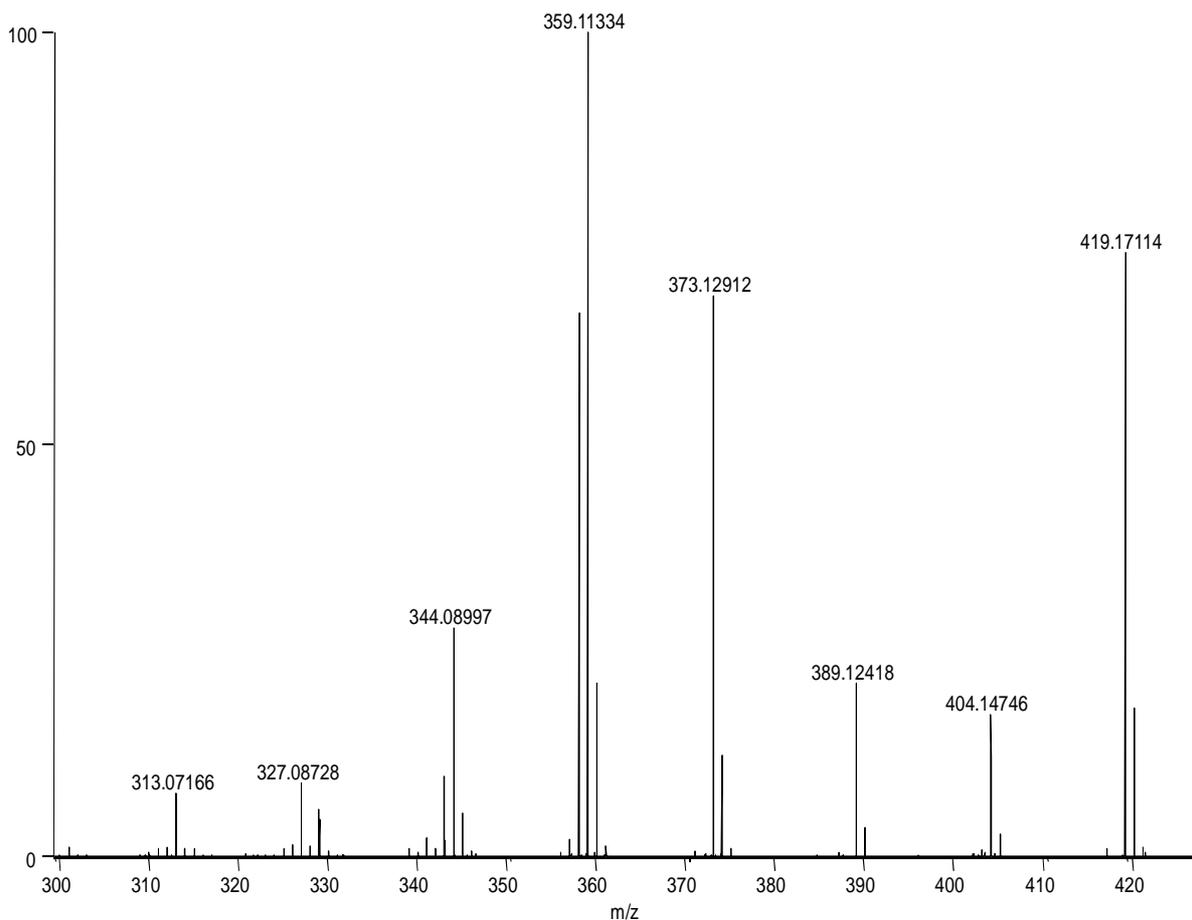
Dans le cas de la molécule **A**, le rapport mesuré est d'environ 25 %, ce qui correspond à un nombre de carbones compris entre 22 et 23 (figure 27). En considérant une marge d'erreur de 10 %, nous ne conservons que les molécules possédant entre 20 et 25 atomes de carbones.

Parmi les formules brutes proposées au tableau 28, deux seulement sont compatibles avec ce critère :  $C_{22}H_{27}O_8$  et  $C_{25}H_{28}N_2PS$ .

Le rapport d'intensité des ions à  $m/z$  419 et 421 permet d'exclure toute présence de Soufre (l'abondance isotopique naturelle du  $^{34}S$  est de 4,4%). La structure  $C_{25}H_{28}N_2PS$  est donc improbable et la quatrième étape, l'analyse des spectres de fragmentation, va en apporter confirmation.

## 2) Etude de la fragmentation

L'application d'une énergie de 40 eV sur la cellule HCD permet de fragmenter le composé **A**. Le spectre de masse enregistré en mode négatif est présenté à la figure 28.



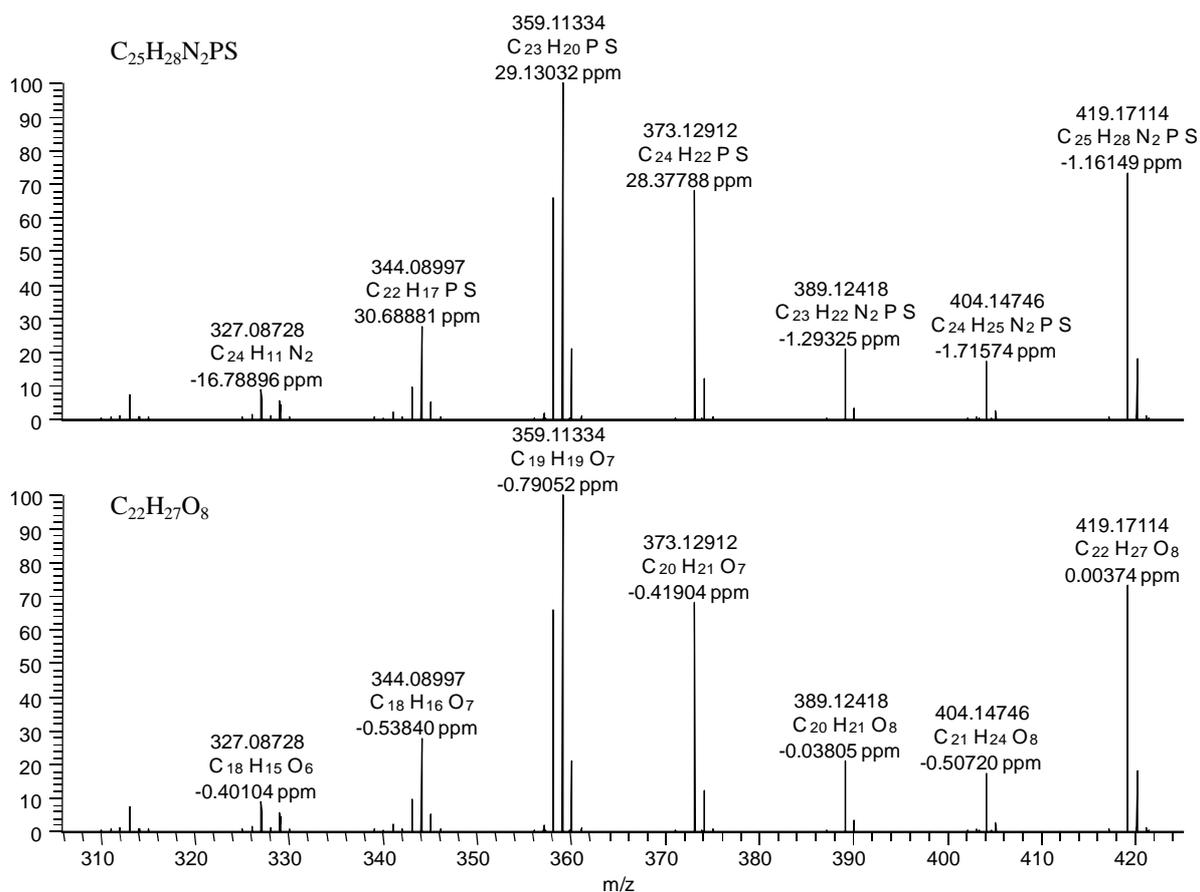
**Figure 28** - Spectre de masse du composé **A** obtenu en fragmentation HCD avec une énergie de 40 eV (mode négatif).

La précision de mesure de masse est conservée en mode HCD.

Le processus de dissociation induite par collision sur des atomes de gaz neutre nous obligeant à considérer la formation d'espèces non radicalaires et radicalaires, nous ne présumerons donc pas de la parité électronique des fragments générés.

Pour chaque molécule, les contraintes concernant le nombre maximum des différents éléments sont fixées par la formule brute étudiée. Par exemple pour la formule brute  $C_{22}H_{27}O_8$ , nous ne choisissons que des atomes de C, H et O, avec des maxima respectifs de 22, 27 et 8.

Pour chaque fragment, la formule brute la plus proche de la valeur mesurée est présentée à la figure 29.



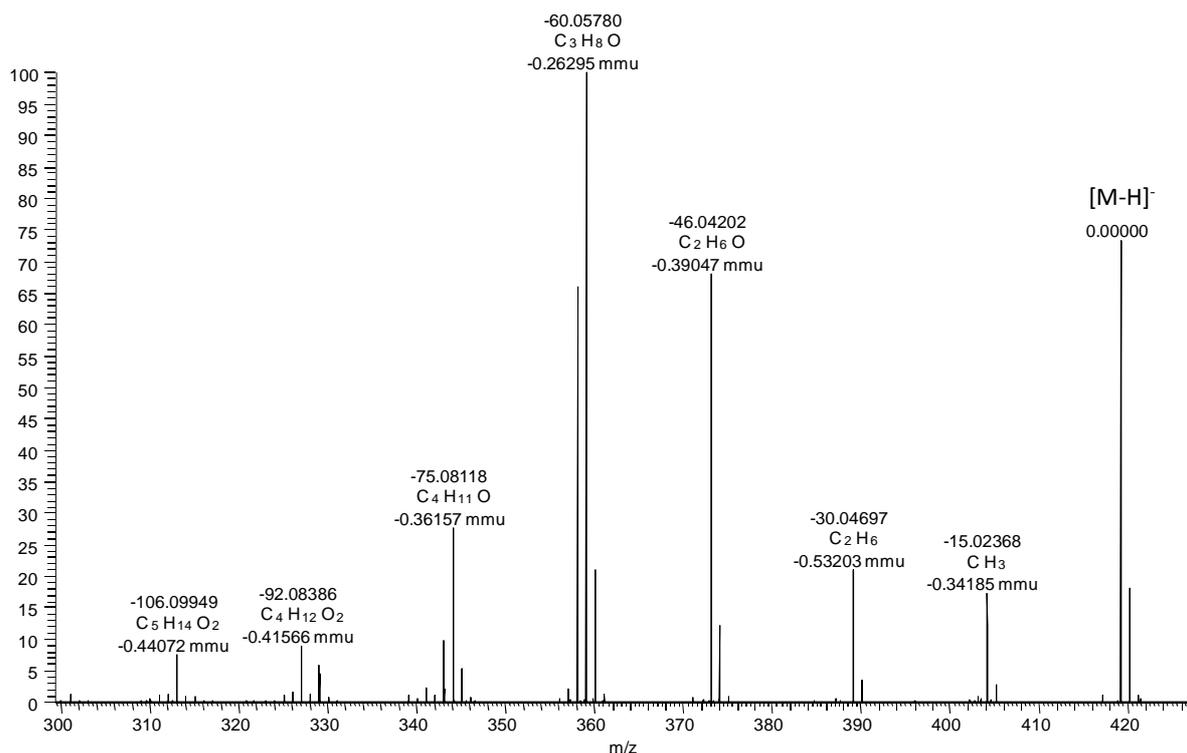
**Figure 29** - Interprétation de la composition des fragments de la molécule **A** sur la base des deux formules brutes proposées.

Pour la formule  $C_{25}H_{28}N_2PS$ , plusieurs fragments présentent un écart très important entre la masse théorique de la formule brute proposée et le rapport  $m/z$  effectivement enregistré. Ces valeurs sont incohérentes avec les performances de la LC-FT/MS en termes de précision de mesure de masse.

En revanche, tous les fragments peuvent être interprétés avec une précision de mesure de masse inférieure à 1 ppm pour la formule brute  $C_{22}H_{27}O_8$  : il s'agit donc de la composition de l'ion quasi-moléculaire.

L'application de ces différentes règles permet ainsi de déterminer avec certitude la formule brute de la molécule **A** :  $C_{22}H_{28}O_8$ .

En ce qui concerne l'interprétation du spectre de fragmentation, nous pouvons calculer les écarts de rapport  $m/z$  entre l'ion quasi-moléculaire  $[M-H]^-$  (fixé alors comme référence à 0) et les fragments observés. Des formules brutes peuvent être associées aux pertes de fragments enregistrées. Les résultats de cette étude sont présentés à la figure 30.



**Figure 30** - Interprétation des écarts entre l'ion quasi-moléculaire et les fragments HCD enregistrés en mode négatif. Les précisions de masse sont données en mmu (milli-unité de masse).

La figure 30 permet d'observer des départs successifs de groupements méthyle, méthoxy et/ou formaldéhyde.

Nous avons pu réaliser des expériences de fragmentation complémentaires à l'aide d'un LTQ-Orbitrap Velos, dans le cadre d'une collaboration avec le Docteur Eric Génin, responsable du laboratoire d'application de la société Thermo Fisher Scientific (les Ulis, France). Ces expériences  $MS^n$  ont confirmé le départ successif de quatre groupements  $-CH_3$ . La molécule **A** contient donc quatre méthyles.

En outre, ces expériences ont permis de montrer que les fragments 249 et 267, visibles en « Full scan » positif, proviennent des dimères  $[2M+H]^+$  et  $[2M+Na]^+$ .

## B) Résultats obtenus en RMN

5 mg du composé **A** ont été analysés dans un tube 5 mm à l'aide du spectromètre Bruker 600. Les données RMN du proton  $^1H$  et du carbone  $^{13}C$  (obtenues à l'aide des expériences de corrélations hétéronucléaires) sont présentées en annexe.

Les résultats obtenus en LC-FT/MS ont facilité l'interprétation des spectres RMN.

Les déplacements chimiques enregistrés sont similaires à ceux publiés par (Nabeta *et al.*, 1987) et complétés par (Rahman *et al.*, 2007b) pour un composé nommé **lyonirésinol**.

L'interprétation des résultats des différentes expériences de RMN confirme la similitude de la structure du composé **A** avec celle du **lyonirésinol**, qui est ainsi connue depuis de nombreuses années et décrite à plusieurs reprises. Par conséquent, nous ne détaillerons pas la résolution de la structure du composé **A** à partir de l'exploitation des spectres de RMN 2D.

### C) Données complémentaires

Pour une concentration de 0.5g/L en **A**, on calcule  $\log(\epsilon)=2.57$  pour un  $\lambda^{\max}$  de 278 nm.

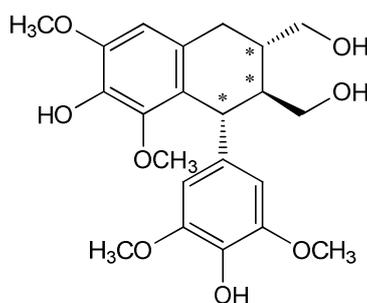
Le pouvoir rotatoire mesuré est nul.

### D) Discussion

La formule brute du **lyonirésinol** est  $C_{22}H_{28}O_8$ , ce qui correspond à la composition trouvée en LC-FT/MS.

La convergence des résultats obtenus en LC-FT/MS et en RMN avec les caractéristiques publiées précédemment nous permettent donc d'établir que le composé **A** est le **lyonirésinol** (figure 31).

La formule semi-développée du **lyonirésinol** nous suggère que le fragment majoritaire de rapport  $m/z$  249, observé en ionisation positive, provient d'une perte d'un groupement diméthoxyphénol et d'une déshydratation.



**Figure 31** - Formule semi-développée du ( $\pm$ )-lyonirésinol (composé **A**).

La valeur nulle mesurée pour le pouvoir rotatoire du lyonirésinol purifié à partir du bois de chêne signifie que ce composé est présent sous forme d'un racémique chez *Quercus petraea*. Le même résultat a été obtenu par Nabeta *et al.* (1987) chez *Quercus robur*.

Le lyonirésinol est un lignane, formé de deux sous-unités syringyles. Il a été identifié pour la première fois par Kato (1963) dans le bois de l'espèce *Lyonia ovalifolia* var. *elliptica*. On le trouve également dans diverses espèces végétales, avec des rapports énantiomériques

variables, et sa voie de biosynthèse a été étudiée en détail (Rahman *et al.*, 2007a; Rahman *et al.*, 2007b).

Sa présence a été recensée dans le genre *Quercus* (Seikel *et al.*, 1971; Nabeta *et al.*, 1987; Vivas *et al.*, 1998), mais aussi dans diverses eaux-de-vie élevées sous bois (Nabeta *et al.*, 1987; Arramon, 2001; Koga *et al.*, 2007) et dans les vins (Moutounet *et al.*, 1989).

Arramon (2001) indique que les vins ne contiennent pas de **lyonirésinol**, en dépit de sa présence dans le bois de chêne utilisé pour la fabrication des barriques et sa relative résistance au traitement thermique (Sarni *et al.*, 1990). Des études quantitatives, présentées dans la partie III de cette thèse, nous permettrons de nous positionner sur ce sujet.

Par ailleurs, ce lignane possède une activité antimutagène et antioxydative (Azhar UI *et al.*, 2006; Takemoto *et al.*, 2006).

De façon plus surprenante, Vivas (1997) affirme que le lyonirésinol est de couleur rouge vermillon. Une étude plus récente à laquelle a participé cet auteur (Nonier *et al.*, 2009), suggère d'ailleurs que ce lignane pourrait, en raison de sa couleur rouge supposée, participer à la coloration brune du bois de chêne utilisé en tonnellerie. Or, le lyonirésinol que nous avons purifié se présente sous forme d'une poudre blanche, au même titre que celui décrit par Nabeta *et al.* (1987), ainsi que par Rahman *et al.* (2006b).

Il semblerait par conséquent que le composé isolé par Vivas (1997) et Nonier *et al.* (2009) ne soit pas pur.

### III) Identification du composé B

4.9 mg du composé **B** ont été récupérés à l'issue de la CLHP préparative décrite au chapitre 5. Cette molécule se positionne donc au second rang en termes d'abondance dans la fraction **CZNCA-X**.

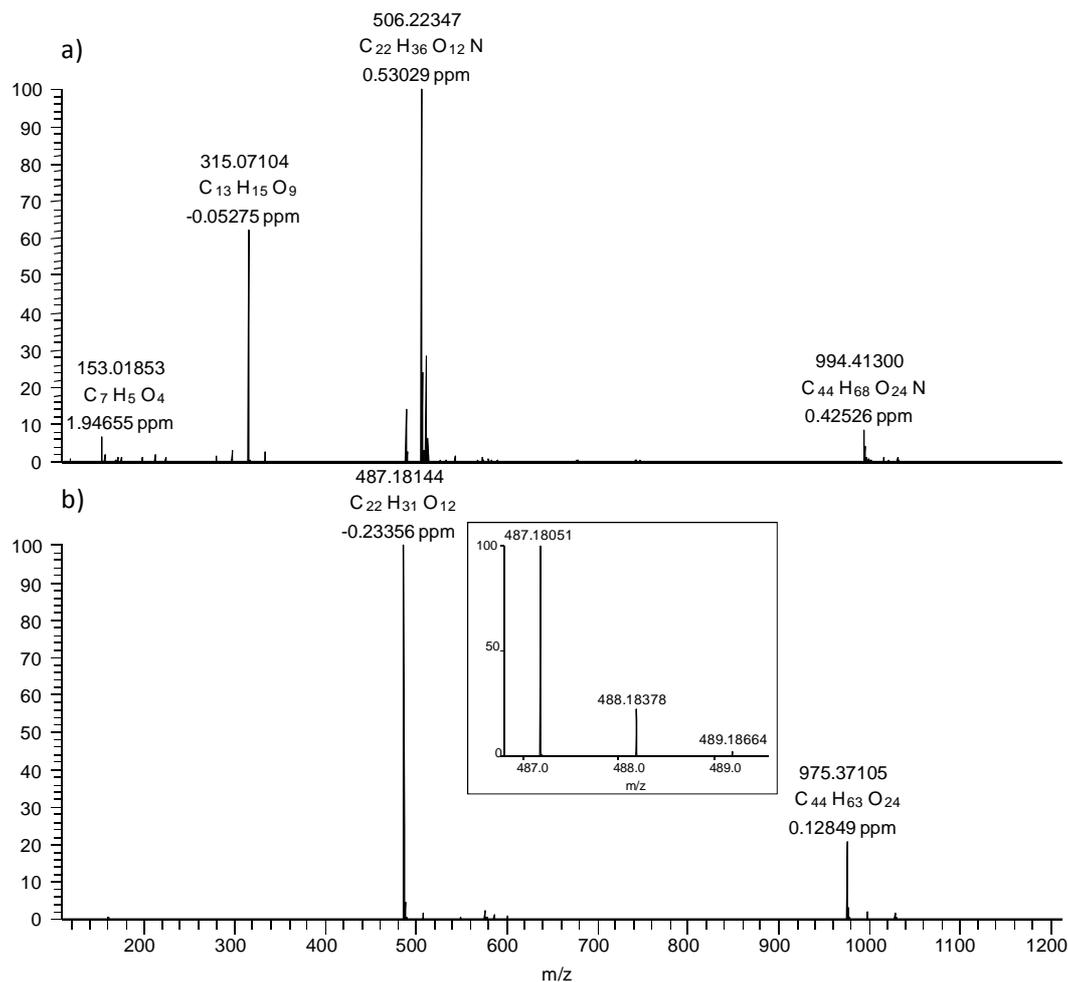
#### A) Résultats obtenus en FT/MS

##### 1) Détermination de la formule brute

Les résultats de FT/MS présentés ici ont été enregistrés à partir de l'injection de 10 µL d'une solution acétonitrile/eau (10 % v/v) de concentration 10 mg/L en composé **B**.

Le chromatogramme des ions totaux obtenu pour le composé **B** présente un seul pic (au temps de rétention de 2 min environ), ce qui confirme la pureté de la molécule.

Le signal ionique enregistré est relativement intense à la fois en mode positif et en mode négatif, et les spectres obtenus sont présentés à la figure 32.



**Figure 32** - Spectres de masse FT/MS du composé **B** en modes positif (a) et négatif (b)  
L'encadré correspond au détail de ce dernier spectre autour de l'ion de rapport  $m/z$  487.

Les principaux ions observés sont de rapports  $m/z$  315, 489, 506, 511 et 994 en mode positif et  $m/z$  487, 601 et 975 en mode négatif.

L'interprétation de ces deux spectres de masse permet de montrer que la molécule **B** possède une masse unitaire de 488 g/mol. Les ions observés peuvent en effet s'expliquer de la façon suivante (tableau 27) :

En mode positif, les ions  $m/z$  489, 506, 511 et 994 correspondent respectivement à l'espèce  $[M+H]^+$  ainsi qu'aux adduits  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+Na]^+$  et au dimère  $[2M+NH_4]^+$ . L'ion 315 est vraisemblablement issu d'une fragmentation.

En mode négatif, les ions  $m/z$  487, 601 et 975 correspondent respectivement à l'espèce  $[M-H]^-$ , à l'adduit  $[M+CF_3COO]^-$  et au dimère  $[2M-H]^-$  (l'encadré de la figure 32 confirme que l'espèce de  $m/z$  487 est monochargée).

La présence du trifluoroacétate est certainement liée à l'utilisation préalable d'acide trifluoroacétique dans le système LC-FT/MS.

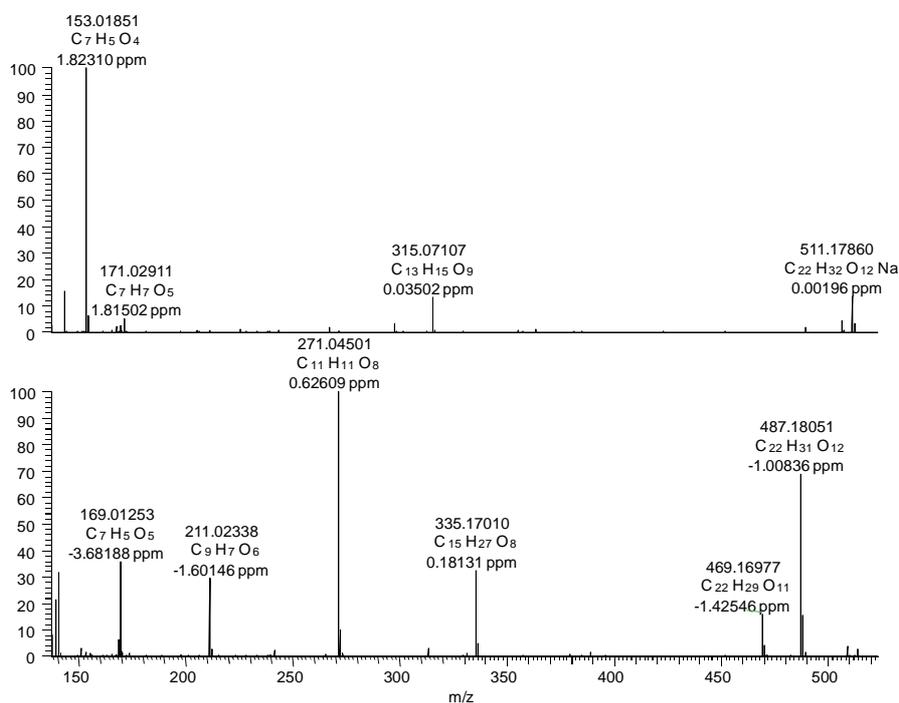
La détermination de la formule brute est effectuée en mode négatif, à partir l'espèce de rapport  $m/z$  487.

En suivant le raisonnement décrit pour la molécule **A**, nous pouvons conclure que la formule brute de la molécule **B** est **C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>12</sub>**, ce que corroborent les compositions proposées pour les autres ions principaux décrits plus haut (écarts variant de 0.04 ppm à 1.1 ppm).

## 2) Etude de la fragmentation

Une énergie de 80 eV est appliquée sur la cellule HCD.

En ionisation négative, un ion de rapport  $m/z$  169.01253 est visible, de formule brute  $C_7H_5O_5^-$  (figure 33). Cet ion peut correspondre à un gallate, groupement présent dans diverses molécules du bois de chêne. En outre, on peut noter qu'un écart de 152.01096 um sépare l'ion  $m/z$  487 ( $[M-H]^-$ ) de l'ion  $m/z$  335, ce qui correspond au départ d'un groupe  $C_7H_4O_4$ , caractéristique d'un groupe galloyle terminal.



**Figure 33** - Spectre de masse du composé **B** obtenu en fragmentation HCD avec une énergie de 80 eV en mode positif (en haut) et en mode négatif (en bas).

Enfin, la fragmentation en mode positif montre un ion de rapport  $m/z$  315, associé à la formule  $C_{13}H_{15}O_9^+$ , qui pourrait correspondre à un hexose *O*-galloylé déprotoné. Le départ

d'un hexose  $C_6H_{10}O_5$  (-162 um) permet d'expliquer le fragment majoritaire du spectre à  $m/z$  153. De formule brute  $C_7H_5O_4$ , cet ion est, lui aussi, indicatif d'un groupe galloylé.

L'utilisation d'un spectromètre de masse réalisant des expériences de  $MS^n$  permettrait d'étudier cette hypothèse de façon plus approfondie.

Les expériences de spectrométrie de masse avec fragmentation semblent donc montrer la présence d'un groupement gallate dans la molécule **B**, celui-ci étant vraisemblablement situé en bout de chaîne.

## B) Résultats obtenus en RMN

4 mg du composé **B** ont été analysés dans un tube 5 mm, à l'aide du spectromètre Bruker 600. Les données RMN du proton  $^1H$  et du carbone  $^{13}C$  (obtenues à l'aide des expériences de corrélations hétéronucléaires) sont présentées en annexe.

Les déplacements chimiques observés sont similaires à ceux décrits par (Tanaka & Kouno, 1996) et complétés par (Masson *et al.*, 2000) pour le dérivé 6'-*O*-gallate de l'acide (3*S*,4*S*)-4- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-3-méthylactanoïque (figure 34).

L'interprétation des expériences de RMN bidimensionnelles tend à confirmer la similitude de la structure du composé **B** avec celle de cette molécule. Toutefois, de la même façon que pour le composé **A**, nous ne détaillerons pas le raisonnement conduisant à la détermination de la structure de **B** à partir des données RMN, car la molécule est connue et ce raisonnement a déjà été présenté dans la littérature (Masson *et al.*, 2000).

## C) Données complémentaires

Pour une concentration de 0.25g/L en **B**, on calcule  $\log(\epsilon)=3.07$  pour un  $\lambda^{\max}$  de 277 nm.

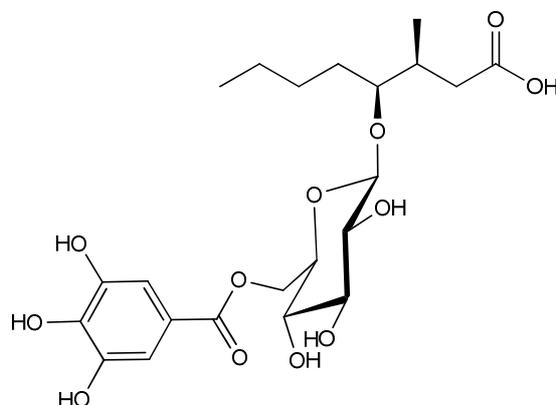
Le pouvoir rotatoire mesuré est - 0.017 pour une concentration en **B** de 0.092 g/100mL. On calcule alors le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]^D = -18.5^\circ$ .

## D) Discussion

La formule brute du composé identifié par Tanaka *et al.* (1996) est  $C_{22}H_{32}O_{12}$  et sa formule semi-développée montre la présence d'un groupement gallate terminal, ce qui correspond aux résultats obtenus pour le composé **B** en LC-FT/MS.

Les données RMN, le coefficient d'extinction molaire et le pouvoir rotatoire sont également similaires aux valeurs publiées.

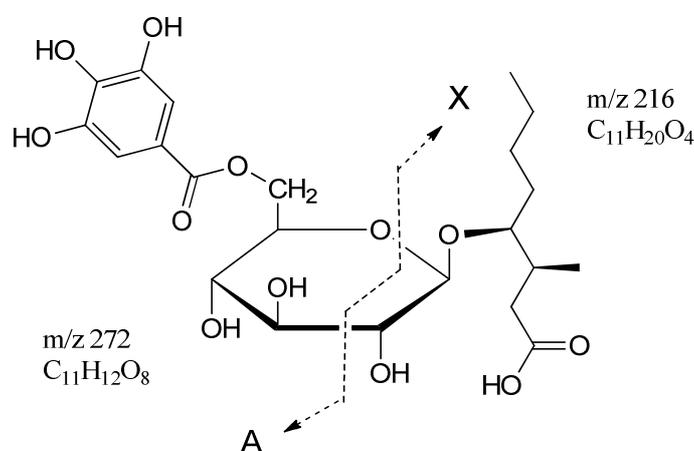
Nous pouvons donc en déduire que la molécule **B** est le **dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3S,4S)-4-β-gluco**pyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque (figure 34).



**Figure 34** - Formule semi-développée du dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3S,4S)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque (composé **B**).

Les données RMN permettent de déterminer la configuration relative des centres stéréogènes de la molécule. Compte tenu de la similarité du pouvoir rotatoire mesuré avec celui publié par Tanaka *et al.*, la stéréochimie absolue de la molécule **B** est vraisemblablement identique à celle de la molécule décrite dans la littérature (le glucopyranosyle est donc visiblement de configuration D).

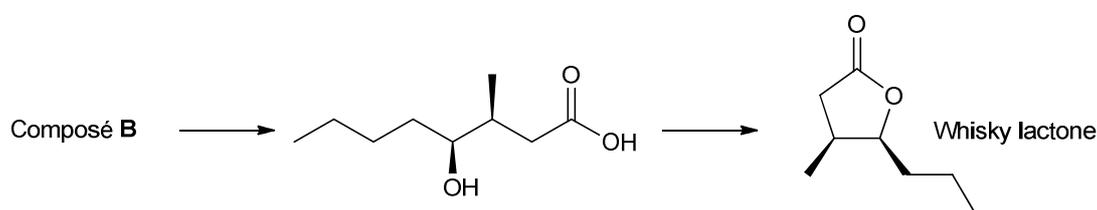
L'ion de rapport  $m/z$  271 enregistré en mode HCD négatif résulte vraisemblablement de la fragmentation du glucose, selon un schéma bien connu, présenté à la figure 35 (Domon & Costello, 1988; Cuyckens & Claeys, 2004).



**Figure 35** - Schéma de fragmentation conduisant à l'ion de  $m/z$  271 enregistré en négatif.

L'ion de m/z 315 observé en HCD positif est obtenu par rupture de la liaison entre le carbone anomère du glucose et l'oxygène relié à l'acide octanoïque.

Le dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3*S*,4*S*)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque a été identifié pour la première fois dans le bois de *Platycarya strobilacea* Sieb. et Zucc (Tanaka *et al.*). Les auteurs ont considéré cette molécule comme un précurseur potentiel de la β-méthyl-γ-octalactone, couramment appelée whisky lactone ou oak lactone, dont les propriétés olfactives ont été décrites dans le chapitre 3. Nous le noterons donc **P-WL**. En 2000, Masson *et al.* ont identifié le composé **B** dans un extrait de bois de *Quercus petraea* et ont confirmé qu'il était un des précurseurs de la cis-β-méthyl-γ-octalactone, via une étape d'hydrolyse puis une lactonisation (figure 36).



**Figure 36** - Schématisation de la formation de cis-β-méthyl-γ-octalactone (whisky lactone) à partir du **P-WL** (composé **B**).

Masson *et al.* (2001) ont également quantifié cette molécule dans le bois de chêne et ils ont montré dans la même étude qu'elle constituait le principal précurseur de la whisky lactone. La libération de cette dernière à partir du **P-WL** se fait au cours de la maturation du bois, sous l'action de microorganismes, ainsi qu'au cours de l'étape de chauffe de la barrique (Wilkinson *et al.*, 2004).

A notre connaissance, la présence du dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3*S*,4*S*)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque (**P-WL**) dans le vin ou les eaux-de-vie, ainsi que ses éventuelles propriétés organoleptiques n'ont jamais été décrites.

#### IV) Identification du composé C

Le composé **C** est nettement moins abondant dans la fraction **CZNCA-X**, puisque seulement 1.2 mg a été récupéré à l'issue de la CLHP préparative effectuée au cours du développement de la méthode de fractionnement.

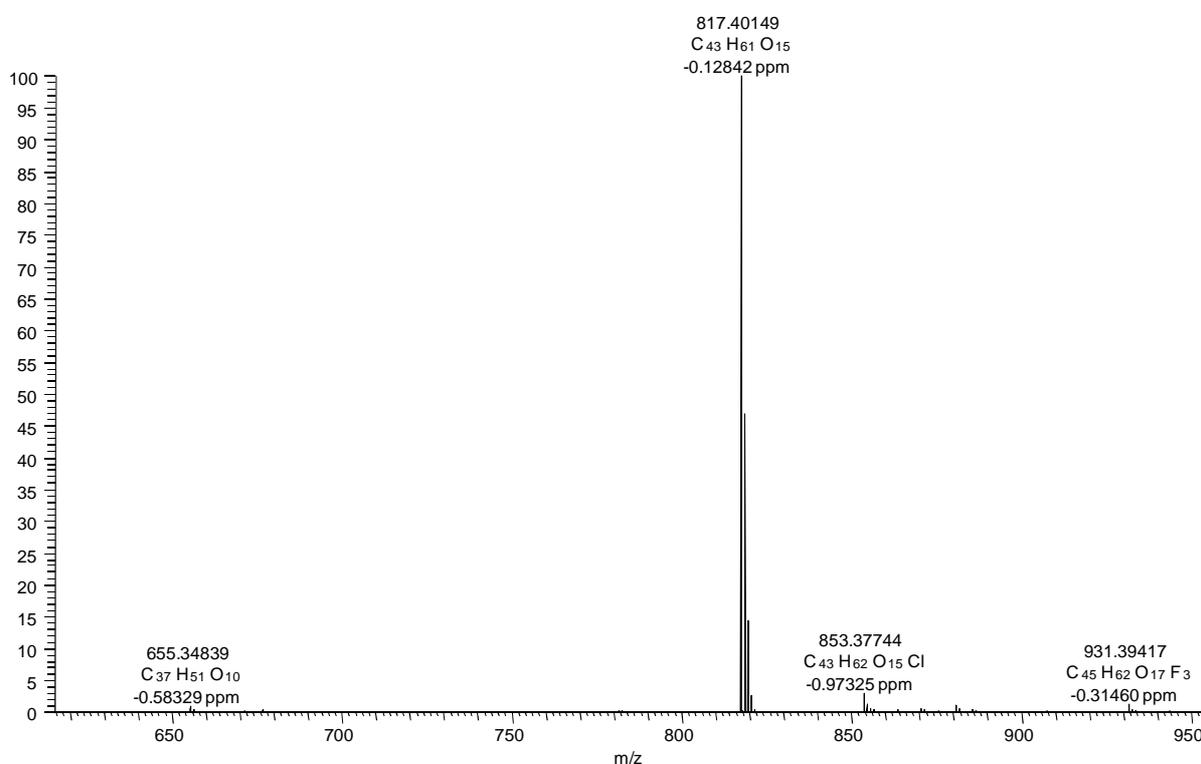
## A) Résultats obtenus en FT/MS

### 1) Détermination de la formule brute

Les résultats de FT/MS présentés ici ont été enregistrés à partir de l'injection de 10  $\mu$ L d'une solution acétonitrile/eau (15 % v/v) de concentration 10 mg/L en composé **C**.

Le chromatogramme des ions totaux obtenu pour le composé **C** présente un seul pic (au temps de rétention de 2.3 min environ), ce qui confirme la pureté de la molécule.

Comme le montre la figure 37 le spectre de masse enregistré en mode négatif est constitué d'un ion majoritaire à  $m/z$  817 et de signaux de plus faible abondance de rapports  $m/z$  655, 853 et 931.



**Figure 37** - Spectre de masse du composé **C** en mode négatif.

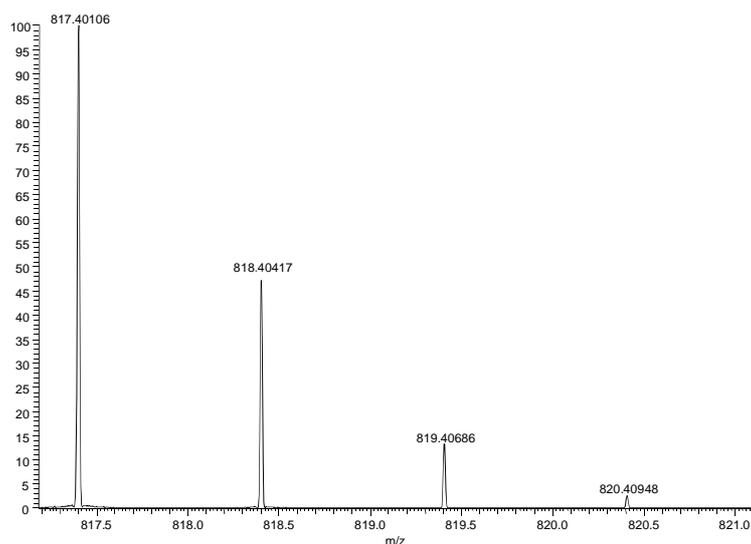
En mode positif, le signal est nettement moins intense : le spectre de masse présente un grand nombre d'ions, notamment de faibles rapports  $m/z$ , correspondant vraisemblablement à des fragments. Toutefois, les ions  $m/z$  657, 819 et 841 sont nettement visibles.

Les différents ions observés peuvent être interprétés de la façon suivante :

- En mode négatif, l'ion majoritaire  $m/z$  817 correspond à l'espèce  $[M-H]^-$ . Les ions  $m/z$  853 et  $m/z$  931 sont associés respectivement aux adduits  $[M+Cl]^-$  et  $[M+CF_3COO]^-$ . L'ion  $m/z$  655 est un fragment généré au cours de l'ionisation.
- En mode positif, les ions  $m/z$  819 et 841 résultent respectivement de la protonation et de la cationisation par le sodium de la molécule neutre, tandis que l'ion  $m/z$  657 correspond vraisemblablement au même fragment que celui associé à l'ion  $m/z$  655 en mode négatif.

L'interprétation des spectres de masse en mode positif et négatif permet donc de proposer une masse unitaire de 818 g/mol pour la molécule **C**.

La détermination de la formule brute est réalisée sur la base de l'ion majoritaire du spectre d'ions négatifs à  $m/z$  817. Le détail du spectre de masse, présenté à la figure 38, permet de confirmer que cette espèce est monochargée ( $z=1$ ).



**Figure 38** - Détail du spectre de masse du composé **C** en mode négatif permettant de déterminer le rapport isotopique de l'espèce  $m/z$  817.

Le rapport isotopique expérimental  $(M+1)/M$  est d'environ 48 % (figure 38).

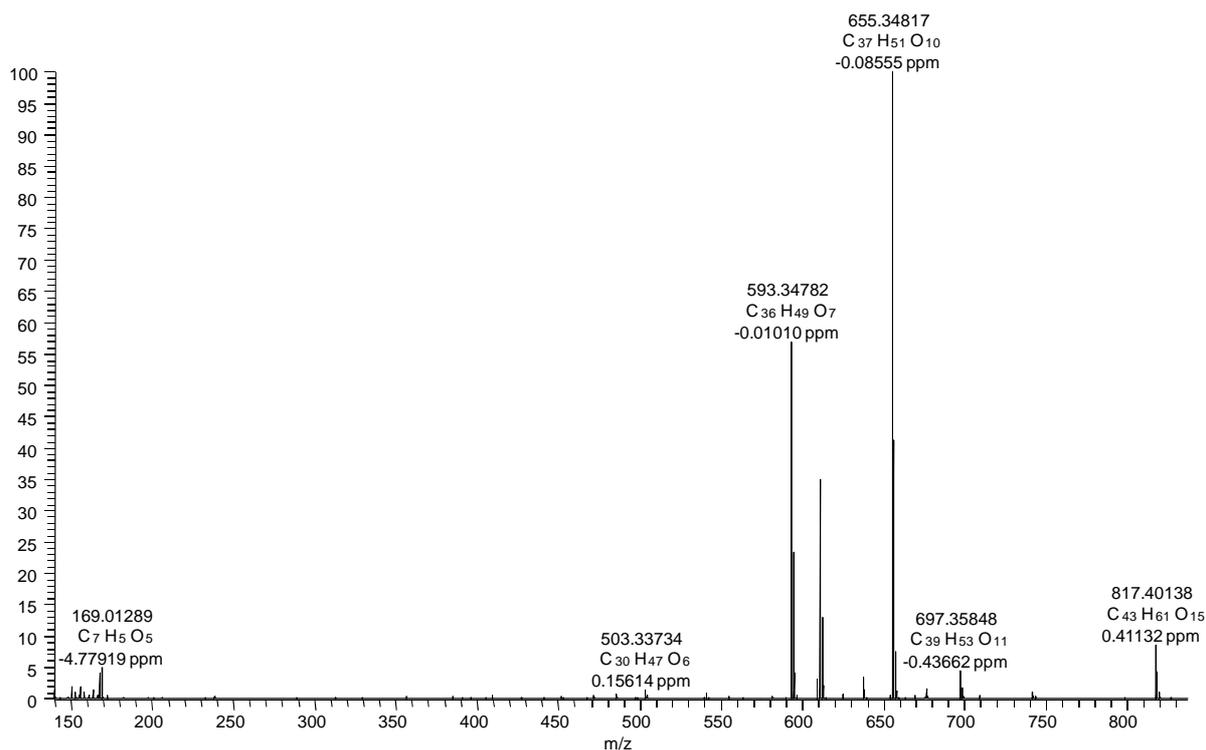
Le logiciel Xcalibur propose la formule  $C_{43}H_{61}O_{15}$  pour cet ion, avec un écart de 0.2 ppm par rapport à la valeur théorique.

En suivant le raisonnement décrit pour la molécule **A**, nous pouvons conclure que le composé **C** a pour formule brute  $C_{43}H_{62}O_{15}$ , ce que confirment les compositions associées aux différents ions décrits ci-dessus (écarts compris entre 0.2 et 0.9 ppm).

La détermination de la formule brute est un élément capital en vue de l'identification de la structure moléculaire. Ce résultat confirme en outre les performances de la LC-FT/MS en termes de fidélité du ratio isotopique mesuré (Erve *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010).

## 2) Etude de la fragmentation

La fragmentation du composé **C**, par application d'une énergie HCD de 80 eV, conduit à la formation de nombreux ions visibles sur le spectre de masse, comme le montre la figure 39.



**Figure 39** - Détail du spectre de fragmentation en mode négatif du composé **C** par application d'une énergie HCD de 80 eV.

L'ion  $m/z$  655, également observé sans fragmentation, est l'espèce majoritaire. La mesure de sa masse exacte permet de lui attribuer la formule brute C<sub>37</sub>H<sub>51</sub>O<sub>10</sub>. La différence avec l'espèce [M-H]<sup>-</sup> est une structure neutre en C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, qui correspond vraisemblablement à un groupement hexose déshydraté (glucosyle par exemple, rencontré dans divers composés du bois de chêne ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998a). Il est fréquent d'observer la perte d'un tel groupement au cours de l'ionisation, ce qui est cohérent avec la présence de l'ion négatif  $m/z$  655 et de l'ion positif  $m/z$  657 en absence de fragmentation. Il est ainsi fort probable que le composé **C** contienne un groupement hexose.

En outre, un ion  $m/z$  169 est également enregistré en mode négatif : sa formule brute, C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, évoque un gallate. L'ion de rapport  $m/z$  503, visible sur le spectre, et de formule brute

$C_{30}H_{47}O_6$ , correspond à une espèce formée par la perte d'un groupement  $C_7H_4O_4$  vis-à-vis de l'ion  $m/z$  655. Ces résultats suggèrent la présence d'un groupement galloyle dans la structure de la molécule **C**.

L'étude du composé **C** en  $MS^n$  pourrait permettre de savoir si ces deux groupements sont liés. Toutefois les hypothèses suggérées par les résultats en FT/MS constituent une aide précieuse pour la détermination de la structure moléculaire à l'aide de la RMN.

L'utilisation de la LC-FT/MS nous a donc permis d'obtenir la formule brute de la molécule **C**, mais également de suggérer la présence de groupements galloyle et hexose. Si cette technique ne permet pas la détermination de la formule semi-développée des molécules, elle fournit toutefois des informations importantes, facilitant l'interprétation des données de résonance magnétique nucléaire.

## B) Résultats obtenus en RMN

A notre connaissance, aucun composé de formule brute  $C_{43}H_{62}O_{15}$  n'a été décrit dans le bois de *Quercus petraea*. La composition élémentaire permet de calculer le nombre d'insaturations ( $N_i$ ) de la molécule **C** :

$$N_i = (2C - H + 2)/2$$

où  $C$  et  $H$  désignent respectivement le nombre d'atomes de carbone et d'hydrogène.

La molécule **C** contient ainsi 13 insaturations.

L'identification des composés **A** et **B** n'a pas été détaillée dans les paragraphes précédents car elle est déjà décrite dans la littérature.

En revanche, aucune donnée RMN ne semble disponible pour le composé **C**. Par conséquent, le raisonnement conduisant à la détermination de sa structure sur la base des expériences de RMN est présenté de façon détaillée dans ce paragraphe.

En raison de la faible quantité de composé **C** disponible (1.1 mg), les analyses ont été effectuées dans un tube de 3 mm à l'aide du spectromètre Bruker 500 équipé d'une cryosonde, dans le cadre d'une collaboration entre le GESVAB et le laboratoire RMN ILP (UMR 6026, Université de Rennes I).

## 1) Détermination des principaux groupes fonctionnels

Les rapports signal/bruit observables pour les différentes expériences sont bons et rendent donc leur interprétation possible.

Dans un premier temps, l'étude des spectres 1D et 2D permet d'observer plusieurs signaux particuliers.

Un singulet intégrant pour 2 protons à  $\delta$  7.1 ppm et portés par deux  $^{13}\text{C}$  de  $\delta$  108.2 ppm est caractéristique de deux C-H équivalents et inclus dans un cycle aromatique. Il s'agit du seul signal observable dans la zone des protons aromatiques. Le spectre HMBC montre que ce signal  $^1\text{H}$  corrèle notamment avec des carbones situés dans la zone des aromatiques à 120.2, 138.7 et 145.2. Les déplacements chimiques de ces deux derniers signaux suggèrent l'hydroxylation des carbones (phénols).

En outre, le proton à  $\delta$  7.1 ppm corrèle en HMBC avec un  $^{13}\text{C}$  à 166.8 ppm, associé généralement à la présence d'un groupement carboxyle estérifié.

Ces différents signaux sont ainsi caractéristiques d'un groupe galloyle. L'attribution des signaux associés aux différents carbones sera présentée ultérieurement.

Ce résultat est cohérent avec les observations de fragmentation en spectrométrie de masse décrites au paragraphe précédent.

Un proton, sous forme de doublet à  $\delta$  5.38 ppm, est porté par un carbone à 94.5 ppm. Ce signal est caractéristique du proton anomérique. L'HSQC-TOCSY montre que les carbones à  $\delta$  61.1,  $\delta$  69.7,  $\delta$  72.6,  $\delta$  76.9 et  $\delta$  77.2 ppm portent 6 protons situés dans le même système de spin que cet anomère, respectivement à  $\delta$  3.69 et  $\delta$  3.82 (gémés),  $\delta$  3.36,  $\delta$  3.31,  $\delta$  3.44 et  $\delta$  3.35 ppm.

Ces signaux caractéristiques montrent ainsi que le composé **C** contient un groupement hexose. L'attribution des atomes de ce groupement sera détaillée ultérieurement.

6 singulets intégrant chacun pour 3 protons, sont visibles à  $\delta$  0.76,  $\delta$  0.86,  $\delta$  0.95,  $\delta$  0.96,  $\delta$  1.08 et  $\delta$  1.19 ppm. L'expérience HSQC permet de montrer qu'ils sont respectivement portés par des carbones à  $\delta$  16.3,  $\delta$  12.3,  $\delta$  27.4,  $\delta$  23.5,  $\delta$  15.7 et  $\delta$  23.4 ppm.

Ces signaux sont caractéristiques de 6 groupements méthyle fixés sur des carbones quaternaires (« méthyles angulaires »).

Un carbone à  $\delta$  176.7 ppm est observable. Il s'agit vraisemblablement d'un groupe carboxyle. Nous ne pouvons affirmer, sur l'unique base de ce déplacement chimique, s'il s'agit d'un acide ou d'un ester. Cette question sera développée ultérieurement.

3 signaux  $^1\text{H}$  sont observés à  $\delta$  3.27,  $\delta$  3.45 et  $\delta$  3.76 ppm, intégrant chacun pour un proton. Ils sont respectivement portés par des carbones à  $\delta$  80.9,  $\delta$  76.4 et  $\delta$  67.9 ppm. Ces signaux caractéristiques montrent que la molécule **C** contient, outre le groupement hexose, 3 fonctions alcools secondaires. En outre, deux protons géminés à  $\delta$  4.07 et 4.23 ppm sont portés par un carbone à  $\delta$  65.2 ppm. Ces signaux montrent que ce  $\text{CH}_2$  est oxygéné.

Un proton est observable à  $\delta$  5.33 ppm, sous forme d'un triplet. Il est porté par un  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  123.1 ppm. Ce signal est caractéristique d'un proton oléfinique : une double liaison  $\text{C}=\text{C}$  est ainsi présente dans la molécule **C**. Hormis les signaux évoqués précédemment, seul le carbone  $\delta$  143.5 ppm présente un déplacement chimique compatible avec un état d'hybridation  $\text{sp}^2$ . Le spectre HMBC confirme qu'il est voisin du  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  123.1 ppm.

Ces différents groupements sont responsables de 8 insaturations de la molécule. Les déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  montrent que la molécule **C** ne contient pas d'autres liaisons multiples C-C. Par conséquent, les 5 insaturations restantes sont vraisemblablement dues à des cycles aliphatiques.

En outre, l'analyse de la molécule en FT/MS a mis en évidence la présence d'un fragment de formule  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_6$ , correspondant à la perte du galloyle et de l'hexose.

L'ensemble de ces observations indique que le squelette de la molécule **C** pourrait être de nature triterpénoïde pentacyclique (Mahato & Kundu, 1994).

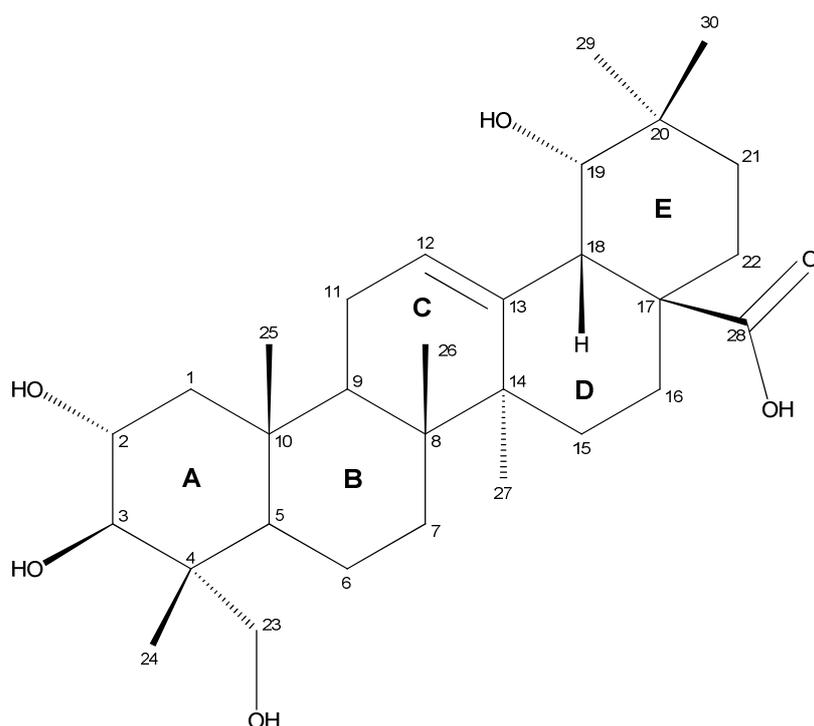
L'interprétation des corrélations 2D, exposée dans le paragraphe suivant, permettra d'étudier cette hypothèse, de montrer comment les groupements fonctionnels sont attachés à la molécule **C**, et ainsi d'en déterminer la structure complète.

## **2) Détermination de la structure complète et attribution des déplacements chimiques**

### *a) Détermination de la génine*

La génine, ou aglycone, est le squelette principal d'un triterpénoïde, sur lequel divers groupements (oses, acétate, gallate par exemple) peuvent être fixés. Elle comporte 30 atomes de carbone.

Une partie des déplacements chimiques de la molécule **C** sont semblables aux données relatives à l'arjungénine (Honda *et al.*, 1976; Nandy *et al.*, 1989; Jossang *et al.*, 1996). Cette molécule est un triterpénoïde de type polyhydroxyoleanane, de formule brute  $C_{30}H_{48}O_6$ , identifié dans diverses espèces tropicales de la famille *Combretaceae*. Sa structure comporte 5 cycles à 6 atomes de carbones (notés A, B...E), ainsi que six méthyles angulaires, une fonction acide carboxylique, 4 fonctions alcools secondaires et une oléfine (figure 40). La composition de l'arjungénine est cohérente avec la formule brute proposée pour le fragment  $m/z$  503 observé en FT/MS.



**Figure 40** - Structure de l'arjungénine.

Les résultats des expériences RMN 2D effectuées permettent de vérifier si la génine de la molécule **C** est bien l'arjungénine.

L'attribution des protons aux carbones qui les portent est effectuée grâce à l'expérience HSQC.

Le spectre HMBC montre une corrélation entre les 3 protons  $\delta$  0.95 ppm, portés par le  $^{13}C$  à  $\delta$  27.4 ppm, et le  $^{13}C$  à  $\delta$  23.5 ppm. De même, les 3 protons  $\delta$  0.96 ppm, portés par ce dernier carbone, corréleront avec le  $^{13}C$   $\delta$  27.4 ppm. Ces atomes appartiennent aux deux méthyles angulaires 29 et 30, H29 et H30 corréleront avec un carbone quaternaire à  $\delta$  34.4 ppm (C20). D'autres corrélations HMBC sont visibles entre les protons H29, H30 et le  $^{13}C$  à  $\delta$  80.9

ppm (hydroxylé) ; ce dernier est donc le C19. La carte COSY montre que le H19, sous forme d'un doublet à  $\delta$  3.27 ppm, est voisin du  $^1\text{H}$  à  $\delta$  3.05 ppm, qui est ainsi le H18. La HSQC-TOCSY confirme que ces protons sont dans le même système de spin.

Le proton H18 a une position stratégique. En effet, sur le spectre HMBC, nous observons des corrélations entre ce proton H18 et les  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  26.9, 41.2, 45.6, 80.9, 123.1, 143.5 et 176.7 ppm, qui sont attribués respectivement aux C16, C14, C17, C19, C12, C13 et C28. Ces corrélations permettent de confirmer la jonction des cycles C, D et E. Une double liaison C=C lie les carbones  $\text{sp}^2$  C12 et C13.

Le carbone carboxylique à  $\delta$  176.7 ppm corrèle avec H18, H16 et deux protons à  $\delta$  1.66 et 1.76 ppm, portés par le même carbone à 31.7 ppm ; il s'agit des H22 et C22. Ces résultats confirment la position du groupe carboxyle, sur le C17. En outre, une corrélation HMBC est visible entre C22 et les protons géminés à  $\delta$  1.01 et 1.76 ppm, portés par le  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  28 ppm. La carte COSY montre que ces protons sont voisins des H22, et la HSQC-TOCSY confirme que ces 4 protons sont dans le même système de spin ; les signaux  $^1\text{H}$  à  $\delta$  1.01 et 1.76 ppm correspondent donc aux H21.

La COSY montre que les H16 corrélient avec deux protons à  $\delta$  0.95 et 1.62 ppm. Il s'agit des H15 (la HSQC-TOCSY confirme que H15 et H16 sont dans le même système de spin). Les atomes des cycles D et E sont tous attribués.

Les 3 protons du méthyle angulaire H27 corrélient en HMBC avec les C13, C14 (quaternaire) et C15 ; et H15 avec C27. Cela confirme que ce méthyle 27 est situé sur le C14. En outre, une corrélation est visible entre H27 et un carbone quaternaire à  $\delta$  39.4 ppm, correspondant au C8. Ce carbone corrèle également avec le triplet  $^1\text{H}$  à 1.85 ppm, qui est donc H9. L'HSQC-TOCSY montre que H9 est dans le même système de spin que H12 et qu'un proton à 2.02 ppm, correspondant aux H11. Les corrélations HMBC H11-C12, H11-C13 et H11-C9 confirment cette attribution. Ces résultats établissent la jonction entre les cycles B et C.

Les 3 protons du singulet à  $\delta$  0.76 ppm présentent des corrélations HMBC avec les carbones C8 (quaternaire), C9 et C14, ce qui détermine la position du méthyle angulaire 26 sur le C8. Par ailleurs, les protons H26 corrélient avec le  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  31.9 ppm, qui portent deux protons géminés à  $\delta$  1.26 et 1.42 ppm. Il s'agit des H7, dont la HSQC-TOCSY révèle qu'ils sont dans le même système de spin que les  $^1\text{H}$  à  $\delta$  1.39, 1.48 ppm (H6) et 1.38 ppm (H5). Ces attributions sont soutenues par les corrélations HMBC C5-H6, C5-H7, C7-H5, C7-H6.

Les protons H9, H5, H11 et H6 corrélient avec un même carbone quaternaire à  $\delta$  37.7 ppm. Ces corrélations permettent ainsi d'attribuer le déplacement 37.7 ppm au carbone 10 et de confirmer la jonction entre les cycles A et B.

Les 3 protons du méthyle angulaire H25 corrélient en HMBC avec les C9, C10 (quaternaire) et C5. Le C25 corréle également avec H5 et H9. Cela confirme que ce méthyle 25 est situé sur le C10. En outre, on observe une corrélation HMBC de H25 avec un  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  46.4 ppm et de C25 avec deux protons géminés à  $\delta$  0.99 et 1.98 ppm, portés par ce  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  46.4 ppm. Ces signaux permettent d'assigner le C1 et les 2 H1.

La COSY montre nettement une corrélation entre les H1 et un proton à 3.76 ppm, porté par un carbone oxygéné comme l'indique la valeur de son déplacement chimique ; il s'agit du H2. Ce dernier corréle également en COSY avec le proton à  $\delta$  3.45 ppm, qui est le H3 (également porté par un carbone oxygéné). La HSQC-TOCSY, ainsi que diverses corrélations HMBC, confirment ces attributions.

H3 et H5 corrélient en HMBC avec un carbone quaternaire à  $\delta$  42.4 ppm ; il s'agit du C4.

Des corrélations HMBC sont visibles entre le singulet  $^1\text{H}$  à  $\delta$  0.86 ppm et les carbones C3, C4 (quaternaire) et C5. Ces 3 protons sont portés par le  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  12.3 ppm, qui corréle avec H3 et H5. Ces résultats confirment la position du méthyle angulaire 24 ( $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  12.3 ppm) sur le carbone 4.

Par ailleurs, des corrélations similaires sont observables avec le carbone à 65.2 ppm et les protons à 4.07 et 4.23 ppm ; ces atomes sont les C23 et H23.

L'étude des corrélations HSQC permet dans un premier temps d'associer les protons aux carbones qui les portent. L'analyse des cartes HMBC, COSY et HSQC-TOCSY conduit ensuite à la détermination de la structure moléculaire de proche en proche, ainsi qu'à l'attribution des déplacements chimiques caractéristiques des différents atomes (tableau 29).

**Tableau 29** - Assignement des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  enregistrés pour la génine de la molécule **C**.

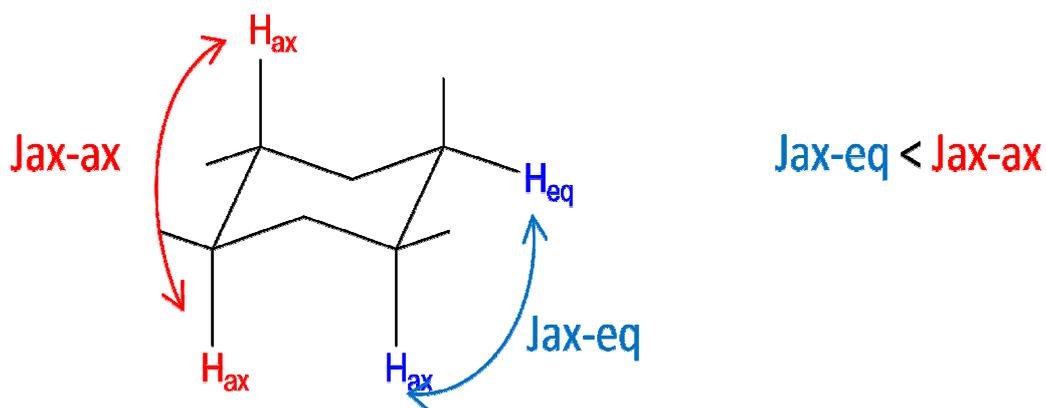
Position	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ ( $J = \text{Hz}$ )	Position	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ ( $J = \text{Hz}$ )
1	46.4	0.99 <i>m</i> 1.98 <i>dd</i> (12.3; 4.3)	16	26.9	1.7 <i>m</i> 2.3 <i>td</i> (13.7; 4.3)
2	67.9	3.76 <i>td</i> (9.9; 4.3)	17	45.6	
3	76.4	3.45 <i>d</i> (9.9)	18	43.7	3.05 <i>d</i> (4.0)
4	42.4		19	80.9	3.27 <i>d</i> (4.0)
5	47.8	1.38 <i>m</i>	20	34.4	
6	17.8	1.48 <i>m</i> 1.39 <i>m</i>	21	28	1.01 <i>m</i> 1.76 <i>m</i>
7	31.9	1.26 <i>m</i> 1.42 <i>m</i>	22	31.7	1.66 <i>m</i> 1.76 <i>m</i>
8	39.4		23	65.2	4.07 <i>d</i> (11.3) 4.23 <i>d</i> (11.3)
9	48	1.85 <i>t</i> (9.3)	24	12.3	0.86 <i>s</i>
10	37.7		25	15.7	1.08 <i>s</i>
11	23.6	2.02 <i>m</i>	26	16.3	0.76 <i>s</i>
12	123.1	5.33 <i>t</i> (3.3)	27	23.4	1.19 <i>s</i>
13	143.5		28	176.7	
14	41.2		29	27.4	0.95 <i>s</i>
15	27.8	0.95 <i>m</i> 1.62 <i>m</i>	30	23.5	0.96 <i>s</i>

Par conséquent, l'interprétation des spectres RMN a permis de confirmer la similarité du squelette général entre la génine de la molécule **C** et l'arjungénine.

Il nous reste toutefois à étudier la stéréochimie relative des centres stéréogènes. En effet, si la RMN ne permet pas de caractériser la configuration absolue d'une molécule, il est en revanche possible de déterminer la configuration relative des cycles, grâce aux constantes de couplage des signaux  $^1\text{H}$  et à l'expérience ROESY.

En effet, la multiplicité d'un signal de RMN  $^1\text{H}$  fournit des informations sur l'environnement chimique du proton, et notamment sur le nombre et la position des protons voisins.

Dans le cadre d'un cycle aliphatique, la valeur de la constante de couplage dépend de la nature de ce couplage. Lorsque les deux protons sont dans une conformation transdiaxiale (figure 41), le couplage scalaire est intense, et la constante de couplage  $J_{\text{ax-ax}}$  élevée (8-10 Hz environ). Le couplage scalaire est plus faible lorsque les protons sont en position axiale et équatoriale ; la constante  $J_{\text{ax-éq}}$  est plus faible (3-4 Hz).



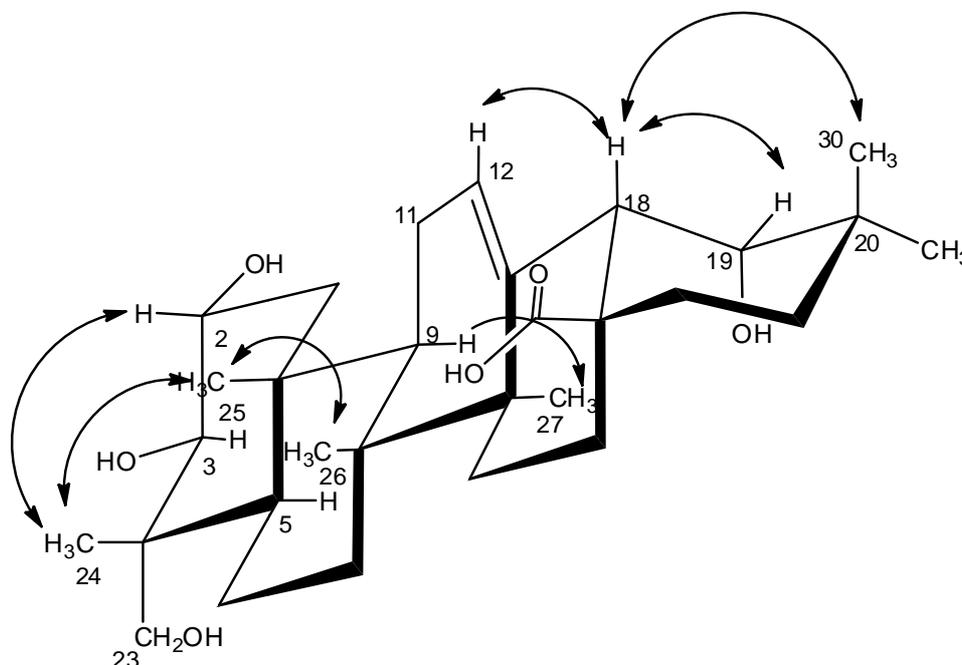
**Figure 41** - Nature et intensité relative des couplages H-H dans un cyclohexane.

La constante de couplage entre H2 et H3 est 9.9 Hz, ce qui caractérise une interaction transdiaxiale.

En revanche, cette constante est de 4 Hz entre H18 et H19 ; ces deux protons sont donc en configuration axiale – équatoriale.

L'expérience ROESY met en évidence les interactions dipolaires. Elle permet de connaître les protons qui sont proches dans l'espace, et donc de préciser la configuration relative de la molécule.

La figure 42 présente quelques corrélations ROESY utilisées dans ce but.



**Figure 42** - Corrélations ROESY permettant de déterminer la stéréochimie relative de la génine de la molécule C.

Les protons H2, H24 et H25 corréleront deux à deux. H25 corréle également avec H26. L'ensemble de ces protons sont donc dans le même demi-espace (en *cis*).

La corrélation entre les protons H9 et H27 montrent qu'ils sont en position *cis*. En revanche, ils ne corréleront pas avec H26 ou H25, ce qui confirme une configuration *trans*.

La configuration *cis* des H18 et 19 est corroborée par une corrélation ROESY. L'attribution des H29 et H30 est effectuée grâce à la corrélation H19-H30.

Le déplacement chimique du H18 (3.05 ppm) est caractéristique d'une configuration  $\beta$  du C28 : H18 et C28 sont en *cis* (Doddrell *et al.*, 1974).

Ces résultats permettent d'établir la stéréochimie relative de la génine de la molécule **C**, qui est identique à celle de l'arjungénine, présentée figure 40.

Ainsi, nous avons détaillé le raisonnement permettant de déterminer une structure semi-développée à partir de l'analyse des spectres RMN. Les résultats de cette étude permettent de confirmer que l'arjungénine est bien l'aglycone de la molécule **C**. La grande similarité des déplacements chimiques obtenus avec ceux rapportés dans la littérature, ainsi que les données de spectrométrie de masse, nous avaient conduits à formuler préalablement cette hypothèse.

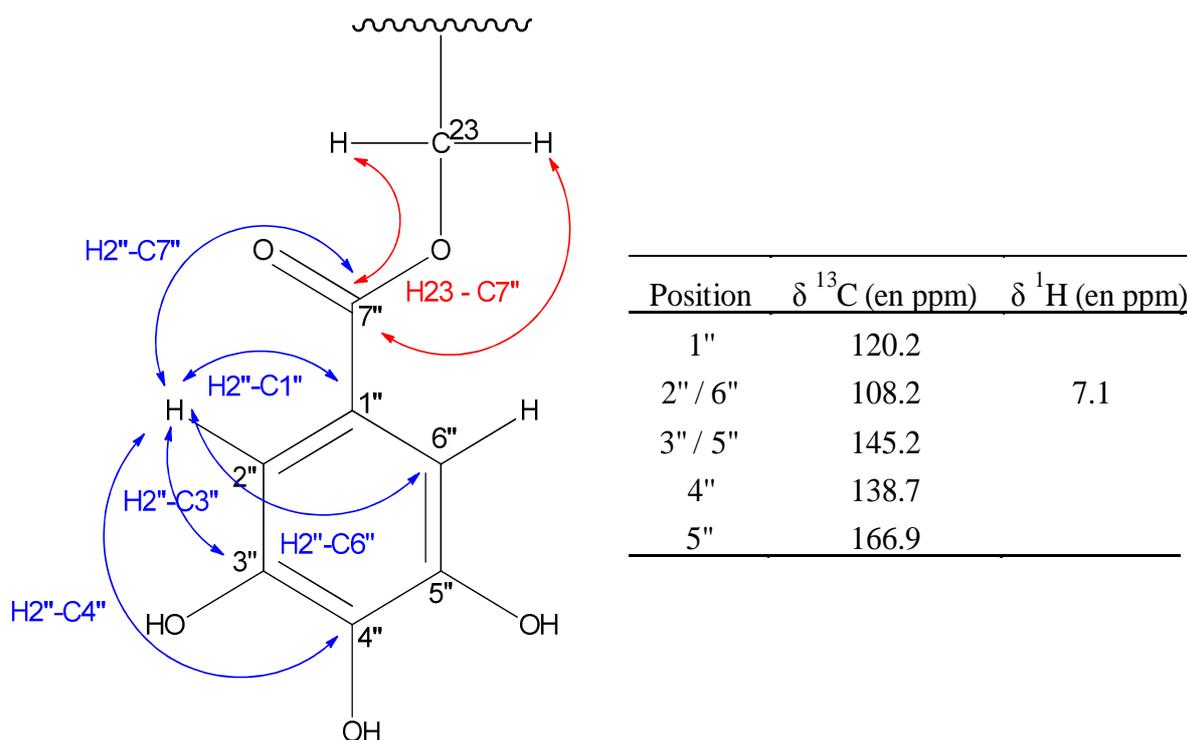
Nous savons par ailleurs qu'un groupe hexose et un gallate sont fixés sur cette génine. Les corrélations HMBC permettent de déterminer les atomes assurant les liaisons des substituants avec l'aglycone.

#### *b) Positions des groupements gallate et hexose*

Nous avons vu que les spectres <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de la molécule **C** présentent des signaux caractéristiques d'un groupement galloyle.

Le cycle aromatique de ce groupement possède un axe de symétrie d'ordre 2 ; en raison de la libre rotation autour de la liaison C7'' – C1'', les protons H2'' / H6'' sont équivalents, ainsi que les carbones C2'' / C6'' et C3'' / C5''.

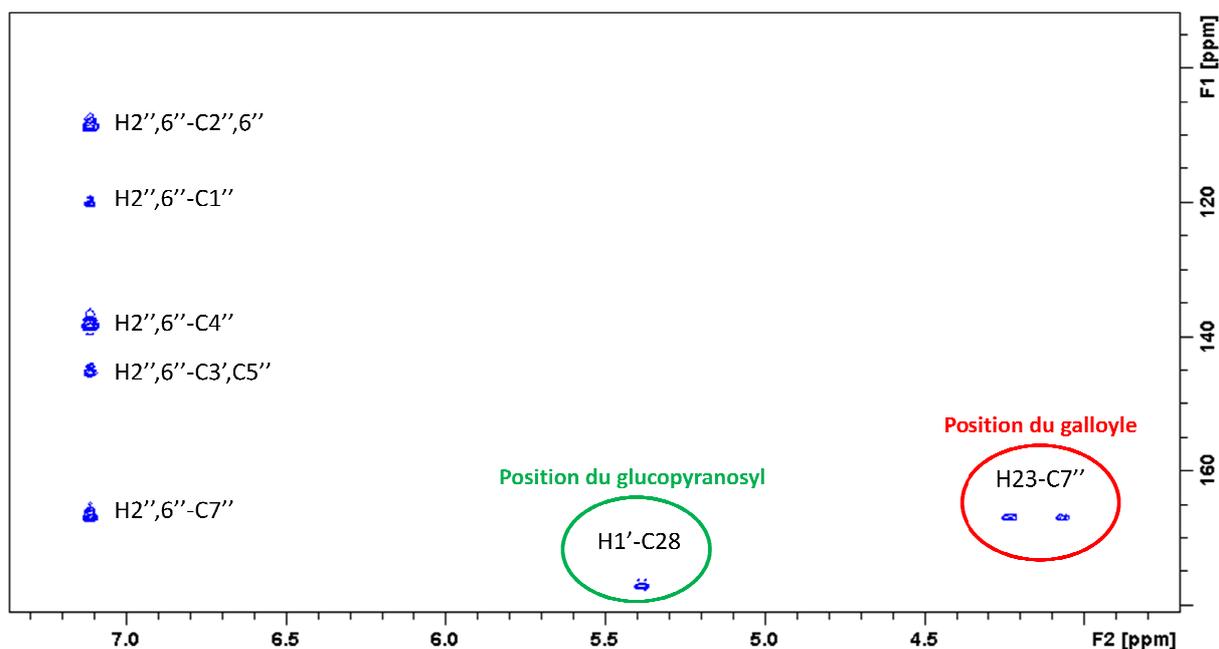
Les corrélations HMBC entre les atomes du groupement galloyle sont visibles sur la figure 43. L'assignation des déplacements chimiques des carbones a été effectuée sur la base de données de la littérature (Nishimura *et al.*, 1986; Ahmad *et al.*, 2005; Ponou *et al.*, 2008).



**Figure 43** - Corrélations HMBC (à gauche) et assignation des signaux du galloyle (à droite)  
 En bleu, couplages  $^2\text{J}$  et  $^3\text{J}$  entre les atomes du groupe. En rouge, couplage  $^3\text{J}$  justifiant la fixation du groupe galloyle sur le C23 de la génine.  
 (Par souci de clarté, les corrélations entre H6'' et les carbones du galloyle n'ont pas été représentées).

Une expérience HMBC permet de visualiser les couplages  $^3\text{J}$  hétéronucléaires  $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ , y compris lorsqu'un hétéroatome (O ou N par exemple) est situé entre le proton et le carbone. Cette expérience peut donc être utilisée pour déterminer la position du groupe galloyle sur la génine.

Le spectre HMBC de la molécule **C**, présenté figure 44, montre nettement une tache de corrélation entre les protons H23 (2 doublets à  $\delta$  4.07 et 4.23 ppm) et le carbone C7'' du galloyle. Ce résultat permet de démontrer de façon claire que la fonction alcool primaire du C23 est estérifiée par le galloyle, ce qui est confirmé par le déblindage des H23 de la molécule **C** par rapport à l'arjungénine.



**Figure 44** - Détail du spectre HMBC. Les corrélations présentées permettent de déterminer la position du galloyle (en rouge) et du glucopyranosyle (en vert) sur la génine.

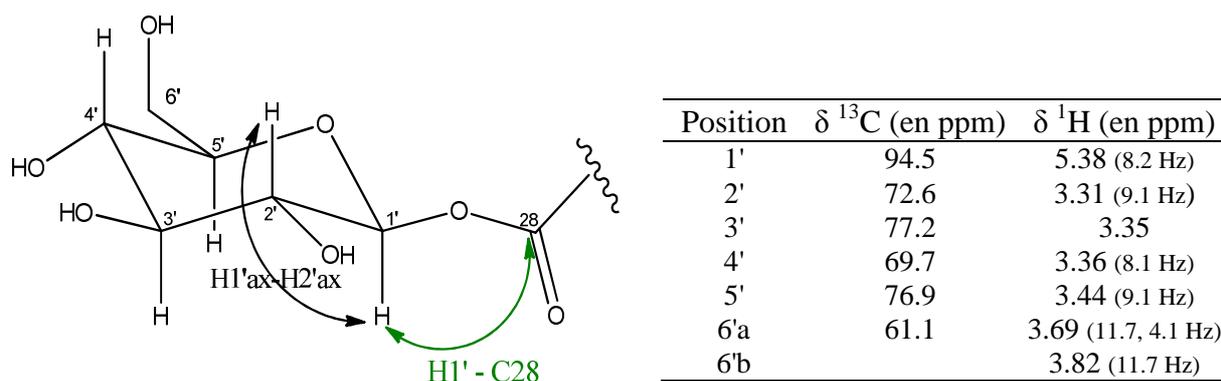
Le proton anomère de l'hexose est facilement repérable : il est présent sous forme d'un doublet à  $\delta$  5.38 ppm. Les signaux correspondant aux autres protons de ce groupement peuvent être repérés grâce à la HSQC-TOCSY, car ils sont tous dans le même système de spin ; cette expérience constitue par conséquent un outil très important pour la détermination de la structure chimique.

La COSY permet ensuite d'assigner chaque proton, de proche en proche : le proton anomérique (H1') corrèle en COSY avec le  $^1\text{H}$  à 3.31 ppm, qui est donc le H2'. Les corrélations HMBC sont également utilisées, et l'interprétation de ces différents spectres conduit à l'assignement de l'ensemble des atomes (tableau 29).

Les constantes de couplage associées aux protons H2', H4', et H5' sont élevées et caractérisent ainsi une configuration transdiaxiale. La multiplicité du signal H3' ne peut être déterminée en raison de la proximité avec le signal du méthanol, mais le spectre ROESY ne montre aucune corrélation de ce proton avec H2' ou H4'. H3' est également en position axiale. Nous pouvons donc affirmer que le groupement hexose est un glucopyranosyle.

Par ailleurs, l'anomère H1' possède une constante de couplage élevée (8.2 Hz), ce qui caractérise une configuration  $\beta$  (figure 45). En revanche, la configuration absolue (D ou L) du glucose ne peut être déterminée sur la base des analyses RMN.

Le spectre HMBC (figure 44) montre nettement une tache de corrélation entre le proton anomérique H1' (5.38 ppm) et le carbone du groupe carboxylique C28 (176.7 ppm). Cette observation permet d'établir la fixation du groupe  $\beta$ -glucopyranosyle sur le carboxyle C28 de la génine. Cette estérification du carboxyle est confirmée par le blindage de 5.2 ppm du signal correspondant au C28 de la molécule **C** par rapport à l'arjungénine (Jossang *et al.*, 1996).



**Figure 45** - Couplages homo et hétéronucléaires (à gauche) et assignation des signaux du  $\beta$ -glucopyranosyle (à droite). En noir, couplage  $^3J$  caractéristique de la configuration  $\beta$ . En vert, couplage  $^3J$  justifiant la fixation du groupe sur le C28 de la génine..

### C) Données complémentaires

Pour une concentration de 1 g/L en **C**, on calcule  $\log(\epsilon) = 2.75$  pour un  $\lambda^{\text{max}}$  de 277 nm.

Le pouvoir rotatoire mesuré est  $-0.018^\circ$  pour une concentration en **C** de 0.083 g/100mL. On calcule alors le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]^D = -21.7^\circ$ .

### D) Discussion

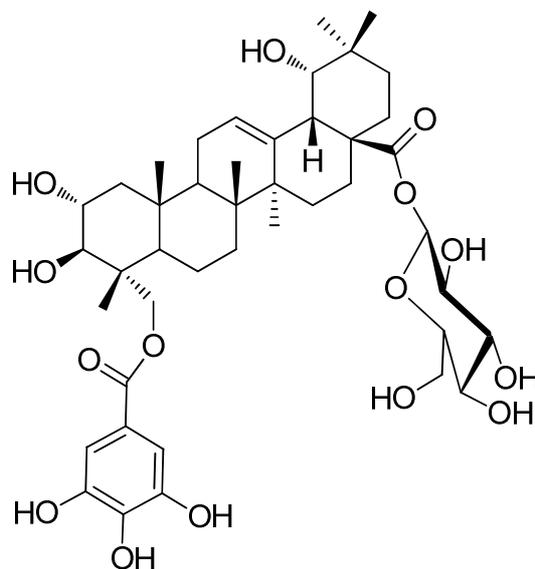
Les expériences RMN ont permis de préciser les résultats obtenus en FT/MS et de fournir des informations structurales déterminantes. L'aglycone de la molécule **C** est ainsi l'arjungénine, sur laquelle sont fixés un groupement galloyle en 23 et un glucopyranosyle en 28. Sa formule brute est  $\text{C}_{43}\text{H}_{62}\text{O}_{15}$  et sa structure moléculaire est présentée à la figure 46.

La molécule **C** est par conséquent le  $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxy-23-galloyleolean-12-ène-28-oate de  $\beta$ -glucopyranosyle.

A notre connaissance, cette molécule n'avait jamais été ni identifiée dans la nature, ni décrite dans la littérature. Nous la nommerons ainsi **quercotriterpénoside I (QTT I)**, en référence au nom de l'espèce dans laquelle nous l'avons identifiée pour la première fois. Nous n'avons pas

étudié sa présence dans d'autres genres ; le nom de la molécule ne traduit donc en aucun cas une éventuelle spécificité au genre *Quercus*.

Le fragment de rapport  $m/z$  593.34782 Th, enregistré à la figure 39, correspond donc à la perte du glucose (-162.05282 Th), ainsi qu'à une décarboxylation (-44.98983 Th) et une déshydratation (-18.01056 Th)



**Figure 46** - Structure chimique du **quercotriterpénoside I** (molécule C).

Les triterpénoïdes sont des composés largement répandus dans le monde vivant (Mahato & Sen, 1997; Connolly & Hill, 2010) et ayant fait l'objet de nombreuses études structurales (Lehn & Vysrčil, 1963; Radics *et al.*, 1975; Agrawal & Jain, 1992). Certains d'entre eux possèdent des propriétés biologiques remarquables, notamment anti-inflammatoires (Price *et al.*, 1987; Mahato *et al.*, 1988; Kapil & Sharma, 1995), anti-tumorales (Tokuda *et al.*, 1986; Oguro *et al.*, 1998) ou bien encore hépato-protectrices (Liu, 1995; Van Rossum *et al.*, 1999).

Si relativement peu de travaux concernent leur étude dans le bois de chêne, divers dérivés de l'acide oléanolique ont toutefois été identifiés dans plusieurs espèces du genre *Quercus*, sous forme d'aglycone ou de glucosides (Suga & Kondo, 1974; Hui & Li, 1977; Romussi *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2006).

Arramon *et al.* (2002; 2003) ont mis en évidence la présence de deux triterpènes et de leur glucoside dans le bois de *Quercus robur* et *Quercus petraea*, ainsi que dans les eaux-de-vie et des vins élevés sous bois. La génine de ces composés n'est pas l'arjungénine mais l'acide bartogénique (Rao *et al.*, 1981).

Parmi les quatre molécules détectées par ces auteurs, seul l'acide bartogénique avait été caractérisé gustativement, cette génine étant amère et astringente. Les concentrations mesurées dans les eaux-de-vie sont supérieures à son seuil de perception, ce qui démontre son impact sensoriel. Les autres molécules, notamment les composés glycosylés, n'ont pas été dégustés et aucune donnée n'est disponible à ce sujet dans la littérature.

A notre connaissance, le **quercotriterpénoside I** est le premier triterpénoïde galloylé et glucosylé identifié dans le bois de chêne. Le goût de tels composés n'a en outre jamais été décrit dans la littérature.

## V) Identification du composé D

Le composé **D** est le moins abondant de la fraction **CZNCA-X**, puisque seulement 0.3 mg ont été récupérés à l'issue de la CLHP préparative effectuée au cours du développement de la méthode de fractionnement. Toutefois, la répétition du protocole de fractionnement a permis d'en obtenir 1.2 mg.

### A) Résultats obtenus en FT/MS

#### 1) Détermination de la formule brute

Les résultats de FT/MS présentés ici ont été enregistrés à partir de l'injection de 10  $\mu$ L d'une solution acétonitrile/eau (15 % v/v) de concentration environ 10 mg/L en composé **D**.

Le chromatogramme des ions totaux obtenu pour le composé **D** présente un seul pic (au temps de rétention de 3.0 min environ), ce qui confirme la pureté de la molécule.

Un signal est observé dans les deux polarités d'ionisation.

Il est toutefois plus intense en mode négatif et présente un ion majoritaire, comme le montre le spectre de masse présenté à la figure 47. Ce mode d'ionisation sera utilisé pour la détermination de la formule brute.

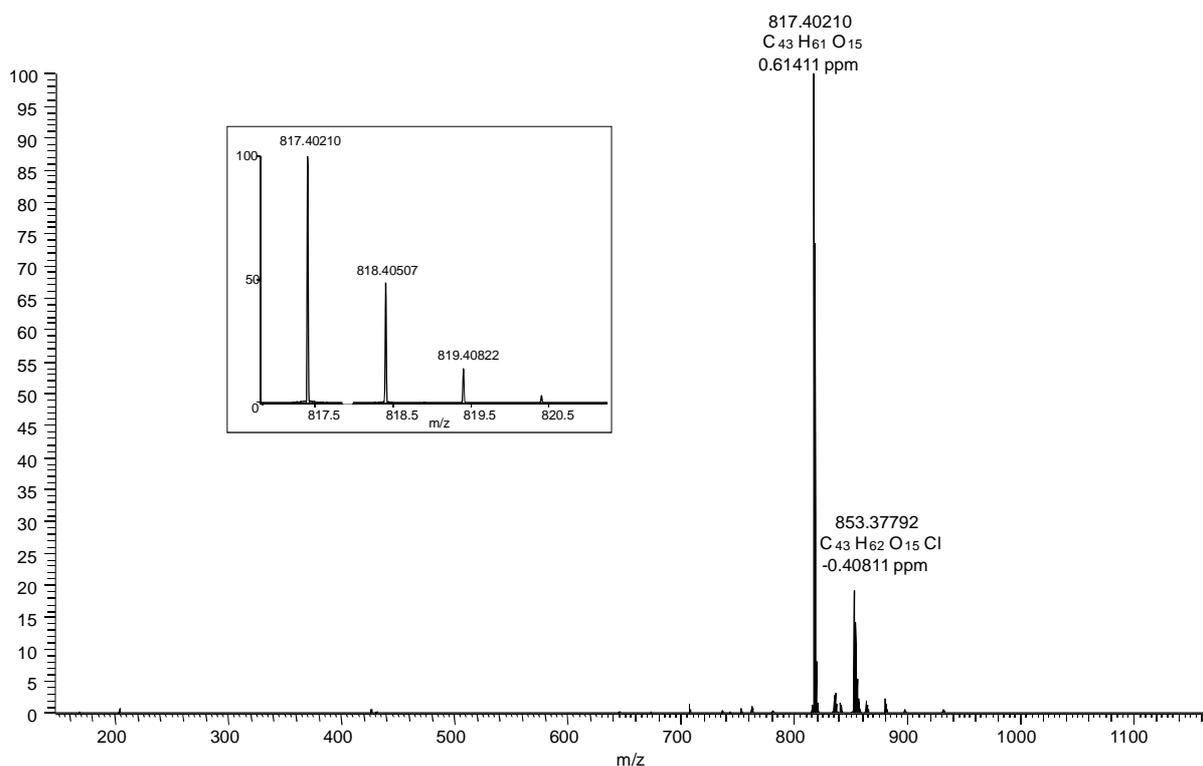
Comme pour le **quercotriterpénoside I**, le signal majoritaire en mode négatif est situé à  $m/z$  817 Th, aux côtés de deux adduits de rapport  $m/z$  853 et 931 Th.

Ces ions sont similaires à ceux observés pour la molécule **C** : l'ion de rapport  $m/z$  817 Th est la molécule déprotonée  $[M-H]^-$  (l'encadré de la figure 47 confirme qu'il s'agit d'une espèce monochargée), tandis que les ions à  $m/z$  853 et 931 correspondent respectivement aux adduits chlorure et trifluoroacétate. En mode positif, l'ion quasi-moléculaire et son adduit sodium

sont détectés aux rapports  $m/z$  819 et 841. La molécule **D** a donc pour masse unitaire 818 g/mol.

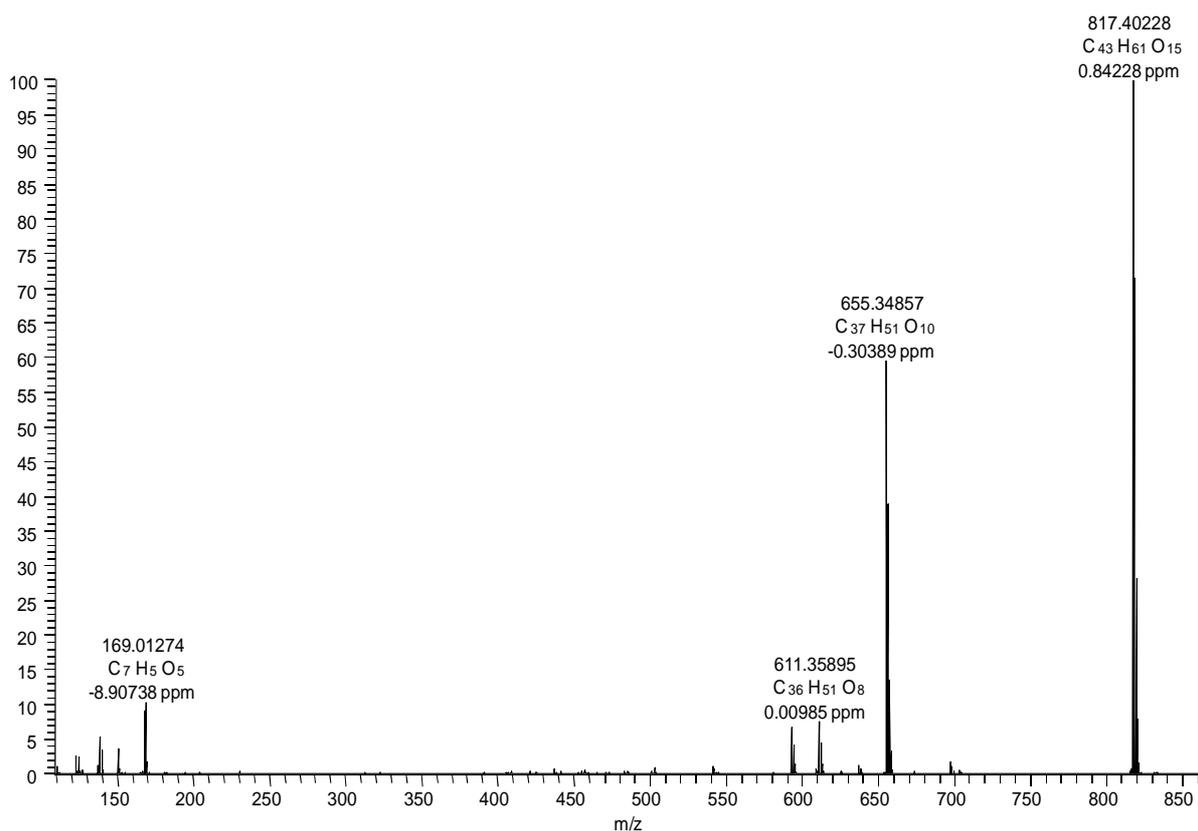
L'étude de la masse mesurée confirme la formule brute  $C_{43}H_{61}O_{15}$  (soit une masse monoisotopique de 818.40887 g/mol, l'ion quasi moléculaire étant mesuré avec un écart de 0.61 ppm à la valeur théorique et un rapport isotopique cohérent).

La molécule **D** est donc un isomère du **quercotriterpénoside I**.



## 2) Etude de la fragmentation

L'application d'une énergie HCD de 80 eV permet d'enregistrer, en mode négatif, des fragments similaires à ceux observés pour le **QTT I**, notamment les ions de rapport  $m/z$  169, 503 (très peu intense) et 655 Th (figure 48). Vraisemblablement, ces espèces correspondent respectivement à un gallate, à l'espèce générée par la perte d'un galloyle et d'un hexose, et à l'espèce obtenue après perte d'un hexose. Comme pour le **quercotriterpénoside I**, on observe également deux ions de rapport  $m/z$  611 Th ( $[M-Glu-CO_2]^-$ ) et  $m/z$  593 Th ( $[M-Glu-CO_2-H_2O]^-$ ). Le processus de fragmentation est donc largement similaire.



**Figure 48** - Détail du spectre de fragmentation en mode négatif du composé **D** par application d'une énergie HCD de 80 eV.

Ces résultats montrent que la molécule **D** contient également un groupement gallate et un hexose.

## B) Résultats obtenus en RMN

Environ 1.2 mg du composé **D** ont été dissous dans du méthanol deutéré, placés dans un tube de 3 mm et analysés à l'aide du spectromètre Bruker 600.

L'allure générale du spectre <sup>1</sup>H de la molécule **D** est proche de celle du **QTT I**. L'étude structurale de la molécule **C** a été présentée en détail dans le paragraphe IV de ce chapitre. L'attribution des divers signaux de la molécule **D** et l'identification de sa formule semi-développée ont été effectuées en suivant le même raisonnement. Par conséquent, ce dernier ne sera pas développé pour la molécule **D**, et nous présenterons uniquement les points-clés de la résolution de la structure de cette dernière.

Les différents signaux caractéristiques d'une génine de type polyhydroxyléanane sont observables :

- 6 méthyles angulaires à  $\delta$  0.79 (H26), 0.96 (H30), 0.97 (H29), 1.06 (H23), 1.15 (H25) et 1.33 ppm (H27), portés respectivement par des carbones à  $\delta$  16.5, 23.8, 27.2, 21.8, 15.7 et 23.8 ppm
- Une double liaison C=C entre les carbones hybridés  $sp^2$  à  $\delta$  123 (C12) et 143.2 ppm (C13)
- Une fonction carboxyle (C28) à  $\delta$  177.5 ppm
- 4 signaux correspondant à des protons portés par des carbones hydroxylés à  $\delta$  3.94 (H2), 4.7 (H3), 3.30 (H19) et 3.85/3.90 ppm (H24, géminés).
- Un proton (H18) à  $\delta$  3.08 ppm, caractéristique de la configuration *cis* de la jonction entre les cycles D et E.

Ces éléments, confirmés par l'étude des corrélations HMBC, démontrent que la molécule **D** a la même génine que le **QTT I** : l'arjungénine.

Par ailleurs, on observe des signaux  $^1H$  à  $\delta$  7.13 ppm (H2''/ H6''), ainsi que  $^{13}C$  à  $\delta$  120.3 (C1''), 108.3 (C2''/C6''), 144.9 (C3''/C5''), 138.2 (C4'') et 167.1 ppm (C7''). Ces signaux sont quasi identiques à ceux observés pour le **QTT I** : ils sont caractéristiques du groupement galloyle.

Les signaux  $^1H$  enregistrés à  $\delta$  5.39 (H1'), 3.32 (H2'), 3.35 (H3'), 3.37 (H4'), 3.41 (H5') et 3.69 / 3.83 ppm (H6' géminés) sont caractéristiques d'un groupement hexose. La comparaison avec les données du **QTT I**, les constantes de couplage élevées et l'étude des corrélations ROESY montrent qu'il s'agit d'un  $\beta$ -glucopyranosyle.

Ainsi, la molécule **D** possède la même génine et les mêmes groupements fonctionnels que le **quercotriterpénoside I**. Ces molécules sont-elles des régioisomères ou des diastéréomères ?

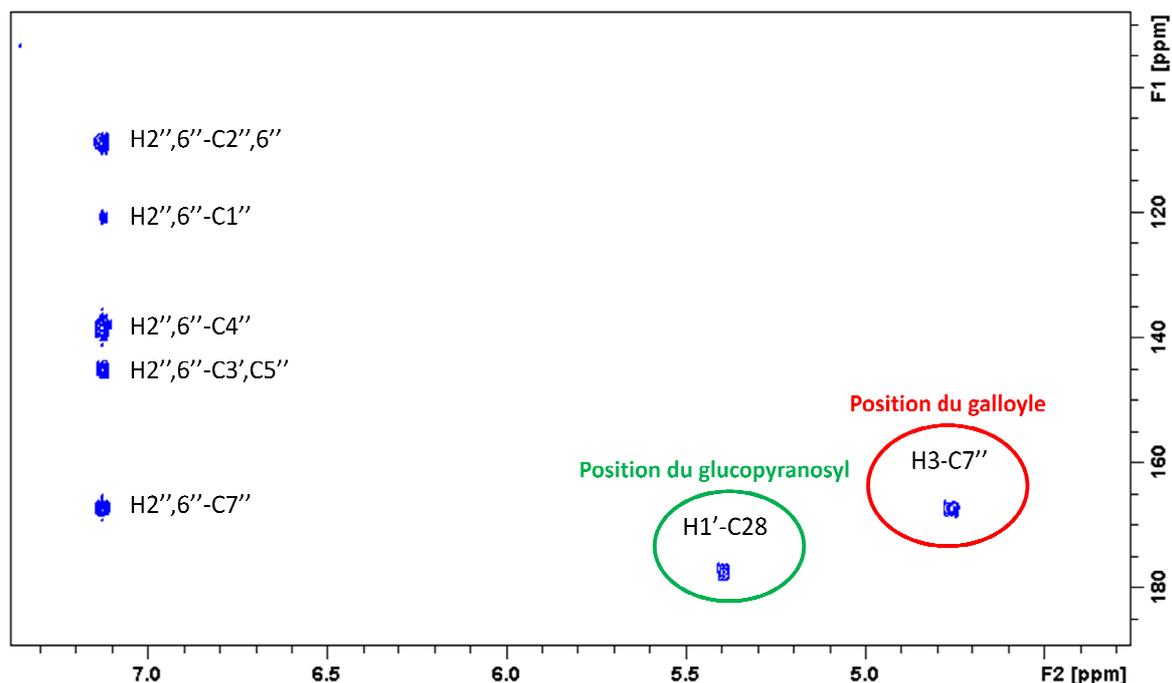
La comparaison des spectres  $^1H$  du **QTT I** et de la molécule **D** montre que les déplacements chimiques sont quasi identiques pour les signaux des cycles C, D et E. Il en est de même pour les signaux  $^{13}C$ .

En revanche, plusieurs déplacements chimiques des atomes des cycles A et B sont modifiés. Un fort déblindage est observé en particulier pour le H3 (de 3.45 à 4.7 ppm), et dans une moindre mesure pour le H2 (de 3.76 à 3.94 ppm).

En outre, on remarque que dans la molécule **D**, les protons du méthyle angulaire à  $\delta$  1.06 ppm corrélient en ROESY avec H3 : il s'agit des H23. La stéréochimie du carbone stéréogène C4 est donc modifiée par rapport au **QTT I**. Les protons de l'alcool primaire de la molécule **D** (H24) sont blindés d'environ 0.2–0.3 ppm par rapport à ceux du **QTT I**.

Ces éléments suggèrent une modification de la position du galloyle sur l'aglycone.

L'étude des corrélations HMBC permet alors de déterminer la position exacte des groupements glucopyranosyle et galloyle sur la génine (figure 49).



**Figure 49** - Détail du spectre HMBC. Les corrélations présentées permettent de déterminer la position du galloyle (en rouge) et du glucopyranosyle (en vert) sur la génine de la molécule **D**.

Une corrélation est nettement visible entre le proton anomère (H1') et le carbone carboxylique de la génine. Dans la molécule **D**, le  $\beta$ -glucopyranosyle est donc positionné sur le carbone 28 de l'aglycone, comme c'est le cas pour le **QTT I**. Cela est cohérent avec la similarité des déplacements chimiques enregistrés pour les cycles C, D et E de ces deux molécules.

Par ailleurs, le spectre HMBC montre clairement que le proton H3 de l'aglycone corrélie avec le carbone C7'', ce qui montre que l'hydroxyle porté par le carbone C3 est estérifié par le groupement galloyle. La position de ce groupement dans la molécule **D** est modifiée par rapport au **QTT I**, ce que confirment les modifications des déplacements chimiques des protons H2, H3, H23 et H24 décrites précédemment. Ces deux molécules sont donc des régioisomères.

Les données RMN complètes de la molécule **D** sont présentées en annexe.

En raison de la faible quantité purifiée, les données complémentaires en polarimétrie et spectrophotométrie UV n'ont pas été enregistrées

### C) Discussion

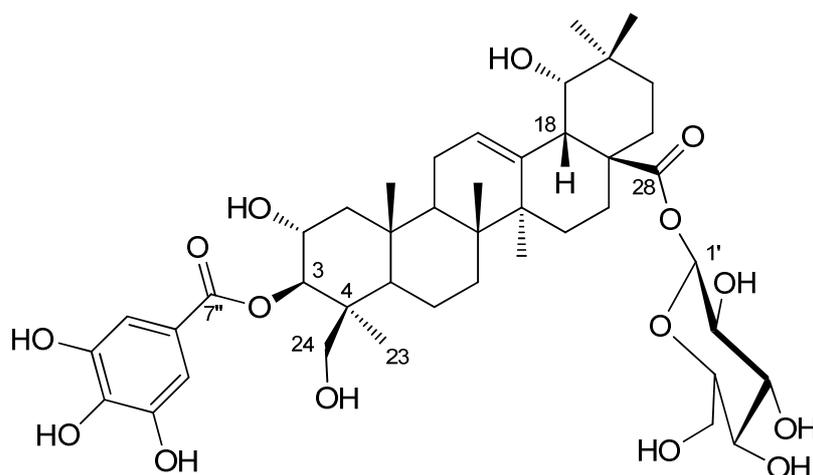
La structure du composé **D** peut être déterminée en suivant un raisonnement identique à celui décrit en détail pour le **QTT I**. Néanmoins, l'identification préalable de ce dernier et la similarité suggérée par la FT/MS permettent d'interpréter les données RMN du **D** par comparaison aux résultats enregistrés précédemment.

Le composé **D** est donc un isomère du **quercotriterpénoside I**. Ces deux molécules diffèrent par la position du groupement galloyle, ainsi que par la configuration relative du carbone 4 de la génine.

La molécule **D** est par conséquent le *2 $\alpha$ ,19 $\alpha$ ,24*-trihydroxy-3 $\beta$ -galloylolean-12-ène-28-oate de  $\beta$ -glucopyranosyle (figure 50).

Comme pour le **QTT I**, la molécule **D** est un nouveau composé ; sa structure chimique n'a jamais été décrite dans la littérature. Nous la nommerons ainsi **quercotriterpénoside II (QTT II)**.

Toutefois, les quantités de **QTT II** observées dans la fraction **CZNCA-X** sont nettement inférieures à celles du **QTT I**.



**Figure 50** - Structure chimique du **quercotriterpénoside II** (molécule **D**).

## Conclusion

Ce chapitre est consacré à la caractérisation moléculaire des quatre composés principaux de la fraction **CZNCA-X**.

L'utilisation conjointe de deux techniques analytiques puissantes, la spectrométrie de masse à transformée de Fourier et la résonance magnétique nucléaire, a permis d'identifier les structures des composés **A**, **B**, **C** et **D**.

Pour chacune de ces molécules, les écarts entre les masses exactes théoriques et mesurées sont très faibles (< 1 ppm). Cela confirme les performances de l'Exactive en termes de précision de mesure de masse et valide son utilisation pour la détermination de formules brutes.

Parmi les quatre composés, deux sont déjà décrits dans la littérature.

Le **lyonirésinol (A)** est un lignane, dont la présence a été rapportée dans le bois de *Quercus petraea* et *Quercus robur*, mais également dans les eaux-de-vie et les vins. Il participerait à l'amertume des eaux-de-vie. En revanche, son impact organoleptique potentiel dans les vins n'a jamais été décrit.

Le **dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3S,4S)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque (B)** est un précurseur de la *cis*-β-methyl-γ-octalactone (whisky lactone) présent dans le bois de *Quercus petraea* et responsable de l'arôme de noix de coco conféré par l'élevage en barrique. Aucune donnée n'a été à ce jour publiée à propos d'éventuelles propriétés gustatives de ce composé.

Les deux autres composés de la fraction **CZNCA-X** sont des nouvelles molécules ; leur présence n'a jamais été décrite, ni dans le bois de chêne, ni dans aucune autre espèce naturelle.

Il s'agit de deux triterpénoïdes galloylés et glycosylés, dérivés de l'acide oléanolique. Nous les avons nommés **quercotriterpénoside I** (composé **C**) et **quercotriterpénoside II** (composé **D**). Ces deux molécules sont des isomères, leurs formules semi-développées différant par la position du groupement galloyle sur la génine et la configuration relative d'un centre stéréogène.

Quelques triterpènes ont certes déjà été identifiés dans le bois de chêne, mais à notre connaissance, aucun composé galloylé appartenant à cette famille n'avait été isolé dans des espèces du genre *Quercus*.

Compte tenu de la structure de ces molécules, l'existence d'autres isomères des **QTT I** et **II** dans le bois de chêne est envisageable.

## Chapitre 7 - Intérêt de l'utilisation de la LC-FT/MS en vue de l'identification de nouveaux triterpénoïdes dans les extraits de bois de chêne

### Introduction

L'étude structurale des quatre principaux composés de la fraction sapide **CZNCA-X** a permis d'identifier deux nouvelles molécules : les **quercotriterpénosides I et II**.

Ces triterpènes galloylés et glycosylés sont des isomères, de formule brute  $C_{43}H_{62}O_{15}$ .

Leur génine possède quatre fonctions alcools, qui constituent autant de sites potentiels d'estérification pour le groupement galloyle. L'existence dans le bois de chêne de plusieurs isomères aux **QTT I et II** est dès lors envisageable.

En outre, il est fréquent d'observer, parmi les triterpénoïdes, des molécules contenant plusieurs sucres fixés sur la génine ; elles sont appelées saponines. L'existence dans le chêne de squelettes similaires à ceux des **QTT**, mais sur lesquels deux sucres (ou davantage) sont greffés, est également possible. Toutefois, aucun composé de ce type n'a été identifié dans le bois de *Quercus petraea*.

Or, les triterpénoïdes, et notamment ceux dérivant de l'oléanane, possèdent des propriétés intéressantes, tant sur le plan biologique (chapitre 6, paragraphe IV.D) que sur le plan gustatif (chapitre 1 paragraphe I.A).

Par conséquent, il nous a semblé intéressant d'étudier la présence éventuelle d'isomères et de dérivés glycosylés des **quercotriterpénosides I et II** pour pouvoir caractériser leur goût par la suite.

A cette fin, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à transformée de Fourier est une technique particulièrement pertinente.

Elle permet d'une part de rechercher, dans l'échantillon initial, la présence des composés étudiés, mais également de guider les étapes de purification, par ciblage d'un ou plusieurs ions caractéristiques.

Le repérage et la purification des triterpénoïdes constituent l'enjeu majeur de ce chapitre.

La caractérisation structurale, consécutive à la purification, repose sur les techniques décrites dans le chapitre 6.

## I) Etude de la présence en LC-FT/MS d'isomères et de dérivés des quercotriterpénosides I et II dans un extrait de bois de chêne

Le système Exactive peut être utilisé, comme décrit au chapitre 6, pour la détermination structurale de nouvelles molécules. Il constitue également un outil performant dans le cadre du ciblage (« screening ») de molécules de formule brute connue, dans un extrait complexe.

### A) Méthode utilisée

Les différentes fractions étudiées sont solubilisées dans une solution acétonitrile/eau à 10 % (v/v) en utilisant un bain à ultrasons, puis filtrées à 0.45 µm.

10 µL de chaque échantillon sont injectés dans le système LC-FT/MS.

Les conditions chromatographiques et de spectrométrie de masse utilisées sont identiques à celles décrites dans le chapitre 6, paragraphe I.A.1. Un calibrage interne est appliqué (ions 112.98450 et 391.28429).

Le traitement des résultats est effectué grâce à l'application Qual Browser du logiciel Xcalibur version 2.0. Il est ainsi possible d'afficher le chromatogramme des ions totaux (TIC), en mode positif ou négatif, ainsi que des chromatogrammes d'ions extraits, en choisissant un ou plusieurs rapports  $m/z$  caractéristiques.

Contrairement aux spectromètres de masse offrant une précision de mesure de masse nominale, la LC-FT/MS permet de rechercher des ions avec une fenêtre de  $m/z$  très étroite. Les chromatogrammes correspondants permettent ainsi de localiser très rapidement les ions de formule  $C_xH_yO_z$ .

Les rapports  $m/z$  suivants sont ainsi recherchés, avec une fenêtre de précision de 4 ppm, en mode négatif :

**Tableau 30** - Formule brute et rapports  $m/z$  des composés recherchés.

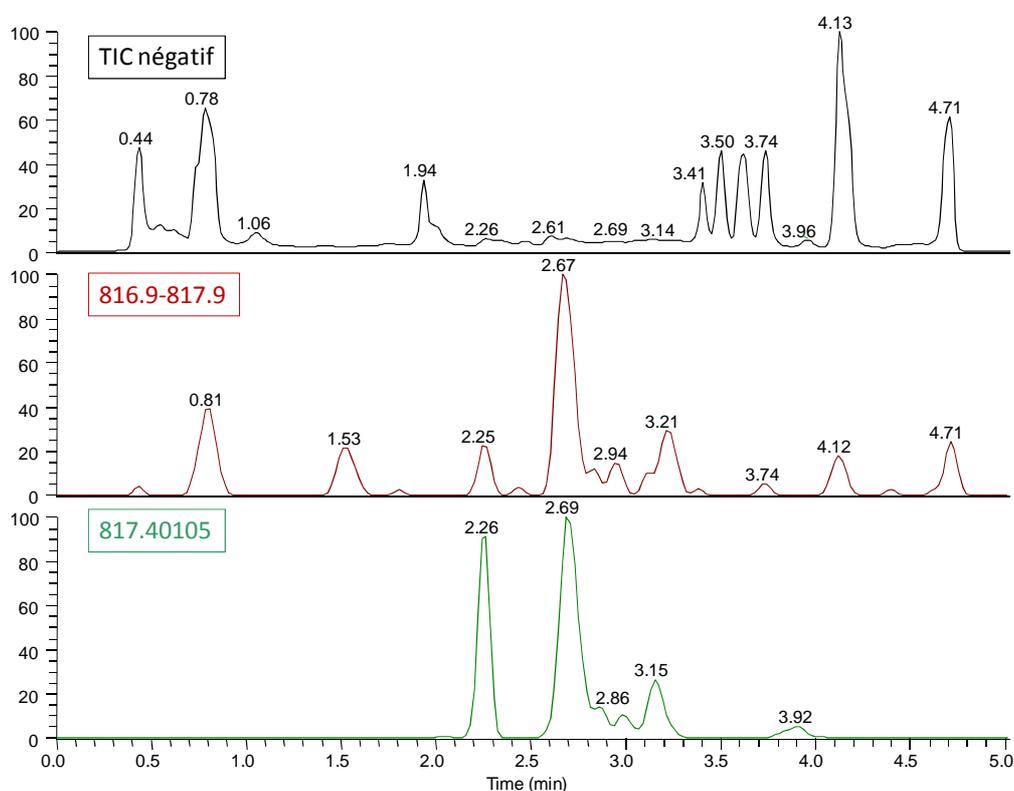
Nature de l'espèce	Formule brute	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>
Isomère des QTT	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>15</sub>	817.40105
Dérivé diglycosylé	C <sub>49</sub> H <sub>71</sub> O <sub>20</sub>	979.45387
Dérivé triglycosylé	C <sub>55</sub> H <sub>81</sub> O <sub>25</sub>	1141.50669

Dans un premier temps, ces molécules sont recherchées dans un extrait de bois non purifié **CZNCA** (à 100 mg/L), puis dans les différentes fractions de CPC décrites au chapitre 5, paragraphe III.C.1. (à 20 mg/L).

## B) Résultats

### 1) Recherche d'isomères des quercotriterpénosides

La figure 51 montre trois chromatogrammes enregistrés pour l'extrait brut **CZNCA** : un chromatogramme des ions totaux (TIC) en mode négatif, un chromatogramme d'ions extraits de  $m/z$  compris entre 816.9 et 817.9 (816.9-817.9) et un chromatogramme d'ions extraits de  $m/z$  817.40105 avec une fenêtre de 4 ppm.



**Figure 51** - TIC négatif (en noir), chromatogramme d'ions extraits 816.9-817.9 (en rouge) et 817.40105 (en vert) d'une solution de **CZNCA**.

Le TIC présente de nombreux signaux en mode négatif et la comparaison avec les chromatogrammes d'ions extraits montre que les composés de formule brute  $C_{43}H_{61}O_{15}$  sont minoritaires dans le macérat de bois.

Le chromatogramme 816.9-817.9 simule le signal qui pourrait être enregistré avec un instrument à mesure de masse nominale. La multiplicité des pics illustre la complexité d'un tel extrait. En comparaison, le chromatogramme 817.40105, forcément plus spécifique,

permet de soustraire tous les composés générant des ions en dehors de la plage  $m/z$  817.39778-817.40432. La localisation des molécules produisant un ion de formule  $C_{43}H_{61}O_{15}$  s'en trouve ainsi extrêmement facilitée. Il est probable que le contraste entre les deux derniers types de chromatogrammes soit encore plus marqué pour des rapports  $m/z$  plus faibles.

Plusieurs pics apparaissent sur le chromatogramme 817.40105, certains pouvant correspondre à un ion quasi-moléculaire (l'espèce correspondante est alors un isomère des **QTT**), d'autres à un fragment (l'espèce est un dérivé). L'étude des spectres de masse permet de distinguer ces deux cas et montre qu'il existe au moins 6 molécules de formule brute  $C_{43}H_{62}O_{15}$  dans l'extrait **CZNCA**.

Ces molécules sont caractérisées par les temps de rétention 2.26 (**QTT I**), 2.69, 2.86, 3.0 (**QTT II**), 3.15 et 3.87 min.

Par conséquent, au moins quatre isomères des **QTT I et II** sont présents dans l'extrait étudié. Le composé majoritaire est associé au temps de rétention 2.69 min.

Les différentes fractions de CPC obtenues au chapitre 5, paragraphe III.C.1, sont analysées en LC-FT/MS, afin de déterminer la fraction qui contient la quantité la plus importante de chacun des isomères. Les résultats sont présentés dans le tableau 31.

**Tableau 31** - Fractions de CPC où chaque isomère est le plus abondant.  
Rappel des goûts associés et décrits au chapitre 5, paragraphe III.C.2.

Temps de rétention de l'isomère en LC-FT/MS	Fraction CPC la plus riche	Goût de la fraction (rappel du gustatogramme)
2.26 ( <b>QTT I</b> )	<b>X</b>	Goût intense de façon générale, douceur importante (intensité 4), grande persistance
2.69	<b>IX</b>	Astringence plus faible, douceur en finale (intensité 2)
2.86	<b>VIII</b>	Astringence très intense, finale amère
3.0 ( <b>QTT II</b> )	<b>X</b>	Goût intense de façon générale, douceur importante (intensité 4), grande persistance
3.15	<b>V</b>	Très légèrement doux en attaque (intensité 1), astringent et amer
3.87	<b>I</b>	Attaque amère, sécheresse, "goût de planche"

Parmi les molécules de formule brute  $C_{43}H_{62}O_{15}$ , le composé à 2.69 min est l'isomère majoritaire dans un extrait de bois de chêne (figure 51). En outre, il est présent dans la fraction **IX** de CPC, qui présente une certaine douceur.

Les autres composés sont présents dans des fractions de faible sucrosité, et leur abondance relative dans l'extrait brut est moins élevée. En outre, les profils chromatographiques montrent que ces fractions contiennent un grand nombre d'autres composés.

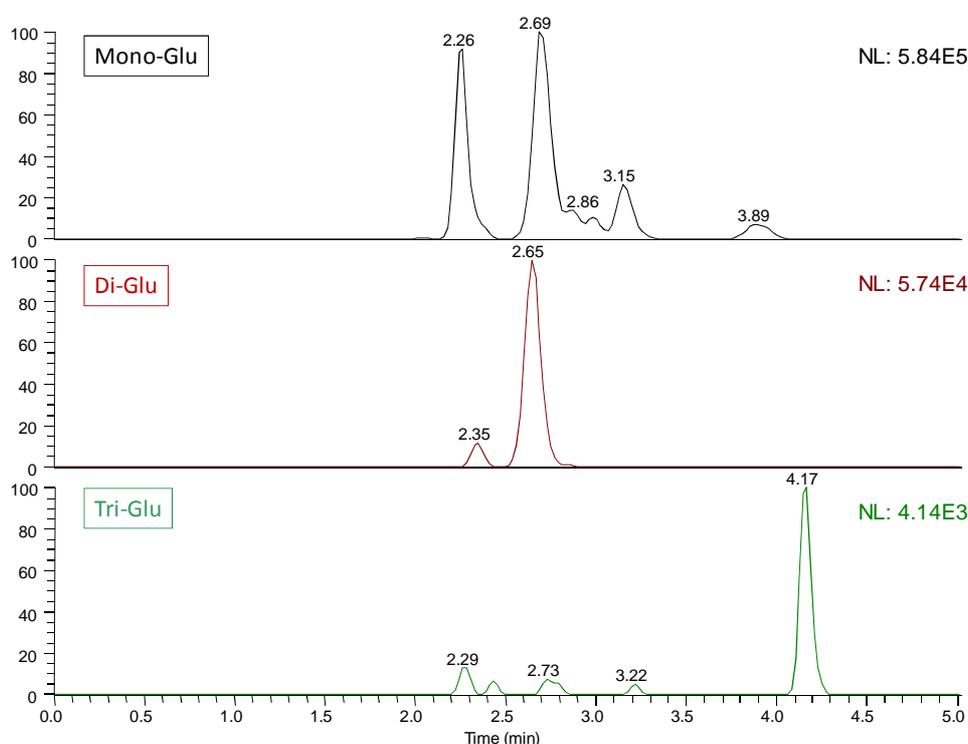
Nous allons donc chercher à purifier et à caractériser en priorité le composé associé au temps de rétention 2.69 minutes (figure 51) à partir de la fraction **IX** de CPC de l'extrait de bois. Nous le nommerons composé **E** tant qu'il ne sera pas identifié.

## 2) Recherche de dérivés glycosylés des quercotriterpénosides

La présence de plusieurs sucres sur un squelette triterpénique est fréquemment observée dans les espèces végétales riches en triterpénoïdes (Massiot & Lavaud, 1995; Vincken *et al.*, 2007).

De tels composés n'ont toutefois jamais été identifiés dans le bois de *Quercus petraea*.

La LC-FT/MS permet d'étudier la présence de composés de formule brute correspondant à des dérivés di- (Di-Glu) et tri-glycosylés (Tri-Glu) des **quercotriterpénosides I et II**. La figure 52 présente les résultats obtenus.



**Figure 52** - Chromatogrammes d'ions extraits pour les  $m/z$  correspondant aux espèces mono- (Mono-Glu, en noir), di- (Di-Glu, en rouge) et tri-glycosylés (Tri-Glu, en vert) de l'extrait **CZNCA**.

Le chromatogramme Di-Glu de l'extrait **CZNCA** présente deux pics : deux ions de formule brute  $C_{49}H_{71}O_{20}$  sont ainsi observés en mode négatif.

L'intensité de ces pics ( $5,7 \cdot 10^4$  pour celui à 2.65 min) est toutefois plus faible que pour les espèces mono-glycosylées ( $5,8 \cdot 10^5$  pour l'isomère  $m/z$  817 à 2.69 min).

Le spectre de masse associé au pic à 2.65 min confirme la présence de l'espèce neutre  $C_{49}H_{72}O_{20}$  dans l'extrait de bois. Cette formule brute correspond à un dérivé di-glycosylé des **QTT I** et **II**. Il semble qu'un isomère de cette molécule soit présent à 2.35 min, mais la faible intensité du signal ne permet pas de confirmer cette hypothèse.

Le chromatogramme Tri-Glu présente plusieurs pics, mais leur intensité est très faible ( $4,1 \cdot 10^3$  pour le plus intense). Il est possible que l'extrait **CZNCA** contienne des dérivés tri-glycosylés des **QTT I** et **II**, mais à l'état de traces uniquement.

L'analyse des fractions CPC montre que les espèces  $m/z$  979 et  $m/z$  1141 sont quasi exclusivement présentes dans la seule fraction **CZNCA-XII**, dont la description sensorielle rapportée au chapitre 5, paragraphe III.C.2 est « *Douceur intense (niveau 4) en attaque, sensation persistante sur le bout de la langue* ».

Compte tenu des intensités enregistrées pour les différentes espèces  $m/z$  979 et  $m/z$  1141 (figure 52) et de la complexité de la fraction (figure 14, chapitre 5), nous avons jugé prioritaire la purification du composé  $m/z$  979 associé au temps de rétention = 2.65 min. Nous le nommerons composé **F** au cours de la description de son isolement et de sa caractérisation moléculaire, réalisés à partir de la fraction **XII** de CPC.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les temps de rétention des composés **E** et **F** sont très proches en LC-FT/MS (respectivement 2.69 et 2.65 min) tandis qu'en CPC, ils sont séparés d'environ 30 minutes. L'élution des composés **C**, **D** et **E** se fait en effet en mode ascendant, alors qu'elle est réalisée en mode descendant pour le composé **F** et pour les autres espèces potentiellement di- et tri-glycosylées.

Bien que fondées de façon générale sur des effets d'affinité moléculaire et en partie guidées par l'hydrophobicité, les modalités de séparation propres à la CPC et à la CLHP sont différentes. Cette observation confirme la complémentarité de ces deux techniques et par conséquent la pertinence de leur utilisation successive dans le cadre d'une démarche de fractionnement. En effet, la CPC a permis dans cette étude de séparer des composés quasiment coélus en CLHP, et inversement.

## II) Purification des composés E et F

L'utilisation de la LC-FT/MS a mis en évidence la présence d'isomères et de dérivés diglycosylés des **quercotriterpénosides I et II** dans un extrait de bois de *Quercus petraea*. Cette technique a également permis de désigner les fractions CPC contenant le composé majoritaire pour chacune de ces deux catégories : **IX** et **XII**. L'isolement des composés **E** et **F** est réalisé à partir de ces fractions obtenues au chapitre 5.

### A) Purification du composé E

#### 1) Essais de purification par CLHP semi-préparative

De façon similaire à la méthode utilisée pour la fraction **X** et décrite au chapitre 5, paragraphe IV, nous avons dans un premier temps essayé de purifier le composé **E** par CLHP. Compte tenu de la plus faible quantité de matière disponible, un système semi-préparatif a été utilisé. Ce système est décrit dans le tableau 32.

**Tableau 32** - Conditions expérimentales de la CLHP semi-préparative.

Appareil :	Hewlett Packard HP 1090 Series II
Logiciel :	HP Chemstation
Détecteur :	UV HP 1050 La longueur d'onde utilisée est 280 nm.
Colonne :	Beckman Coulter Ultrasphere ODS (C <sub>18</sub> ) 250 x 10 mm Porosité 5 µm
Phase mobile :	Solvant A : eau milliQ + 0.05 % d'acide trifluoroacétique Solvant B : acétonitrile CLHP + 0.05 % d'acide trifluoroacétique
Injection :	Manuelle, à l'aide d'une boucle d'injection de 100 µL

Afin d'optimiser la séparation, différents gradients d'éluion sont testés. Pour cela, 1 mg de la fraction **IX** est injecté en CLHP-UV et les différents pics enregistrés sont collectés, puis analysés en LC-FT/MS, dans les conditions décrites au chapitre 6, paragraphe I.A.2.

De nombreux gradients ont ainsi été testés, mais aucun d'eux n'a permis d'obtenir une purification satisfaisante du composé **E**, d'autres ions sans rapport avec la molécule étant

visibles en LC-FT/MS. En effet, la fraction **CZNCA-IX** est particulièrement complexe ; elle contient un grand nombre de composés, à l'origine de coélutions. Des étapes supplémentaires de fractionnement doivent donc être mises en œuvre en amont de la séparation par CLHP semi-préparative.

## 2) Fractionnement de l'échantillon **CZNCA-IX**

### *a) Précipitation au chloroforme*

25 mg de la fraction **CZNCA-IX** sont solubilisés dans 1 mL de méthanol. Une solution limpide de couleur jaune foncé est ainsi obtenue. Dans un bécher, on ajoute 20 mL de chloroforme. Un précipité jaunâtre apparaît. La suspension est filtrée à l'aide d'un filtre seringue de diamètre moyen des pores 0.45 µm. Le rétentat est alors dissous en rinçant le filtre avec 5 mL de méthanol. Le filtrat est une solution limpide jaune foncé tandis que le rétentat repris dans le méthanol est de couleur jaune pâle.

Ces deux échantillons sont analysés en LC-FT/MS.

Les résultats montrent que le filtrat contient très peu de composé **E**, contrairement au rétentat ; cette molécule précipite donc lors de la diminution de polarité de la solution engendrée par l'ajout de chloroforme.

Cette précipitation a permis un fractionnement de l'extrait. Le rétentat, enrichi en composé **E** par rapport à la fraction **CZNCA-IX**, est conservé.

### *b) Fractionnement par extraction sur phase solide*

Les 5 mL de solution méthanolique de rétentat obtenus précédemment sont dilués par ajout de 300 mL d'eau milliQ. La solution obtenue est percolée à travers une cartouche Oasis<sup>®</sup> HLB 20 cc de Waters, préalablement rincée avec 200 mL d'eau, 20 mL d'acétonitrile et 200 mL d'eau. Un léger vide est appliqué à la cartouche afin de favoriser la percolation.

Après avoir été chargée par l'échantillon, la cartouche est percolée successivement par 20 mL de différentes solutions : eau, acétonitrile/eau à 10 % (v/v), acétonitrile/eau à 20 % (v/v), acétonitrile/eau à 30 % (v/v), acétonitrile/eau à 40 % (v/v), acétonitrile/eau à 50 % (v/v) et acétonitrile pur.

Les échantillons ainsi obtenus sont analysés en LC-FT/MS.

Les résultats montrent que le composé **E** est quasi exclusivement récupéré dans les percolats obtenus avec les solutions à 30 et 40 %. Les profils chromatographiques de ces deux fractions sont assez proches et nettement simplifiés par rapport à l'échantillon initial.

En outre, ces fractions ne présentent pas d'ions « étrangers » au temps de rétention du composé **E**, contrairement à ce qui a été décrit au paragraphe II.A.1. de ce chapitre.

Ces deux percolats ont été assemblés, évaporés sous vide et lyophilisés. 9 mg de solide jaune pâle sont obtenus ; cet échantillon est nommé **CZNCA-IX-p**.

### 3) Purification du composé **E** par CLHP semi-préparative

Les 9 mg de fraction **CZNCA-IX-p** obtenus sont dissous dans 90 µL de méthanol puis injectés dans le système CLHP-UV HP 1090, en utilisant le gradient décrit dans le tableau 33.

**Tableau 33** - Gradient chromatographique utilisé pour la purification du composé **E**.

Temps (min)	0	5	8	20	30	35	45	47	54	55	60
% de B	20	20	25	25	27	27	36	100	100	20	20

Le débit est de 4 mL/min, et la pression observée est d'environ 160 bars.

La séparation chromatographique est correcte ; le pic correspondant au composé **E** est ainsi collecté, évaporé puis lyophilisé. 1.7 mg d'une poudre blanche amorphe est obtenu.

Seule une très faible proportion du composé **E** contenu dans la fraction CPC **CZNCA-IX** est récupérée à l'issue de cette purification. Ce bas rendement est dû à la complexité de l'échantillon initial ; le grand nombre de composés qu'il comporte nécessite la mise en œuvre de fractionnements successifs.

## B) Purification du composé **F**

### 1) Fractionnement préalable de l'échantillon **CZNCA-XII**

Le profil chromatographique de la fraction **CZNCA-XII** traduit également la présence d'un grand nombre de molécules.

Un protocole de fractionnement similaire à celui décrit dans le paragraphe II.A.2 de ce chapitre est ainsi appliqué à cette fraction.

Le composé **F** se retrouve dans un premier temps dans le rétentat obtenu après filtration du précipité au chloroforme, puis dans les percolats à 30 % et 40 % d'acétonitrile. Toutefois, il est nettement plus présent dans le percolat à 30 % tandis que celui à 40 % contient de nombreuses autres espèces. Nous n'avons donc conservé que le percolat à 30 % qui a été évaporé, et lyophilisé. 8 mg d'un solide jaune foncé (noté **CZNCA-XII-p**) ont été obtenus.

## 2) Purification du composé F par CLHP semi-préparative

Les 8 mg de fraction **CZNCA-XII-p** obtenus sont dissous dans 90  $\mu$ L de méthanol puis injectés dans le système CLHP-UV HP 1090, en utilisant le gradient décrit dans le tableau 34.

**Tableau 34** - Gradient chromatographique utilisé pour la purification du composé **F**.

Temps (min)	0	5	8	11	16	25	45	47	54	55	60
% de B	10	10	18	18	25	25	36	100	100	10	10

Le débit est de 4 mL/min, et la pression observée est d'environ 160 bars.

La séparation chromatographique est correcte ; le pic correspondant au composé **F** est ainsi collecté, évaporé puis lyophilisé. 1.2 mg d'une poudre blanche amorphe est obtenu.

Le rendement observé est également très faible, pour des raisons identiques à celles avancées pour le composé **E**.

Par ailleurs, le chromatogramme de CLHP-UV semi-préparative montre un pic qui, d'après les analyses en LC-FT/MS, correspond à l'espèce  $m/z$  979 observée au temps de rétention 2.35 min. Toutefois, seules des traces de ce composé ont pu être collectées.

La purification des composés **E** et **F** s'est ainsi révélée longue et délicate, en raison du très grand nombre de composés présents dans les fractions CPC initiales. Néanmoins, l'optimisation des méthodes utilisées a permis de collecter une quantité suffisante de ces deux molécules, en vue de leur identification structurale.

## III) Identification du composé E

Le composé **E** a été purifié à partir de la fraction **CZNCA-IX** ; 1.7 mg a ainsi été obtenu. Dans ce chapitre, la LC-FT/MS et les RMN ont été utilisées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre 6, paragraphe I.

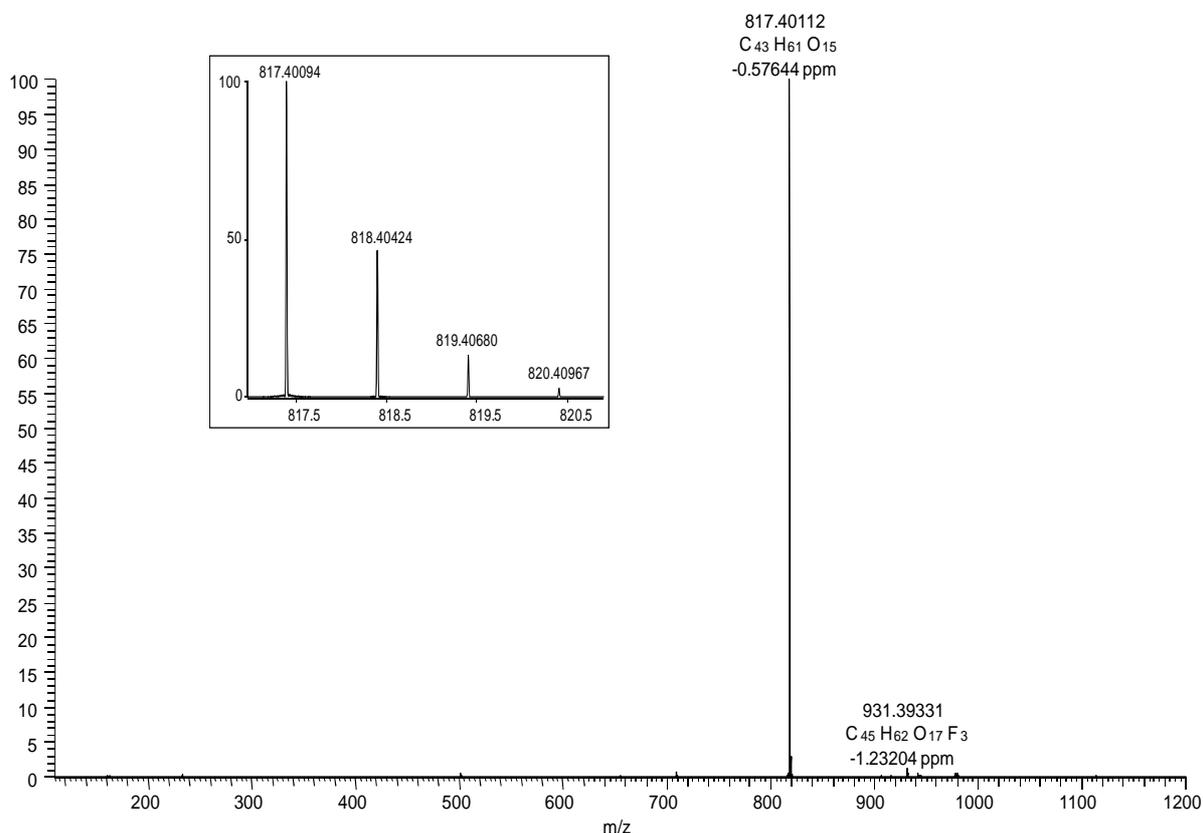
### A) Résultats obtenus en FT/MS

#### 1) Détermination de la formule brute

Les résultats de FT/MS présentés ici ont été enregistrés à partir de l'injection de 10  $\mu$ L d'une solution acétonitrile/eau (15 % v/v) de concentration 10 mg/L en composé **E**.

Le chromatogramme des ions totaux présente un seul pic au temps de rétention 2.69 min, tant en mode positif qu'en mode négatif. Le signal est plus intense en mode négatif.

Le spectre de masse, présenté à la figure 53, est constitué d'un ion quasi-moléculaire majoritaire monochargé à  $m/z$  817 et d'un signal faible à  $m/z$  931.



**Figure 53** - Spectre de masse du composé **E** en mode négatif  
L'encadré correspond au détail de ce spectre autour de l'ion de rapport  $m/z$  817.

La mesure de la masse exacte permet de confirmer que la molécule **E** a pour formule brute C<sub>43</sub>H<sub>62</sub>O<sub>15</sub> (écart de 0.61 ppm à la valeur théorique) ; il s'agit bien d'un isomère des **QTT I** et **II**.

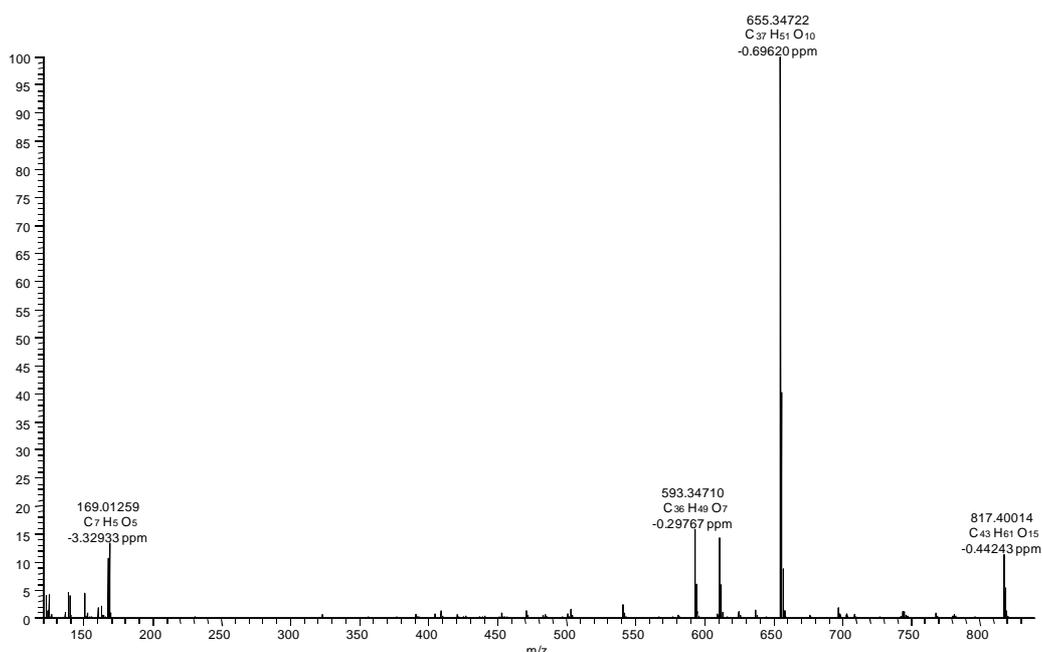
Les ions à  $m/z$  817 et  $m/z$  931 correspondent respectivement aux espèces  $[M-H]^-$  et  $[M+CF_3COO]^-$ .

Ces résultats confirment la pureté du composé **E** et ainsi l'efficacité de la purification effectuée au paragraphe III.A de ce chapitre.

## 2) Etude de la fragmentation

L'application d'une énergie HCD de 80 eV permet d'enregistrer, en mode négatif, des fragments similaires à ceux observés pour le **QTT I** et **II**, notamment les ions de rapport  $m/z$  169, 503, 593, 611 et 655 (figure 54).

Ces résultats suggèrent donc la présence d'un groupement galloyle et d'un hexose dans la molécule, le processus de fragmentation étant similaire à ceux des **QTT I** et **II**.



**Figure 54** - Spectre de fragmentation en mode négatif du composé **E** par application d'une énergie HCD de 80 eV.

### B) Résultats obtenus en RMN

Environ 1.5 mg du composé **E** a été dissous dans du méthanol deutéré, placé dans un tube de 3 mm et analysé à l'aide du spectromètre Bruker 600.

Les déplacements chimiques enregistrés pour la molécule **E** sont fournis en annexe.

Les déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  enregistrés sont très proches des données obtenues pour les **quercotriterpénosides I** et **II**. Les différents signaux caractéristiques de l'arjungénine sont ainsi observés :

- 6 méthyles angulaires sont caractérisés par des singulets situés à  $\delta$  0.79 (H26), 0.86 (H24), 0.96 (H30), 0.97 (H29), 1.11 (H25) et 1.34 ppm (H27)
- Une double liaison C=C entre les carbones hybridés  $\text{sp}^2$  à  $\delta$  123.4 (C12) et 142.6 ppm (C13)
- Une fonction carboxyle (C28) à  $\delta$  177.1 ppm

- 4 signaux correspondant à des protons portés par des carbones hydroxylés à  $\delta$  3.99 (H2), 5.05 (H3), 3.29 (H19) et 3.01/3.32 ppm (H23, géminés).
- Un proton (H18) à  $\delta$  3.07 ppm, caractéristique de la configuration *cis* de la jonction entre les cycles D et E

Les données ROESY et les constantes de couplage des signaux  $^1\text{H}$  montrent que les configurations relatives des jonctions de cycle sont identiques à celles des **QTT I** et **II**.

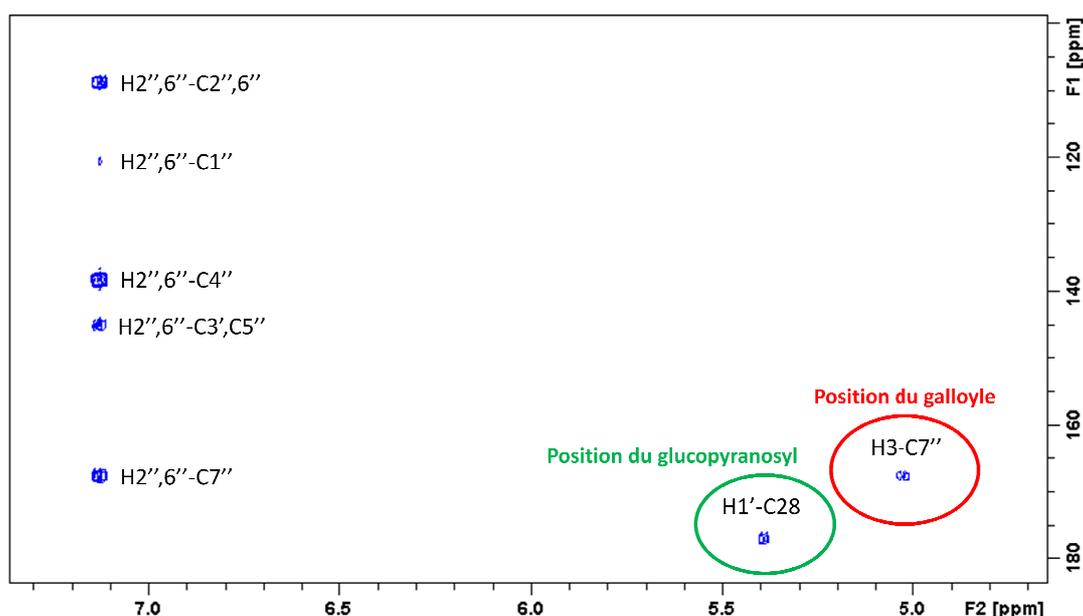
Par ailleurs, les signaux correspondant aux groupements galloyle et  $\beta$ -glucopyranosyle, déjà décrits pour les **QTT I** et **II** (chapitre 6, paragraphes IV.B et V.B), sont observables. Cela confirme les résultats de FT/MS relatifs à la présence de ces groupements sur la génine.

La comparaison des spectres  $^1\text{H}$  des **QTT** et de la molécule **E** montre que les déplacements chimiques sont quasi identiques pour les signaux des cycles C, D et E. Il en est de même pour les signaux  $^{13}\text{C}$ .

En revanche, plusieurs déplacements chimiques des atomes des cycles A et B sont modifiés.

Le proton H3 est encore plus déblindé que pour le **QTT II** (de 4.70 à 5.05 ppm).

En outre, les protons du méthyle angulaire à  $\delta$  0.86 ppm corrént en ROESY avec H2 : il s'agit des H24. Les protons géminés H23 corrént avec H2 et H5. La stéréochimie observée pour le carbone stéréogène C4 est donc similaire à celle du **QTT I** mais inversée par rapport au **QTT II**. Les protons de l'alcool primaire de la molécule **D** (H23) sont encore davantage blindés (de 0.6–0.8 ppm) par rapport à ceux du **QTT II**.



**Figure 55** - Détail du spectre HMBC. Les corrélations présentées permettent de déterminer la position du galloyle (en rouge) et du glucopyranosyle (en vert) sur la génine de la molécule **E**.

L'étude de la carte HMBC montre une corrélation entre le proton anomère (H1') et le carbone carboxylique C28 de la génine (figure 55). La position du  $\beta$ -glucopyranosyle sur l'aglycone de la molécule **E** est donc la même que dans les **QTT I** et **II**, ce qui explique les très faibles écarts des déplacements chimiques observés pour les cycles C, D et E.

Par ailleurs, le proton H3 de l'aglycone corrèle avec le carbone C7'', ce qui montre que l'hydroxyle porté par le carbone C3 est estérifié par le groupement galloyle. Ce groupement est donc situé à la même position que dans le **QTT II**.

### C) Données complémentaires

Pour une concentration de 1 g/L en **E**, on calcule  $\log(\epsilon) = 2.81$  pour un  $\lambda^{\max}$  de 277 nm.

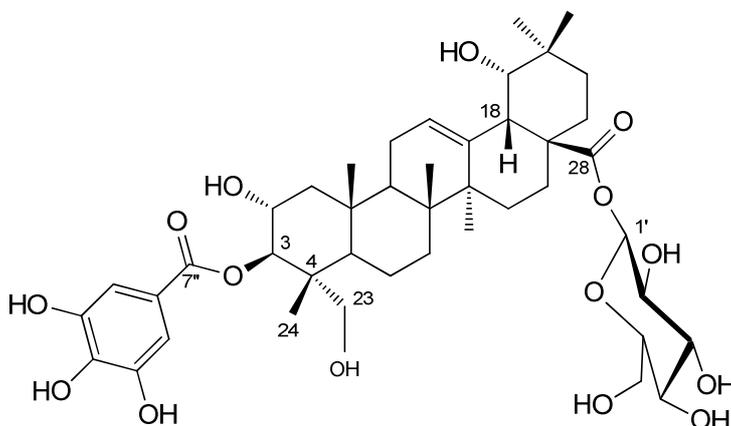
Le pouvoir rotatoire mesuré est  $+ 0.011^\circ$  pour une concentration en **E** de 0.058 g/100mL. On calcule alors le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]^D = + 20^\circ$ .

### D) Discussion

L'utilisation de la LC-FT/MS a confirmé la pureté et la formule brute du composé **E** ; il s'agit bien d'un isomère des **quercotriterpénosides I** et **II**.

Les expériences RMN réalisées ont permis d'identifier la structure de la molécule **E**. Il s'agit du 2 $\alpha$ ,19 $\alpha$ ,23-trihydroxy-3 $\beta$ -galloylolean-12-ène-28-oate de  $\beta$ -glucopyranosyle (figure 56).

Ce composé est également une nouvelle molécule, jamais identifiée jusqu'à ce jour ; nous le nommerons ainsi **quercotriterpénoside III (QTT III)**.



**Figure 56** - Structure chimique du **quercotriterpénoside III** (molécule **E**).

Le **QTT III** est ainsi un isomère de position du **QTT I** (le galloyle n'est plus fixé sur le C23 mais sur le C3) et un diastéréoisomère du **QTT II** (inversion de configuration du carbone stéréogène C4, liée probablement à l'oxydation d'un méthyle différent au cours des mécanismes de biosynthèse).

Ce **quercotriterpénoside III** est l'isomère de formule brute  $C_{43}H_{62}O_{15}$  le plus abondant dans l'extrait **CZNCA** analysé en LC-FT/MS.

#### IV) Identification du composé F

Le composé **F** a été purifié à partir de la fraction **CZNCA-XII** ; seulement 1.2 mg a pu être obtenu.

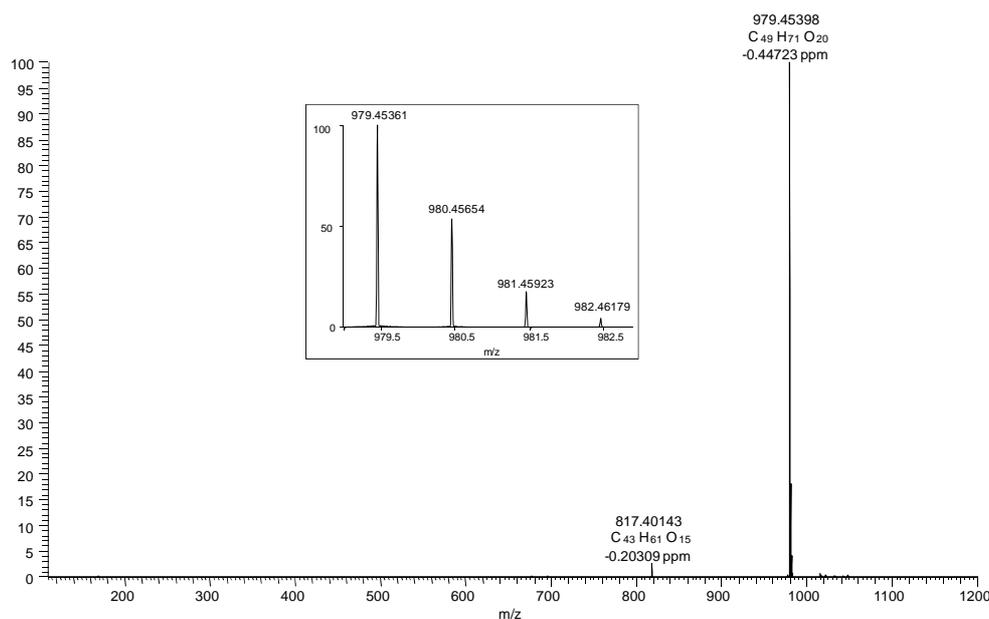
##### A) Résultats obtenus en FT/MS

##### 1) Détermination de la formule brute

Les résultats de FT/MS présentés ici ont été enregistrés à partir de l'injection de 10  $\mu$ L d'une solution acétonitrile/eau (15 % v/v) de concentration 10 mg/L en composé **F**.

Le chromatogramme des ions totaux en mode négatif présente un seul pic au temps de rétention 2.69 min.

Le spectre de masse, présenté à la figure 57, contient majoritairement l'ion monochargé à  $m/z$  979, ainsi qu'un signal à  $m/z$  817.



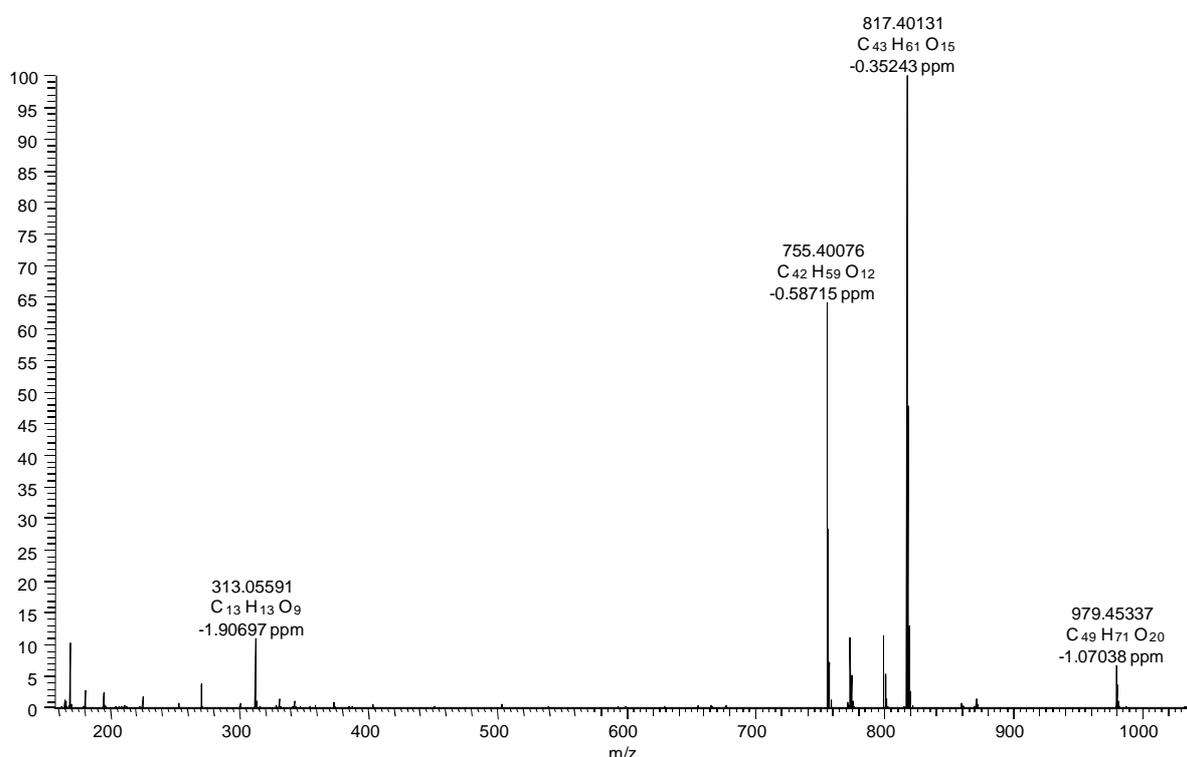
**Figure 57** - Spectre de masse du composé **F** en mode négatif  
L'encadré correspond au détail de ce spectre autour de l'ion de rapport  $m/z$  817.

La mesure de la masse exacte confirme la formule brute  $C_{49}H_{72}O_{20}$ , avec un écart de 0.6 ppm à la masse théorique. L'ion  $m/z$  817 est un fragment, de composition  $C_{43}H_{61}O_{15}$  ; il correspond à la perte d'un groupement hexose.

Ces résultats confirment la pureté du composé **F** et ainsi l'efficacité de la purification effectuée au paragraphe III.B de ce chapitre.

## 2) Etude de la fragmentation

Le spectre de fragmentation en mode négatif, présenté figure 58, est obtenu par application d'une énergie HCD de 80 eV.



**Figure 58** - Spectre de fragmentation en mode négatif du composé **F** par application d'une énergie HCD de 80 eV.

On observe notamment sur le spectre les ions de rapport  $m/z$  817, 665, 503, pouvant correspondre respectivement à la perte d'un hexose, d'un hexose et d'un galloyle, de deux hexoses et d'un galloyle. En outre, un fragment de rapport  $m/z$  755 est intense. Cet ion est séparé de 162.05282 uma (soit un groupement hexose) de l'ion de rapport  $m/z$  593, observé pour les **QTT I, II et III**. Par rapport à l'ion quasi-moléculaire, cette espèce de rapport  $m/z$  755 correspond à la perte d'un groupement hexose, à une décarboxylation et une déshydratation. Le processus de fragmentation semble donc similaire à ceux observés pour les **quercotriterpénosides I à III**.

Ces résultats semblent confirmer la présence de deux hexoses dans la molécule **F**. Des études en MS<sup>n</sup> permettraient d'approfondir des liaisons éventuelles entre ces groupements et le galloyle.

## B) Résultats obtenus en RMN

Environ 1.1 mg du composé **F** a été dissous dans du méthanol deutéré, placé dans un tube de 3 mm et analysé à l'aide du spectromètre Bruker 600.

Les déplacements chimiques enregistrés (fournis en annexe) sont comparés aux données obtenues pour les **QTT I**, **II** et **III**. Les signaux caractéristiques de l'arjungénine, décrits au paragraphe III.B. de ce chapitre, sont observables. Le proton H18 se situe à 3.07 ppm, ce qui traduit la configuration *cis* de la jonction entre les cycles D et E.

Les signaux des cycles C, D et E sont très proches de ceux observés pour les **QTT**.

Le doublet H3 est nettement blindé par rapport au **QTT III** (de 5.05 ppm à 3.21 ppm), tandis que le C3 est déblindé, de 78.7 ppm à 94.4 ppm.

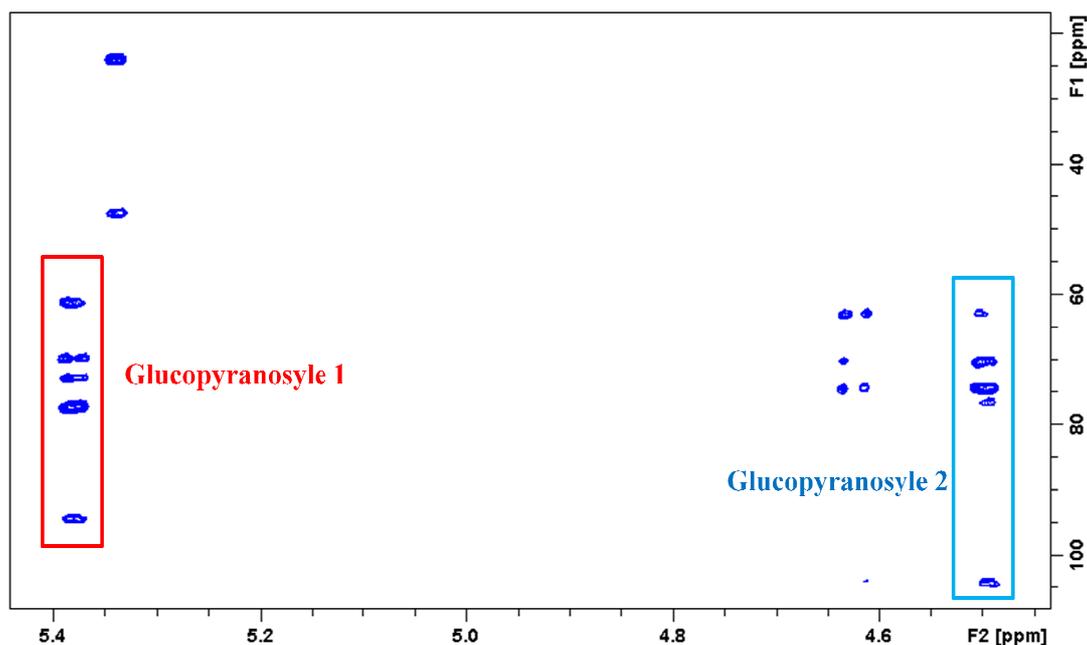
Le singulet à  $\delta$  1.25 ppm corrèle en ROESY avec H3 et H5 ; et en HMBC avec C3, C4 et C5. Ce signal correspond donc aux H23. Les protons H24 apparaissent sous forme de doublets géminés à  $\delta$  3.41 et 3.92 ppm, corrélant avec H25 en ROESY.

La configuration relative du carbone stéréogène C4 de la molécule **F** est donc similaire à celle du **QTT II** et inversée par rapport aux **QTT I** et **III**. Ce résultat est cohérent avec les valeurs relativement élevées des déplacements chimiques des H23 et H24, comparables à celles observées pour le **QTT II**.

Les signaux caractéristiques du groupement galloyle sont observés.

En revanche, sept signaux supplémentaires sont visibles dans la zone correspondant aux protons portés par des carbones hydroxylés. Cela confirme la présence d'un second groupe hexose dans la molécule **F**. Son proton anomère H1'' est situé à  $\delta$  4.51 ppm.

L'expérience HSQC-TOCSY est ici particulièrement utile, parce qu'elle permet de distinguer les atomes appartenant à chacun des deux hexoses alors que leurs déplacements chimiques sont très proches (figure 59). Ces différents atomes peuvent ainsi être assignés, avec l'aide complémentaire des spectres COSY et HSQC, comme décrit au chapitre 6, paragraphe IV.B.1.



**Figure 59** - Détail du spectre HSQC-TOCSY de la molécule **F**.

Les encadrés montrent les corrélations entre les protons anomères (en rouge H1', en bleu H1'') et les carbones portant des protons situés dans le même système de spin que l'anomère.

Les signaux enregistrés pour le second hexose sont caractéristiques d'un groupement glucopyranosyle. Le proton anomère H1'' est un doublet dont la constante de couplage est 8.2 Hz, ce qui traduit sa configuration  $\beta$ .

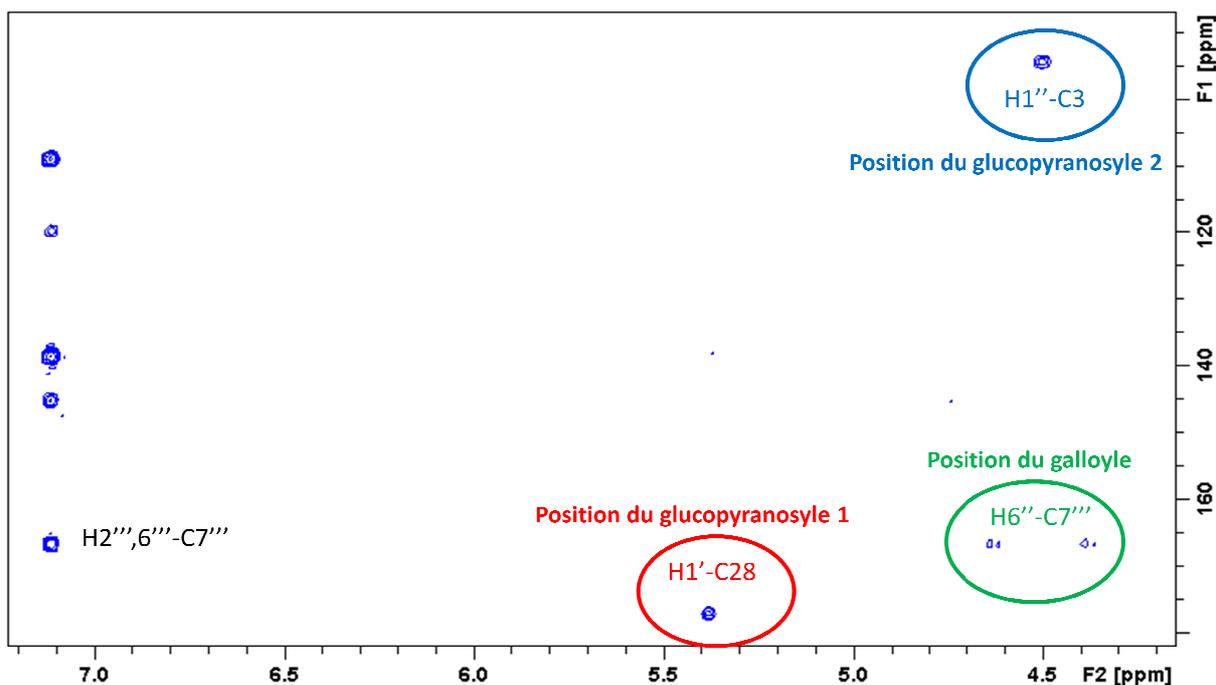
La molécule **F** contient donc bien un galloyle et deux groupements  $\beta$ -glucopyranosyle.

La figure 60 présente les signaux HMBC utilisés pour déterminer la position de ces groupements sur la génine.

Le spectre HMBC montre une corrélation entre H1' et C28. Le glucopyranosyle 1 est donc à nouveau porté par le carboxyle C28, la liaison étant de type ester. Ce résultat est cohérent avec la faible variabilité des déplacements chimiques des cycles C, D et E.

Une corrélation est également visible entre H1'' et C3, ainsi qu'entre H3 et C1''. Le glucopyranosyle 2 est ainsi fixé par le C3 de la génine, sous forme d'un acétal.

Le carbone C7''' du galloyle corrèle avec les protons géminés H6'' du glucopyranosyle 2. Le gallate est donc porté par le C6'' du glucopyranosyle 2.



**Figure 60** - Détail du spectre HMBC de la molécule **F**.

Les corrélations présentées permettent de déterminer la position du galloyle (en vert) et des glucopyranosyles 1 (en rouge) et 2 (en bleu) sur la génine.

Compte tenu de la faible quantité purifiée, les données complémentaires (polarimétrie, UV) n'ont pas été enregistrées.

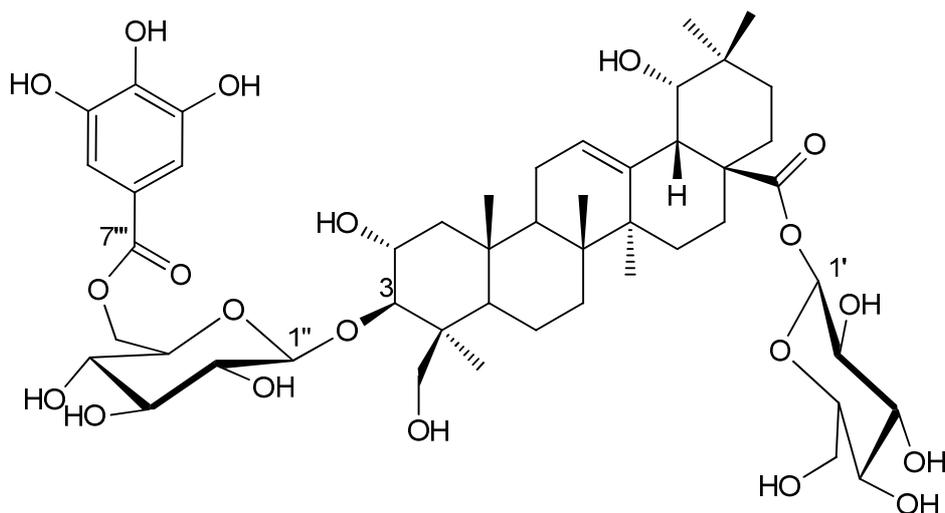
### C) Discussion

L'utilisation de la LC-FT/MS et de la RMN ont confirmé que le composé **F** est un dérivé diglucosylé des **quercotriterpénosides I, II et III**.

La configuration relative du carbone 4 est identique à celle du **QTT II**, et le glucopyranosyle 1 est également porté par le carboxyle C28.

En revanche, le gallate de la molécule **F** n'est pas fixé directement sur la génine, comme c'est le cas pour les autres **QTT**, mais sur l'alcool primaire du glucopyranosyle 2. Ce dernier est lui-même fixé sur le carbone 3 de l'aglycone. Le squelette de cette molécule se distingue ainsi des composés préalablement décrits.

Il s'agit du  $2\alpha,19\alpha,24$ -trihydroxy- $3\beta$ -((6''-galloyl)- $\beta$ -glucopyranosyl)olean-12-ène-28-oate de  $\beta$ -glucopyranosyle, dont la structure est présentée à la figure 61.



**Figure 61** - Structure chimique du **quercotriterpénoside IV** (molécule **F**).

Le composé **F** est également une nouvelle molécule, jamais décrite dans la littérature. Nous la nommerons **quercotriterpénoside IV** (QTT IV).

A notre connaissance, il s'agit du premier triterpène diglycosylé identifié dans le bois de *Quercus petraea*.

## Conclusion

Les performances du couplage LC-FT/MS en termes de précision de masse permettent de rechercher sélectivement des molécules de formules brutes données dans un extrait de bois. Nous avons en effet observé dans un premier temps plusieurs isomères des **quercotriterpénosides I** et **II** et deux dérivés diglycosylés de ces molécules.

La mise au point d'un protocole de purification guidé par la LC-FT/MS a permis d'isoler et de purifier l'isomère majoritaire de formule brute  $C_{43}H_{62}O_{15}$ , ainsi que le principal dérivé diglycosylé. Le rendement de cette purification est néanmoins très faible, en raison de la complexité des fractions initiales.

Nous avons ensuite déterminé la structure moléculaire des deux molécules purifiées en utilisant la RMN. A notre connaissance, ces composés n'avaient jamais été identifiés dans la nature. Nous les avons respectivement nommés **quercotriterpénosides III** et **IV**.

Les résultats obtenus dans ce chapitre démontrent l'efficacité de la spectrométrie de masse à haute résolution pour l'identification de nouvelles molécules. Toutefois, à la

différence du fractionnement guidé par la dégustation décrit dans le chapitre 5, cette méthode de purification ne tient pas compte des propriétés gustatives des composés isolés.

L'objet de ce chapitre était de vérifier notre hypothèse, à savoir l'existence d'autres isomères des **QTT I** et **II** et de leurs dérivés diglycosylés. L'approche développée a donc été basée sur des données analytiques. C'est au chapitre suivant que nous étudierons les propriétés gustatives des composés identifiés.



## **Troisième partie :**

**Caractérisation sensorielle des composés  
purifiés. Quantification et impact gustatif dans  
les vins et les eaux-de-vie**



## Chapitre 8 - Etude des propriétés gustatives de molécules identifiées dans un extrait de bois de chêne. Détermination de leurs seuils de perception

### Introduction

Le développement d'un protocole de purification guidé par la dégustation, décrit au chapitre 5, nous a permis d'isoler une fraction douce à partir d'un extrait de bois de chêne. Les quatre principales molécules de cette fraction ont été identifiées au chapitre 6. Deux d'entre elles (le **lyonirésinol** et le **P-WL**) ont déjà été signalées dans le bois de *Quercus petraea*, mais leurs propriétés sensorielles ne sont pas ou peu renseignées dans la littérature. Les deux autres composés sont de nouvelles molécules nommées **quercotriterpénosides I** et **II**. La caractérisation gustative de ces quatre molécules doit être effectuée afin de déterminer notamment leur contribution respective à la saveur de la fraction **CZNCA-X**.

Par ailleurs, deux autres **quercotriterpénosides** ont été identifiés dans l'extrait de bois de chêne **CZNCA**. L'un (**QTT III**) est l'isomère majoritaire des **QTT I** et **II** et l'autre (**QTT IV**) est un dérivé de ces molécules possédant un glucose supplémentaire ; leurs propriétés gustatives sont également inconnues.

Au-delà de la description de la saveur des molécules pures, la détermination de leurs seuils de perception est nécessaire pour étudier leur impact organoleptique sur le goût des vins élaborés au contact du bois de chêne.

Toutefois, la caractérisation gustative des molécules non-volatiles requiert des quantités de produit importantes. Cela constitue une limite majeure de ce type d'étude, *a fortiori* lorsque les substances ne sont pas commercialisées, ce qui est le cas des composés objets de cette étude.

Ce chapitre porte sur les propriétés gustatives du **lyonirésinol**, du **P-WL**, des **QTT I** et **III** ainsi que sur les seuils de perception des composés dont nous avons pu purifier des quantités suffisantes.

## **I) Etude des propriétés gustatives de composés identifiés dans le bois de chêne**

### **A) Préparation des échantillons et conditions de dégustation**

Les quantités obtenues pour les différents composés identifiés sont variables et parfois très faibles. Or, la caractérisation gustative d'une molécule nécessite une quantité suffisante de celle-ci.

Nous pouvons ainsi étudier les propriétés sensorielles du **lyonirésinol**, du **P-WL**, ainsi que des **quercotriterpénosides I et III**.

Chacun de ces composés a été dégusté à une concentration de 10 mg/L, dans deux matrices différentes.

#### **1) Préparation des échantillons dans une solution eau/éthanol**

Pour chaque molécule, une solution à 1 g/L a été réalisée dans de l'éthanol. L'utilisation du bain à ultrasons permet d'obtenir des échantillons limpides.

Ces solutions sont ensuite diluées au 1/100<sup>ème</sup> avec de l'eau osmosée afin d'atteindre un volume final de 100 mL.

On obtient ainsi quatre solutions à 10 mg/L dans un mélange eau/éthanol à 1 % v/v.

Les différents composés ne sont pas ou peu solubles dans l'eau, ce qui justifie l'utilisation de l'éthanol.

Par ailleurs, un « blanc » a été réalisé (solution eau/éthanol 1 % v/v)

#### **2) Préparation des échantillons dans un vin blanc**

Pour chaque molécule, une solution à 10 mg/L a été réalisée dans le vin blanc de Bordeaux 2008 décrit au chapitre 1, paragraphe III.A.2. Les échantillons obtenus sont placés pendant 2 min dans un bain à ultra-sons ; ils sont alors limpides.

Le vin sans ajout a été utilisé comme « blanc ».

#### **3) Dégustation des échantillons**

Les échantillons ont été dégustés par quatre personnes entraînées à la dégustation des vins, dans des verres AFNOR.

Chaque solution est dégustée individuellement, en comparaison avec le « blanc » correspondant à la matrice considérée. Les modalités en solution eau/éthanol sont dégustées dans un premier temps.

Il est demandé aux dégustateurs de décrire les sensations perçues pour chaque échantillon.

Le faible nombre de dégustateurs est incompatible avec une analyse statistique des résultats. Toutefois, leur expertise et leur expérience permettent d'accorder du crédit à la description de leurs perceptions sensorielles.

## B) Résultats

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 35 ci-dessous.

**Tableau 35** - Sensations associées à la présence des quatre composés étudiés dans une solution eau/éthanol 1 % v/v et dans un vin blanc.

Molécule	Solution eau/éthanol	Bordeaux blanc 2008
<b>Lyonirésinol</b>	Amertume persistante	Dureté et amertume renforcées en finale
<b>P-WL</b>	Pas de goût	Pas de goût
<b>Quercotriterpénoside I</b>	Légère douceur et sensation rémanente	Sucrosité augmentée, diminution de l'acidité et de l'amertume, sensation douce et persistante en finale
<b>Quercotriterpénoside III</b>	Légère douceur et sensation rémanente	Diminution de la perception acide en attaque, augmentation de la douceur

Le **lyonirésinol** développe un caractère amer, tant en solution hydro-alcoolique que dans le vin blanc. Son ajout à 10 mg/L a un effet préjudiciable sur la qualité gustative du vin blanc. Ce composé n'est donc vraisemblablement pas responsable de la douceur perçue dans la fraction **CZNCA-X**.

L'addition de **P-WL** à 10 mg/L n'est pas perçue par les dégustateurs, que ce soit en solution ou dans le vin. Cette molécule n'a vraisemblablement pas d'effet ni sur la saveur de la fraction **CZNCA-X**, ni sur celle d'un extrait de bois de chêne.

En revanche, l'ajout de **quercotriterpénoside I** (10 mg/L) en solution hydro-alcoolique est associé à une douceur et une sensation persistante. Son impact gustatif est encore nettement plus important sur le vin blanc. Il procure ainsi une augmentation de la sensation de sucrosité ainsi qu'une diminution de l'acidité et de l'amertume. La différence

avec le témoin est très nette à cette concentration. Il est possible que cette molécule soit au moins en partie responsable des propriétés de la fraction **CZNCA-X**.

Le **quercotriterpénoside III** possède un goût similaire en solution hydro-alcoolique. Dans un vin blanc, son effet se ressent essentiellement en attaque ; il atténue sensiblement l'acidité perçue et contribue ainsi à une augmentation de la sucrosité.

Les **QTT I** et **III** ont par ailleurs été dégustés séparément dans un vin rouge, à 1mg/L. A cette concentration, ils possèdent un effet « enrobant », la perception tannique étant diminuée et la saveur sucrée plus intense.

Le **QTT II** est la quatrième molécule principale de la fraction **CZNCA-X**. Néanmoins, en raison des trop faibles quantités purifiées, nous n'avons pas pu le déguster. Des expériences de purification complémentaires sont actuellement menées afin de caractériser le goût de cette molécule et de savoir si elle contribue à la saveur de sa fraction d'origine.

De la même façon, le **QTT IV** n'a pu être dégusté. Sa purification permettra l'étude des propriétés gustatives de cette espèce diglucosylée.

## C) Goût des composés en mélange

### 1) Goût d'un mélange **lyonirésinol** / **QTT**

La dégustation des composés purs en solution montre que le **lyonirésinol** et le **QTT I** développent des goûts opposés : amer pour le lignane et doux pour le triterpène.

Or, la fraction **CZNCA-X**, qui contient notamment ces derniers, a été décrite au chapitre 5 comme douce et persistante.

Le **QTT I** atténue-t-il jusqu'à la masquer la saveur amère du **lyonirésinol** ? Pour répondre à cette question, il semble intéressant de préparer et de déguster un mélange de ces deux molécules.

On prélève respectivement 1 mL et 200 µL des solutions de **lyonirésinol** et de **QTT I** à 1 g/L, puis on complète avec de l'eau osmosée jusqu'à 100 mL. On obtient ainsi une solution eau/éthanol 1.2 % v/v, de concentrations 10 mg/L en **lyonirésinol** et 2 mg/L en **QTT I**.

L'échantillon est dégusté en comparaison avec un « blanc ».

Il est caractérisé par une sensation douce en finale, le caractère amer et persistant du **lyonirésinol** n'étant plus perceptible en présence du **QTT I**.

L'échantillon préparé s'apparente à une reconstitution imprécise de la fraction **CZNCA-X**. Le ratio utilisé entre les deux composés est en effet fixé de façon approximative, non par des analyses quantitatives.

L'ajout de **P-WL** à 5 mg/L ne modifie pas le goût de l'échantillon, ce qui confirme les résultats obtenus au paragraphe précédent. Le **P-WL** ne contribue pas au goût de la fraction de bois et, *a fortiori*, de l'extrait de bois. Nous ne nous intéresserons donc plus à ce composé dans la suite des travaux.

En revanche, il est regrettable que le **QTT II** n'ait pu être ajouté à l'échantillon à cause de la trop faible quantité purifiée. En raison de sa proximité structurale avec le **QTT I**, il est en effet possible que cette molécule possède également des propriétés gustatives et interagisse ainsi avec les deux autres composés sapides de la fraction, de façon synergique ou antagoniste.

La dégustation des composés en mélange montre néanmoins que le **quercotriterpénoside I** masque l'amertume persistante et le caractère dérangeant du **lyonirésinol** ; l'échantillon résultant du mélange des deux composés est ainsi perçu comme légèrement doux par les dégustateurs. Ce résultat permet d'expliquer la perception de la fraction **X** dans le gustatogramme présenté au chapitre 5.

Un phénomène similaire est observé dans le vin blanc. L'effet masquant du **QTT I** sur l'amertume est encore plus intense dans cette matrice, la sucrosité de la finale étant nettement augmentée.

Dans un vin blanc, le **QTT III** possède également un effet masquant vis-à-vis de l'amertume du **lyonirésinol** pour les concentrations utilisées précédemment.

## 2) Goût d'un mélange QTT I / QTT III

Les **QTT I** et **III** ont été additionnés séparément à 5mg/L dans un vin blanc. Un mélange de ces deux composés à 5 mg/L a également été préparé dans le même vin.

L'acidité est plus faible et la saveur sucrée plus intense dans le mélange que dans les échantillons contenant une seule molécule.

Ce résultat montre donc l'existence de phénomènes synergiques entre les deux **quercotriterpénosides**.

## II) Détermination des seuils de perception du lyonirésinol et du QTT I

L'ajout de **lyonirésinol** à 10 mg/L confère une amertume persistante et un caractère dérangeant au vin, tandis que le **quercotriterpénoside I** augmente la sucrosité et masque les sensations amères. Le seuil de perception d'une molécule est la concentration au-delà de laquelle cette molécule est perçue dans une matrice donnée. Elle concerne soit un dégustateur (seuil individuel) soit un groupe d'individus (seuil collectif). La détermination de cette dernière valeur est nécessaire afin de connaître l'impact organoleptique effectif d'un composé.

Compte tenu des trop faibles quantités disponibles, le seuil de perception du **quercotriterpénoside III** ne peut être étudié.

### A) Matériel et méthodes

#### 1) Choix de la matrice d'étude

La détermination du seuil de perception a été très fréquemment réalisée lors de l'étude des arômes du vin. En comparaison, relativement peu de seuils sont disponibles dans la littérature pour des composés non-volatils.

Or, les propriétés sensorielles d'un composé peuvent être considérablement influencées par la matrice dans laquelle il se trouve : les seuils déterminés dans l'eau sont généralement différents de ceux obtenus dans le vin. En outre, ces valeurs peuvent également varier, de façon plus faible, d'un vin à un autre.

En raison de ces effets matrices, la caractérisation sensorielle exhaustive d'un composé du vin nécessite la détermination d'au moins trois seuils : dans l'eau, dans un vin blanc et dans un vin rouge. Il peut être également intéressant d'évaluer le seuil dans une solution modèle (par exemple 12 % d'éthanol, 3 g/L d'acide tartrique, pH 3.5) ou dans d'autres types de vins.

Toutefois, la robustesse d'un seuil de perception dépend du nombre de dégustateurs. Une quantité importante de la molécule étudiée est ainsi nécessaire pour chaque test sensoriel. Les composés que nous étudions ne sont pas disponibles commercialement, et les quantités disponibles demeurent faibles. Par conséquent, nous ne pouvons utiliser qu'une seule matrice pour la détermination des seuils dans le cadre de ce travail.

Les dégustations présentées au paragraphe I de ce chapitre ont montré que le goût des deux composés est plus facilement perceptible dans le vin que dans l'eau. Nous avons ainsi choisi d'utiliser un vin blanc (Bordeaux blanc 2009, tableau 36) élevé en cuve inox, car la valeur obtenue permettra de discuter l'impact gustatif des composés dans ce type de matrice.

**Tableau 36** - Principales caractéristiques analytiques du vin blanc de Bordeaux 2009 utilisé pour la détermination des seuils de perception.

Bordeaux blanc 2009	
Titre alcoométrique volumique (à 20°C)	12.6 %
Concentration en glycérol	5.9 g/L
Concentration en D-glucose + D-fructose	0.71 g/L

L'étude du comportement des différentes molécules dans d'autres milieux devront néanmoins faire l'objet de recherches ultérieures.

## 2) Préparation des échantillons

Les seuils de perception du **lyonirésinol** et du **QTT I** sont déterminés au cours de deux sessions distinctes.

Pour chaque molécule, une solution à 1 g/L est préparée dans du vin blanc, puis elle est diluée de façon à obtenir les différentes concentrations présentées au tableau 37.

**Tableau 37** - Concentrations en **lyonirésinol** et en **QTT I** préparées pour la détermination des seuils de perception.

Molécule	Concentrations préparées					
<b>Lyonirésinol</b>	250 µg/L	500 µg/L	1 mg/L	2,5 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
<b>QTT I</b>	125 µg/L	250 µg/L	500 µg/L	1 mg/L	1.5 mg/L	3 mg/L

Ces concentrations ont été choisies préalablement par trois dégustateurs et les échantillons ont été préparés une heure avant les sessions.

### 3) Conditions de la dégustation

La caractérisation sensorielle des molécules non-volatiles est plus délicate et exigeante que celle des composés volatils. En effet, le dégustateur est soumis à la fatigue liée au nombre d'échantillons présentés, ainsi qu'à d'éventuels phénomènes de saturation ou de rémanence. Pour cette raison, nous avons ainsi organisé deux sessions pour chaque molécule : une le matin et une l'après-midi.

Pour chaque concentration, trois verres sont présentés aux dégustateurs, l'un d'entre eux contenant le vin additionné du composé étudié, les deux autres contenant le vin témoin. Il est demandé à chaque individu de désigner l'échantillon différent (test à choix forcé de 1 parmi 3).

Le matin, trois concentrations sont présentées, par ordre croissant : 0.5, 1 et 2.5 mg/L pour le **lyonirésinol** et 0.25, 0.5 et 1 mg/L.

Pour chaque dégustateur, les concentrations proposées à la session de l'après-midi dépendent des résultats du matin. Il dégustera en effet à nouveau la concentration la plus basse pour laquelle il a donné une bonne réponse, afin de confirmer son jugement, ainsi que les 2 concentrations inférieures.

Par exemple, dans le cas du **lyonirésinol**, si un individu s'est trompé à 500 µg/L puis a répondu correctement à 1 mg/L et 2.5 mg/L, alors au cours de la séance de l'après-midi, il dégustera le composé à 250 µg/L, 500 µg/L et 1 mg/L.

Cette méthode permet de limiter la fatigue des dégustateurs en adaptant au mieux les concentrations présentées à sa propre sensibilité.

26 personnes appartenant au personnel des laboratoires de l'ISVV et entraînés à la dégustation des vins ont participé à ces tests sensoriels.

Les échantillons ont été présentés dans des verres AFNOR, à une température de 12°C, dans une salle de dégustation équipée de boxes individuels.

### 4) Traitement des résultats

Le calcul du seuil de perception individuel a été réalisé en effectuant la moyenne géométrique entre la plus basse concentration trouvée appartenant à une suite continue de bonnes réponses et la valeur qui lui est juste inférieure (plus haute valeur non trouvée). Le seuil des dégustateurs ayant répondu correctement pour toutes les concentrations est fixé à la plus basse valeur de la série.

Le seuil de perception collectif résulte de la moyenne géométrique des seuils individuels. C'est cette valeur qui est utilisée pour la caractérisation sensorielle du composé.

## B) Résultats

Dans le cas du lyonirésinol, deux dégustateurs n'ont répondu correctement pour aucune des concentrations proposées. Nous leur avons fait déguster l'échantillon à 20 mg/L, et ils ont cette fois donné la bonne réponse à deux reprises, ce qui a permis de déterminer leur seuil.

Les résultats obtenus pour les deux molécules sont présentées dans le tableau 38.

**Tableau 38** - Seuils de perception du **lyonirésinol** et du **quercotriterpénoside I** dans un vin blanc

Molécule	Seuil collectif	Seuil individuel le plus bas	Seuil individuel le plus élevé
<b>Lyonirésinol</b>	<b>1.52 mg/L</b>	250 µg/L	14.1 mg/L
<b>QTT I</b>	<b>590 µg/L</b>	125 µg/L	2.1 mg/L

## C) Discussion

La détermination des seuils de perception des composés non-volatils du vin est assez peu décrite, certainement en raison des difficultés pratiques inhérentes à ce type de caractérisation sensorielle. Toutefois, la méthode que nous avons développée permet de limiter les effets de rémanence et de saturation généralement observables pour des molécules sapides. Le nombre d'individus du panel, et leur entraînement à la dégustation, garantissent une bonne robustesse aux valeurs obtenues, tout en demeurant compatibles avec les quantités disponibles pour les deux molécules étudiées. Contrairement à l'olfaction directe, la gustation est en effet un acte destructeur ; des quantités importantes de molécules non volatiles sont donc nécessaires pour leur caractérisation sensorielle.

Les valeurs des seuils de perception déterminées sont relativement faibles pour des composés non-volatils, notamment en ce qui concerne le **QTT I**. En effet, à 590 µg/L, ce composé modifie le goût du vin. Cette molécule possède une saveur douce ; la détermination de son seuil de perception dans l'eau serait intéressante car elle permettrait de le comparer à

d'autres édulcorants. Néanmoins, nous pensons que la saveur douce de ce composé se manifeste essentiellement dans le vin, dont il atténue les perceptions acide et amère.

La sucrosité associée à cette molécule s'exprime ainsi pleinement, par déplacement de l'équilibre des saveurs vers des sensations plus douces.

Arramon (2001) avait étudié le seuil de perception du lyonirésinol dans les eaux-de-vie. L'auteur l'avait évalué comme étant « inférieur à 2.5 mg/L ». L'ordre de grandeur de cette estimation semble cohérent avec nos résultats dans le vin.

Par ailleurs, notre travail montre, pour les deux composés, une grande diversité de sensibilité entre les dégustateurs. Par exemple, certains individus perçoivent le **lyonirésinol** dans le vin blanc à 250 µg/L, tandis que d'autres y sont insensibles à 10 mg/L. Cette observation phénoménologique intéressante mériterait une étude physiologique approfondie.

## Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié les propriétés sensorielles des molécules purifiées, lorsque la quantité de produit disponible l'autorisait.

Dans un premier temps, leur dégustation en solution et dans le vin à concentration assez élevée (10 mg/L) a permis de déterminer leur saveur individuelle. Le **lyonirésinol** est ainsi associé à de l'amertume persistante et dérangeante, tandis que les **QTT I** et **III** sont décrits comme doux, persistants.

Dégustés dans le vin, ces composés ont des saveurs plus intenses et leurs descripteurs sont plus affirmés. Selon les dégustateurs, les **QTT** confèrent en effet de la sucrosité aux vins, notamment en finale. En outre, ces triterpénoïdes masquent notablement la sensation amère développée par le **lyonirésinol**, tant dans l'eau que dans le vin, lorsqu'ils sont présents à une concentration cinq fois inférieure à celle du lignane. Le **P-WL** ne présente pas d'activité gustative à la concentration testée.

Nous avons ensuite déterminé les seuils de perception du **lyonirésinol** et du **QTT I** dans un vin blanc. Ces valeurs sont respectivement de 1.52 et 0.59 mg/L, ce qui est relativement bas pour des composés non-volatils. Nous avons observé une grande variabilité de la sensibilité des dégustateurs, certains étant particulièrement sensibles à ces composés.

Ces résultats devront également être complétés dans le futur par la poursuite de la caractérisation sensorielle du **lyonirésinol** ainsi que des **QTT I** et **III** dans d'autres types de

matrices, mais également par l'étude des autres **quercotriterpénosides** identifiés. D'un point de vue physiologique, il semble important d'étudier les mécanismes des interactions entre ces composés et les récepteurs sensoriels. En particulier, le phénomène de masquage exercé par les **QTT** sur le **lyonirésinol** constitue à notre sens un sujet particulièrement intéressant ; son origine, supramoléculaire ou cognitive, mérite d'être déterminée.

Néanmoins, la détermination des seuils de perception du **lyonirésinol** et du **QTT I** dans les vins constitue une première étape permettant d'évaluer leur impact organoleptique effectif. Ces résultats doivent être ensuite comparés aux quantités de ces deux molécules observables dans les vins. La mise au point d'une méthode de quantification fiable est ainsi nécessaire afin de discuter l'effet réel des composés étudiés.



## Chapitre 9 - Quantification du lyonirésinol et des quercotriterpénosides I et III dans les vins et les eaux-de-vie

### Introduction

Les chapitres précédents ont présenté la purification de plusieurs molécules extraites du bois de chêne. L'utilisation de diverses techniques analytiques et sensorielles a permis d'élucider la structure chimique de ces molécules et de préciser l'activité gustative de certaines d'entre elles.

Toutefois, nous avons réalisé ces différentes études à partir d'extraits hydro-alcooliques de copeaux de bois. Afin de déterminer l'impact organoleptique potentiel dans le vin des composés isolés, il est nécessaire, dans un premier temps, d'y vérifier leur présence, puis de comparer les concentrations observées aux seuils de perception déterminés précédemment.

Ce chapitre traite du développement d'une méthode de quantification fiable du **lyonirésinol** et des **quercotriterpénosides I** et **III** dans les vins. En raison de la composition complexe du vin, le couplage LC-MS est une technique adaptée à cette approche quantitative.

Nous précisons les conditions chromatographiques et les paramètres de spectrométrie de masse choisis dans cette méthode, en soulignant l'intérêt et l'originalité de l'utilisation du couplage LC-FT/MS. Nous présenterons ensuite les résultats des dosages effectués dans différents vins blancs, issus notamment de modalités d'élevage variables. Ces données seront complétées par des analyses quantitatives réalisées dans plusieurs eaux-de-vie élevées sous bois de chêne. Les résultats obtenus permettront de discuter l'effet gustatif des molécules étudiées.

### I) Développement d'une méthode de quantification du lyonirésinol et des quercotriterpénosides I et III

Le développement d'une méthode de dosage de composés naturels dans une matrice complexe doit répondre à plusieurs exigences relatives notamment à sa sensibilité, à sa validité et à sa fiabilité. L'optimisation des paramètres expérimentaux utilisés permet de satisfaire à ces critères.

## A) Principe de la méthode. Composés quantifiés

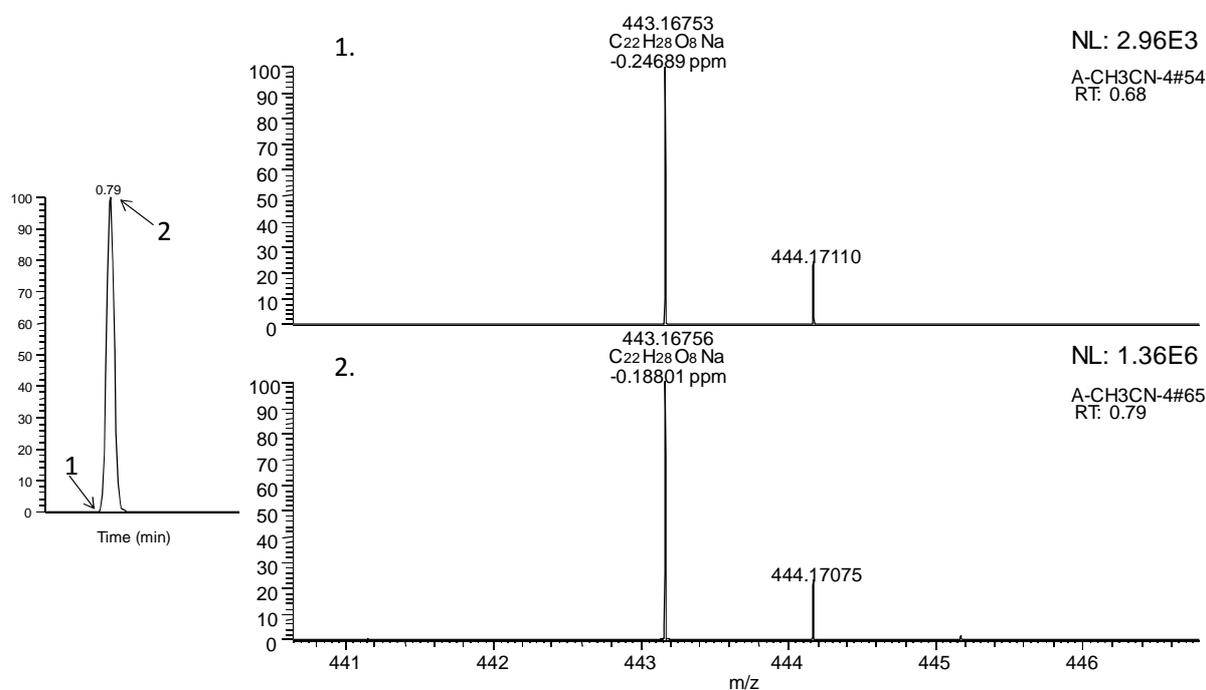
### 1) Principe général de la méthode

La plupart des dosages en LC-MS de composés présents à faibles concentrations dans une matrice complexe se font à l'aide de spectromètres de masse de type triple quadrupôle. Ces appareils permettent en effet une quantification sensible et précise grâce au suivi d'ions obtenus par fragmentation d'une ou plusieurs molécules sélectionnées (mode « Multiple Reaction Monitoring »).

Néanmoins, la LC-FT/MS peut être utilisée dans le cadre d'analyses quantitatives, en raison de ses caractéristiques décrites au chapitre 6, paragraphe I.A (Kaufmann *et al.*, 2010).

La quantification, dans ce cas, n'est pas effectuée sur la base d'expériences de fragmentation, mais directement sur les ions quasi-moléculaires ou adduits (mode « Full Scan ») ; elle est ainsi réalisée à partir des chromatogrammes d'ions extraits.

La figure 62 illustre la conservation de la précision de mesure de masse entre deux balayages, l'un effectué à la base (noté 1) et l'autre au sommet (2) du pic chromatographique correspondant au **lyonirésinol**, lors de l'injection d'un extrait de bois **CZNCA**. Les conditions utilisées sont similaires à celles décrites dans les chapitres précédents. Le rapport des intensités de l'ion de rapport  $m/z$  443.1675 est d'environ 500 entre les deux balayages.



**Figure 62** - Spectres de masse enregistrés à la base (en haut à droite) et au sommet (en bas à droite) du pic chromatographique (à gauche) du **lyonirésinol**.

Cette figure illustre la stabilité de la précision de mesure de masse en fonction de l'intensité du signal (0.25 et 0.18 ppm). On peut également noter la conservation du ratio isotopique entre ces deux balayages.

Cette stabilité de la précision de la mesure de masse vis-à-vis de l'intensité du signal permet de reconstruire les chromatogrammes d'ions avec des tolérances très faibles (typiquement 5 ppm), ce qui augmente d'autant la sélectivité du dosage.

Les chromatogrammes d'ions extraits obtenus en LC-FT/MS présentent très peu de bruit de fond, ce qui facilite l'intégration des pics d'intérêt (Mullen *et al.*, 2010). Cette caractéristique, conjuguée à la grande sensibilité de l'analyseur Orbitrap, permet d'atteindre des limites de quantification généralement très basses.

En outre, le contrôle automatique du gain et la vaste gamme dynamique « intra-scan » de la LC-FT/MS contribuent à son efficacité pour la quantification de molécules dans des matrices complexes.

En pratique, une série d'échantillons est préparée par ajout des composés étudiés à une même matrice, afin d'obtenir des concentrations croissantes et précisément connues. L'injection de ces échantillons, suivie de la mesure de l'aire des pics obtenus dans le chromatogramme des ions extraits, permet de tracer, pour chaque composé étudié, une courbe "concentration = f (aire du pic d'intérêt)".

La concentration des molécules étudiées est alors déterminée dans les échantillons « inconnus », c'est-à-dire dans lesquels aucun ajout n'a été effectué. Afin d'améliorer la précision du dosage, un étalon interne peut être utilisé.

La quantification en LC-FT/MS est effectuée en mode « Full scan », la sélectivité de la détection étant assurée, comme nous l'avons décrit plus haut, par la précision et la stabilité de la mesure de masse. Cette stratégie permet notamment d'effectuer des analyses quantitatives rétrospectives ; il est possible de détecter et de doser *a posteriori* des molécules non visées lors des injections initiales. Cet aspect constitue l'originalité de cette méthode, qui se distingue ainsi des dosages effectués en MS/MS à l'aide des spectromètres de type triple-quadrupôles. Dans ce dernier cas, les transitions entre ions parents et fragments, qui sont à l'origine de la sélectivité de la détection, doivent être définies avant l'analyse.

Malgré son développement récent, le dosage « en masse exacte » a déjà donné des résultats probants et offre ainsi des perspectives prometteuses (Zhang *et al.*, 2009).

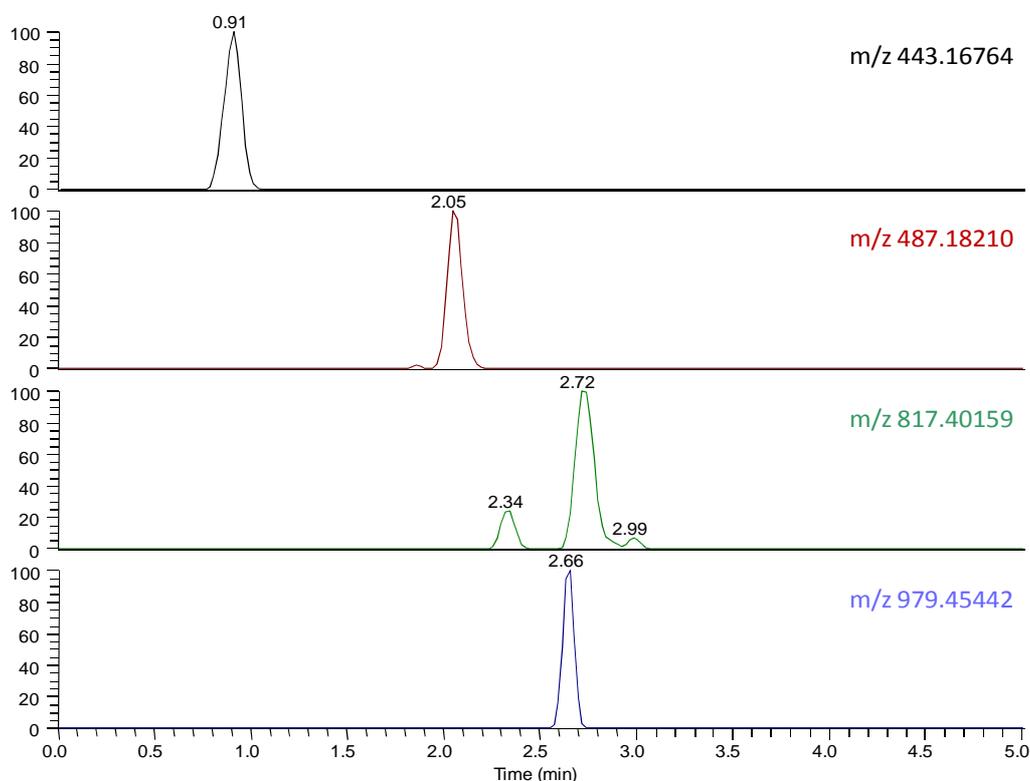
La mise en place d'une telle méthode de dosage, et en particulier la préparation de la gamme, nécessitent de disposer d'une quantité suffisante des composés purs. Cela constitue parfois une limite majeure lors de l'étude de nouvelles molécules, non disponibles dans le commerce.

## 2) Composés quantifiés

Les différentes molécules présentées dans ce travail (chapitre 6 et 7) ont été isolées et identifiées à partir d'extraits hydro-alcooliques de copeaux de bois de chêne. Les **quercotriterpénosides** sont de nouvelles molécules, la présence du **P-WL** n'a jamais été rapportée dans les vins ou les eaux-de-vie. Ainsi, parmi les molécules identifiées, seul le **lyonirésinol** a déjà été observé dans des vins blancs par Moutounet *et al.* (1989) et sa concentration a été estimée par CLHP-UV. Arramon (2001) a également quantifié ce composé dans les eaux-de-vie mais a indiqué qu'il n'était pas présent dans les vins.

Préalablement au développement d'une méthode de quantification, il est par conséquent nécessaire de vérifier la présence de ces différentes molécules dans les vins élaborés au contact du bois de chêne.

Un vin blanc de l'appellation Graves élaboré en barrique a été dilué au demi avec de l'eau milliQ puis filtré à 0.45  $\mu\text{m}$ . 10  $\mu\text{L}$  ont été injectés en LC-FT/MS, dans les conditions décrites au chapitre 6, paragraphe I.A.2. Les chromatogrammes d'ions extraits correspondant aux formules brutes des espèces étudiées sont présentés à la figure 63.



**Figure 63** - Chromatogrammes des ions extraits obtenus pour l'injection en LC-FT/MS d'un vin blanc des Graves élaboré sous bois. Les ions extraits correspondent, de haut en bas, à l'adduit sodium du **lyonirésinol**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{Na}$ , en noir), à l'espèce  $[\text{M}-\text{H}]^-$  du **P-WL** ( $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_{12}$ , en rouge), à l'espèce  $[\text{M}-\text{H}]^-$  des **QTT I à III** ( $\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{O}_{15}$ , en vert) et à l'espèce  $[\text{M}-\text{H}]^-$  du **QTT IV** ( $\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{O}_{15}$ , en bleu). La fenêtre de tolérance utilisée pour la reconstruction des signaux est de 5 ppm.

Les chromatogrammes de la figure 63 présentent des signaux dont les temps de rétention sont quasi identiques à ceux des molécules identifiées dans les chapitres 6 et 7. Une injection similaire a été effectuée avec une fragmentation HCD (tension de 80 V). Les fragments caractéristiques de ces composés ont été observés.

L'ensemble de ces éléments démontre la présence de **lyonirésinol** dans un vin élaboré sous bois, ce qui confirme ainsi les travaux de Moutounet *et al.* (1989). Cette présence avait été contestée par Arramon, à l'évidence à tort.

Les **quercotriterpénosides I, II, III et IV** sont également détectés dans le vin analysé. C'est la première fois que des triterpènes galloylés sont identifiés dans un vin.

Le précurseur galloylé et glycosylé de la whisky-lactone (**P-WL**) est lui aussi détecté pour la première fois dans un vin. A ce jour, il n'avait en effet été décrit et quantifié que dans des extraits de bois de chêne (Masson *et al.*, 2001).

Les molécules que nous avons identifiées à partir d'un extrait de bois sont effectivement présentes dans un vin élaboré sous bois ; ces résultats confirment donc la fécondité de notre démarche d'extraction et de purification.

En revanche, ces molécules ne sont pas observées lors de l'injection en LC-FT/MS d'un vin non élaboré sous bois de chêne. La présence de ces composés dans les vins nécessite donc une phase de contact avec le bois de chêne.

La confirmation de la présence de ces différentes molécules dans le vin analysé permet d'envisager leur quantification.

Toutefois, nous avons vu au chapitre 8 que le précurseur de la whisky-lactone **P-WL** est sans saveur. Son dosage ne constitue donc pas un objectif de notre étude.

Les faibles quantités disponibles des **QTT II et IV** n'ont pas permis de déterminer leur goût éventuel ; elles sont, qui plus est, insuffisantes pour préparer une gamme de concentrations, ce qui rend leur quantification impossible à ce stade.

Par conséquent, l'étude quantitative développée dans ce chapitre s'attachera au **lyonirésinol** ainsi qu'aux **quercotriterpénosides I et III**. Ces trois composés présentent en effet des propriétés sensorielles notables et les quantités purifiées sont compatibles avec la préparation d'une gamme de concentrations dans des vins et des eaux-de-vie.

La fiabilité de la méthode de quantification utilisée nécessite l'optimisation de divers paramètres expérimentaux.

## B) Conditions chromatographiques

L'utilisation d'un système chromatographique U-HPLC et de colonnes de faible porosité (inférieure à 2 µm) permet de réduire considérablement les temps d'analyse tout en conservant une bonne qualité de séparation. Cela constitue un avantage considérable dans le cadre de la quantification d'un grand nombre d'échantillons.

Le système chromatographique décrit au chapitre 6, paragraphe I.A.2.a, est utilisé dans les conditions décrites au tableau 39.

**Tableau 39** – Conditions chromatographiques utilisées pour la méthode de quantification du **lyonirésinol** et des **QTT I** et **III**.

Colonne :							
Hypersil GOLD C <sub>18</sub> PFP (Thermo Fisher Scientific)							
100 x 2.1 mm							
Porosité 1.9 µm							
Phase mobile :							
Solvant A : eau LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % d'acide formique + 1 mmol/L de formate d'ammonium							
Solvant B : acétonitrile LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % d'acide formique							
Gradient :							
	Temps						
	(min)	0	0,5	4	4,2	5,4	5,5 6,5
	% de B	18	18	45	98	98	18 18
Débit : 600 µL/min							
Injection :							
10 µL à l'aide d'un passeur automatique HTC0 Pal équipé de « racks »							
réfrigérés							

Le formate d'ammonium est ajouté dans le solvant A afin de favoriser l'ionisation du **lyonirésinol** en mode positif. L'acide formique améliore la résolution chromatographique.

La colonne PFP utilisée permet d'assurer une bonne séparation entre les différents **quercotriterpénosides**. Les échantillons sont conservés à 12°C dans les tiroirs du passeur d'échantillon. Cela limite leur éventuelle dégradation lorsqu'une série importante d'injections est programmée.

Les pressions observées sont de l'ordre de 700 à 800 bar.

A l'issue de chaque injection, la seringue et l'injecteur sont rincés trois fois, à l'aide de deux solvants différents : une solution eau/méthanol 50/50 à 0.5 % d'acide formique et de l'acétonitrile. Ce protocole a été mis en place car des phénomènes d'« effets mémoire »

(traces résiduelles) sont observables avec un rinçage classique eau/méthanol, lors de l'injection d'un « blanc » (eau) à la suite d'un échantillon concentré.

Le détecteur à barrette de diodes est activé pour un éventuel contrôle, mais il n'est pas utilisé pour la quantification.

## C) Paramètres de spectrométrie de masse

### 1) Ions utilisés pour la quantification

Les ions utilisés pour le dosage du **lyonirésinol** et des **quercotriterpénosides I et III** sont présentés dans le tableau 40. Ils ont été choisis en raison de la valeur de leur rapport signal/bruit pour une faible concentration.

Afin de limiter les erreurs de mesure liées à l'injection, un étalon interne est utilisé. Un composé phénolique, la néohespéridine dihydrochalcone (**NHDC**) est ainsi ajouté aux échantillons (de la gamme et inconnus), à une concentration de 100 µg/L. Nous avons choisi cette molécule car elle possède une masse molaire (611. 19814) et un temps de rétention (3.0 min) proches de ceux des composés étudiés. En outre, il s'agit d'un composé glycosylé, jamais observé dans la nature. La NHDC est détectée en mode négatif.

**Tableau 40** - Description des ions utilisés pour la quantification du **lyonirésinol** et des **QTT**.

Molécule	Temps de rétention	Rapport $m/z$ des ions (en Th)	Nature des ions
<b>Lyonirésinol</b>	1.40 min	438.21224	$[M+NH_4]^+$
		443.16764	$[M+Na]^+$
		841.36411	$[2M+H]^+$
		863.34606	$[2M+Na]^+$
<b>Quercotriterpénoside I</b>	2.70 min	655.34877	$[M-Glucose-H]^-$
		817.40105	$[M-H]^-$
<b>Quercotriterpénoside III</b>	3.05 min	655.34877	$[M-Glucose-H]^-$
		817.40105	$[M-H]^-$
<b>NHDC (étalon interne)</b>	3.00 min	611.19814	$[M-H]^-$

## 2) Conditions expérimentales de la spectrométrie de masse

Les valeurs des gaz et des tensions appliquées pour l'ionisation et le transfert des ions ont été optimisées en utilisant comme références les intensités des signaux de rapport  $m/z$  443.16764 Th pour le mode positif (ion de quantification majoritaire du **lyonirésinol**) et 817.40105 Th pour le mode négatif (ion de quantification majoritaire des **QTT I** et **III**). Ces valeurs sont rapportées dans le tableau 41.

**Tableau 41** - Conditions d'ionisation utilisées en mode positif et en mode négatif.

Paramètre	Mode positif	Mode négatif
Débit du « sheath gas »	75	75
Débit du gaz auxiliaire	20	20
Débit du « sweep gas »	3	3
Tension du spray	3.5 kV	3 kV
Température du capillaire	350 °C	350 °C
Tension du capillaire	35 V	-95 V
Tension du tube lens	120 V	-190 V
Tension du skimmer	18 V	-46 V
Température de la source	320 °C	320 °C

Nous avons observé, dans les conditions appliquées, la présence d'un adduit [**QTT** +  $\text{CF}_3\text{COO}$ ], caractérisé par le rapport  $m/z$  931.39446. La versatilité généralement rencontrée pour cette espèce nous a ainsi amené à appliquer une énergie de collision de 30 eV dans la source (SID) en mode négatif. Cette opération permet de briser l'adduit avec le trifluoroacétate. Le fragment de rapport  $m/z$  655.34877 Th également généré est pris en compte pour la quantification.

L'analyse chromatographique dure 6.5 minutes. Le spectromètre de masse enregistre les données pendant les cinq premières minutes. Deux segments d'acquisition sont alors programmés : le premier (de 0 à 2 minutes) correspond à des balayages en mode positif (détection du **lyonirésinol**) et le second (2 à 5 minutes) en mode négatif (détection des **QTT**). Les molécules étant suffisamment séparées, il n'est donc pas utile d'alterner les polarités entre chaque balayage. En augmentant le nombre de balayages effectués par pic

chromatographique, la segmentation des modes d'acquisition permet d'améliorer encore la précision des dosages.

Les gammes de balayage utilisées sont adaptées aux ions choisis.

Le flux chromatographique est envoyé vers la poubelle de 0 à 1 min et de 5 à 6.5 min. Ces phases correspondent à l'élution du volume mort, à l'équilibrage, et au rinçage de la colonne.

Les paramètres utilisés pour les deux segments d'acquisition sont présentés dans le tableau 42 ci-dessous.

**Tableau 42** - Configuration de l'analyseur Orbitrap pour les deux segments de la méthode de quantification utilisée.

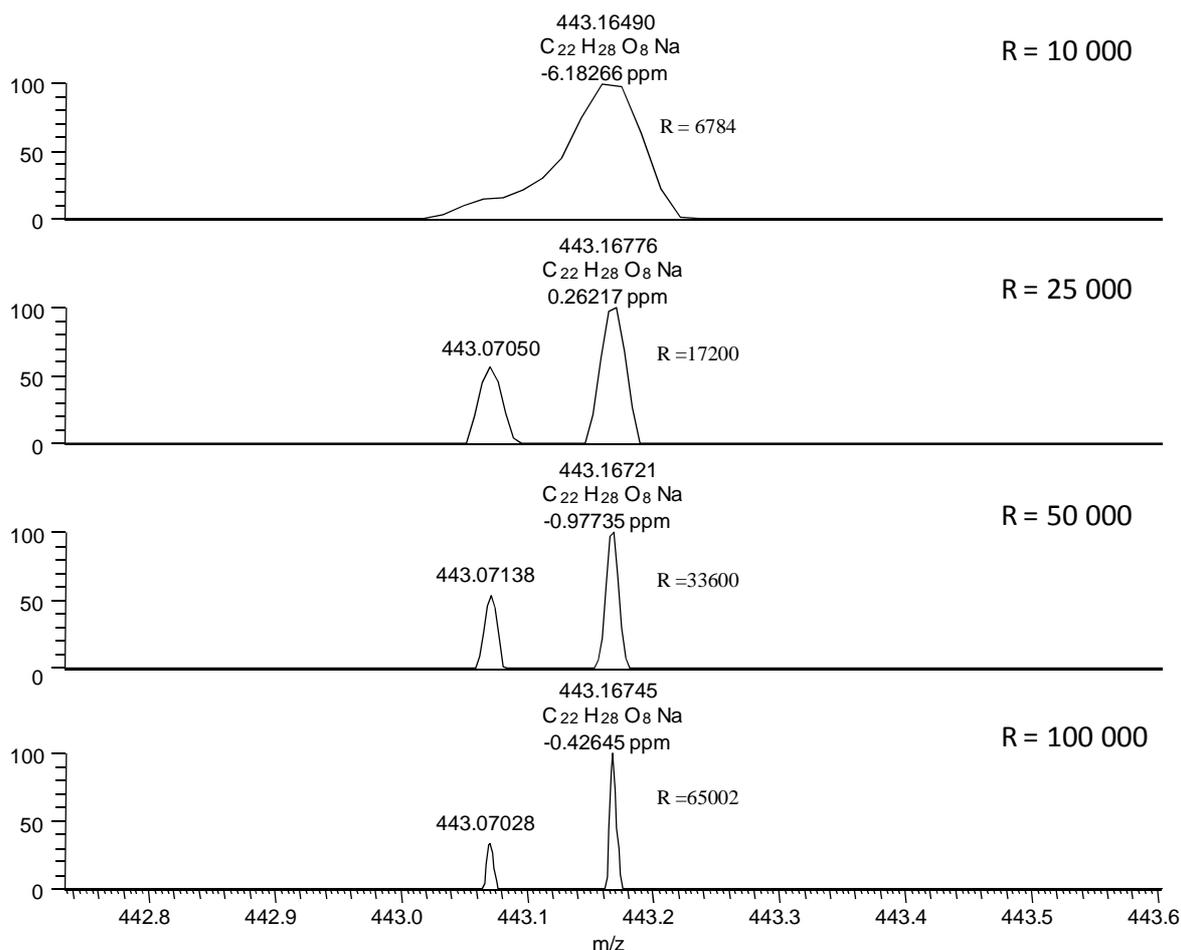
Segment	0-2 minutes	2-5 minutes
Mode	Positif	Négatif
Gamme de balayage	200-900 Th	600-1000 Th
SID (collision dans la source)	Aucun	30 V
Temps d'injection maximal	100 ms	
Contrôle automatique du gain	3.10 <sup>6</sup> ions ("High dynamic range")	
Calibrage	Externe	
Résolution	25 000 (à $m/z$ 200 Th) "Enhanced"	

Par rapport à la méthode utilisée pour la détermination de la formule brute, le nombre d'ions introduits dans l'Orbitrap est augmenté (multiplié par 6), ce qui améliore la gamme dynamique ainsi que la sensibilité de la détection. Le temps d'injection observé est inférieur à 100 ms, cette valeur peut donc être utilisée comme majorant.

Le calibrage externe permet d'atteindre des précisions de la mesure de masse inférieures à 3 ppm, pendant au moins une semaine. Cette valeur est suffisante pour une analyse quantitative.

La vitesse de balayage est dépendante de la résolution utilisée : elle est de 10 balayages par seconde à 10 000 de résolution et de 1 balayage par seconde à 100 000 (pour un ion de rapport  $m/z$  200 Th). Il convient de trouver une valeur permettant d'obtenir un nombre de points suffisant pour chaque pic chromatographique tout en garantissant l'absence d'interférences liées à la présence de composés isobariques.

La figure 64 présente un détail des spectres de masse obtenus à partir de l'injection de 10 µL d'un vin blanc non boisé, auquel du **lyonirésinol** a été ajouté à une concentration de 100 µg/L. Ces spectres ont été enregistrés en utilisant les quatre niveaux de résolution disponibles pour le système Exactive, indiqués par défaut pour un rapport  $m/z$  de 200 Th (10 000, 25 000, 50 000 et 100 000). A titre indicatif, les résolutions effectivement obtenues pour l'adduit  $[M+Na]^+$  du **lyonirésinol** sont mentionnées à côté du signal de cette espèce. Un calibrage interne a été utilisé. Les spectres sont présentés sur une fenêtre de 0.8 Th.



**Figure 64** - Détails des spectres de masse obtenus pour un vin blanc non boisé additionné de 100 µg/L de **lyonirésinol** en utilisant quatre niveaux de résolution.

Pour une résolution de  $R = 10\ 000$  (à  $m/z$  200 Th), l'écart entre la valeur de la masse théorique et la valeur enregistrée est anormalement élevé (6.2 ppm). En utilisant des niveaux de résolution supérieurs, on observe qu'une espèce isobarique est détectable et que la précision de mesure de masse enregistrée pour l'espèce  $C_{22}H_{28}O_8Na^+$  devient alors conforme aux valeurs attendues. L'ion isobare, caractérisé par un rapport  $m/z$  d'environ 443.07, est donc

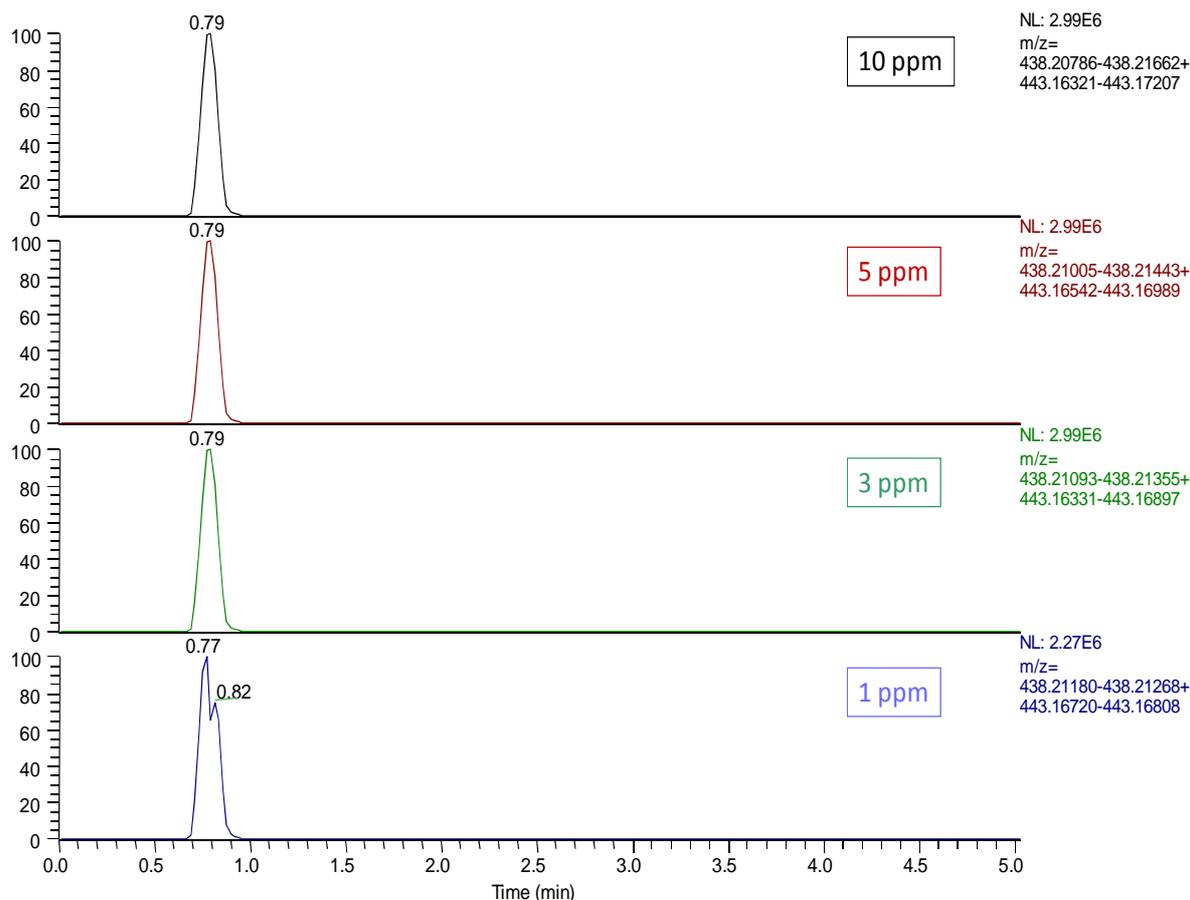
à l'origine d'une interférence avec l'adduit sodium du **lyonirésinol** lorsque le pouvoir résolutif ne permet pas de séparer ces deux ions.

Par conséquent, nous utilisons une résolution de  $R = 25\ 000$  (à 200 Th) pour l'analyse quantitative, ce qui correspond à une vitesse de balayage de 4 Hz.

#### D) Traitement des résultats

L'analyse des résultats est effectuée grâce à l'application Quan Browser du logiciel Xcalibur, en utilisant l'algorithme Genesis. La très grande sélectivité de la LC-FT/MS permet l'intégration automatique des signaux. La quantification est basée sur le rapport entre les aires du pic du composé étudié et de l'étalon interne.

La figure 65 présente plusieurs chromatogrammes obtenus par extraction des ions de rapport  $m/z$  438.21224 et 443.16764 Th (respectivement adduits ammonium et sodium du **lyonirésinol** en mode positif), en appliquant des conditions de précision de masse variables.



**Figure 65** - Chromatogrammes d'un échantillon **CZNCA** obtenus par extraction des ions de rapport  $m/z$  438.21224 et 443.16764 Th, en appliquant des fenêtres de masse variant de 1 à 10 ppm.

Ces résultats montrent que l'allure et l'intensité du pic chromatographique sont conservées pour des contraintes de précision de masse de 10 ; 5 et 3 ppm. L'intensité du signal chute lorsque l'on fixe la tolérance de la précision à 1 ppm ; la forme du pic n'est alors plus gaussienne. En effet, à ce niveau d'exigence, certains ions sont exclus du chromatogramme reconstruit car l'écart entre le rapport  $m/z$  mesuré et la valeur théorique est supérieur à 1 ppm pour certains balayages de l'expérience.

Nous appliquons donc une fenêtre de masse de 5 ppm pour la construction des chromatogrammes d'ions extraits ; cette valeur garantit un niveau de sélectivité élevé sans affecter l'allure et l'intensité des pics obtenus.

### E) Préparation des échantillons

Le dosage des composés étudiés est réalisé dans deux types de matrices : vin blanc et eau-de-vie. Compte-tenu de la complexité chimique de ces solutions, il est fort probable que des « effets matrices » soient observables, c'est-à-dire que l'ionisation et la détection des molécules d'intérêt varient avec la nature des échantillons. L'influence de tels effets sur la quantification de molécules du vin en LC-MS a récemment été étudiée de façon approfondie (Stark *et al.*, 2010).

L'objectif de ce chapitre est d'obtenir des valeurs de concentrations en **lyonirésinol** et en **QTT I** et **III** dans quelques vins et spiritueux afin de discuter l'impact organoleptique de ces molécules. Par conséquent, nous n'avons pas réalisé les gammes-étalons dans l'eau mais directement dans les matrices utilisées. Toutefois, l'étude des influences de la matrice devra faire l'objet de travaux ultérieurs.

La quantification est effectuée en injection directe, c'est-à-dire sans étape de purification préalable. Afin de diminuer le degré alcoolique (des valeurs trop élevées peuvent nuire à la résolution chromatographique), les vins sont dilués au demi avec de l'eau milliQ et les eaux-de-vie au dixième. Les échantillons sont filtrés à 0.45  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un filtre-seringue. L'étalon interne (**NHDC**) est ajouté à tous les échantillons, à une concentration de 100  $\mu\text{g/L}$ .

Les gammes-étalons sont réalisées dans un vin blanc et une eau-de-vie de raisin non boisés. Une solution éthanolique à 1 g/L est réalisée pour chacun des composés, puis les différentes concentrations sont obtenues par des dilutions successives ; elles sont identiques dans les deux matrices (tableau 43). Les concentrations utilisées ont été déterminées par une

estimation préalable des teneurs effectivement rencontrées dans les vins. Les ajouts sont réalisés après dilution de la matrice ; le facteur de dilution est pris en compte lors de l'expression des résultats des échantillons. Les injections en LC-FT/MS se font dans le sens des concentrations croissantes, afin d'éviter des éventuels phénomènes de « carry-over ».

**Tableau 43** - Concentrations (C1, C2...C6) en **lyonirésinol** et en **quercotriterpénosides** préparées pour les différents échantillons de la gamme-étalon.

Molécule	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<b>Lyonirésinol</b>	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1 mg/L	2 mg/L
<b>QTT I</b>	2 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 µg/L
<b>QTT III</b>	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L

## F) Validation de la méthode de quantification

Les différents éléments permettant de valider la méthode de quantification sont détaillés ci-dessous pour une matrice « vin blanc ». La même démarche est utilisée pour la matrice « eau-de-vie ».

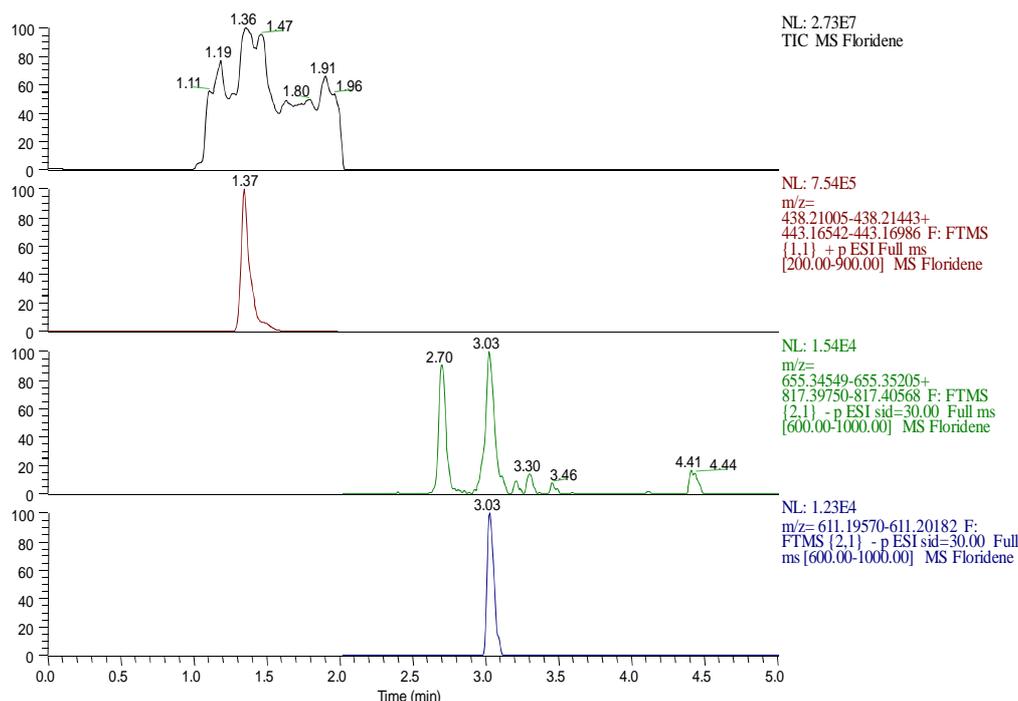
### 1) Conditions générales

La figure 66 montre les différents chromatogrammes obtenus pour l'injection de 10 µL d'un vin blanc des Graves (Clos Floridène 2007), élaboré sous bois de chêne, dilué au demi avec de l'eau et auquel l'étalon interne a été additionné.

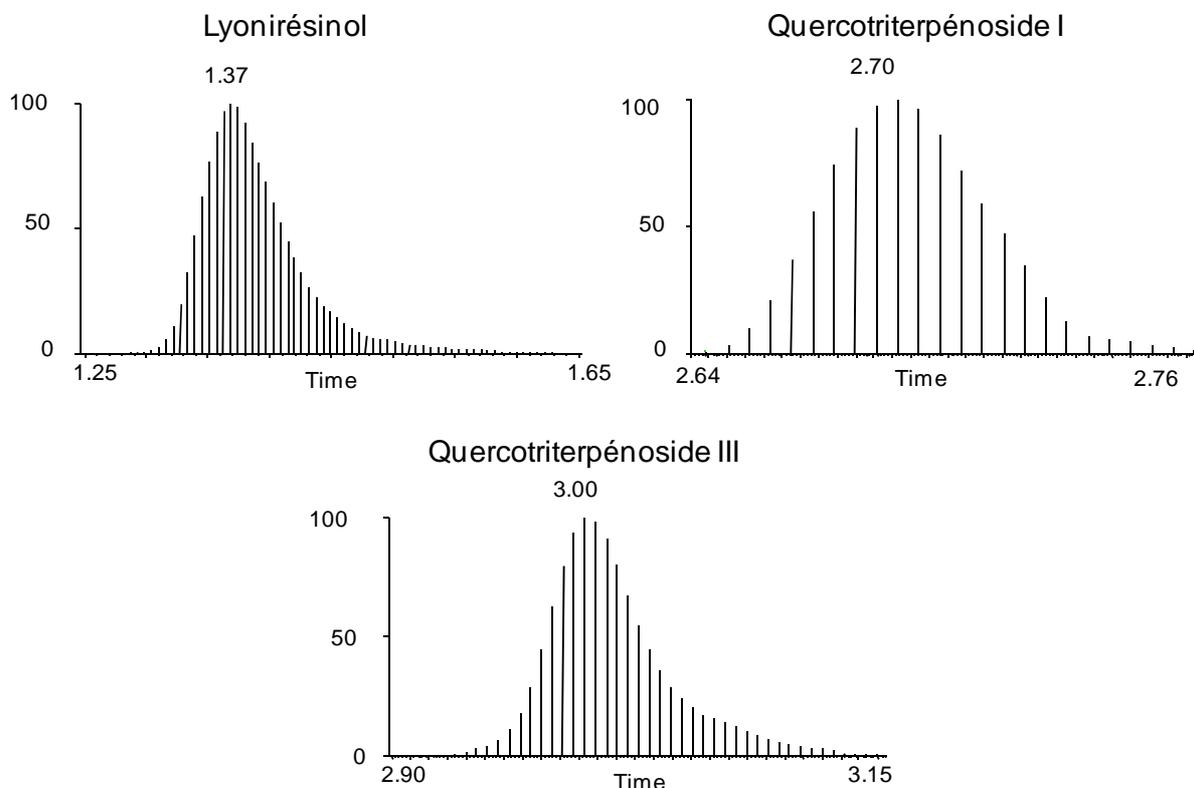
Cette figure montre la bonne séparation des espèces utilisées pour la quantification, elle confirme donc l'efficacité de la méthode chromatographique utilisée.

Par ailleurs, les chromatogrammes de la figure 67, dits « en sticks », permettent d'illustrer le nombre de balayages enregistrés pour les pics d'intérêt lors de l'injection d'un vin blanc non boisé complétement par les trois composés étudiés à hauteur de 20 µg/L.

Nous voyons ainsi que les pics sont constitués d'au moins 20 « scans », appelés « points de quantification ». Ce nombre est compatible avec les exigences de fiabilité liées au développement d'une méthode de dosage.



**Figure 66** - Chromatogrammes obtenus pour un vin blanc boisé.  
De haut en bas : chromatogramme des ions totaux (en noir), chromatogrammes des ions extraits pour la quantification du **lyonirésinol** (en rouge), des **QTT** (en vert), et de l'étalon interne (en bleu).



**Figure 67** - Détail des chromatogrammes « en sticks » obtenus pour le **lyonirésinol** et les **QTT I** et **III** dans un vin blanc non boisé complétement par chaque composé à 20 µg/L

## 2) Sensibilité

Compte tenu de la grande sélectivité de la LC-FT/MS, la notion de rapport signal/bruit n'a pas vraiment de sens pour cette technique. La limite de détection d'une molécule est donc définie comme la concentration la plus basse de cette molécule pour laquelle on observe, au temps de rétention attendu, un signal fiable, répétable et différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions.

Dans le mode opératoire décrit ici, la limite de détection est inférieure à 5 µg/L pour le **lyonirésinol** et à 1 µg/L pour les **quercotriterpénosides I et III**.

La limite de quantification est la concentration la plus basse permettant de répondre aux exigences de fiabilité, de linéarité et de répétabilité imposées dans le cadre de la méthode. Nous avons choisi de suivre les consignes éditées par le département américain de la santé et des services aux personnes (Guidance for Industry, 2001). Les conditions requises pour la limite de quantification sont les suivantes :

- L'intensité du signal doit être au-moins cinq fois supérieure à celle enregistrée pour un « blanc »
- Le signal enregistré doit être identifiable, exact (avec une tolérance de 20 %) et reproductible (avec une tolérance de 20%).

Avec ces niveaux d'exigence, les limites de quantification déterminées dans le cadre de cette méthode sont de 10 µg/L pour le **lyonirésinol** et 1 µg/L pour les **QTT I et III**.

La sensibilité de la méthode est donc suffisante au regard des concentrations observées dans les vins, ce qui est compatible avec l'injection directe des échantillons et leur dilution au demi.

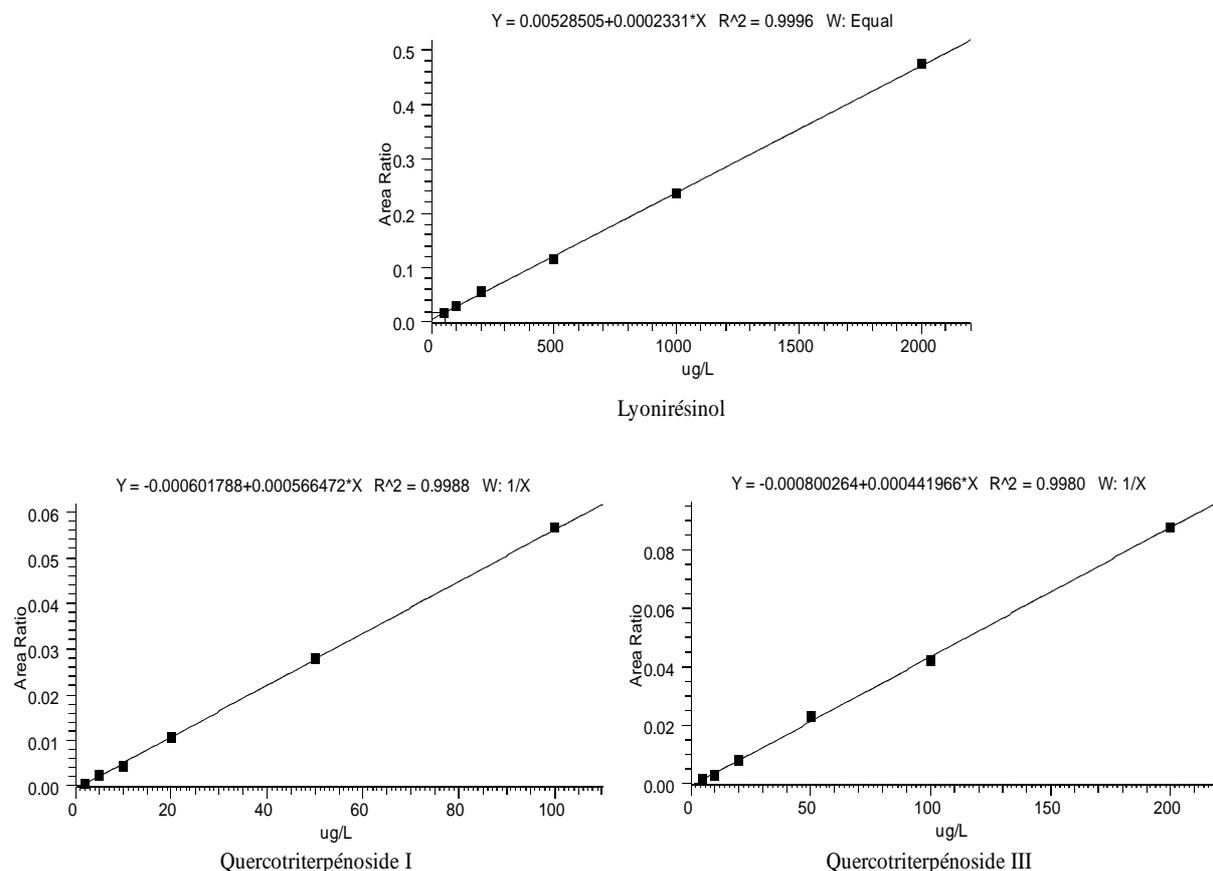
## 3) Linéarité

La linéarité permet de vérifier la proportionnalité entre les rapports (aire du composé) / (aire de l'étalon interne) et les concentrations correspondantes, dans la gamme des teneurs quantifiées. Une régression linéaire est ainsi réalisée à partir des divers points obtenus.

La figure 68 présente les droites d'étalonnage construites à l'aide de l'application Quan Browser du logiciel Xcalibur pour les trois molécules étudiées dans un vin blanc.

Afin d'améliorer la régression linéaire, des pondérations « equal » (tous les points ayant la même importance) et « en 1/X » (les points de basse concentration ayant davantage de poids) ont été respectivement utilisées pour le **lyonirésinol** et les **QTT**. Ces pondérations sont en accord avec le positionnement des concentrations natives dans les vins au sein de la gamme

étalon (les valeurs trouvées dans les vins sont plutôt proches des points C4-C6 pour le lignane et des points C2-C4 pour les QTT). Afin d'améliorer la linéarité de la réponse, le passage par le point (0 ; 0) n'a pas été forcé.



**Figure 68** - Droites de calibration obtenues pour le lyonirésinol et les quercotriterpénoside I et III dans un vin blanc.

Les coefficients de corrélation ( $R^2$ ) obtenus sont tous nettement supérieurs à 0.99, ce qui valide la linéarité du dosage.

#### 4) Exactitude

Pour les différents échantillons de la gamme étalon, l'écart entre la valeur théorique et la valeur obtenue à partir de la droite d'étalonnage est calculé. Ces écarts de concentration sont présentés dans le tableau 44.

**Tableau 44** - Exactitude de la méthode de quantification.

Molécule	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<b>Lyonirésinol</b>	6.5 %	4.0 %	9.5 %	5.6 %	0.6 %	0.4 %
<b>QTT I</b>	3.6 %	9.9 %	5.7 %	2.4 %	1.8 %	5.4 %
<b>QTT III</b>	4.5 %	2.1 %	6.2 %	5.3 %	1.9 %	5.6 %

Les valeurs trouvées sont tout à fait acceptables, elles valident l'exactitude de la méthode.

### 5) Répétabilité

La répétabilité de l'analyse est mesurée en injectant six fois le même échantillon C2 de la gamme étalon.

On obtient des coefficients de répétabilité de 3.7 % pour le **lyonirésinol**, 4 % pour le **QTT I** et 2.6 % pour le **QTT III** (calculés sur la base des concentrations déduites des droites). Lorsque l'on n'utilise pas d'étalon interne, les valeurs de répétabilité augmentent très sensiblement et deviennent supérieures à 10 %.

La quantification développée permet donc une bonne répétabilité, *a fortiori* lorsqu'un étalon interne (la NHDC en l'occurrence) est utilisé.

Par ailleurs, nous avons préparé puis injecté six échantillons C2. Les coefficients obtenus sont légèrement supérieurs (respectivement 5.6 ; 4.2 et 6.1 %). Cela s'explique notamment par les erreurs expérimentales commises au cours de la préparation des échantillons. Toutefois, ces valeurs demeurent largement acceptables.

L'injection de la même gamme à trois reprises consécutives conduit à des réponses très similaires (écarts inférieurs à 10 %). En revanche, d'un jour à l'autre, les résultats obtenus sont sensiblement différents pour les différents points de la gamme (écarts supérieurs à 20 %). Cette faible reproductibilité est une limite fréquemment observée en LC-MS.

Il convient dès lors d'injecter les différents échantillons de la gamme à chaque fois que l'on souhaite doser les trois molécules étudiées dans une série de vins (Guidance for Industry, 2001).

### 6) Ajouts dosés

Afin de tester la précision de la méthode, des ajouts dosés sont effectués dans des vins élaborés au contact du bois. Les modalités et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 45 ci-dessous.

**Tableau 45** - Résultats obtenus lors d'ajouts dosés de **lyonirésinol**, et de **quercotriterpénosides I et III** dans des vins boisés.

Molécule	Concentration initiale	Concentration ajoutée	Concentration retrouvée	Ecart relatif
<b>Lyonirésinol</b>	1.4 mg/L	200 µg/L	1.75 mg/L	8.6 %
	1.9 mg/L	1 mg/L	3.1 mg/L	6.4 %
<b>QTT I</b>	22.3 µg/L	50 µg/L	78.1 µg/L	7.4 %
	47.5 µg/L	100 µg/L	137.3 µg/L	6.9 %
<b>QTT III</b>	28 µg/L	50 µg/L	74.2 µg/L	4.9 %
	240.2 µg/L	100 µg/L	362.3 µg/L	6.1 %

Les ajouts de quantités connues des trois composés sont donc retrouvés avec une précision satisfaisante.

L'étude de ces divers critères permet de valider la méthode de quantification développée, ce qui garantit la fiabilité des résultats obtenus pour les échantillons à doser. Des données similaires sont observables pour la gamme étalon réalisée dans de l'eau-de-vie.

## II) Application à l'analyse des vins blancs

Le **lyonirésinol**, ainsi que les **quercotriterpénosides I et III**, ont été dosés dans trois séries de vins blancs.

### A) Nature et origine des vins analysés

La première série contient cinq vins blancs de Bordeaux, élaborés comme décrit au chapitre 3, paragraphe II.A.1.a. Seule la nature du contenant varie entre les modalités ; une cuve en inox, une cuve en bois de chêne de 50 hL neuve, une cuve similaire usagée (1 an), deux barriques usagées (1 an) et 2 barriques neuves sont utilisées. Les différents vins sont élevés cinq mois dans leur contenant respectif.

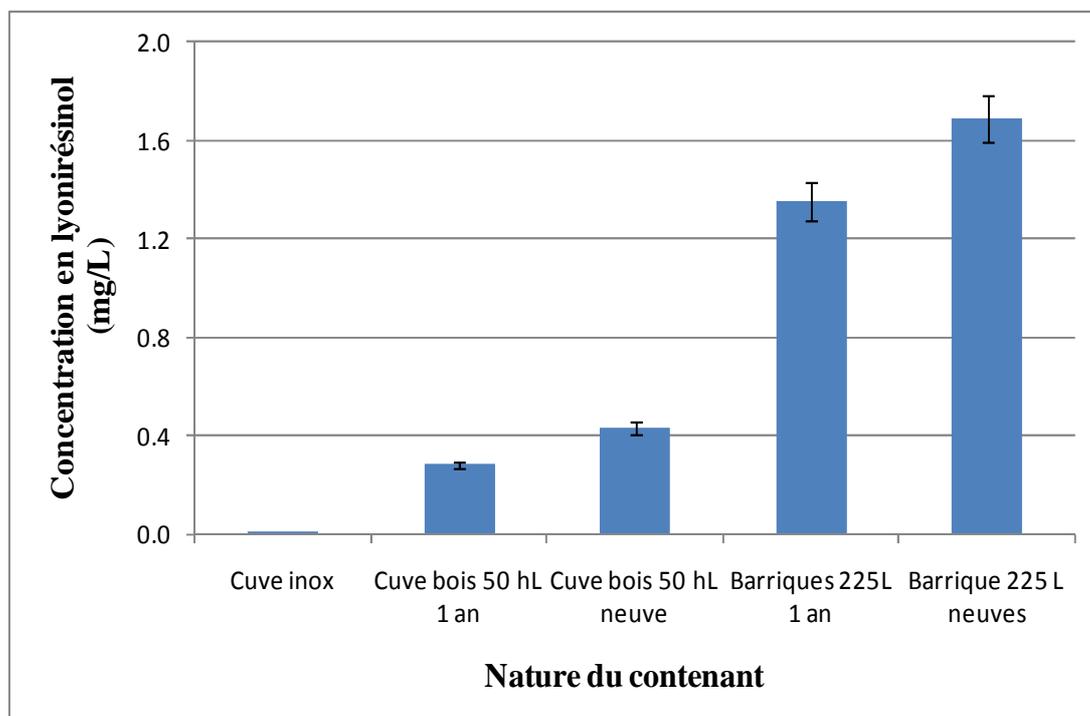
La seconde série est constituée par treize millésimes d'un même cru classé de l'appellation Pessac-Léognan (Graves).

La troisième série rassemble quelques vins d'origines diverses : deux vins issus du cépage Chardonnay, provenant d'un même moût et élaboré pendant six mois dans deux barriques (l'une de 225 L, l'autre de 400 L), plusieurs vins blancs secs du Bordelais et trois crus de la côte de Beaune, élevés pendant 18 mois en barrique (228 L).

## B) Résultats du dosage du **lyonirésinol** dans les vins blancs

### 1) Vins issus de contenants différents

Les résultats sont présentés à la figure 69. Pour les modalités « barriques neuves » et « barriques 1 an », les dosages ont été effectués pour les deux duplicats. Les coefficients de variation sont inférieurs aux coefficients de répétabilité de la méthode. La valeur moyenne est utilisée dans la figure 69.



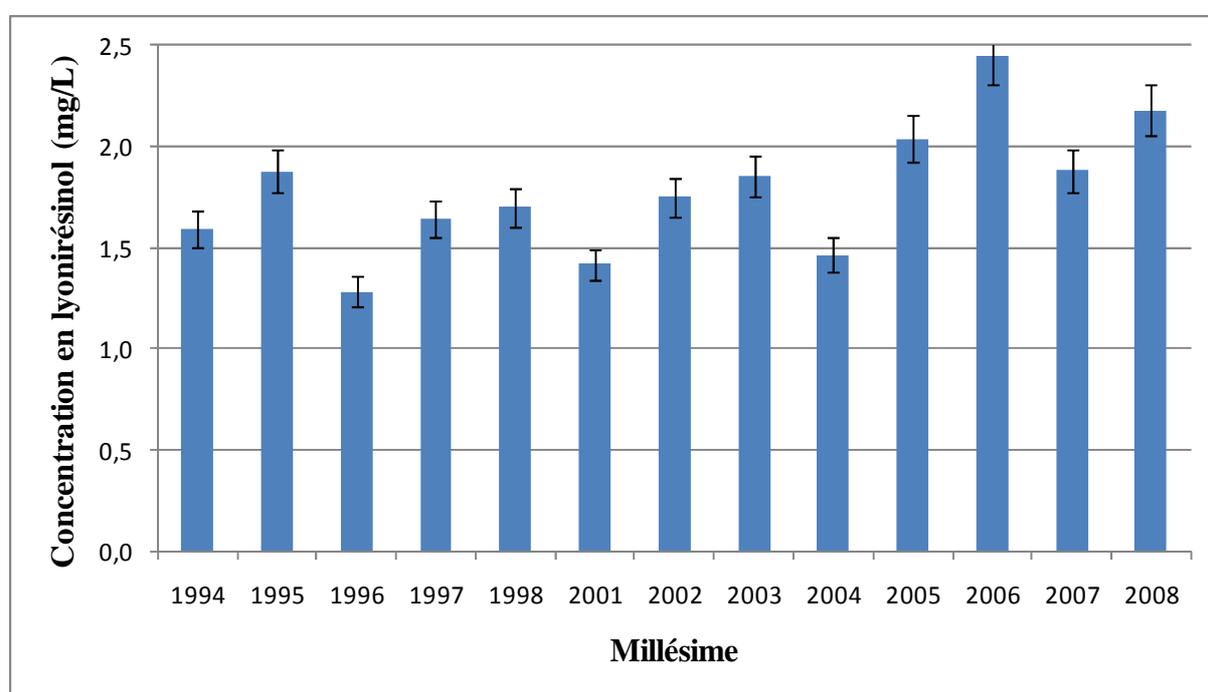
**Figure 69** - Dosage du **lyonirésinol** dans des vins issus de divers contenants.

La figure 69 confirme que le **lyonirésinol** n'est présent que dans les vins élaborés au contact du bois de chêne. La comparaison entre les modalités « barriques » et les modalités « cuves » montre que la concentration en **lyonirésinol** augmente avec le rapport 'surface de contact avec le bois' / 'volume de vin'. Cette concentration diminue également avec l'âge du bois de chêne.

Le seuil de perception du **lyonirésinol** dans les vins blancs a été déterminé à 1.52 mg/L. Après cinq mois d'élevage, le vin élaboré en barrique neuve possède une concentration en **lyonirésinol** supérieure au seuil de perception ; elle en est proche pour la modalité « barriques un an ». En revanche, les valeurs déterminées dans les modalités « cuves » sont nettement inférieures au seuil.

## 2) Vins issus du même cru sur plusieurs millésimes

Le cru classé de Graves étudié a été élevé pendant environ douze mois en barrique (225 L) de bois de chêne, avec en moyenne 25 à 30 % de barriques neuves.



**Figure 70** - Dosage du **lyonirésinol** dans différents millésimes d'un vin blanc du même cru classé de Graves.

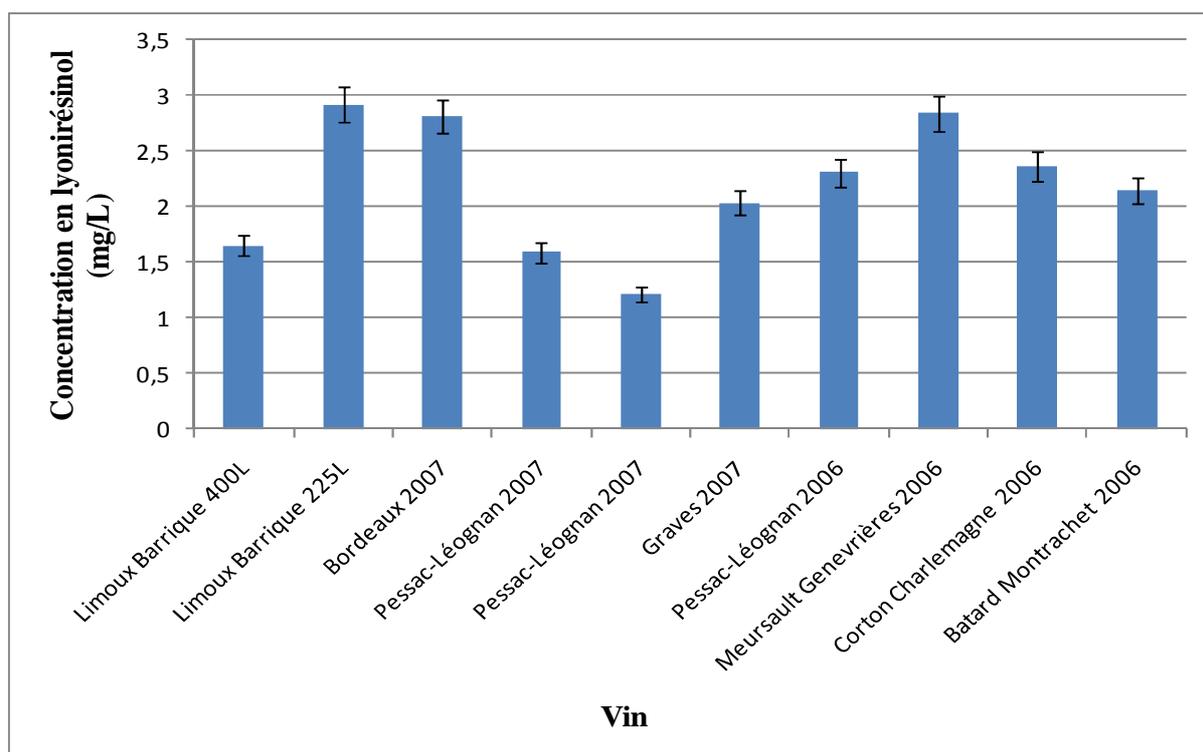
Dix des treize vins analysés possèdent une concentration en **lyonirésinol** supérieure au seuil de perception, avec un maximum de 2.4 mg pour le millésime 2006. Les autres vins en sont proches. Ces valeurs sont proches des estimations effectuées par Moutounet *et al.* (1989). Par ailleurs, nous n'observons pas d'effet notable du vieillissement sur la concentration en lignane.

Les modalités d'élevage mises en œuvre par cette propriété, et notamment le pourcentage de bois neuf utilisé, n'ont guère été modifiées de 1994 à 2005. En revanche, depuis 2005, ce pourcentage a diminué, de 30 à 25 %. Cette diminution n'est pas observée dans les teneurs en **lyonirésinol**.

Par conséquent, si le **lyonirésinol** semble assez stable dans le vin à cette échelle de temps, il n'est pas exclu qu'il soit partiellement dégradé au cours de la conservation en bouteille. Il est également envisageable qu'une variabilité assez importante puisse exister d'une barrique à une autre, et que la quantité en **lyonirésinol** extrait varie ainsi en fonction des millésimes. Des expériences ultérieures devront être réalisées afin d'étudier ces hypothèses en détail.

### 3) Vins d'origines diverses

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 71.



**Figure 71** - Dosage du **lyonirésinol** dans des vins d'origines diverses.

A l'exception d'un Pessac-Léognan 2007, tous les vins analysés possèdent une concentration en **lyonirésinol** supérieure au seuil de perception, avec une valeur maximale de 2.9 mg/L.

Les valeurs calculées pour les deux vins de Limoux sont cohérentes avec les observations du paragraphe II.B.2 ; la concentration la plus élevée étant observée pour la barrique de plus grand rapport 'surface de contact' / 'volume'.

Les trois vins de Bourgogne, élevés pendant une durée supérieure (18 mois), présentent des teneurs en **lyonirésinol** plutôt hautes (supérieures à 2 mg/L) ; elles ne sont toutefois pas les plus importantes de la série.

De façon générale, les concentrations en **lyonirésinol** des vins blancs analysés sont élevées et supérieures au seuil de perception. Cette molécule possède donc un impact organoleptique dans les vins boisés ; elle leur confère de l'amertume rémanente et un caractère dérangent. A notre connaissance, les propriétés gustatives de cette molécule dans les vins n'avaient jamais été décrites.

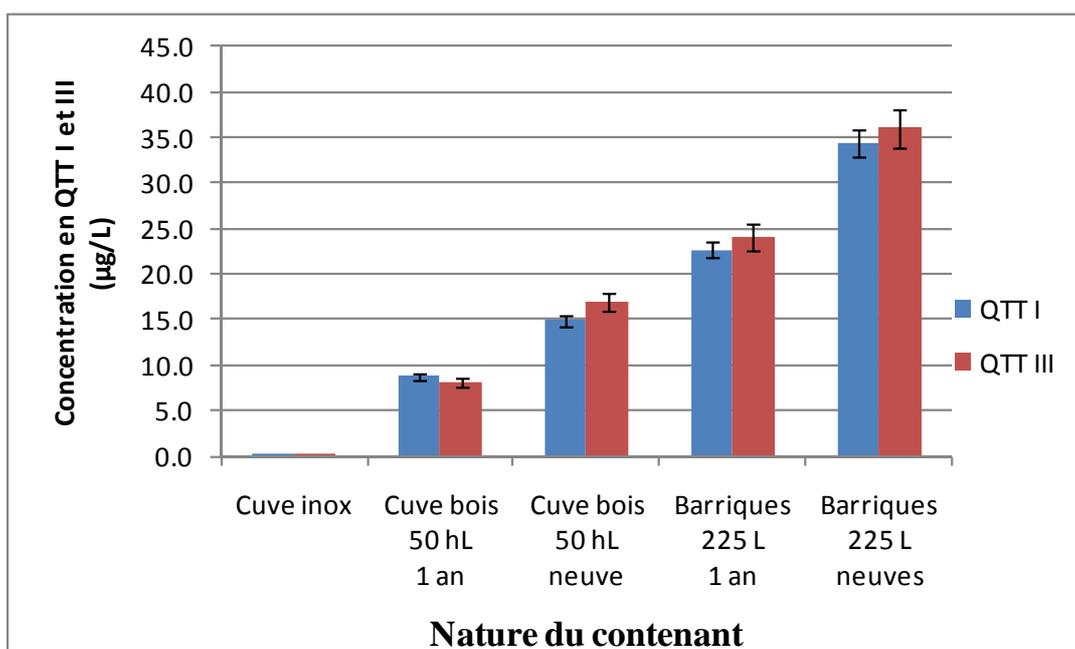
Ce composé est relativement stable dans le temps, certains vins en possèdent des teneurs supra-liminales après 15 ans de vieillissement en bouteille. L'élevage en barrique neuve augmente sensiblement la teneur en **lyonirésinol** des vins. Certains vins blancs sont élevés pendant 12 à 18 mois avec 100 % de barriques neuves. Nous n'avons pas pu analyser de tels vins ici, mais il est probable que les concentrations en lignane y soient élevées.

### C) Résultats du dosage des **quercotriterpénosides I et III** dans les vins blancs

Compte tenu de leur parenté chimique, nous présenterons ensemble les résultats obtenus pour les deux **QTT**.

#### 1) Vins issus de contenants différents

Comme pour le **lyonirésinol**, les coefficients de variation calculés ici pour les deux duplicats des modalités « barriques » sont inférieurs aux coefficients de répétabilité de la méthode. Les résultats sont présentés à la figure 72.



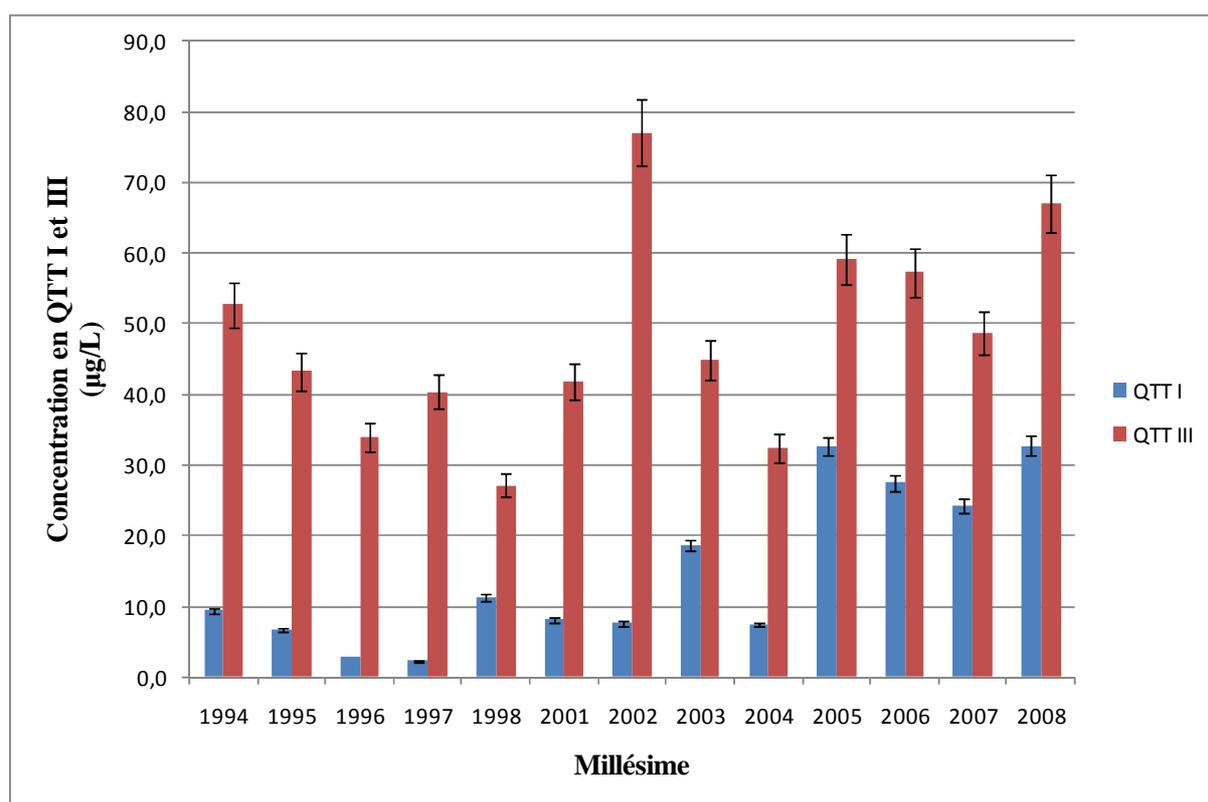
**Figure 72** - Dosage des **quercotriterpénosides I et III** dans des vins élaborés dans divers contenants.

Pour chaque modalité, les concentrations en **QTT I** et **III** sont très proches. Comme pour le **lyonirésinol**, elles augmentent avec le rapport ‘surface de contact’ / ‘volume’ et diminuent avec l’âge du contenant. Ces deux molécules ne sont pas présentes dans la modalité élaborée en cuve en inox.

Les valeurs observées dans ces vins élevés pendant cinq mois sont nettement inférieures au seuil de perception du **QTT I**. Cette molécule ne possède vraisemblablement pas d’impact sensoriel à elle seule. Nous n’avons pas pu déterminer le seuil du **QTT III**.

## 2) Vins issus du même cru sur plusieurs millésimes

Les résultats des différents millésimes du cru classé de Pessac-Léognan sont présentés à la figure 73.



**Figure 73** - Dosage des **quercotriterpénosides I et III** dans différents millésimes d’un vin blanc du même cru classé de Graves.

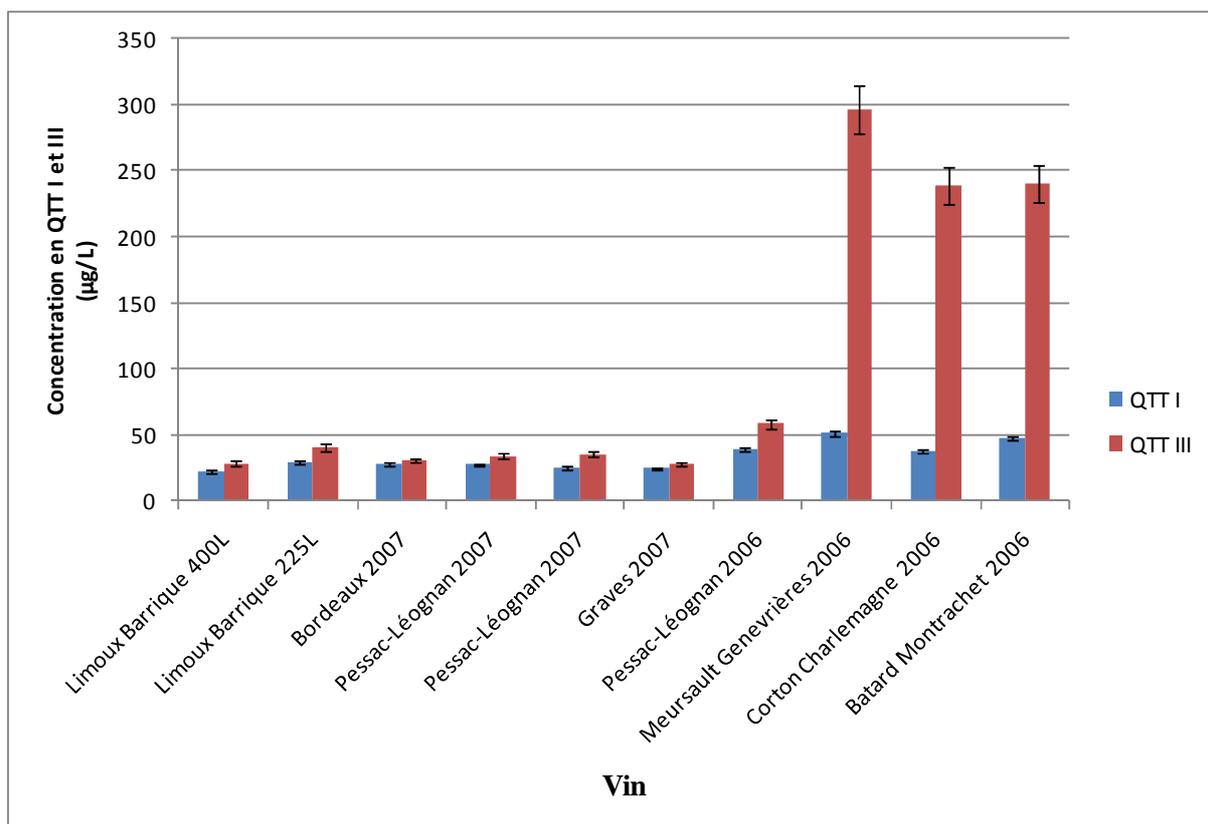
Contrairement aux vins de la série précédente, les concentrations en **QTT III** sont supérieures à celles en **QTT I** pour tous les échantillons analysés. Ces dernières sont toutes inférieures au seuil de perception.

La teneur maximale en **QTT III** est de 80 µg/L pour le millésime 2002.

Par ailleurs, on observe que les concentrations en **QTT I** sont plus faibles pour les millésimes les plus anciens, alors que le vieillissement ne semble pas avoir d'effet sur les teneurs en **QTT III**. Toutefois, nous ne connaissons pas la variabilité pouvant exister d'une barrique à l'autre au sein d'un même millésime ; si cette variabilité est importante, l'écart des concentrations entre les millésimes n'est pas forcément directement lié à des phénomènes de dégradation des molécules avec le temps. Des analyses quantitatives réalisées sur un même vin à différents moments de son vieillissement en bouteille permettraient d'étudier cette hypothèse de façon plus détaillée.

### 3) Vins d'origines diverses

Les résultats obtenus pour les différents vins sont présentés à la figure 74.



**Figure 74** - Dosage du quercotriterpénosides **I** et **III** dans des vins d'origines diverses.

Les résultats obtenus pour les deux vins de Limoux sont cohérents avec ceux décrits pour les vins issus de divers contenants, les concentrations en **QTT I** et **III** étant plus élevées pour le vin provenant d'une barrique de 225 L.

Pour ces derniers vins, comme pour les vins du Bordelais, les concentrations des deux molécules sont proches. L'écart est légèrement plus élevé pour le Pessac-Léognan 2006, mais il est nettement plus important pour les trois vins de Bourgogne (la teneur en **QTT III** atteint quasiment 300 µg/L pour le Meursault Genevrières).

Ces vins ont été élevés pendant 18 mois dans des barriques de bois chêne sessile. Nous ne disposons pas d'informations plus détaillées sur l'origine géographique précise du chêne utilisé. A ce stade, il ne nous est pas possible de préciser si ces teneurs élevées en **QTT III** sont liées à la durée supérieure de l'élevage, à la nature du bois utilisé pour les barriques, ou éventuellement à d'autres paramètres. Des études complémentaires pourront s'attacher à la compréhension de ce résultat. Si le phénomène observé est lié à la durée supérieure de l'élevage, nous pouvons alors imaginer que le **QTT III** possède une cinétique d'extraction assez lente. Les vins élevés en barrique usagée sont donc susceptibles d'en contenir des teneurs non négligeables, ce qui est observé à la figure 72.

Les concentrations en **QTT I** dans les différents vins présentés figure 74 sont également inférieures au seuil de perception de cette molécule. Leur impact individuel semble donc négligeable.

En revanche, des teneurs plus élevées sont enregistrées pour le **QTT III**. Dans le chapitre 8, nous avons vu que certains dégustateurs perçoivent le **QTT I** à 125 µg/L dans un vin blanc. Dans les trois vins de Bourgogne, les concentrations en **QTT III** dépassent nettement cette valeur. Nous ne connaissons pas le seuil de perception de ce composé donc nous ne pouvons conclure sur son impact gustatif.

Si le **QTT I** est retrouvé dans les vins à des concentrations inférieures à son seuil de perception, il n'est pas exclu que les **QTT**, et d'autres molécules de cette famille, influencent la perception gustative des vins boisés, notamment par des phénomènes de synergie. En effet, les interactions entre composés non-volatils sont fréquentes. A titre d'exemple, le glucose et le fructose goûtés séparément en solution à 1 g/L ne sont pas perçus par une majorité de dégustateurs, tandis qu'un mélange de ces deux composés à la même concentration est décrit comme sucré. Dans le chapitre 8, nous avons décrit l'existence d'un tel effet de synergie.

Par ailleurs, nous avons montré que le **QTT I** a un effet de masque de l'amertume développée par le **lyonirésinol**. Il est possible qu'il en soit de même pour d'autres molécules de cette famille.

### III) Application à l'analyse des eaux-de-vie

La méthode de quantification mise au point peut être utilisée pour l'analyse des eaux-de-vie élevées au contact du bois de chêne. Le pourcentage d'éthanol et la durée de vieillissement sous bois sont plus importants dans ce type de matrice ; l'extraction de composés non volatils du chêne y est donc *a priori* favorisée.

#### A) Nature et origine des eaux-de-vie analysées

Deux séries d'eaux-de-vie ont été analysées.

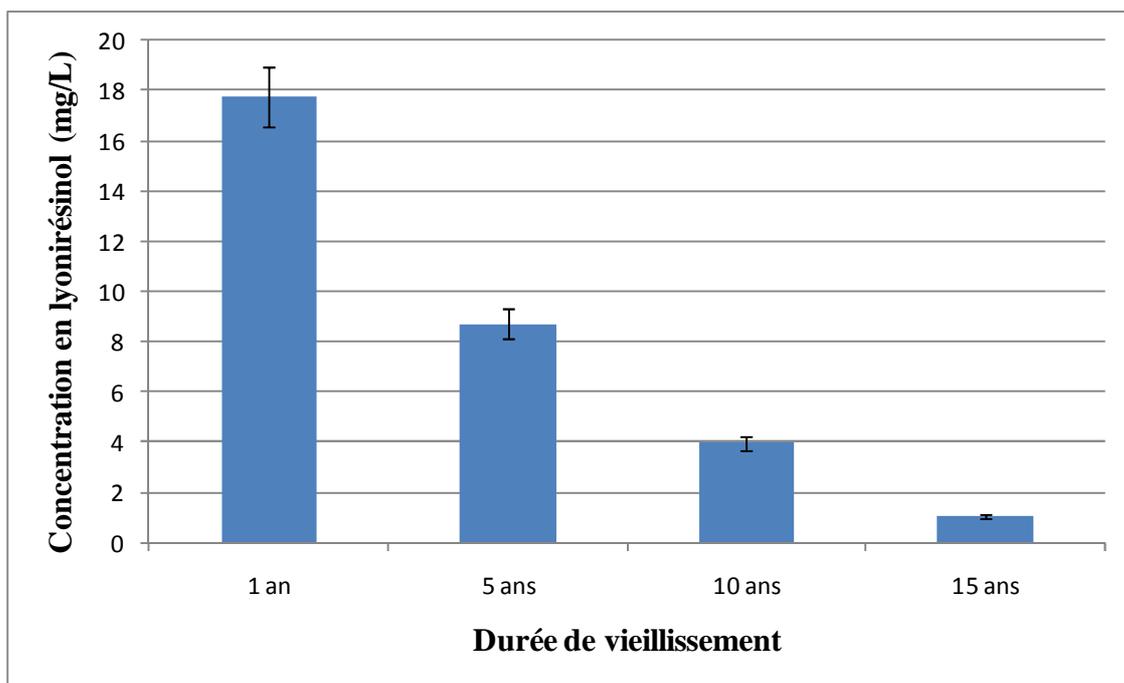
La première est constituée de quatre eaux-de-vie de Cognac, provenant du même producteur. Ces eaux-de-vie ne résultent pas d'un assemblage et ne sont pas commercialisées; elles ont été prélevées dans des lots en cours de maturation et se distinguent par leur durée de vieillissement : 1, 5, 10 et 15 ans. Les contenants utilisés pour l'élevage de ces quatre échantillons sont sensiblement similaires.

La seconde série est formée de plusieurs eaux-de-vie élevées sous bois de chêne, d'origines et de natures différentes (Cognac, Armagnac, Whisky), provenant de divers producteurs. Leur durée de maturation est également variable ; nous indiquerons par défaut la mention présentée sur l'étiquette. Nous ne connaissons pas les détails des modalités d'élevage de ces eaux-de-vie.

#### B) Résultats du dosage du **lyonirésinol** dans les eaux-de-vie

##### 1) Eaux-de-vie mûries pendant des durées différentes

Les résultats pour les quatre échantillons sont présentés à la figure 75. Les concentrations en **lyonirésinol** observées dans ces eaux-de-vie sont très variables (de 1 mg/L environ, pour la modalité « 15 ans », à quasiment 18 mg/L, pour la modalité « 1 an »). Arramon (2001) avaient enregistré des valeurs du même ordre de grandeur, mais globalement plus basses (6.2 mg/L au maximum).



**Figure 75** - Dosage du **lyonirésinol** dans des eaux-de-vie mûries de 1 à 15 ans.

Hormis pour l'eau-de-vie mûrie pendant 15 ans, les teneurs présentées figure 75 sont toutes supérieures au seuil de perception du **lyonirésinol** dans les vins blancs.

Nous n'avons pas déterminé le seuil dans une matrice « eau-de-vie ». Il a été estimé par Arramon (2001), et décrit comme « inférieur à 2.5 mg/L ».

Il sera toutefois important de déterminer cette valeur plus précisément et de façon plus fiable (le panel utilisé par cet auteur n'était constitué que de cinq dégustateurs).

En raison des concentrations présentes, nous pouvons cependant imaginer que le **lyonirésinol** possède un impact gustatif dans au moins trois de ces eaux-de-vie (modalités « 1 an », « 5 ans » et « 10 ans »).

Par ailleurs, les teneurs obtenues ici sont en moyenne supérieures à celles rencontrées dans les vins blancs. Pour la modalité « 1 an », le temps de contact avec le bois de chêne est similaire à celui observé pour la plupart des vins décrits au paragraphe II de ce chapitre. La différence des concentrations peut ainsi notamment s'expliquer par la polarité plus faible de la matrice « eau-de-vie » et ainsi son meilleur pouvoir de solvation vis-à-vis du **lyonirésinol**.

La figure 75 montre que la concentration en **lyonirésinol** diminue notablement avec la durée de maturation des eaux-de-vie. En première lecture, ce résultat apparaît paradoxal, car l'extraction solide/liquide d'un composé augmente généralement avec la durée de contact, surtout lorsque la surface de contact est limitée, ce qui est le cas dans une barrique.

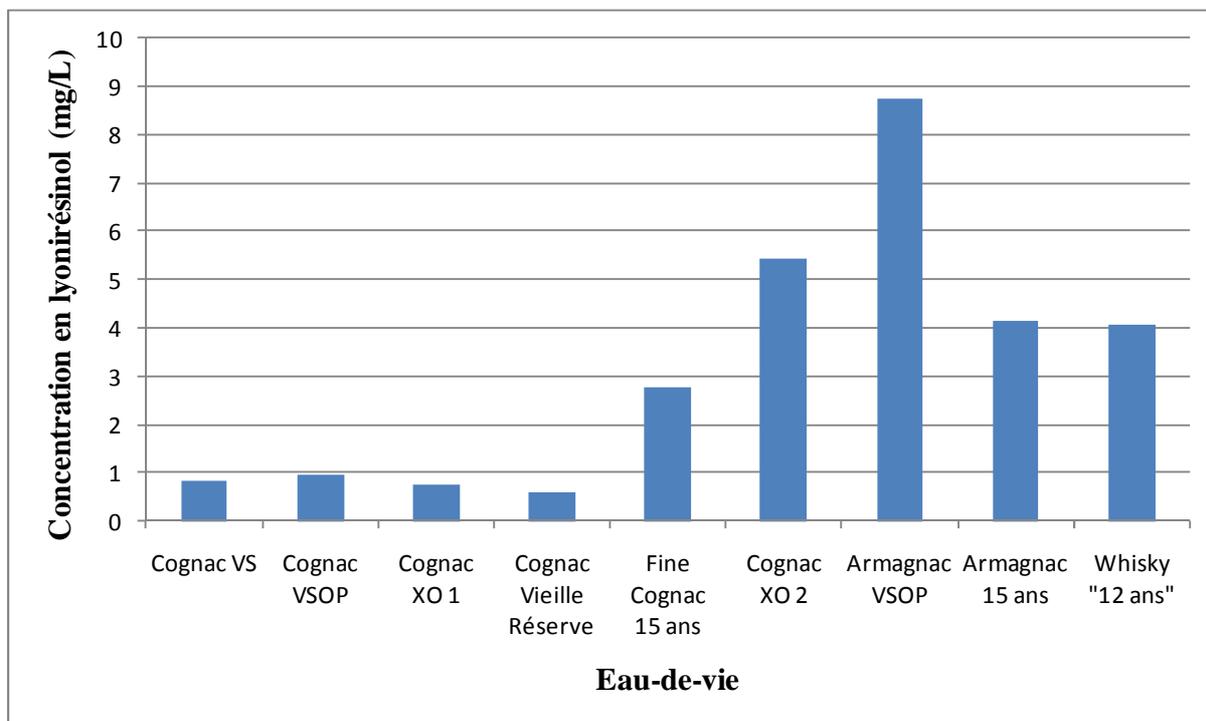
Aussi, il est possible que le **lyonirésinol** soit dans un premier temps extrait du bois de chêne, puis dégradé au cours du vieillissement sous bois. Ce phénomène pourrait en partie expliquer l'importance de la maturation en barrique sur la qualité des eaux-de-vie, et notamment le gain de douceur ainsi que la diminution de la dureté observés avec le vieillissement. Nous avons vu précédemment que le **lyonirésinol** était relativement stable avec le temps de conservation en bouteille. Dans l'hypothèse d'une dégradation de ce composé au cours du vieillissement en barrique des eaux-de-vie, il est donc possible qu'elle soit associée à des phénomènes oxydatifs.

Toutefois, nous ne possédons aucune donnée concernant les concentrations en **lyonirésinol** de ces eaux-de-vie après une même durée de vieillissement (un an) ; elles permettraient une comparaison plus rigoureuse. Les différences observées pourraient par exemple s'expliquer par une grande variabilité de la quantité de **lyonirésinol** extractible dans les différentes barriques.

La répétition de cette observation ainsi que l'étude cinétique de la teneur en lignane sont donc nécessaires pour confirmer cette tendance et étudier l'hypothèse d'une dégradation avec le temps de maturation.

## 2) Eaux-de-vie diverses

Les résultats sont présentés à la figure 76.



**Figure 76** - Dosage du **lyonirésinol** dans diverses eaux-de-vie.

Les résultats présentés à la figure présentent une variabilité importante de la teneur en **lyonirésinol** dans les eaux-de-vie. Les valeurs observées sont du même ordre de grandeur que celles décrites plus haut. Les quatre premiers Cognac analysés proviennent du même producteur ; ils ont été vieillis en barrique pendant des durées croissantes. Les valeurs observées pour ces quatre échantillons sont étonnamment basses. Nous ne connaissons pas les modalités d'élaboration de ces Cognac, aussi il nous est difficile de discuter les résultats obtenus. Toutefois, les échantillons analysés proviennent de bouteilles ouvertes depuis plusieurs mois et conservées à la lumière. Il sera intéressant d'étudier l'évolution des concentrations en **lyonirésinol** dans ces conditions de conservation.

Par ailleurs, les valeurs observées pour l'Armagnac VSOP (ayant subi 5 à 7 années de vieillissement en barrique) et l'Armagnac mûri pendant 15 ans confirment les résultats du paragraphe précédent, montrant une diminution du **lyonirésinol** avec la durée de vieillissement. Ces valeurs sont en outre comparables à celles obtenues pour les Cognac de la figure 75 pour des durées de vieillissement comparables.

De la même façon, la concentration en **lyonirésinol** du whisky vieilli 12 ans est d'environ 4 mg/L, c'est-à-dire quasi égale à celle du Cognac mûri 10 ans présenté à la figure 75.

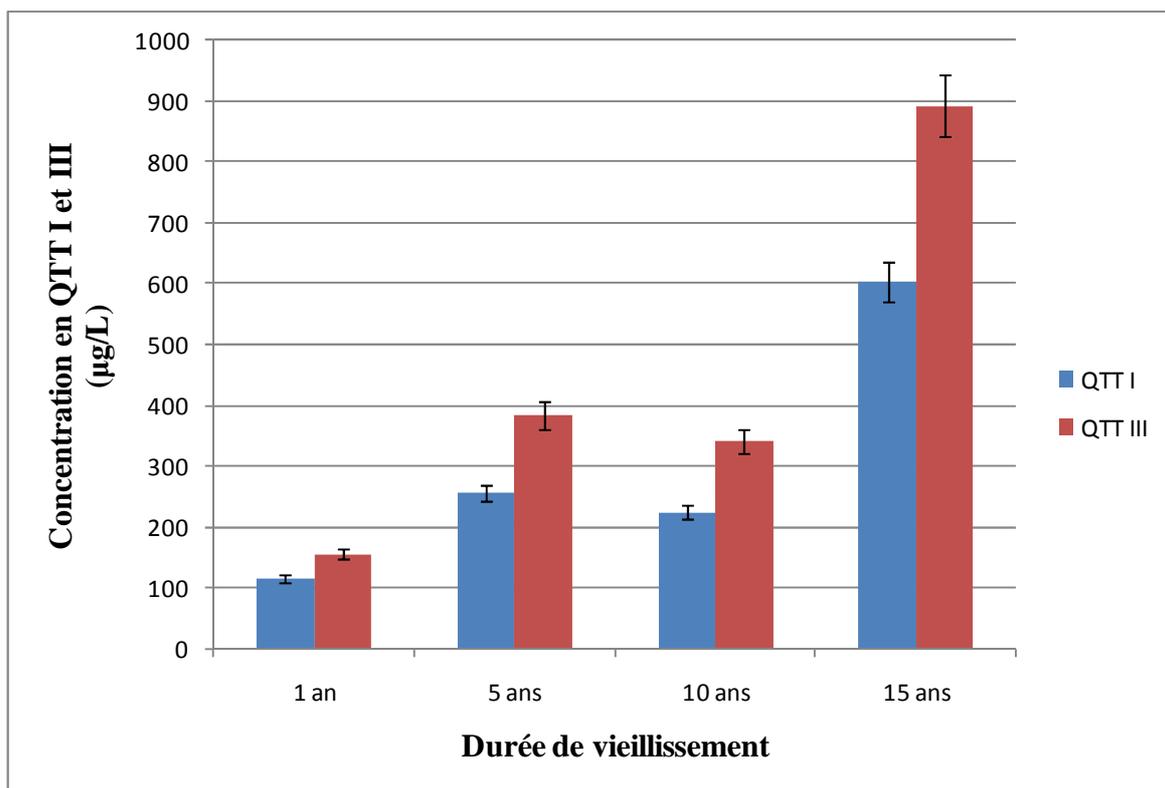
Nous observons donc une intensité moyenne mais également une variabilité de la concentration en **lyonirésinol** plus élevées dans les eaux-de-vie que dans les vins.

### C) Résultats du dosage des **quercotriterpénosides I et III** dans les eaux-de-vie

#### 1) Eaux-de-vie mûries pendant des durées différentes

La figure 77 présente les résultats obtenus.

Les teneurs en **quercotriterpénosides I et III** sont nettement plus élevées dans ces eaux-de-vie que dans les vins blancs analysés précédemment. La polarité de ces triterpénoïdes est vraisemblablement à l'origine de cette différence ; ils sont davantage extraits lorsque le pourcentage en éthanol du solvant augmente. Nous pouvons donc imaginer que le degré alcoolique influence également l'extraction de ces composés dans les vins, les vins les plus alcoolisés possédant en principe un pouvoir extracteur supérieur.



**Figure 77** - Dosage des **quercotriterpénosides I et III** dans des eaux-de-vie maturées de 1 à 15 ans.

De façon générale, les concentrations en **QTT I** et **III** augmentent avec la durée de vieillissement. Les valeurs de la modalité « 10 ans » sont toutefois légèrement moins élevées, ce résultat pouvant être lié à une variabilité « inter-barriques ».

La cinétique d'extraction des **QTT I** et **III** semble plus lente que pour le **lyonirésinol**, mais ces composés apparaissent en revanche plus stables au cours de la maturation en barrique. L'utilisation de barriques usagées est par conséquent susceptible de permettre une libération conséquente de **QTT**. Ici encore, la comparaison entre les modalités doit toutefois être complétée afin de valider ces hypothèses.

Les concentrations observées atteignent respectivement 600 et quasiment 900 µg/L pour les **QTT I** et **III** dans l'eau-de-vie élevée pendant 15 ans. Les seuils de perception de ces composés dans l'eau-de-vie sont inconnus, mais nous remarquons que les valeurs obtenues sont supérieures au seuil de perception du **QTT I** dans les vins blancs. Nous pouvons donc imaginer que les **QTT I** et **III** ont un impact gustatif dans cet échantillon. En outre, la somme de ces deux composés est supérieure à 500 µg/L pour les trois eaux-de-vie les plus âgées.

Par ailleurs, le **QTT III** est le triterpène galloylé majoritaire pour les quatre échantillons analysés. L'écart de concentration avec le **QTT I** tend à augmenter légèrement

avec la durée de vieillissement. Cette observation rejoint les résultats obtenus pour les vins, les élevages longs semblant favoriser davantage l'extraction du **QTT III**.

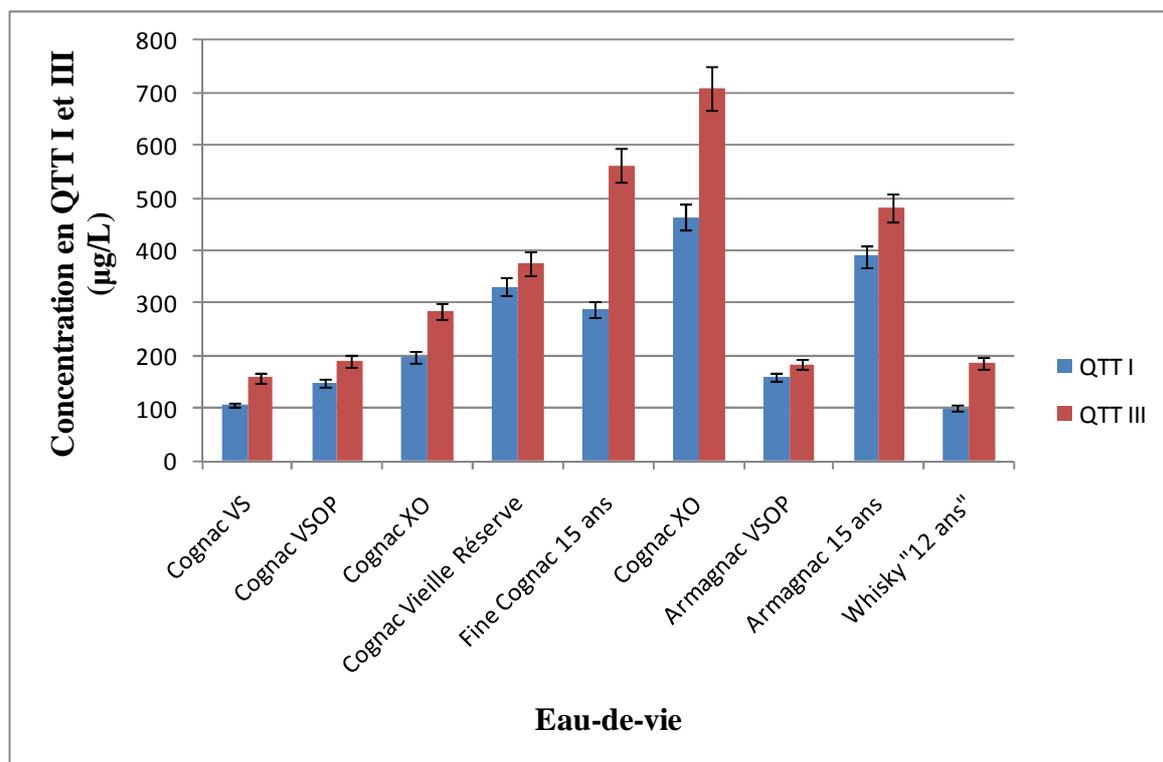
Ainsi, la longue maturation des eaux-de-vie en barrique semble être associée à une augmentation de la teneur en composés à saveur sucrée (les **QTT**) et, en parallèle, à une diminution de la concentration d'une molécule amère (le **lyonirésinol**). Ces observations sont cohérentes avec le gain de sucrosité perceptible lorsque la durée de maturation des eaux-de-vie augmente.

L'amélioration de la qualité des eaux-de-vie au cours de leur maturation en barrique de bois de chêne est bien connue. Les données obtenues ici apportent donc un élément d'interprétation de ce phénomène.

## 2) Eaux-de-vie diverses

La figure 78 présente les résultats d'analyses complémentaires, effectuées dans différentes eaux-de-vie.

De façon générale, les concentrations observées sont de l'ordre de quelques centaines de microgrammes par litre (plus de 700 µg/L pour le second Cognac XO).



**Figure 78** - Dosage des **quercotriterpénosides I et III** dans diverses eaux-de-vie.

Les quatre premiers échantillons correspondent à des Cognac provenant d'un même producteur, et dont la durée de vieillissement augmente de « VS » à « Vieille Réserve ». Les résultats obtenus confirment ceux présentés dans le paragraphe précédent, la concentration en **QTT** augmentant avec la durée de maturation. La même observation peut être faite pour les deux Armagnac.

Les teneurs enregistrées pour le Whisky semblent relativement basses au regard de la durée de maturation indiquée sur l'étiquette (12 ans) et de la concentration en **lyonirésinol** présentée à la figure 76. Toutefois, nous ne connaissons pas les modalités de vieillissement exactes de cette eau-de-vie. Il est possible que la nature du bois utilisé soit à l'origine de ces différences.

De façon générale, les teneurs en **QTT** sont nettement plus importantes dans les eaux-de-vie élevées sous bois que dans les vins. Leurs concentrations augmentent nettement avec la durée de maturation, au même titre que la perception de la saveur sucrée. Il est probable que ces molécules aient un impact gustatif dans les spiritueux.

## Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté le développement d'une méthode de dosage du **lyonirésinol** et des **quercotriterpénosides I et III**.

L'originalité et l'efficacité de cette méthode tiennent à l'utilisation de la LC-FT/MS. En effet, les analyses sont effectuées en mode « full scan », les performances de la LC-FT/MS en termes de précision de la mesure de masse garantissant leur sélectivité.

Nous avons validé la méthode mise au point, à travers l'étude de plusieurs paramètres comme la sensibilité, la linéarité et la répétabilité. Les résultats obtenus sont tout à fait satisfaisants et permettent l'application de cette méthode au dosage des trois molécules d'intérêt dans des vins blancs et des eaux-de-vie.

Le **lyonirésinol** est présent dans les vins et les eaux-de-vie boisés, à des concentrations allant respectivement de 1 à 3 mg/L et de 1 à 18 mg/L environ. Ce composé possède donc un impact organoleptique dans la plupart des échantillons analysés ; il contribue à leur amertume. Son rôle gustatif dans les vins n'avait jamais été établi.

Le **lyonirésinol** est davantage libéré par les barriques que par les cuves, et les quantités extraites diminuent avec l'âge des barriques. Cette molécule est relativement stable dans le vin au cours du vieillissement en bouteille, tandis que ses concentrations diminuent nettement au cours de la maturation des eaux-de-vie sous bois de chêne. Il est possible qu'il subisse des réactions de dégradation.

Les **quercotriterpénosides I** et **III** sont également détectés dans les vins et les eaux-de-vie, à des teneurs variables (de l'ordre de quelques dizaines à quasiment 300 µg/L pour le **QTT III** dans les vins, et jusqu'à 900 µg/L dans les eaux-de-vie). Compte tenu des concentrations observées, il est peu probable que le **QTT I** participe directement au goût des vins. Toutefois, une grande hétérogénéité de sensibilité est observée entre les dégustateurs, certains percevant le **QTT I** à 125 µg/L. Le seuil du **QTT III** n'est pas connu ; toutefois nous pouvons envisager qu'il contribue à l'augmentation de la douceur de certains vins, et a fortiori des eaux-de-vie. L'extraction de ces deux composés augmente visiblement avec le degré alcoolique et la durée de contact entre le liquide et le bois de chêne. En outre, ils sont capables de masquer l'amertume du **lyonirésinol**, ce qui limite l'effet préjudiciable de ce lignane sur le goût des vins élevés sous bois de chêne.

En ce qui concerne les eaux-de-vie, il est notable que la quantité de **lyonirésinol** diminue avec la maturation alors que celle des **QTT** augmente. Ces évolutions inversées de composés aux saveurs antagonistes contribuent vraisemblablement au gain de douceur des eaux-de-vie observé lors du vieillissement en barrique. Les données analytiques enregistrées dans ce chapitre permettent donc d'interpréter en partie un phénomène empiriquement constaté.



## CONCLUSION GÉNÉRALE

La qualité des vins, c'est-à-dire l'agrément qu'ils procurent au dégustateur, dépend de la complexité et de l'harmonie de leurs odeurs et de leurs goûts. La représentation de cette qualité dans la conscience du dégustateur se construit par la perception sensorielle des nombreux composés volatils et non volatils du vin, suivie de l'intégration neurophysiologique et cognitive des stimuli perçus.

La saveur douce, évoquant celle du sucre, caractérise paradoxalement l'équilibre gustatif des vins secs, et plus particulièrement des grands vins. Elle atténue l'acidité, l'amertume ou bien encore l'astringence, générées par certaines molécules du vin comme les acides organiques ou les polyphénols. Toutefois, les déterminants moléculaires de cette « *sucrosité sans sucre* » n'ont jamais été clairement caractérisés jusqu'ici.

L'éthanol et le glycérol, produits par la levure au cours de la fermentation alcoolique des moûts de raisin, possèdent un goût sucré. Cependant, nous avons montré que leur impact sur la sucrosité des vins secs est limité et que les faibles variations de leurs concentrations ne permettent pas d'expliquer des différences sensibles de l'intensité du goût sucré. Ces résultats invalident la théorie de leur contribution gustative déterminante et suggèrent l'existence de molécules édulcorantes dans les vins secs.

Notre travail s'est intéressé à la contribution édulcorante éventuelle des lies de levures et du bois de chêne lors de l'élaboration du vin.

Aussi, nous avons étudié l'impact gustatif des lies de levures et démontré leur rôle dans la « *sucrosité sans sucre* » des vins rouges. L'utilisation couplée de techniques sensorielles et biomoléculaires a permis d'établir l'implication d'une protéine de choc thermique de *Saccharomyces cerevisiae* dans ce phénomène : Hsp12. L'expression du gène HSP12 est notamment régulée par la température ainsi que par la concentration en éthanol et en glycérol. De nombreuses applications œnologiques sont donc envisageables. A notre connaissance, il s'agit de la première mise en évidence d'un lien entre une protéine de la levure et un caractère gustatif des vins.

Par ailleurs, nous avons montré que l'élaboration des vins sous bois de chêne participe à une augmentation de leur sucrosité et que cette modification organoleptique n'est pas imputable aux composés volatils extraits du bois.

Afin d'étudier la contribution des molécules non-volatiles du bois de chêne à la saveur sucrée des vins, nous avons adopté une démarche inductive et mis en place une méthode de purification basée sur la dégustation. L'utilisation du couplage Chromatographie de Partage Centrifuge – Gustatométrie (CPC-G) a permis d'isoler une fraction douce, comportant quatre molécules principales. Leur purification a été réalisée par CLHP.

La spectrométrie de masse à transformée de Fourier et la résonance magnétique nucléaire ont été utilisées pour la caractérisation structurale. Nous avons ainsi identifié les quatre molécules purifiées. Il s'agit d'un lignane nommé **lyonirésinol**, d'un dérivé galloylé de l'acide (3*S*,4*S*)-4- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque (**P-WL**) et de deux triterpénoïdes galloylés et glycosylés, dérivés de l'acide oléanolique. Les deux premiers composés ont déjà été observés dans le bois de chêne, le second étant le précurseur d'une molécule volatile d'impact : la whisky lactone. En revanche, les deux triterpènes n'avaient jamais été identifiés dans la nature. Nous les avons nommés **quercotriterpénosides I et II**. Ils constituent le premier exemple de triterpènes galloylés et glycosylés identifiés dans le bois de chêne.

Les performances de la LC-FT/MS ont permis de repérer des isomères et des dérivés diglycosylés de ces deux molécules, puis de guider la purification des plus abondants d'entre eux. Cette démarche a conduit à l'identification de deux nouvelles molécules, nommées **quercotriterpénosides III et IV**.

Ces différents composés ont été isolés soit sur la base de leurs propriétés gustatives en mélange, soit en fonction de leur composition chimique. Leur purification a permis la caractérisation sensorielle de quatre d'entre eux. Le **lyonirésinol** possède un goût amer, le **P-WL** n'a pas de saveur particulière, tandis que les **QTT I et III** génèrent une perception douce et augmentent la sucrosité d'un vin auquel ils sont ajoutés. Les seuils de perception du lignane et du **QTT I** dans un vin blanc ont été respectivement établis à 1.52 mg/L et 590  $\mu$ g/L, ce qui constitue des valeurs relativement basses pour des composés non volatils.

Par ailleurs, le développement d'une méthode de dosage en LC-FT/MS a permis de quantifier les molécules identifiées dans divers vins et eaux-de-vie. Le **lyonirésinol** est généralement présent dans les vins blancs à des concentrations supérieures à son seuil de perception, et il semble stable au cours du vieillissement en bouteille. Ce composé participe à la saveur des vins blancs, dans le registre de l'amertume.

Dans les eaux-de-vie, les teneurs en ce composé présentent une variabilité supérieure ; elles diminuent considérablement avec la durée de maturation en barrique, ce qui est cohérent avec l'amélioration gustative observée.

Les concentrations en **QTT I** et **III** sont nettement plus basses dans les vins blancs. Elles ne dépassent pas le seuil de perception du **QTT I** et ne possèdent donc pas d'impact direct pour la majorité des dégustateurs.

Cependant, il est fortement envisageable que ces composés (et d'autres appartenant à la même famille) puissent interagir et exercer des effets synergiques conduisant à une augmentation de la sucrosité dans les vins. En outre, nous avons montré qu'ils peuvent masquer l'amertume conférée par le **lyonirésinol**. Il n'est pas exclu qu'ils agissent de même sur d'autres composés du vin à saveur amère.

Par ailleurs, nous avons observé que les **QTT** semblent posséder une cinétique d'extraction assez lente puisque les barriques usagées peuvent en céder aux vins des quantités non négligeables.

Les teneurs observées dans les eaux-de-vie sont nettement supérieures à celles rencontrées dans les vins ; elles augmentent avec la durée de vieillissement en barrique. Il est vraisemblable qu'ils possèdent un impact gustatif direct dans les spiritueux élevés sous bois pendant une durée importante. Pour le confirmer, nous devons déterminer les seuils de perception des **QTT** dans cette matrice.

La caractérisation sensorielle des autres triterpènes identifiés doit être poursuivie ; elle permettrait notamment d'étudier les relations entre structure chimique et activité gustative.

En outre, la variabilité des concentrations de ces différentes molécules (**lyonirésinol** et **QTT**) d'une barrique à l'autre, ainsi que l'effet de divers paramètres de tonnellerie méritent certainement une étude approfondie pouvant conduire à des applications pratiques importantes.

Au cours de ce travail, nous avons ainsi identifié plusieurs molécules appartenant à une famille chimique encore inconnue dans le bois de chêne. D'autres composés de structure similaire semblent exister dans les vins boisés. Leurs caractérisations structurale et gustative constituent un enjeu majeur pour la poursuite de ce travail ; il est en effet possible que certaines molécules présentent des seuils de perception plus bas et possèdent de fait un impact organoleptique notable.

En outre, l'identification d'une série de molécules de la même famille permet d'envisager l'étude des relations structure/goût. L'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) encéphalique permettrait d'étudier les stimulations neuro-sensorielles exercées par les différentes molécules purifiées. Il nous semble notamment intéressant de déterminer quelles sont les zones stimulées par les **QTT**, en comparaison avec d'autres

molécules douces (édulcorants), ainsi que l'origine de l'effet de masque exercé par ces composés sur la perception du **lyonirésinol**. Cette perspective plus fondamentale constitue un aspect attrayant d'un point de vue scientifique.

Les peptides provenant de la protéine Hsp12 et responsables du gain de sucrosité au cours de l'autolyse des levures devront également être caractérisés de façon approfondie. Leur quantification permettra d'évaluer précisément l'influence de la souche de levures et de divers paramètres de vinification sur l'augmentation de la sucrosité des vins au cours de leur élaboration.

De façon plus générale, ce travail constitue une première approche visant à la compréhension des bases moléculaires de la saveur sucrée dans les vins secs. Nous nous sommes intéressés à deux aspects, inspirés par des observations empiriques évidentes : le rôle des lies de levure et de l'élevage sous bois de chêne.

Pour autant, l'existence de variations importantes de sucrosité en fonction des terroirs et des cépages nous suggère l'existence de composés non glycosidiques provenant du raisin et possédant une saveur sucrée. Ces molécules permettraient d'expliquer des différences nettes de sucrosité perçues entre des vins pourtant vinifiés et élevés de la même façon ; leur concentration est vraisemblablement fortement dépendante du terroir. Ils sont l'apanage des grands vins et leur étude constitue un défi passionnant.

## Références bibliographiques

### A

- Agrawal, P. K. & Jain, D. C. (1992).**  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **24**, 1-90.
- Ahmad, V. U., Zubair, M., Abbasi, M. A., Rashid, M. A., Rasool, N., Khan, S. N., Choudhary, M. I. & Kousar, F. (2005).** Structure determination of bioactive galloyl derivatives by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **43**, 486-488.
- Alcaide-Hidalgo, J. M., Pueyo, E., Polo, M. C. & Martínez-Rodríguez, A. J. (2007).** Bioactive peptides released from *Saccharomyces cerevisiae* under accelerated autolysis in a wine model system. *Journal of Food Science* **72**.
- Aristote.** De Anima. Livre II, chapitre 10, 422b.
- Arnold, W. N. (1981).** Autolysis. In *Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure*. New York: CRC.
- Arramon, G. (2001).** *Les triterpènes et lignanes des bois de chêne européen Quercus robur L. et Quercus petraea Liebl. Quantification et apports qualitatifs aux eaux de vie d'Armagnac.*, Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Arramon, G., Saucier, C., Colombani, D. & Glories, Y. (2002).** Identification of triterpene saponins in *Quercus robur* L. *Q. petraea* Liebl. heartwood by LC-ESI/MS and NMR. *Phytochemical Analysis* **13**, 305-310.
- Arramon, G., Saucier, C., Tijou, S. & Glories, Y. (2003).** Estimation of triterpenes in wines, spirits, and oak heartwoods by LC-MS. *LC-GC North America* **21**, 910-918.
- Aussenac, J., Chassagne, D., Claparols, C., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M. & Charpentier, C. (2001).** Purification method for the isolation of monophosphate nucleotides from Champagne wine and their identification by mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **907**, 155-164.
- Azhar Ul, H., Malik, A., Khan, M. T. H., Anwar Ul, H., Khan, S. B., Ahmad, A. & Choudhary, M. I. (2006).** Tyrosinase inhibitory lignans from the methanol extract of the roots of *Vitex negundo* Linn. and their structure-activity relationship. *Phytomedicine* **13**, 255-260.

### B

- Bachmanov, A. A., Li, X., Reed, D. R., Ohmen, J. D., Li, S., Chen, Z., Tordoff, M. G., De Jong, P. J., Wu, C. & other authors (2001).** Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus. *Chemical Senses* **26**, 925-933.

- Bate-Smith, E. C. (1968).** Odour qualities: a glossary of usage. *The British journal of psychology* **59**, 231-252.
- Bax, A. & Summers, M. F. (1986).**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *Journal of the American Chemical Society* **108**, 2093-2094.
- Berg, H. W., Filipello, F., Hinreiner, E. & Webb, A. D. (1955).** Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. 1. Sweetness: The effect of ethyl alcohol, organic acids and tannin. *Food Technology* **9**, 138-140.
- Blizard, D. A. (2007).** Sweet and bitter taste of ethanol in C57BL/6J and DBA2/J mouse strains. *Behavior Genetics* **37**, 146-159.
- Bodenhausen, G. & Ruben, D. J. (1980).** Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **69**, 185-189.
- Boidron, J. N., Chatonnet, P. & Pons, M. (1988).** Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaiss Vigne Vin* **22**, 275-294.
- Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J. M., Warren, C. D. & Jeanloz, R. W. (1984).** Structure determination of a tetrasaccharide: Transient nuclear overhauser effects in the rotating frame. *Journal of the American Chemical Society* **106**, 811-813.
- Brillat-Savarin, J. A. (1825).** *Physiologie du goût ou méditations de gastronomie transcendante*. Paris: Sauteleat.
- Brochet, F. & Dubourdiou, D. (2001).** Wine descriptive language supports cognitive specificity of chemical senses. *Brain and Language* **77**, 187-196.

## C

- Cadahía, E., Varea, S., Muñoz, L., Fernández de Simón, B. & García-Vallejo, M. C. (2001).** Evolution of ellagitannins in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3677-3684.
- Cala, O., Fabre, S., Fouquet, E., Dufourc, E. J. & Pianet, I. (2010).** NMR of human saliva protein/wine tannin complexes. Towards deciphering astringency with physico-chemical tools. *Comptes Rendus Chimie* **13**, 449-452.
- Cardello, A. V., Ball, D. H. & Alabran, D. M. (1984).** The taste, odor and hedonic quality of polyglycerols. *Chemical Senses* **9**, 285-301.
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E. & De Freitas, V. (2006).** Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8936-8944.

- Charpentier, C., Aussenac, J., Charpentier, M., Prome, J. C., Duteurtre, B. & Feuillat, M. (2005).** Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: Kinetics and potential impact on flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 3000-3007.
- Chatonnet, P. (1995).** *Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne.* Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux II.
- Chatonnet, P. & Dubourdiou, D. (1998).** Comparative study of the characteristics of American white oak (*Quercus alba*) and European oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) for production of barrels used in barrel aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 79-85.
- Chatonnet, P., Dubourdiou, D. & Boidron, J. N. (1992).** Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sci Aliments* **12**, 665-685.
- Chatonnet, P., Boidron, J., Dubourdiou, D. & Pons, M. (1994).** Évolution des composés polyphénoliques du bois de chêne au cours de son séchage. Premiers résultats. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **28**, 337-357.
- Chen, H. D., Yang, S. P., Liao, S. G., Zhang, C. R. & Yue, J. M. (2006).** Three new 24-noroleanane triterpenoids from *Quercus aliena* var. *acuteserrata*. *Helvetica Chimica Acta* **89**, 1971-1977.
- Clark, C. C. & Lawless, H. T. (1994).** Limiting response alternatives in time-intensity scaling: An examination of the halo-dumping effect. *Chemical Senses* **19**, 583-594.
- Cohn, C. (1914).** Organic flavours. The relation of chemical constitution to taste. *Pharmazeutische Zentralhalle* **55**, 735-747.
- Connolly, J. D. & Hill, R. A. (2010).** Triterpenoids. *Natural product reports* **27**, 79-132.
- Cui, M., Jiang, P., Maillet, E., Max, M., Margolskee, R. E. & Osman, R. (2006).** The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites. *Current Pharmaceutical Design* **12**, 4591-4600.
- Cuyckens, F. & Claeys, M. (2004).** Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* **39**, 1-15.

## D

- Dalton, P., Doolittle, N., Nagata, H. & Breslin, P. A. S. (2000).** The merging of the senses: Integration of subthreshold taste and smell. *Nature Neuroscience* **3**, 431-432.
- Delahunty, C. M., Eyres, G. & Dufour, J. P. (2006).** Gas chromatography-olfactometry. *Journal of Separation Science* **29**, 2107-2125.

**Doddrell, D. M., Khong, P. W. & Lewis, K. G. (1974).** The stereochemical dependence of <sup>13</sup>C chemical shifts in olean-12-enes and urs-12-enes as an aid to structural assignment. *Tetrahedron Letters* **15**, 2381-2384.

**Domon, B. & Costello, C. E. (1988).** A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal* **5**, 397-409.

**Dravnieks, A. (1985).** *Atlas of odor character profiles*. American Society for Testing and Materials, PA.

**DuBois, G. E., Crosby, G. A. & Saffron, P. (1977).** Nonnutritive sweeteners: Taste-structure relationships for some new simple dihydrochalcones. *Science* **195**, 397-399.

**Dubourdiou, D. (1995).** Intérêts oenologiques et risques associés à l'élevage des vins blancs sur lies en barriques. *Revue Française d'oenologie* **155**, 30-35.

## E

**Eggers, S. C., Acree, T. E. & Shallenberger, R. S. (2000).** Sweetness chemoreception theory and sweetness transduction. *Food Chemistry* **68**, 45-49.

**Erve, J. C. L., Gu, M., Wang, Y., DeMaio, W. & Talaat, R. E. (2009).** Spectral Accuracy of Molecular Ions in an LTQ/Orbitrap Mass Spectrometer and Implications for Elemental Composition Determination. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20**, 2058-2069.

**Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L. & Charpentier, C. (2001).** Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **7**, 153-159.

## F

**Faurion, A. (1988).** Naissance et obsolescence du concept de quatre qualités en gustation. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* **XXXV**, 21-40.

**Faurion, A. & Mac Leod, P. (1982).** Sweet taste receptor mechanisms. In *Nutritive Sweeteners*, pp. 247-273. Edited by G. G. Birch & K. J. Parker. Londres: Applied Science.

**Faurion, A., Saito, S. & Mac Leod, P. (1980).** Sweet taste involves several distinct receptor mechanisms. *Chemical Senses* **5**, 107-121.

**Fornairon, C., Mazauric, J. P., Salmon, J. M. & Moutounet, M. (1999).** Observations on the oxygen consumption during maturation of wines on lees. *J Int Sci Vigne Vin* **33**, 79-86.

- Foucault, A. P. & Chevolut, L. (1998).** Counter-current chromatography: Instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A* **808**, 3-22.
- Frank, R. A. & Byram, J. (1988).** Taste-smell interactions are tastant and odorant dependent. *Chem Senses* **13**, 445-455.
- Froloff, N., Faurion, A. & Mac Leod, P. (1996).** Multiple human taste receptor sites: A molecular modeling approach. *Chemical Senses* **21**, 425-445.
- Fuke, S. & Ueda, Y. (1996).** Interactions between umami and other flavor characteristics. *Trends in Food Science and Technology* **7**, 407-411.

## G

- Galindo-Cuspinera, V., Winnig, M., Bufe, B., Meyerhof, W. & Breslin, P. A. S. (2006).** A TAS1R receptor-based explanation of sweet 'water-taste'. *Nature* **441**, 354-357.
- Garde-Cerdán, T. & Ancín-Azpilicueta, C. (2006).** Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science and Technology* **17**, 438-447.
- Gawel, R., Van Sluyter, S. & Waters, E. J. (2007).** The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **13**, 38-45.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. (1992).** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* **20**, 1425.
- Glabasnia, A. & Hofmann, T. (2006).** 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* **54**, 3380-3390.
- Goodman, M., Del Valle, J. R., Amino, Y. & Benedetti, E. (2002).** Molecular basis of sweet taste in dipeptide taste ligands. *Pure and Applied Chemistry* **74**, 1109-1116.
- Guadalupe, Z., Palacios, A. & Ayestaran, B. (2007).** Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4854-4862.
- Guidance for Industry (2001).** Bioanalytical Method Validation. *Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research*, Rockville, MD.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. & Hegemann, J. H. (1996).** A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **24**, 2519-2524.

## H

- Hardman, M. & Makarov, A. A. (2003).** Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Analytical Chemistry* **75**, 1699-1705.
- Hendrick, M. E. (1991).** Alitame. In *Alternative sweeteners*. New York Marcel Dekker Inc.
- Hervé Du Penhoat, C. L. M., Michon, V. M. F., Peng, S., Viriot, C., Scalbert, A. & Gage, D. (1991).** Structural elucidation of new dimeric ellagitannins from *Quercus robur* L. roburins A-E. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1653-1660.
- Himbert, F., Pennanec, R., Guillaumet, G. & Lafosse, M. (2004).** Preparative liquid chromatography and centrifugal partition chromatography for purification of new anticancer precursors. *Chromatographia* **60**, 269-274.
- Hoffmann, E. D. & Stroobant, V. (2005).** *Spectrométrie de masse : cours et exercices corrigés*, 3ème edn. Paris: Dunod.
- Honda, T., Murae, T., Tsuyuki, T., Takahashi, T. & Sawai, M. (1976).** Arjungenin, arjunglucoside I, and arjunglucoside II. A new triterpene and new triterpene glucosides from *Terminalia arjuna*. *Bull Chem Soc Jpn* **49**, 3213-3218.
- Hort, J. & Hollowood, T. A. (2004).** Controlled continuous flow delivery system for investigating taste-aroma interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4834-4843.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. & Cooks, R. G. (2005).** The Orbitrap: A new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **40**, 430-443.
- Hui, W. H. & Li, M. M. (1977).** Six new triterpenoids and other triterpenoids and steroids from three *Quercus* species of Hong Kong. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 897-903.
- Humbert, A. (2003).** *Recherches sur les phénomènes enzymatiques intervenant lors de l'élevage des vins*. Thèse pour le doctorat de l'Université Bordeaux 2.

## I

- ISO (2002).** ISO 13301:2002. Sensory analysis - Methodology - General guidance for measuring odour, flavour and taste detection thresholds by a three-alternative forced-choice (3-AFC) procedure. Edited by I. O. f. Standardization. Genève.
- ISO (2004).** ISO 4120:2004. Sensory analysis. Methodology. Triangle test. Edited by I. O. o. Standardization. Genève.
- ISO (2006).** ISO 8587:2006. Sensory analysis - Methodology - Ranking. Edited by I. O. f. Standardization. Genève.

**Iwamura, H. (1981).** Structure-sweetness relationship of L-aspartyl dipeptide analogues. A receptor site topology. *Journal of Medicinal Chemistry* **24**, 572-583.

## J

**Jeener, J. (1971).** Lecture presented at Ampere International Summer School II, Tech Rep.

**Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. (1979).** Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics* **71**, 4546-4553.

**Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L. & Waters, E. J. (2008).** The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference* **19**, 596-607.

**Jossang, A., Seuleiman, M., Maidou, E. & Bodo, B. (1996).** Pentacyclic triterpenes from *Combretum Nigricans*. *Phytochemistry* **41**, 591-594.

## K

**Kadim, D. & Mannheim, C. H. (1999).** Kinetics of phenolic extraction during aging of model wine solution and white wine in oak barrels. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 33-39.

**Kapil, A. & Sharma, S. (1995).** Effect of oleanolic acid on complement in adjuvant- and carrageenan-induced inflammation in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **47**, 585-587.

**Karvela, E., Makris, D. P., Kefalas, P. & Moutounet, M. (2008).** Extraction of phenolics in liquid model matrices containing oak chips: Kinetics, liquid chromatography-mass spectroscopy characterisation and association with in vitro antiradical activity. *Food Chemistry* **110**, 263-272.

**Kato, Y. (1963).** Structure of lyoniresinol (dimethoxysolariciresinol). *Chem Pharm Bull* **11**, 823-827.

**Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S. & Widmer, M. (2010).** Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): "Where is the crossover point?". *Analytica Chimica Acta* **673**, 60-72.

**Kawai, M., Okiyama, A. & Ueda, Y. (2002).** Taste enhancements between various amino acids and IMP. *Chemical Senses* **27**, 739-745.

**Kier, L. B. (1972).** A molecular theory of sweet taste. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **61**, 1394-1397.

- Kim, N. C. & Kinghorn, A. D. (2002).** Highly sweet compounds of plant origin. *Archives of Pharmacal Research* **25**, 725-746.
- Kind, T. & Fiehn, O. (2007).** Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* **8**.
- Kingdon, K. H. (1923).** A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Physical Review* **21**, 408-418.
- Kinghorn, A. D. & Soejarto, D. D. (2002).** Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure and Applied Chemistry* **74**, 1169-1179.
- Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y. & Hino, A. (2001).** Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**, 236-242.
- Koga, K., Taguchi, A., Koshimizu, S., Suwa, Y., Yamada, Y., Shirasaka, N. & Yoshizumi, H. (2007).** Reactive oxygen scavenging activity of matured whiskey and its active polyphenols. *Journal of Food Science* **72**, S212-S217.
- Kövér, K. E., Hruby, V. J. & Uhrin, D. (1997).** Sensitivity- and Gradient-Enhanced Heteronuclear Coupled/Decoupled HSQC-TOCSY Experiments for Measuring Long-Range Heteronuclear Coupling Constants. *Journal of Magnetic Resonance* **129**, 125-129.

## L

- Labbe, D., Damevin, L., Vaccher, C., Morgenegg, C. & Martin, N. (2006).** Modulation of perceived taste by olfaction in familiar and unfamiliar beverages. *Food Quality and Preference* **17**, 582-589.
- Lapierre, C., Rolando, C. & Monties, B. (1983).** Characterization of poplar lignins acidolysis products: Capillary gas-liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds. *Holzforschung* **37**, 189-198.
- Lavigne-Cruège, V. & Dubourdiou, D. (2002).** Role of glutathione on development of aroma defects in dry white wines. *13th International Enology Symposium*, 331-347.
- Lavigne, V. (1998).** *Recherche sur les composés volatils formés par la levure au cours de la vinification et de l'élevage des vins blancs secs*. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Lavigne, V. & Dubourdiou, D. (1996).** Demonstration and interpretation of the yeast lees ability to adsorb certain volatile thiols contained in wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **30**, 201-206.
- Lavigne, V., Pons, A. & Dubourdiou, D. (2007).** Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. Changes in

concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *Journal of Chromatography A* **1139**, 130-135.

**Lehn, J. M. & Vystrčil, A. (1963).** Resonance magnetique nucleaire de produits naturels-VI. Triterpènes dérivés de la bétuline. *Tetrahedron* **19**, 1733-1745.

**Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. & Adler, E. (2002).** Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4692-4696.

**Li, X., Inoue, M., Reed, D. R., Huque, T., Puchalski, R. B., Tordoff, M. G., Ninomiya, Y., Beauchamp, G. K. & Bachmanov, A. A. (2001).** High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal Chromosome 4. *Mammalian Genome* **12**, 13-16.

**Liu, J. (1995).** Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **49**, 57-68.

## M

**Maciuk, A. (2005).** *Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : application à l'isolement de substances naturelles.*, Thèse pour le doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardennes.

**Mahato, S. B. & Kundu, A. P. (1994).** <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. *Phytochemistry* **37**, 1517-1575.

**Mahato, S. B. & Sen, S. (1997).** Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry* **44**, 1185-1236.

**Mahato, S. B., Sarkar, S. K. & Poddar, G. (1988).** Triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **27**, 3037-3067.

**Makarov, A. (1999).** Mass spectrometer. US Patent 5 886 346.

**Makarov, A. (2000).** Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* **72**, 1156-1162.

**Makarov, A. (2006).** Theory and practice of the orbitrap mass analyzer. In *Proceedings of the 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. Seattle, WA.

**Marchal, A., Marullo, P., Moine, V. & Dubourdieu, D. (2011).** Influence of yeast macromolecules on sweetness in dry wines: role of the protein Hsp12. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **In press**.

**Marston, A. & Hostettmann, K. (2006).** Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A* **1112**, 181-194.

- Marullo, P., Mansour, C., Dufour, M., Albertin, W., Sicard, D., Bely, M. & Dubourdiou, D. (2009).** Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. *FEMS Yeast Research* **9**, 1148-1160.
- Massiot, G. & Lavaud, C. (1995).** Structural elucidation of saponins *Studies in Natural Products Chemistry* **15**, 187-224.
- Masson, E., Baumes, R. & Puech, J. L. (2001).** Comparison of direct and indirect methods of measuring the precursors of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone and their application to the analysis of Sessile oak wood [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.]. *Journal of Chromatography A* **905**, 183-191.
- Masson, E., Baumes, R., Le Guernevé, C. & Puech, J. L. (2000).** Identification of a precursor of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone in the wood of Sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 4306-4309.
- Masson, G., Moutounet, M. & Puech, J. L. (1995).** Ellagitannin content of oak wood as a function of species and of sampling position in the tree. *American Journal of Enology and Viticulture* **46**, 262-268.
- Max, M., Shanker, Y. G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S. & Margolskee, R. F. (2001).** Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nature Genetics* **28**, 58-63.
- McLafferty, F. W. & Turecek, F. (1993).** *Interpretation of Mass Spectra*. Mill Valley, California: University Science Books.
- Mesulam, M. M. (1998).** From sensation to cognition. *Brain* **121**, 1013-1052.
- Meyers, B. & Brewer, M. S. (2008).** Sweet Taste in Man: A Review. *Journal of Food Science* **73**, R81-R90.
- Moine-Ledoux, V. & Dubourdiou, D. (1999).** An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 4, 537-543.
- Moine-Ledoux, V., Perrin, A., Paladin, I. & Dubourdiou, D. (1997).** First result of tartaric stabilization by adding mannoproteins (Mannostab™). *Premiers résultats de stabilisation tartrique des vins par addition de mannoprotéines purifiées (Mannostab™)* **31**, 23-31.
- Moine, V. (2006).** WO/2006/056725 Patent : Drink-treatment method which is used to increase the sweetness thereof and compound to be added to a drink in order to increase the sweetness of same. Edited by W. I. P. Organization. Genève, Suisse.
- Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H. & Buck, L. B. (2001).** A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nature Neuroscience* **4**, 492-498.
- Moutounet, M., Rabier, P. H., Sarni, F. & Scalbert, A. (1992).** Les tanins du bois de chêne, les conditions de leur présence dans le vin. *J Int Sci Vigne Vin*, 75-79.

- Moutounet, M., Rabier, P. H., Puech, J. L., Verette, E. & Barillere, J. M. (1989).** Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Sci Aliments* **9**, 35-51.
- Mullen, W., Larcombe, S., Arnold, K., Welchman, H. & Crozier, A. (2010).** Use of accurate mass full scan mass spectrometry for the analysis of anthocyanins in berries and berry-fed tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 3910-3915.
- Murayama, W., Kobayashi, T., Kosuge, Y., Yano, H., Nunogaki, Y. & Nunogaki, K. (1982).** A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *Journal of Chromatography A* **239**, 643-649.

## N

- Nabeta, K., Yonekubo, J. & Miyake, M. (1987).** Phenolic compounds from the heartwood of European oak (*Quercus robur* L.) and brandy. *Mokuzai Gakkaishi* **33**, 408-415.
- Nagayama, K., Kumar, A., Wüthrich, K. & Ernst, R. R. (1980).** Experimental techniques of two-dimensional correlated spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **40**, 321-334.
- Nagodawithana, T. (1992).** Yeast-derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. *Food Technol* **46**, 138-144.
- Nandy, A. K., Podder, G., P. Sahu, N. & Mahato, S. B. (1989).** Triterpenoids and their glucosides from *Terminalia bellerica*. *Phytochemistry* **28**, 2769-2772.
- Nishimura, H., Nonaka, G. I. & Nishioka, I. (1986).** Scyllo-quercitol gallates and hexahydroxydiphenates from *quercus stenophylla*. *Phytochemistry* **25**, 2599-2604.
- Noble, A. C. & Bursick, G. F. (1984).** The Contribution of Glycerol to Perceived Viscosity and Sweetness in White Wine. *Am J Enol Vitic* **35**, 110-112.
- Nofre, C. & Tinti, J. M. (1996).** Sweetness reception in man: The multipoint attachment theory. *Food Chemistry* **56**, 263-274.
- Nonier, M. F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N. & Fouquet, E. (2009).** Origin of brown discoloration in the staves of oak used in cooperage - Characterization of two new lignans in oak wood barrels. *Comptes Rendus Chimie* **12**, 291-296.
- Nonier, M. F., Vivas, N., Vivas De Gaulejac, N., Absalon, C., Vitry, C. & Fouquet, E. (2005).** Global fractionation of oak heartwood extractable polymers (lignins, polysaccharides and ellagitannins) by selective precipitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 343-353.

## O

**Oguro, T., Liu, J., Klaassen, C. D. & Yoshida, T. (1998).** Inhibitory effect of oleanolic acid on 12-O-tetradecanoylphorbol-13- acetate-induced gene expression in mouse skin. *Toxicological Sciences* **45**, 88-93.

## P

**Page, E. B. (1963).** Ordered hypotheses for multiple treatments: a significance test for linear ranks. *Journal of the American Statistical Association* **58**, 216-230.

**Pauli, G. F., Pro, S. M. & Friesen, J. B. (2008).** Countercurrent Separation of Natural Products#. *Journal of Natural Products* **71**, 1489-1508.

**Pérez-Prieto, L. J., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Pardo Mínguez, F. & Gómez-Plaza, E. (2002).** Maturing wines in oak barrels. Effects of origin, volume, and age of the barrel on the wine volatile composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3272-3276.

**Pérez-Serradilla, J. A. & de Castro, M. D. L. (2008).** Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry* **111**, 447-456.

**Peynaud, E. (1980).** *Le Goût du Vin*. Paris: Dunod.

**Pianet, I., Barathieu, K., Tarascou, I., Fouquet, E., Simon, C., Laguerre, M., André, Y. & Dufourc, E. (2009).** 3D-structure, colloidal behavior and Human saliva Protein recognition of wine tannins determined by NMR. *Acta Horticulturae* **841**, 389-396.

**Pinel, B., Audo, G., Mallet, S., Lavault, M., Poype, F. D. L., Séraphin, D. & Richomme, P. (2007).** Multi-grams scale purification of xanthanolides from *Xanthium macrocarpum*. Centrifugal partition chromatography versus silica gel chromatography. *Journal of Chromatography A* **1151**, 14-19.

**Ponou, B. K., Barboni, L., Teponno, R. B., Mbiancha, M., Nguelefack, T. B., Park, H. J., Lee, K. T. & Tapondjou, L. A. (2008).** Polyhydroxyoleanane-type triterpenoids from *Combretum molle* and their anti-inflammatory activity. *Phytochemistry Letters* **1**, 183-187.

**Pozo-Bayon, M. A., Alcaide, J. M., Polo, M. C. & Pueyo, E. (2007).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory compounds in white and red wines. *Food Chemistry* **100**, 43-47.

**Praekelt, U. M. & Meacock, P. A. (1990).** HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function. *Molecular and General Genetics* **223**, 97-106.

- Prakash, I., Bishay, I. & Schroeder, S. (1999).** Neotame: Synthesis, stereochemistry and sweetness. *Synthetic Communications* **29**, 4461-4467.
- Price, K. R., Johnson, I. T. & Fenwick, G. R. (1987).** The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *Critical reviews in food science and nutrition* **26**, 27-135.
- Prida, A. & Puech, J. L. (2006).** Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8115-8126.
- Puech, J. L., Feuillat, F. & Mosedale, J. R. (1999).** The tannins of oak heartwood: Structure, properties, and their influence on wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 469-478.

## Q

- Quideau, S., Jourdes, M., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P. & Baudry, C. (2003).** DNA Topoisomerase Inhibitor Acutissimin A and Other Flavano-Ellagitannins in Red Wine. *Angewandte Chemie - International Edition* **42**, 6012-6014.
- Quideau, S., Varadinova, T., Karagiozova, D., Jourdes, M., Pardon, P., Baudry, C., Genova, P., Diakov, T. & Petrova, R. (2004).** Main structural and stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonhydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. *Chemistry & biodiversity* **1**, 247-258.
- Quinn, M. K. & Singleton, V. L. (1985).** Isolation and identification of ellagitannins from white oak wood and an estimation of their roles in wine. *Am J Enol Vitic* **36**, 148-155.

## R

- Radics, L., Kajtár-Peredy, M., Corsano, S. & Standoli, L. (1975).** Carbon-13 NMR spectra of some polycyclic triterpenoids. *Tetrahedron Letters* **16**, 4287-4290.
- Rahman, M. D., Katayama, T., Suzuki, T. & Nakagawa, T. (2007a).** Stereochemistry and biosynthesis of (+)-lyoniresinol, a syringyl tetrahydronaphthalene lignan in *Lyonia ovalifolia* var. *elliptica* I: isolation and stereochemistry of syringyl lignans and predicted precursors to (+)-lyoniresinol from wood. *Journal of Wood Science* **53**, 161-167.
- Rahman, M. D., Katayama, T., Suzuki, T., Yoshihara, Y. & Nakagawa, T. (2007b).** Stereochemistry and biosynthesis of (+)-lyoniresinol, a syringyl tetrahydronaphthalene lignan in *Lyonia ovalifolia* var. *elliptica* II: feeding experiments with <sup>14</sup>C labeled precursors. *Journal of Wood Science* **53**, 114-120.

- Rao, G. S. R. S., Prasanna, S., Kumar, V. P. S. & Mallavarapu, G. R. (1981).** Bartogenic acid, a new triterpene acid from *Barringtonia speciosa*. *Phytochemistry* **20**, 333-334.
- Renault, J.-H., Nuzillard, J.-M., Intes, O. & Maciuk, A. (2002).** Solvents systems. In *Countercurrent Chromatography – The support-Free Liquid Stationary Phase*, pp. 49-83. Edited by A. Berthod. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Ribéreau-Gayon, J. (1933).** Bordeaux: Delmas (ed).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D. (1998a).** *Traité d'Oenologie. Tome 2. Chimie du Vin. Stabilisation et Traitements*. Paris: Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B. & Lonvaud, A. (1998b).** *Traité d'Oenologie. Tome 1. Microbiologie du vin. Vinifications*. Paris: Dunod.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T. & Moutounet, M. (2002).** Aggregation of grape seed tannins in model wine - Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **16**, 17-23.
- Romussi, G., Parodi, B., Pizza, C. & De Tommasi, N. (1994).** Constituents of fagaceae (Cupuliferae). XIX: Triterpene saponins and acylated flavonoids from *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck. *Arch Pharm* **327**, 643-645.
- Rowe, J. D., Harbertson, J. F., Osborne, J. P., Freitag, M., Lim, J. & Bakalinsky, A. T. (2010).** Systematic Identification of Yeast Proteins Extracted into Model Wine during Aging on the Yeast Lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 2337-2346.

## S

- Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D. & Ferreira, V. (2010).** An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry* **121**, 1139-1149.
- Sainz, E., Korley, J. N., Battey, J. F. & Sullivan, S. L. (2001).** Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *Journal of Neurochemistry* **77**, 896-903.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E. & Lindsey, G. (2000).** The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1463**, 267-278.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory press ed.
- Sarni, F., Moutounet, M., Puech, J.-L. & Rabier, P. (1990).** Effect of Heat Treatment of Oak Wood Extractable Compounds. *Holzforschung* **44**, 461-466.

- Scalbert, A., Duval, L., Peng, S., Monties, B. & Du Penhoat, C. (1990).** Polyphenols of *Quercus robur* L.: II. Preparative isolation by low-pressure and high-pressure liquid chromatography of heartwood ellagitannins. *Journal of Chromatography* **502**, 107-119.
- Schiffman, S. S. (2000).** Taste quality and neural coding: Implications from psychophysics and neurophysiology. *Physiology and Behavior* **69**, 147-159.
- Schiffman, S. S. & Gatlin, C. A. (1993).** Sweeteners: State of knowledge review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **17**, 313-345.
- Scinska, A., Koros, E., Habrat, B., Kukwa, A., Kostowski, W. & Bienkowski, P. (2000).** Bitter and sweet components of ethanol taste in humans. *Drug and Alcohol Dependence* **60**, 199-206.
- Seikel, M. K., Hostettler, F. D. & Niemann, G. J. (1971).** Phenolics of *Quercus rubra* wood. *Phytochemistry* **10**, 2249-2251.
- Shallenberger, R. S. & Acree, T. E. (1967).** Molecular theory of sweet taste [16]. *Nature* **216**, 480-482.
- Shoolery, J. N. (1984).** Recent developments in <sup>13</sup>C- and proton-NMR. *Journal of Natural Products* **47**, 226-259.
- Siegel, S. (1956).** *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New-York: Mc Graw Hill.
- Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J. M., Fouquet, E., Pianet, I. & Dufourc, E. J. (2003).** Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry* **42**, 10385-10395.
- Singleton, V. L. (1974).** *Some aspects of the wooden container as a factor in wine maturation*. In *Chemistry of Wine Making*. Washington DC: A.D. Webb.
- Small, D. M. & Prescott, J. (2005).** Odor/taste integration and the perception of flavor. *Experimental Brain Research* **166**, 345-357.
- Small, D. M., Voss, J., Mak, Y. E., Simmons, K. B., Parrish, T. & Gitelman, D. (2004).** Experience-dependent neural integration of taste and smell in the human brain. *Journal of Neurophysiology* **92**, 1892-1903.
- Spillman, P. J., Sefton, M. A. & Gawel, R. (2004).** The effect of oak wood source, location of seasoning and coopering on the composition of volatile compounds in oak-matured wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **10**, 216-226.
- Stark, T., Wollmann, N., Wenker, K., Lösch, S., Glabasnia, A. & Hofmann, T. (2010).** Matrix-calibrated LC-MS/MS quantitation and sensory evaluation of oak ellagitannins and their transformation products in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 6360-6369.

**Stevenson, R. J., Boakes, R. A. & Prescott, J. (1998).** Changes in Odor Sweetness Resulting from Implicit Learning of a Simultaneous Odor-Sweetness Association: An Example of Learned Synesthesia. *Learning and Motivation* **29**, 113-132.

**Stevenson, R. J., Prescott, J. & Boakes, R. A. (1999).** Confusing tastes and smells: How odours can influence the perception of sweet and sour tastes. *Chemical Senses* **24**, 627-635.

**Suga, T. & Kondo, S. (1974).** Alkanes and triterpenoids of *Quercus glauca*. *Phytochemistry* **13**, 522-523.

## T

**Takayanagi, T. & Yokotsuka, K. (1999).** Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 65-68.

**Takemoto, M., Fukuyo, A., Aoshima, Y. & Tanaka, K. (2006).** Synthesis of lyoniresinol with combined utilization of synthetic chemistry and biotechnological methods. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **54**, 226-229.

**Tanaka, T. & Kouno, I. (1996).** Whisky lactone precursors from the wood of *Platycarya strobilacea*. *Journal of Natural Products* **59**, 997-999.

**Temussi, P. (2006).** The history of sweet taste: Not exactly a piece of cake. *Journal of Molecular Recognition* **19**, 188-199.

**Temussi, P. A., Lelj, F. & Tancredi, T. (1978).** Three-dimensional mapping of the sweet taste receptor site. *Journal of Medicinal Chemistry* **21**, 1154-1158.

**Temussi, P. A., Lelj, F. & Tancredi, T. (1991).** Structure-activity relationship of sweet molecules. *Sweeteners, Discovery, Molecular Design and ChemoReception* **450**, 143-161.

**Temussi, P. A., Lelj, F., Tancredi, T., Castiglione-Morelli, M. A. & Pastore, A. (1984).** Soft agonist-receptor interactions: Theoretical and experimental simulation of the active site of the receptor site of sweet molecules. *Int J Quantum Chem* **26**, 889-906.

**Thorngate, J. H. (1997).** The physiology of human sensory response to wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **48**, 271-279.

**Tokuda, H., Ohigashi, H., Koshimizu, K. & Ito, Y. (1986).** Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Letters* **33**, 279-285.

**Tominaga, T., Blanchard, L., Darriet, P. & Dubourdiou, D. (2000).** A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *J Agric Food Chem* **48**, 1799-1802.

**Toribio, A. (2007).** *Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt.* Thèse pour le doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardennes.

**Toribio, A., Delannay, E., Richard, B., Plé, K., Zèches-Hanrot, M., Nuzillard, J. M. & Renault, J. H. (2007).** Preparative isolation of huperzines A and B from *Huperzia serrata* by displacement centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **1140**, 101-106.

## V

**Van Rossum, T. G. J., Vulto, A. G., Hop, W. C. J., Brouwer, J. T., Niesters, H. G. M. & Schalm, S. W. (1999).** Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: A double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **14**, 1093-1099.

**Varela, J. C. S., Praekelt, U. M., Meacock, P. A., Planta, R. J. & Mager, W. H. (1995).** The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high- osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6232-6245.

**Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V. & Waters, E. (2004).** The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry* **85**, 519-525.

**Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A. & Gruppen, H. (2007).** Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **68**, 275-297.

**Vitrac, X., Castagnino, C., Waffo-Téguo, P., Delaunay, J. C., Vercauteren, J., Monti, J. P., Deffieux, G. & Mérillon, J. M. (2001).** Polyphenols newly extracted in red wine from Southwestern France by centrifugal partition chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5934-5938.

**Vivas, N. (1997).** *Recherches sur la Qualité du Chêne Français de Tonnelerie (Q. Petraea Liebl., O. Robur L.) et sur les Mécanismes d'Oxydoréduction des Vins Rouges au Cours de Leur Élevage en Barriques.* Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.

**Vivas, N., Pianet, I., Bourgeois, G., Vitry, C., Servens, C. & Glories, Y. (1998).** Characterization of heartwood lignin fractions from *Quercus robur* l. and *Quercus petraea* (matt) liebl., the main oak species used for barrel making. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 49-55.

## W

**Wieghaus, A., Makarov, A., Froehlich, U., Kellmann, M., Denisov, E. & Lange, O. (2008).** The Thermo Scientific Exactive Benchtop LC/MS Orbitrap Mass Spectrometer. *Application Note: 30162 Thermo Scientific*.

**Wilkinson, K. L., Elsey, G. M., Prager, R. H., Tanaka, T. & Sefton, M. A. (2004).** Precursors to oak lactone. Part 2: Synthesis, separation and cleavage of several  $\beta$ -D-glucopyranosides of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid. *Tetrahedron* **60**, 6091-6100.

## X

**Xu, Y., Heilier, J. F., Madalinski, G., Genin, E., Ezan, E., Tabet, J. C. & Junot, C. (2010).** Evaluation of accurate mass and relative isotopic abundance measurements in the LTQ-Orbitrap mass spectrometer for further metabolomics database building. *Analytical Chemistry* **82**, 5490-5501.

## Y

**Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C. G., François, J., Bertin, G. & Jouany, J. P. (2003).** A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: Application to zearalenone. *Biotechnology Letters* **25**, 783-789.

## Z

**Zga, N., Papastamoulis, Y., Toribio, A., Richard, T., Delaunay, J. C., Jeandet, P., Renault, J. H., Monti, J. P., Mérillon, J. M. & other authors (2009).** Preparative purification of antiamyloidogenic stilbenoids from *Vitis vinifera* (Chardonnay) stems by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B* **877**, 1000-1004.

**Zhang, N. R., Yu, S., Tiller, P., Yeh, S., Mahan, E. & Emary, W. B. (2009).** Quantitation of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers-a different approach for analysis of biological samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**, 1085-1094.

# **ANNEXES**



# ANNEXE 1 : Méthodes expérimentales

## Matériels et méthodes de la première partie

### Etude de l'addition d'éthanol et de glycérol dans des vins (rouge et blanc) (page 19)

#### Test de classement par rangs

Ce protocole d'analyse sensorielle, correspondant à la norme AFNOR ISO 8587:2006, repose sur la présentation simultanée de plusieurs échantillons anonymes et codés à un panel. Il est demandé aux sujets de classer les échantillons par ordre croissant d'intensité d'un critère spécifié. Tous les échantillons doivent être ordonnés strictement.

Le traitement statistique utilisé dépend de la nature des échantillons. Le test de Page est préconisé (Page, 1963) lorsqu'il existe entre les modalités un ordre *a priori* prévisible, comme c'est le cas lors de l'ajout de quantités différentes mais connues d'un composé à un même vin de base.

Il s'agit d'un test non paramétrique.  $p$  modalités sont classées par ordre croissant d'intensité par les  $n$  sujets. Pour chacun d'entre eux, un chiffre de 1 à  $p$  est attribué aux différentes modalités, dans l'ordre de leur classement (1 à la modalité jugée comme la moins intense,  $p$  à la plus intense).

Les sommes de rangs sont ensuite calculées pour chaque échantillon à partir des notes attribuées par les  $n$  dégustateurs. On les note  $R_1, R_2 \dots R_p$ , sachant que l'ordre est déterminé par la hiérarchie supposée entre les modalités et non par le classement réel ( $R_1$  est définie comme la somme des rangs de la modalité considérée comme la moins intense *a priori*,  $R_2$  la deuxième moins intense, etc...). On calcule ensuite les variables  $L$  et  $L'$ , définies ci-dessous.

$$L = \sum_{i=1}^p i.R_i$$

La notion d'ordre prédéterminé est en effet prise en compte dans le calcul de  $L$  (pondération de  $R_i$  par  $i$ )

$$L' = \frac{12L - 3n.p.(p+1)^2}{p.(p+1).\sqrt{n.(p-1)}}$$

La significativité du test est déterminée par la valeur de  $L'$

Le test est ainsi considéré comme significatif (c'est-à-dire que les modalités sont jugées globalement différentes par les dégustateurs)

- au risque de 5 % si  $L' \geq 1.645$
- au risque de 1 % si  $L' \geq 2.326$

#### Conditions et modalités de l'analyse sensorielle

Deux sessions distinctes ont été organisées.

La session 1, en avril 2009, rassemblait 38 étudiants du Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation, tous professionnels du vin. Le vin de base était un Bordeaux rouge 2007, élevé en cuve en inox.

La session 2, en mai 2010, rassemblait 47 étudiants en seconde année du Diplôme National d'œnologie. Le vin de base était un Bordeaux blanc 2008, élaboré en cuve en inox.

Dans les deux cas, les dégustateurs étaient formés et entraînés à la dégustation du vin.

Les caractéristiques analytiques des vins utilisés sont mentionnées dans le tableau 2.

Tableau 2 - Caractéristiques analytiques des vins de base utilisés pour l'analyse sensorielle.

Session	Session 1	Session 2
Type de vin	Bordeaux rouge 2007	Bordeaux blanc 2008
Titre alcoométrique volumique (à 20°C)	12.2 %	12.0 %
Concentration en glycérol	6.9 g/L	5.8 g/L
Concentration en D-glucose + D-fructose	0.37 g/L	0.54 g/L

Pour chaque session, deux séries ont été proposées aux dégustateurs : l'une consistant en des ajouts d'éthanol, l'autre en des ajouts de glycérol. Ces composés ont été ajoutés dans les vins de base, une heure avant la dégustation (voir tableau 3). Les modalités obtenues pour chaque série ont été rendues anonymes par un code à 3 chiffres, puis proposées simultanément aux dégustateurs dans un ordre aléatoire et variable en fonction des postes, afin d'éviter d'éventuels artefacts liés à l'ordre de la dégustation. La dégustation s'est déroulée dans la

salle d'analyse sensorielle de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, climatisée à 20°C et équipée de postes individuels. Les deux séries (éthanol et glycérol) ont été dégustées successivement dans des verres AFNOR en verre blanc, une pause de 10 minutes séparant les deux tests. La fiche de dégustation type utilisée est reportée en annexe.

Tableau 3 - Modalités préparées pour l'analyse sensorielle de l'influence de l'éthanol et du glycérol sur la perception de la sucrosité.

	Modalité	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Session 1	Quantité d'éthanol ajoutée (teneur finale)	Témoins (12.2 %)	+ 0.5 % (12.7 %)	+ 1 % (13.2 %)	+ 1.5 % (13.7 %)
	Quantité de glycérol ajoutée (teneur finale)	Témoins (6.9 g/L)	+ 1 g/L (7.9 g/L)	+ 3 g/L (9.9 g/L)	+ 5 g/L (11.9 g/L)
Session 2	Quantité d'éthanol ajoutée (teneur finale)	Témoins (12.0 %)	+ 0.5 % (12.5 %)	+ 1 % (13.0 %)	+ 1.5 % (13.5 %)
	Quantité de glycérol ajoutée (teneur finale)	Témoins (5.8 g/L)	+ 1 g/L (6.9 g/L)	+ 3 g/L (8.8 g/L)	+ 5 g/L (10.8 g/L)

## Etude de l'effet de l'autolyse des levures sur la sucrosité (page 23)

### *Culture des levures*

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour cette étude est la Zymaflore Fx10 (société Laffort, France). Il s'agit d'une souche homothallique, homozygote, référencée comme H4-1D (Marullo *et al.*, 2009), utilisée essentiellement dans le cadre de la vinification des vins rouges en raison de sa bonne tolérance à la température. Les levures sont déposées sur une boîte de Pétri contenant du milieu YPD (1% d'extrait de levures, 2% de peptone, 2% de D-glucose) solidifié avec 2 % d'agar. La boîte est conservée pendant 2 jours à 30°C, puis est utilisée afin d'inoculer 2 erlenmeyers contenant 20 mL de milieu YPD. Ce levain est agité à 28°C pendant 2 jours puis est additionné dans 2 litres de YPD répartis en 2 erlenmeyers. La culture des levures s'effectue sous agitation pendant 4 jours à 30°C afin d'obtenir une production maximale de biomasse. L'ensemble de la verrerie et les milieux utilisés ont été préalablement stérilisés à l'aide d'un autoclave (120°C, 20 min). A l'issue de la période de culture, le milieu est centrifugé à 4000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot, constitué des levures, est rincé par 400 mL d'eau milliQ, centrifugé dans les mêmes conditions puis repris dans 400 mL d'eau milliQ. Le nombre total de levures est déterminé par mesure de l'absorbance à 600 nm, en considérant qu'une unité d'absorbance équivaut à  $2.410^7$  cellule/ml.

Les volumes correspondant aux quantités de levures souhaitées sont prélevés et centrifugés à 4000 rpm pendant 15 minutes puis le surnageant est éliminé.

### *Autolyse dans un vin rouge*

Le vin rouge utilisé pour cette étude est le Bordeaux rouge 2007 décrit au chapitre I, paragraphe III.A.2. Les culots de levures obtenus après centrifugation des volumes correspondant aux quantités souhaitées sont suspendus dans un litre de vin. Un flacon en verre de contenance adaptée, préalablement saturé en dioxyde de carbone, est rempli à l'aide de chaque modalité de vin ainsi obtenue. La variable de cette expérience est la quantité de levures. Les flacons sont placés dans une étuve à 32°C pendant 10 jours. Quatre modalités sont préparées : une modalité témoin, et trois modalités correspondant à des ajouts de levures à hauteur de  $2.10^8$ ,  $4.10^8$  et  $8.10^8$  cellules/mL respectivement.

Les levures sont remises en suspension une fois, après 5 jours.

A l'issue de cette période, les échantillons sont centrifugés à 4000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant (vin) est récupéré et conservé à 10°C sous atmosphère de dioxyde de carbone jusqu'à la dégustation, prévue le lendemain.

### *Analyse sensorielle*

Deux expériences sont menées à partir d'échantillons préparés de façon similaire.

- Expérience 1 : test triangulaire

Le panel utilisé pour ce test est constitué de 25 dégustateurs travaillant dans les laboratoires de la Faculté d'œnologie et entraînés à la dégustation œnologique. La fiche de dégustation utilisée est présentée en annexe.

Deux modalités sont utilisées : le vin témoin et le vin +  $2.10^8$  cellules/mL.

Un test triangulaire (norme **ISO 4120 :2004**) est utilisé : les modalités sont servies à 16°C dans trois verres, l'une d'entre elles étant dupliquée. Des verres noirs de type AFNOR sont utilisés. L'ordre de présentation des

verres est équilibré sur l'ensemble des individus. Il est demandé aux dégustateurs de préciser l'échantillon différent parmi les trois verres présentés.

Le traitement statistique est basé sur la loi binomiale : l'hypothèse initiale est l'identité entre les deux produits (hypothèse nulle nommée  $H_0$ , probabilité de réponse correcte  $p=1/3$ ). La probabilité de réalité de l'hypothèse initiale, notée  $P$ , est calculée comme suit :

$$P = \sum_{i=r}^n C_n^k p^k q^{(n-k)}$$

Avec  $r$  = nombre de réponses correctes

$n$  = nombre de sujets

$q = 1-p = 2/3$

Plus  $P$  est faible, moins l'hypothèse d'identité des modalités est vraisemblable. Les valeurs limites de significativité généralement adoptées sont 0.05 ; 0.01 et 0.001. Lorsque  $P$  est inférieure à ces valeurs, les échantillons sont considérés comme différents aux risques respectifs de 5 %, 1 % et 0.1 %.

- Expérience 2 : test de classement par rangs.

Le panel utilisé est constitué de 38 étudiants au Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation de l'Université Bordeaux 2.

Quatre modalités sont utilisées :

- Modalité 1 : vin témoin
- Modalité 2 : vin +  $2.10^8$  cellules/mL
- Modalité 3 : vin +  $4.10^8$  cellules/mL
- Modalité 4 : vin +  $8.10^8$  cellules/mL

Ces modalités sont présentées aux dégustateurs sous forme d'un test de classement par rangs, selon le critère de sucrosité. La méthodologie de l'analyse sensorielle est identique à celle décrite au chapitre 1, paragraphe III.A. Des verres AFNOR noirs sont utilisés.

L'existence d'une hiérarchie supposée entre les échantillons conduit à l'utilisation du test de Page pour l'interprétation statistique. Pour chaque dégustateur, la modalité perçue comme étant la moins sucrée est affectée du rang 1, la plus sucrée du rang 4. On calcule alors la somme des rangs (notées  $R1...R4$ ) pour les quatre modalités d'ajout de levures.

## Mise en évidence de l'effet de la protéine Hsp12 sur la sucrosité (page 30)

### *Souches et conditions de culture utilisées*

Pour les expériences de clonage, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  a été utilisé et développé selon les conditions décrites par Sambrook *et al.* (1989). Les souches de levures utilisées, rappelées dans le tableau 8, ont été cultivées sur le milieu YPD solidifié décrit précédemment dans ce chapitre, au paragraphe II.A.1. Dans le cadre de la sélection des marqueurs génétiques KANMx, BLER, et HYGR, les antibiotiques G418, phléomycine et hygromycine B (Sigma, France) ont été utilisés aux concentrations finales respectives de 1  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL et 50  $\mu$ g/mL.

Tableau 8 - Souches de levures et plasmides utilisés

Matériel biologique	Description	Origine
<b>Souches de levures</b>		
Fx10	Levure commerciale <i>HO/HO</i> entièrement homozygote (Zymaflore Fx10, Laffort)	Référencé comme H4-1D
RG1	F10 <i>HO::HYG<sup>R</sup>, Mat a</i>	Aimablement fourni par le Pr. Richard Gardner
YPM32	Dérivé haploïde de Fx10, <i>HO::HYG<sup>R}, MATa</sup></i>	Cette étude
YPM33	YPM32, <i>HSP12::LoxP::KANMx::LoxP, HO::HYG<sup>R}, MATa</sup></i>	Cette étude
YPM34	YPM33, $\Delta^{\circ}HSP12$ , <i>HO::HYG<sup>R}, MATa</sup></i>	Cette étude
YPM35	YPM33 x Fx10 spore, <i>HO/HO::HYG<sup>R}, HSP12/\Delta^{\circ}HSP12</sup></i>	Cette étude
$\Delta^{\circ}hsp12$	Segregant méiotique de YPM35, <i>HO/HO, \Delta^{\circ}HSP12/\Delta^{\circ}HSP12</i>	Cette étude
<b>Plasmides</b>		
pUG6		Aimablement fourni par le Pr. Bruno Blondin
pZEO		Aimablement fourni par le Pr. Bruno Blondin

Les transformations des levures ont été réalisées en utilisant la méthode de perméabilisation chimique décrite par Gietz *et al.* (1992). La souche « mutant zéro »  $\Delta^{\circ}hsp12$  a été construite en utilisant la technique de « short-

flanking homology » développée par Güldener *et al.* (1996). Cette stratégie permet la délétion du gène *HSP12* en utilisant la cassette *loxP::kanMX::loxP*, qui peut être excisée sous l'effet de la recombinase Cre.

La souche Fx10 étant diploïde, un dérivé haploïde (YPM32) a été construit afin de faciliter la mise en œuvre du système *loxP::kanMX::loxP*/recombinase Cre. La cassette *HO::HYG<sup>R</sup>* a été amplifiée par PCR à partir des oligonucléotides p26: 5'AAATCGAAGACCCATCTGCT et p36: 5'GTCACGAAAAGTGATGTAAC ainsi qu'en utilisant l'ADN génomique de la souche RG1 comme matrice.

La souche YPM33 a été obtenue en transformant YPM32 avec la cassette *loxP::kanMX::loxP* contenant les séquences adjacentes du gène *HSP12*. Cette cassette a été amplifiée à partir du plasmide pUG6 et des oligonucléotides suivants :

p484 **gataatctcaacaacaactcaaaacaaaaaaactaatacaacaGCATAGGCCACTAGTGGATCTG;**

p485 **tcacacatcataagaagaaaacatgtaactacaagagttccgaaagatCAGCTGAAGCTTCGTACGC.**

La transformation de YPM33 avec pZEO, avec excision de la cassette *loxP::kanMX::loxP* au niveau du locus de *HSP12*, conduit à la souche YPM34.

Enfin, le « mutant zéro »  $\Delta^{\circ}hsp12$  est obtenu par sélection du ségrégant méiotique approprié de YPM35. YPM35 provient du croisement de YPM34 et de spores de H4-1D en utilisant un micromanipulateur.

La construction génétique de toutes les souches a été vérifiée par PCR.

#### *Préparation des échantillons : autolyses parallèles*

Les deux souches de levures Fx10 et  $\Delta^{\circ}hsp12$  sont cultivées séparément sur milieu YPD selon la méthode décrite au chapitre 2, paragraphe II.A.2. Chacune de ces deux souches est ensuite additionnée dans 1 litre de vin rouge de Bordeaux 2007 à hauteur de  $2.10^8$  cellules/mL et placée dans les conditions d'autolyse décrites précédemment.

Après dix jours d'incubation, les deux modalités sont centrifugées à 4000 rpm pendant 15 minutes et conservées à 10°C dans un récipient hermétique saturé en dioxyde de carbone.

#### *Analyse sensorielle*

Les deux modalités obtenues sont servies dans des verres noirs à un panel de 23 dégustateurs travaillant dans les laboratoires de la Faculté d'œnologie, entraînés à la dégustation œnologique et avertis de la nature de l'expérimentation.

Les échantillons sont présentés à 16°C sous forme d'un test triangulaire, comme décrit au chapitre 2, paragraphe II.A.3.

## **Influence de la nature du contenant d'élaboration des vins secs sur la perception de la sucrosité (page 39)**

### *Essais mis en place*

#### *Expérimentation 1 : vins blancs*

L'expérimentation a été menée à partir d'un vin blanc de Bordeaux du millésime 2007, issu du cépage Sauvignon blanc et provenant de sols argilo-calcaires. Le moût obtenu après le pressurage (63 hL) est débourbé à 200 NTU et ensemencé à l'aide de la levure Zymaflore X5 de la société Laffort à 10 g/hL. Le taux d'azote assimilable est amené à 200 mg/L par ajout de sulfate d'ammonium. Le début de la fermentation alcoolique est effectué dans une cuve en béton. Après une baisse de densité de 0.02, le moût est aéré et distribué dans 4 types de contenants différents (série 1) :

- Modalité 1 : cuve en inox de 4 hL
- Modalité 2 : 1 cuve tronconique neuve en bois de chêne sessile de 50hL
- Modalité 3 : 2 barriques usagées (1 an) de 2.25 hL en bois de chêne sessile
- Modalité 4 : 2 barriques neuves de 2.25 hL en bois de chêne sessile

A l'issue de la fermentation alcoolique, les vins sont conservés sur lies totales et le prélèvement des échantillons a eu lieu après cinq mois d'élevage. Pour les modalités dupliquées (barriques), l'échantillon est prélevé en utilisant les deux barriques de chaque lot à part égale.

#### *Expérimentation 2 : vins rouges*

L'expérimentation a été menée à partir d'un vin rouge de Crozes-Hermitage du millésime 2008, issu du cépage Syrah et provenant de sols argileux et caillouteux. La vinification s'est déroulée en cuve inox, et à l'issue de la fermentation malo-lactique, le vin a été distribué dans 4 types de contenants (série 2) :

- Modalité 1 : 1 cuve tronconique usagée (1 an) en bois de chêne sessile de 85 hL
- Modalité 2 : 2 barriques usagées (2 ans) de 2.25 hL en bois de chêne sessile
- Modalité 3 : 2 barriques usagées (1 an) de 2.25 hL en bois de chêne sessile
- Modalité 4 : 2 barriques neuves de 2.25 hL en bois de chêne sessile

Le prélèvement des échantillons est réalisé après 12 mois d'élevage. Pour les modalités dupliquées (barriques), l'échantillon est prélevé en utilisant les deux barriques de chaque lot à part égale.

#### Analyse sensorielle

##### Test de classement par rangs - Test de Friedman

Le test sensoriel utilisé pour ces essais est le test de classement par rangs, dont le principe a été décrit au chapitre 1. En revanche, le traitement statistique appliqué diffère. Le but de cette expérimentation est d'étudier l'influence de la nature du contenant sur la perception de la sucrosité, il n'existe donc pas clairement de hiérarchie supposée entre les modalités. L'AFNOR préconise l'utilisation du test de Friedman pour l'analyse des résultats.

A l'instar du test de Page, il s'agit d'un test non paramétrique largement utilisé en analyse sensorielle. Les  $p$  modalités sont classées par ordre croissant par les  $n$  sujets et les sommes de rangs  $R_1, R_2 \dots R_p$ , sont déterminées. On calcule la valeur  $F$ :

$$F = \frac{12 \sum_{i=1}^p R_i^2}{n \cdot p \cdot (p + 1)} - 3 \cdot n \cdot (p + 1)$$

On compare alors  $F$  à la valeur  $\Lambda$  lue dans la table du  $\chi^2$  à  $(p - 1)$  degrés de liberté.

- Si  $F > \Lambda$ , les produits sont considérés comme étant significativement différents.
- Si  $F \leq \Lambda$ , les produits sont considérés comme n'étant pas différenciables.

Si le test est globalement significatif, il est alors possible d'effectuer une comparaison multiple des sommes de rangs afin de déterminer la différence éventuelle des échantillons deux à deux. On compare en effet la valeur absolue de la différence entre les sommes de rangs de deux produits à la valeur  $\delta$  calculée comme suit :

$$\delta = 1.96 \sqrt{n \cdot p \cdot (p + 1) / 6}$$

- Si  $|R_i - R_j| > \delta$ , les modalités  $i$  et  $j$  sont considérées comme différentes au risque de 5 %.
- Si  $|R_i - R_j| < \delta$ , les modalités  $i$  et  $j$  sont considérées comme non différenciables.

##### Conditions et panels utilisés

Dans le cadre de l'expérimentation 1 (vins blancs), le panel utilisé est constitué de 32 dégustateurs du Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation (DUAD).

Pour l'expérimentation 2 (vins rouges), le panel est constitué de 28 dégustateurs travaillant dans les laboratoires de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV).

Les vins sont présentés dans des verres noirs de type AFNOR, à 12°C pour les vins blancs et à 16°C pour les vins rouges. Les dégustations ont lieu dans la salle de dégustation de la Faculté d'œnologie, climatisée à 20°C.

Tableau 9 - Panels et modalités utilisés pour l'analyse sensorielle de l'influence du contenant sur la sucrosité.

Vin	Panel	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Bordeaux blanc 2007 (série 1)	32 dégustateurs DUAD	Cuve inox 4 hL	Cuve bois 50hL	Barriques 1 an	Barriques neuves
Crozes-Hermitage rouge 2008 (série 2)	28 dégustateurs ISVV	Cuve bois 85 hL	Barriques 2 ans	Barriques 1 an	Barriques neuves

## Ajout de vanilline, de whisky-lactone et d'eugénol dans les vins élaborés dans des contenants différents. Effet sur la perception de la sucrosité (page 46)

### Dosage des composés volatils

La méthode utilisée, dite des « ajouts dosés », a été décrite par Chatonnet *et al.* (1992).

Une gamme étalon est réalisée par ajout des 3 molécules (vanilline, whisky-lactone – isomères *cis* et *trans*, eugénol) à des concentrations connues. Le protocole décrit ci-dessous est appliqué à un vin blanc et un vin rouge non boisés.

100 mL de vins sont additionnés de 100 µL d'étalon interne (octan-3-ol à 100 mg/L dans l'éthanol absolu) et des composés aromatiques aux concentrations définies dans le tableau 11.

Tableau 11 - Concentrations en vanilline, whisky-lactone et eugénol des différents points de la gamme-étalon (Témoin, G1...G4).

Molécule	G0	G1	G2	G3	G4
Vanilline	0 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	400 µg/L
Whisky-lactone	0 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	300 µg/L	600 µg/L
Eugénol	0 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L

On procède ensuite à trois extractions successives de chaque échantillon de la gamme par 10, 5 et 5 mL de dichlorométhane par agitation à 800 rpm pendant 10, 5 et 5 minutes. Les phases organiques, séparées par décantation statique, sont assemblées, séchées au sulfate de sodium et lentement concentrées à froid sous flux d'azote (100 mL/min) jusqu'à 500 µL environ.

Les vins provenant des différents contenants sont également additionnés de 100 µL d'étalon interne puis extraits de la même façon.

Les extraits sont alors analysés par un chromatographe en phase gazeuse (CPG) TRACE GC ULTRA couplé à un spectromètre de masse (SM) DSQ II, de la société Thermo Fisher Scientific, USA.

Chromatographie en phase gazeuse : l'injection (2 µl) est effectuée en mode split/splitless. Le temps d'ouverture de la vanne est de 0.8 minute et la pression en tête de colonne de 20 psi. La programmation du four est la suivante : isotherme initiale de 5 minutes à 45°C, puis 3°C/minute jusqu'à 230°C, isotherme finale de 20 minutes à 230°C.

On utilise une colonne BP20 polaire (50 m de longueur, 0.22 mm de diamètre interne, 0.25 µm d'épaisseur de film, SGE, France).

La programmation de l'injecteur est de 180°C à 230°C à la vitesse de 150°C/min avec une isotherme initiale de 0.1 minute et une isotherme finale de 30 minutes.

Le gaz utilisé est l'hélium.

Spectrométrie de masse : la température de la ligne de transfert est de 210°C. L'acquisition des spectres de masse est en mode impact électronique (mode SIM, énergie d'ionisation : 70 eV).

#### *Analyse sensorielle*

A la suite de leur dosage dans les vins issus des divers contenants, vanilline, whisky-lactone et eugénol sont additionnés dans les différentes modalités jusqu'à obtenir une concentration égale à celle de l'échantillon le plus intense.

Ainsi modifiés, tous les vins de la même expérience, contenant la même quantité de composés volatils, sont alors soumis à l'analyse sensorielle en utilisant exactement les mêmes conditions et les mêmes panels que ceux décrits dans ce chapitre, au paragraphe II.A.1.

### **Ajout de 2-furanemethanethiol et de vanilline dans des vins non boisés. Effet sur la perception de la sucrosité (page 50)**

Les deux vins utilisés pour cette étude ont été décrits au chapitre 1: un Bordeaux blanc 2008 et un Bordeaux rouge 2007. Ces deux vins, élevés en cuve inox, n'ont jamais été au contact du bois de chêne.

Le 2-furanemethanethiol et la vanilline sont additionnés dans les vins à partir de solutions éthanoliques à 100 µg/L et 1 g/L respectivement. Les quantités introduites suivent une loi géométrique de raison 3.

Pour le 2-furanemethanethiol, les quatre modalités préparées sont les suivantes :

- Modalité 1 : vin de base (témoin)
- Modalité 2 : vin de base + 5 ng/L
- Modalité 3 : vin de base + 15 ng/L
- Modalité 4 : vin de base + 45 ng/L

Pour la vanilline, les quatre modalités préparées sont les suivantes :

- Modalité 1 : vin de base (témoin)
- Modalité 2 : vin de base + 100 µg/L
- Modalité 3 : vin de base + 300 µg/L
- Modalité 4 : vin de base + 900 µg/L

Le panel utilisé est constitué de 38 dégustateurs du Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation (DUAD). Les vins sont servis dans des verres noirs de type AFNOR, à 12°C pour les vins blancs et à 16°C pour les vins rouges.

Deux sessions sont organisées en mai 2009 :

- Une session portant sur l'étude du 2-furanemethanethiol, dans les vins blancs et rouges
- Une session portant sur l'étude de la vanilline, dans les vins blancs et rouges

La dégustation se présente sous forme d'un test de classement : il est demandé aux dégustateurs de classer les vins selon l'intensité de la sucrosité, et non de la perception aromatique.

Les modalités contiennent des concentrations croissantes et connues de 2-furanemethanethiol et de vanilline : il existe une hiérarchie supposée entre eux. Par conséquent, le test de Page est utilisé pour le traitement des résultats.

## Matériels et méthodes de la deuxième partie

### Protocole d'extraction solide/liquide (page 62)

1 kg de copeaux de bois de cœur de chêne sessile du Caucase mûré à l'air libre pendant 3 ans sont placés dans un récipient en verre contenant 4 L d'un mélange eau/éthanol 50/50 (soit une concentration massique en bois de 250 g/L). Le récipient, préalablement saturé en dioxyde de carbone, est fermé de façon hermétique et maintenu à l'obscurité pendant 20 jours à 22°C environ.

A l'issue de cette période, le macérat obtenu (environ 3 L) est filtré sur un papier-filtre de un diamètre moyen des pores 30 µm, puis stocké sous dioxyde de carbone. Il est noté **CZNCA**.

### Généralités concernant le suivi de la purification de l'extrait CZNCA (page 64)

A l'issue de chaque étape de purification, les fractions sont évaporées, reprises dans l'eau milliQ et lyophilisées. On renouvelle la reprise dans l'eau et la lyophilisation afin d'éliminer les éventuelles traces de solvants.

Sauf indication contraire, les conditions de dégustation utilisées dans ce protocole sont les suivantes : 3 mg de chaque fraction sont repris dans 600 µL d'éthanol. 60 mL d'eau osmosée sont ensuite additionnés, de façon à obtenir une solution à 1 % d'éthanol et de concentration 50 mg/L en composés du chêne. La dégustation est réalisée par quatre personnes entraînées, dans des verres AFNOR.

Un suivi analytique des fractions peut également être effectué par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse. Les conditions expérimentales sont résumées ci-dessous.

Tableau 17 - Conditions expérimentales de la CLHP analytique.

Appareil :	Spectra System (Thermo Fisher Scientific)
Logiciel :	ChromQuest 4.2
Détecteur :	UV à barrette de diodes Spectra System UV 1000 (Thermo Fisher Scientific) La longueur d'onde utilisée est 280 nm.
Colonne :	Beckman Coulter Ultrasphere ODS (C18) 250 x 4.6 mm Porosité 5 µm
Phase mobile :	Solvant A : eau milliQ + 0.1 % d'acide formique Solvant B : acétonitrile CLHP + 0.1 % d'acide formique Gradient :
	Temps (min) 0 2 19 20 23 24 27
	% de B 10 10 70 95 95 10 10
	Débit : 1 mL/min
Injection :	10 µL, à l'aide d'un injecteur automatique

## Extractions liquides/liquides successives de CZNCA (page 67)

### *Extraction à l'heptane*

Une macération de copeaux est réalisée selon la procédure décrite précédemment.

3 L de filtrat **CZNCA** sont récupérés et concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide (la température du bain ne dépassant pas 35°C) jusqu'à obtenir un volume de 1 litre environ. Une suspension de couleur brune est obtenue : elle constitue la phase aqueuse.

Une ampoule à décanter de 1 litre est remplie avec 500 mL de phase aqueuse et de 100 mL de *n*-heptane de qualité CLHP. Après agitation manuelle, les deux phases sont séparées par décantation.

La séparation est aisée et rapide.

La phase supérieure (organique) est isolée, et la phase inférieure (aqueuse) est réintroduite dans l'ampoule à décanter. Deux extractions supplémentaires sont réalisées de la même façon. Les phases organiques sont assemblées puis évaporées sous vide. La phase aqueuse est également concentrée sous vide.

L'ensemble de cette extraction est réalisée de la même façon avec les 500 mL de phase aqueuse restants.

La fraction organique est reprise dans quelques gouttes d'éthanol, puis complétée avec 100 mL d'eau milliQ. Les deux fractions obtenues sont alors lyophilisées deux fois. Le lyophilisat de la phase aqueuse se présente sous forme d'une poudre brun foncé. La phase organique conduit à une très faible quantité (quelques milligrammes) de solide jaunâtre.

### *Extraction à l'acétate d'éthyle*

Le lyophilisat de la fraction **CZNCA-1Aq** obtenu précédemment est solubilisé dans 500 mL d'eau milliQ, dans un bain à ultrasons. La suspension obtenue constitue la phase aqueuse qui est extraite 7 fois par 100 mL d'acétate d'éthyle (agitation manuelle).

La décantation est délicate au cours des deux ou trois premières extractions, puisqu'un précipité marron foncé se forme et tend à gêner l'écoulement du liquide dans l'ampoule. Ce précipité est toutefois conservé au cours des extractions successives car il est susceptible de se solubiliser partiellement.

Les phases organiques (phases supérieures) sont assemblées puis évaporées sous vide. Le résidu solide est repris dans 2 mL d'éthanol et complété par 200 mL d'eau milliQ. La phase aqueuse est concentrée sous vide.

Les fractions obtenues sont alors lyophilisées deux fois. Les lyophilisats se présentent sous forme de poudres de couleur marron foncé pour la phase aqueuse et marron-orangé pour la phase organique.

### *Extraction au méthyl ter-butyl éther (MtBE)*

Le lyophilisat de **CZNCA-2Org** est solubilisé par sonication dans 5 mL d'éthanol puis repris dans 500 mL d'eau milliQ. La phase aqueuse ainsi obtenue est extraite 7 fois par 100 mL de MtBE dans une ampoule à décanter de 1 L, par agitation manuelle.

La séparation entre les deux phases est rapide et la décantation ne pose pas de problème majeur. Le solvant organique, constituant la phase supérieure, se colore rapidement en jaune foncé.

Les phases organiques recueillies sont assemblées et évaporées sous vide. Le résidu solide est repris dans 3 mL d'éthanol et complété par 200 mL d'eau milliQ. La phase aqueuse est concentrée sous vide.

Les fractions provenant de cette extraction sont lyophilisées deux fois puis dégustées. Les phases organique et aqueuse se présentent sous forme de poudres respectivement marron-orangé et marron foncé.

## Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge couplée à la Gustatométrie (CPC-G) (page 73)

### *Appareillage*

Le laboratoire GESVAB dispose de deux appareils de CPC : l'un équipé avec une colonne de volume 1 L, l'autre de volume 200 mL. C'est ce dernier appareil qui est utilisé pour la mise au point de la méthode de fractionnement.

Il s'agit d'un appareil FCPC 200 de la firme Kromaton® (Angers, France), constitué de 20 disques de partition, contenant au total 1320 cellules de volume 0.13 mL. La capacité totale de la colonne est de 204 mL, avec un volume mort de 32.3 mL. Une distance de 105 mm sépare chaque cellule du centre du rotor. La vitesse de rotation peut varier de 0 à 2000 rpm.

L'alimentation de la colonne en solvants est assurée par une pompe binaire CLHP modèle 321-H12 de marque Gilson.

L'injection de l'échantillon dans le système se fait par l'intermédiaire d'une valve haute pression (3725(i)038 Rhéodyne), équipée d'une boucle d'injection de 10 mL. Un détecteur Varian UV Prostar 325 est utilisé.

En sortie de colonne, les fractions sont récupérées à l'aide d'un collecteur Gilson FC 204, dans des tubes en verre de 12 mL.

### *Système de solvants*

Le choix du système de solvants est basé sur l'étude de la partition des composés de l'échantillon dans les deux phases.

En pratique, divers systèmes sont préparés en faible quantité (quelques mL) à partir des solvants considérés. Parallèlement, des piluliers sont remplis avec chacun 1 mg de l'échantillon à fractionner. Chaque pilulier est complété avec 1 mL de phase supérieure et 1 mL de phase inférieure d'un système donné. Après agitation, 100 µL de chaque phase sont prélevés, évaporés à l'aide d'un évaporateur sous vide RapidVap, repris dans 1 mL de solution méthanol/eau 50/50. Les divers échantillons sont alors injectés en CLHP analytique. La partition des composés dans les deux phases est estimée à l'aide des chromatogrammes enregistrés.

Les systèmes B, C, D, F, G, H, J, K, L et M de la gamme Arizona (Foucault & Chevolut, 1998) ont été testés de cette façon.

En mode élution, on estime que le meilleur système pour le fractionnement d'un extrait complexe est celui dont les solutés se répartissent entre les deux phases avec un coefficient de partage proche de 1 (Maciuk, 2005).

Le système G de la gamme Arizona a été choisi sur cette base.

Il s'agit d'un système biphasique quaternaire, dont les solvants sont le *n*-heptane (Hept), l'acétate d'éthyle (AcOEt), le méthanol (MeOH) et l'eau (H<sub>2</sub>O).

Les proportions sont les suivantes : Hept / AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O     1 / 4 / 1 / 4

On remplit une ampoule à décanter de deux litres avec :

- 200 mL de *n*-heptane de qualité CLHP
- 800 mL d'acétate d'éthyle de qualité CLHP
- 200 mL de méthanol de qualité CLHP
- 800 mL d'eau milliQ

Après agitation manuelle, les deux phases obtenues (environ un litre de chaque) sont séparées par décantation puis placées dans un bain à ultrasons pendant une heure afin de les dégazer.

### *Mise en œuvre de la séparation*

La CPC est utilisée en mode élution. La phase inférieure (composée essentiellement de méthanol et d'eau milliQ) constitue la phase stationnaire, notée **A**, et la phase supérieure (composée essentiellement de *n*-heptane et d'acétate d'éthyle) constitue la phase mobile, notée **B**.

Dans un premier temps, la colonne est remplie à l'aide de la phase stationnaire **A**, par pompage de 500 mL à un débit de 10 mL/min. La rotation de la colonne est fixée à 1200 rpm.

L'élution se fait ensuite selon un mode isocratique, avec un débit de 10 mL/min de phase **B**.

Dans ces conditions, la pression de remplissage est de 28 bars et le volume de phase stationnaire éjecté, correspondant au volume de phase mobile dans la colonne, est de 72 mL (le pourcentage de rétention de la phase stationnaire est donc de 62.5 %). L'élution est effectuée en mode ascendant.

700 mg d'extrait **CZNCA-3Org** sont solubilisés dans 2 mL de phase mobile et 4 mL de phase stationnaire. Une émulsion orange est obtenue, elle est filtrée à l'aide d'un filtre-seringue en téflon de 0.45 µm. Le filtrat se présente sous forme d'un système biphasique stable.

L'échantillon est alors injecté dans le système par l'intermédiaire de la vanne Rhéodyne.

L'acquisition débute au moment de l'injection, et la détection UV se fait à 254 et 280 nm.

Le collecteur de fraction est réglé à 1 tube/min.

Le système est basculé en mode descendant au tube 68. L'élution se fait alors à partir de la phase **A** avec un débit de 10 mL/min. L'ensemble de l'expérience est effectuée à température ambiante (environ 20°C).

La durée totale de la manipulation est de 90 minutes. A l'issue de cette période, 200 mL de phase **A**, puis 500 mL de méthanol sont pompés, afin de nettoyer la colonne.

### *Constitution des fractions et dégustation*

L'expérience a permis de collecter 90 tubes, contenant chacun 10 mL de liquide.

Afin de réduire le nombre d'échantillons à déguster, il faut regrouper certains tubes pour constituer un nombre limité de fractions. Le regroupement des tubes a été effectué sur la base d'analyses en CLHP et en particulier des profils chromatographiques.

Dans un premier temps, 100 µL ont été prélevés tous les cinq tubes. Ils ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur sous vide RapidVap (bloc chauffant de 110 tubes de contenance) puis repris dans 500 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50.

10 µL de chaque échantillon ont été injectés en CLHP analytique, selon les conditions décrites précédemment.

Le regroupement des tubes est basé sur l'allure générale des chromatogrammes : les échantillons successifs présentant les mêmes pics majeurs et un profil chromatographique similaire sont considérés comme appartenant à une même fraction. Des prélèvements et des analyses CLHP supplémentaires ont été effectués sur d'autres tubes, afin d'affiner le regroupement des tubes.

Chaque fraction est alors constituée par assemblage des tubes, puis elle est évaporée à l'aide de l'évaporateur rotatif, reprise dans de l'eau milliQ puis lyophilisée deux fois.  
Les différentes fractions, numérotées en chiffres romains, sont alors dégustées selon le protocole décrit au paragraphe I.A.2.

## Purification par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse (page 88)

La mise au point de la méthode expérimentale, en particulier du gradient d'élution, est réalisée en injectant de faibles quantités (1 mg) de l'échantillon initial.

La purification effective de la fraction est permise par trois injections successives de 17 mg d'échantillon, qui a été préalablement dissous dans 160 µL de méthanol de qualité CLHP, puis filtré à 0.45 µm à l'aide d'un filtre seringue.

Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode choisie sont résumées dans le tableau 21.

Au cours de la séparation, la pression du système se situe entre 180 et 200 bars.

Les différents pics sont collectés manuellement à la sortie du détecteur UV, dans des tubes en verres. Généralement, l'acquisition est stoppée après l'élution du dernier pic : la colonne est alors lavée puis équilibrée avant une nouvelle injection.

Tableau 21 - Conditions expérimentales de la CLHP préparative.

Appareil :	
Varian	
Pompes haute pression : modèle Prostar 218	
Logiciel :	
Prostar Dynamax 24 (Varian)	
Détecteur :	
UV à barrette de diodes Prostar 345 (Varian)	
Les longueurs d'onde utilisées sont 254 et 280 nm.	
Colonne :	
Microsorb 100-5 C <sub>18</sub> (Varian Dynamax)	
250 x 21.4 mm	
Porosité 5 µm	
Pré-colonne :	
Prontosil C <sub>18</sub> 6 µm 50 x 20 mm (Bischoff chromatography)	
Phase mobile :	
Solvant A : eau milliQ + 0.05 % d'acide trifluoroacétique	
Solvant B : acétonitrile CLHP + 0.05 % d'acide trifluoroacétique	
Gradient :	
Temps (min)	0    5    13    26    35    50    52    24    27
% de B	8    18    18    26    36    50    100    92    92
Débit : 20 mL/min	
Injection :	
Manuelle, à l'aide d'une boucle d'injection de 5 mL	

Trois injections de **CZNCA-X** ont été effectuées, soit une quantité totale de 52 mg. Un aliquot (50 µL) de chaque tube collecté est prélevé, dilué 10 fois avec de l'eau milliQ, et injecté en CLHP analytique afin de vérifier la pureté obtenue.

Après vérification de la pureté de chacun des tubes, ces derniers sont regroupés par composé. En vue de la lyophilisation de l'extrait, la teneur en acétonitrile des échantillons est réduite par évaporation et addition d'eau milliQ. La masse totale récupérée est de 22.4 mg, ce qui correspond à un rendement global de 44 %.

## Utilisation de la LC-FTMS pour l'identification des molécules de la fraction CZNCA-X (page 102)

Un spectromètre FT/MS Exactive est couplé à un système de Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (système LC-FT/MS).

### *Descrptif du système et conditions chromatographiques*

La partie chromatographique est constituée de la chaîne U-HPLC Accela de Thermo Fisher Scientific. Elle comporte une pompe quaternaire, pouvant supporter des pressions de 15000 psi (plus de 1000 bar), et dont le

volume mort est de 65  $\mu\text{L}$ , ce qui permet d'obtenir des séparations très fines et à vitesse élevée, sur des colonnes de faible granulométrie (inférieure à 2  $\mu\text{m}$ ). Cette pompe est associée à un passeur automatique, dont une partie est isotherme afin de garantir l'intégrité des échantillons, et à un détecteur UV à barrette de diodes. Le descriptif technique du système et les conditions chromatographiques utilisées sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 24 - Conditions opératoires utilisées pour l'analyse qualitative en LC-FT/MS.

Appareil :	
Accela (Thermo Fisher Scientific)	
Pompes U-HPLC	
Logiciel :	
Xcalibur 2.1 pour Exactive	
Détecteur UV :	
Accela PDA 1cm LightPipe Flow cell	
Colonne :	
Hypersil GOLD C18 (Thermo Fisher Scientific)	
50 x 2.1 mm	
Porosité 1.9 $\mu\text{m}$	
Phase mobile :	
Solvant A : eau LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % d'acide formique + 5 mmol/L de formate d'ammonium	
Solvant B : acétonitrile LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % d'acide formique	
Gradient :	
Temps (min)	0 0,5 4 4,2 5,4 5,5 6,5
% de B	18 18 45 98 98 18 18
Débit : 600 $\mu\text{L}/\text{min}$	
Injection :	
10 $\mu\text{L}$ à l'aide d'un passeur automatique HTC0 Pal équipé de « racks » réfrigérés	

L'acide formique est utilisé dans les deux solvants de la phase mobile, en remplacement de l'acide trifluoroacétique (TFA) décrit dans les conditions de la CLHP analytique au chapitre 5. En effet, le TFA à concentration élevée est connu pour diminuer très fortement le signal observé en spectrométrie de masse. Le formate d'ammonium permet de favoriser l'ionisation de certaines molécules via la formation d'adduits ammonium en ionisation positive. En outre, la présence de tels adduits peut favoriser le repérage de l'ion moléculaire dans le spectre de masse.

Une attention toute particulière doit être portée à la qualité des solvants, afin d'éviter une pollution des spectres de masse et un éventuel endommagement du système après de nombreuses utilisations.

Les pressions observées en cours d'analyse se situent entre 400 et 500 bar. Le nombre très élevé de plateaux théoriques conférés par la colonne choisie et les conditions d'élution autorisent une réduction considérable de la durée des analyses chromatographiques.

Le détecteur UV n'est pas indispensable dans cette étude, son utilisation permet de relier les résultats observables en LC-MS avec les données enregistrées précédemment et ainsi de vérifier que les composés **A**, **B**, **C**, **D**, qui absorbent à 280 nm, soient visibles en spectrométrie de masse.

#### *Conditions de spectrométrie de masse*

Le système est équipé d'une vanne à trois voies en aval de la colonne chromatographique. Au cours d'une analyse, la phase mobile est envoyée vers le spectromètre de 0.5 à 4 min, et vers la poubelle en dehors de cette période, afin de ne pas encrasser le système avec d'éventuels composés non retenus (0-0.5 min) ou libérés pendant le lavage de la colonne (après 4 min).

Le spectromètre Exactive est connecté à un générateur d'azote produisant un flux de 30 L/min à 7 bar.

Une source d'ionisation à électrospray chauffée (H-ESI) est utilisée, avec une alternance entre le mode positif et le mode négatif entre chaque scan. Le chauffage de la sonde permet de favoriser l'élimination de la phase mobile : on peut travailler avec des débits chromatographiques relativement élevés sans utiliser une déviation vers la poubelle (split). Les conditions d'ionisation (« tune ») associées aux deux modes sont présentées dans le tableau 25.

Tableau 25 - Conditions d'ionisation utilisées en mode positif et en mode négatif.

Paramètre	Mode positif	Mode négatif
Débit du « sheath gas »	80	80
Débit du gaz auxiliaire	15	15
Débit du « sweep gas »	0	0
Tension du spray	3.5 kV	3.5 kV
Température du capillaire	350 °C	350 °C
Tension du capillaire	35 V	-35 V
Tension du tube lens	120 V	-120 V
Tension du skimmer	18 V	-18 V
Température de la source	320 °C	320 °C

Dans ces conditions d'ionisation et d'élution, la valeur de l'intensité du courant de spray demeure modérée (inférieure à 20  $\mu$ A).

Le vide observé dans l'analyseur Orbitrap est de l'ordre de  $2,5 \cdot 10^{-10}$  mbar.

Dans le cadre de l'identification des composés étudiés, la LC-FT/MS est utilisée dans la configuration suivante :

- Une gamme de masse allant de 110 à 1200 Th est choisie
- L'alternance entre mode positif et mode négatif entre chaque scan est sélectionnée
- La gamme de résolution de masse est « Ultra high », ce qui correspond à une valeur de 100 000 pour un rapport  $m/z$  200 Th
- Le calibrage est interne, en utilisant l'ion trifluoroacétate ( $m/z$  112.98450 Th) en négatif et l'ion diéthylhexyl phtalate ( $m/z$  391.28429 Th) en positif. Ces deux ions sont présents en permanence à l'état de traces dans la phase mobile
- Les acquisitions sont effectuées sans fragmentation HCD pour la détermination de la masse exacte, puis avec une énergie HCD de 80 eV afin d'obtenir des spectres de fragmentation
- Le contrôle automatique du gain est utilisé en mode « Ultimate mass accuracy », ce qui correspond à l'introduction de  $5 \cdot 10^5$  ions dans l'Orbitrap
- Le temps d'injection maximum (IT) est fixé à 100 ms
- Le traitement des résultats et la proposition de formules brutes sont réalisés à l'aide du logiciel Xcalibur 2.0

## Utilisation de la résonance magnétique nucléaire pour l'identification des molécules de la fraction CZNCA-X (page 109)

### *Matériel utilisé*

Les analyses ont été effectuées sur deux types de spectromètres.

Un spectromètre Bruker AVANCE 3, de champ magnétique 14,1 T, opérant à 600,27 MHz en proton et équipé d'une sonde 5 mm TXI (triple détection inverse noyaux X)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  et d'une sonde 5 mm BBO  $^1\text{H}$ -X, à 300 K.

Un spectromètre Bruker AVANCE DMX 500 de champ magnétique 11,5 T, opérant à 500,12 en proton et équipé d'une cryo-sonde 5 mm TXI. Ce spectromètre est situé au sein du laboratoire RMN-ILP (RMN et Interactions Lipides-Protéines), rattaché à l'UMR CNRS 6026 (Université de Rennes 1), avec lequel le GESVAB développe une collaboration.

Les échantillons sont dissous dans du méthanol deutéré (CD<sub>3</sub>OD) puis placés dans des tubes NMR 3x100 mm de Bruker ou des tubes NMR 5x200 mm 509-UP-QTZ de Norell en fonction de la quantité d'échantillon.

### *Paramètres d'acquisition*

Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) des protons ( $^1\text{H}$ ) et carbones ( $^{13}\text{C}$ ) ont été calibrés par rapport au signal de résonance du méthanol. Ils sont exprimés en ppm. Les constantes de couplage, notées  $J$ , sont exprimées en Hz.

Les principaux paramètres d'acquisition relatifs aux expériences réalisées sont résumés dans le tableau 26.

Les spectres enregistrés ont été traités avec le logiciel Topspin version 3.0

La quantité de solide dissoute dans le méthanol varie entre 1 et 5 mg, en fonction de la masse de composé pur disponible.

Tableau 26 - Principaux paramètres d'acquisition des séquences RMN mono- et bidimensionnelle.

Expérience	Proton <sup>1</sup> H	COSY	ROESY	HSQC	HMBC	HSQC-TOCSY
Nombre de points en F1	32768	256	256	256	256	256
Nombre de scans	16	32	32	64	128	48
Largeur spectrale	8417 Hz	5411 Hz	7203 Hz	7211 / 31700 Hz	7812 / 33526 Hz	7211 / 31700 Hz
Délai de relaxation D1	1.5 s	1.799 s	1.5 s	1.5 s	1.5 s	1.799 s
Durée de spin-lock			400 ms			150 ms

### Données complémentaires pour la caractérisation des composés (page 110)

#### *Pouvoir rotatoire*

Le pouvoir rotatoire des composés a été mesuré sur un polarimètre Perkin-Elmer 241, et le pouvoir rotatoire spécifique a été calculé en utilisant la loi de Biot. Les mesures ont été effectuées dans le méthanol, à 25°C.

#### *Coefficient d'extinction molaire*

L'absorbance des molécules a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Cary 300 Bio de Varian dans des cuves de 1 cm, à partir de solutions de concentration précise. La gamme de longueurs d'onde analysée est 400-190 nm. Le coefficient d'extinction molaire a été calculé en utilisant la loi de Beer-Lambert. Les mesures ont été effectuées dans le méthanol, à 25°C.

### Utilisation de la LC-FT/MS pour l'étude de la présence d'isomères et de dérivés des quercotriterpénosides I et II dans un extrait de bois de chêne (page 151)

Les différentes fractions étudiées sont solubilisées dans une solution acétonitrile/eau à 10 % (v/v) en utilisant un bain à ultrasons, puis filtrées à 0.45 µm.

10 µL de chaque échantillon sont injectés dans le système LC-FT/MS.

Les conditions chromatographiques et de spectrométrie de masse utilisées sont identiques à celles décrites dans le chapitre 6, paragraphe I.A.1. Un calibrage interne est appliqué (ions 112.98450 et 391.28429).

Le traitement des résultats est effectué grâce à l'application Qual Browser du logiciel Xcalibur version 2.0. Il est ainsi possible d'afficher le chromatogramme des ions totaux (TIC), en mode positif ou négatif, ainsi que des chromatogrammes d'ions extraits, en choisissant un ou plusieurs rapports *m/z* caractéristiques.

Contrairement aux spectromètres de masse offrant une précision de mesure de masse nominale, la LC-FT/MS permet de rechercher des ions avec une fenêtre de *m/z* très étroite. Les chromatogrammes correspondants permettent ainsi de localiser très rapidement les ions de formule C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>O<sub>z</sub>.

Les rapports *m/z* suivants sont ainsi recherchés, avec une fenêtre de précision de 4 ppm, en mode négatif :

Tableau 30 - Formule brute et rapports *m/z* des composés recherchés.

Nature de l'espèce	Formule brute	<i>m/z</i> [M-H] <sup>-</sup>
Isomère des QTT	C <sub>43</sub> H <sub>61</sub> O <sub>15</sub>	817.40105
Dérivé diglycosylé	C <sub>49</sub> H <sub>71</sub> O <sub>20</sub>	979.45387
Dérivé triglycosylé	C <sub>55</sub> H <sub>81</sub> O <sub>25</sub>	1141.50669

Dans un premier temps, ces molécules sont recherchées dans un extrait de bois non purifié CZNCA (à 100 mg/L), puis dans les différentes fractions de CPC décrites au chapitre 5, paragraphe III.C.1. (à 20 mg/L).

## Matériels et méthodes de la troisième partie

### Détermination des seuils de perception du lyonirésinol et du QTT I (page 177)

#### *Choix de la matrice d'étude*

La détermination du seuil de perception a été très fréquemment réalisée lors de l'étude des arômes du vin. En comparaison, relativement peu de seuils sont disponibles dans la littérature pour des composés non-volatils.

Or, les propriétés sensorielles d'un composé peuvent être considérablement influencées par la matrice dans laquelle il se trouve : les seuils déterminés dans l'eau sont généralement différents de ceux obtenus dans le vin. En outre, ces valeurs peuvent également varier, de façon plus faible, d'un vin à un autre.

En raison de ces effets matrices, la caractérisation sensorielle exhaustive d'un composé du vin nécessite la détermination d'au moins trois seuils : dans l'eau, dans un vin blanc et dans un vin rouge. Il peut être également intéressant d'évaluer le seuil dans une solution modèle (par exemple 12 % d'éthanol, 3 g/L d'acide tartrique, pH 3.5) ou dans d'autres types de vins.

Toutefois, la robustesse d'un seuil de perception dépend du nombre de dégustateurs. Une quantité importante de la molécule étudiée est ainsi nécessaire pour chaque test sensoriel. Les composés que nous étudions ne sont pas disponibles commercialement, et les quantités disponibles demeurent faibles. Par conséquent, nous ne pouvons utiliser qu'une seule matrice pour la détermination des seuils dans le cadre de ce travail.

Les dégustations présentées au paragraphe I de ce chapitre ont montré que le goût des deux composés est plus facilement perceptible dans le vin que dans l'eau. Nous avons ainsi choisi d'utiliser un vin blanc (Bordeaux blanc 2009, tableau 36) élevé en cuve inox, car la valeur obtenue permettra de discuter l'impact gustatif des composés dans ce type de matrice.

Tableau 36 - Principales caractéristiques analytiques du vin blanc de Bordeaux 2009 utilisé pour la détermination des seuils de perception.

Bordeaux blanc 2009	
Titre alcoométrique volumique (à 20°C)	12.6 %
Concentration en glycérol	5.9 g/L
Concentration en D-glucose + D-fructose	0.71 g/L

L'étude du comportement des différentes molécules dans d'autres milieux devront néanmoins faire l'objet de recherches ultérieures.

#### *Préparation des échantillons*

Les seuils de perception du **lyonirésinol** et du **QTT I** sont déterminés au cours de deux sessions distinctes.

Pour chaque molécule, une solution à 1 g/L est préparée dans du vin blanc, puis elle est diluée de façon à obtenir les différentes concentrations présentées au tableau 37.

Tableau 37 - Concentrations en **lyonirésinol** et en **QTT I** préparées pour la détermination des seuils de perception.

Molécule	Concentrations préparées					
<b>Lyonirésinol</b>	250 µg/L	500 µg/L	1 mg/L	2,5 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
<b>QTT I</b>	125 µg/L	250 µg/L	500 µg/L	1 mg/L	1.5 mg/L	3 mg/L

Ces concentrations ont été choisies préalablement par trois dégustateurs et les échantillons ont été préparés une heure avant les sessions.

#### *Conditions de la dégustation*

La caractérisation sensorielle des molécules non-volatiles est plus délicate et exigeante que celle des composés volatils. En effet, le dégustateur est soumis à la fatigue liée au nombre d'échantillons présentés, ainsi qu'à d'éventuels phénomènes de saturation ou de rémanence. Pour cette raison, nous avons ainsi organisé deux sessions pour chaque molécule : une le matin et une l'après-midi.

Pour chaque concentration, trois verres sont présentés aux dégustateurs, l'un d'entre eux contenant le vin additionné du composé étudié, les deux autres contenant le vin témoin.

Il est demandé à chaque individu de désigner l'échantillon différent (test à choix forcé de 1 parmi 3).

Le matin, trois concentrations sont présentées, par ordre croissant : 0.5, 1 et 2.5 mg/L pour le **lyonirésinol** et 0.25, 0.5 et 1 mg/L.

Pour chaque dégustateur, les concentrations proposées à la session de l'après-midi dépendent des résultats du matin. Il dégustera en effet à nouveau la concentration la plus basse pour laquelle il a donné une bonne réponse, afin de confirmer son jugement, ainsi que les 2 concentrations inférieures.

Par exemple, dans le cas du **lyonirésinol**, si un individu s'est trompé à 500 µg/L puis a répondu correctement à 1 mg/L et 2.5 mg/L, alors au cours de la séance de l'après-midi, il dégustera le composé à 250 µg/L, 500 µg/L et 1 mg/L.

Cette méthode permet de limiter la fatigue des dégustateurs en adaptant au mieux les concentrations présentées à sa propre sensibilité.

26 personnes appartenant au personnel des laboratoires de l'ISVV et entraînés à la dégustation des vins ont participé à ces tests sensoriels.

Les échantillons ont été présentés dans des verres AFNOR, à une température de 12°C, dans une salle de dégustation équipée de boxes individuels.

#### *Traitement des résultats*

Le calcul du seuil de perception individuel a été réalisé en effectuant la moyenne géométrique entre la plus basse concentration trouvée appartenant à une suite continue de bonnes réponses et la valeur qui lui est juste inférieure (plus haute valeur non trouvée). Le seuil des dégustateurs ayant répondu correctement pour toutes les concentrations est fixé à la plus basse valeur de la série.

Le seuil de perception collectif résulte de la moyenne géométrique des seuils individuels. C'est cette valeur qui est utilisée pour la caractérisation sensorielle du composé.

## **Développement d'une méthode de quantification du lyonirésinol et des quercotriterpénosides I et III (page 188)**

#### *Conditions chromatographiques*

L'utilisation d'un système chromatographique U-HPLC et de colonnes de faible porosité (inférieure à 2 µm) permet de réduire considérablement les temps d'analyse tout en conservant une bonne qualité de séparation. Cela constitue un avantage considérable dans le cadre de la quantification d'un grand nombre d'échantillons.

Le système chromatographique décrit au chapitre 6, paragraphe I.A.2.a, est utilisé dans les conditions décrites au tableau 39.

Tableau 39 – Conditions chromatographiques utilisées pour la méthode de quantification du lyonirésinol et des QTT I et III.

Colonne :							
Hypersil GOLD C <sub>18</sub> PFP (Thermo Fisher Scientific)							
100 x 2.1 mm							
Porosité 1.9 µm							
Phase mobile :							
Solvant A : eau LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % d'acide formique + 1 mmol/L de formate d'ammonium							
Solvant B : acétonitrile LC-MS Optima (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % d'acide formique							
Gradient :							
	Temps						
	(min)	0	0,5	4	4,2	5,4	5,5
	% de B	18	18	45	98	98	18
							18
Débit : 600 µL/min							
Injection :							
10 µL à l'aide d'un passeur automatique HTC0 Pal équipé de « racks »							
réfrigérés							

Les échantillons sont conservés à 12°C dans les tiroirs du passeur d'échantillon. Les pressions observées sont de l'ordre de 700 à 800 bar.

A l'issue de chaque injection, la seringue et l'injecteur sont rincés trois fois, à l'aide de deux solvants différents : une solution eau/méthanol 50/50 à 0.5 % d'acide formique et de l'acétonitrile. Le détecteur à barrette de diodes est activé pour un éventuel contrôle, mais il n'est pas utilisé pour la quantification.

## Paramètres de spectrométrie de masse

### Ions utilisés pour la quantification

Les ions utilisés pour le dosage du lyonirésinol et des quercotriterpénosides I et III sont présentés dans le tableau 40. Afin de limiter les erreurs de mesure liées à l'injection, un étalon interne est utilisé. Un composé phénolique, la néohespéridine dihydrochalcone (NHDC) est ainsi ajouté aux échantillons (de la gamme et inconnus), à une concentration de 100 µg/La NHDC est détectée en mode négatif.

Tableau 40 - Description des ions utilisés pour la quantification du lyonirésinol et des QTT.

Molécule	Temps de rétention	Rapport $m/z$ des ions (en Th)	Nature des ions
Lyonirésinol	1.40 min	438.21224	$[M+NH_4]^+$
		443.16764	$[M+Na]^+$
		841.36411	$[2M+H]^+$
		863.34606	$[2M+Na]^+$
Quercotriterpénoside I	2.70 min	655.34877	$[M-Glucose-H]^-$
		817.40105	$[M-H]^-$
Quercotriterpénoside III	3.05 min	655.34877	$[M-Glucose-H]^-$
		817.40105	$[M-H]^-$
NHDC (étalon interne)	3.00 min	611.19814	$[M-H]^-$

### Conditions expérimentales de la spectrométrie de masse

Les valeurs des gaz et des tensions appliquées pour l'ionisation et le transfert des ions ont été optimisées en utilisant comme références les intensités des signaux de rapport  $m/z$  443.16764 Th pour le mode positif (ion de quantification majoritaire du lyonirésinol) et 817.40105 Th pour le mode négatif (ion de quantification majoritaire des QTT I et III). Ces valeurs sont rapportées dans le tableau 41.

Tableau 41 - Conditions d'ionisation utilisées en mode positif et en mode négatif.

Paramètre	Mode positif	Mode négatif
Débit du « sheath gas »	75	75
Débit du gaz auxiliaire	20	20
Débit du « sweep gas »	3	3
[Tension du spray]	3.5 kV	3 kV
Température du capillaire	350 °C	350 °C
Tension du capillaire	35 V	-95 V
Tension du tube lens	120 V	-190 V
Tension du skimmer	18 V	-46 V
Température de la source	320 °C	320 °C

Une énergie de collision de 30 eV est appliquée dans la source (SID) en mode négatif. L'analyse chromatographique dure 6.5 minutes. Le spectromètre de masse enregistre les données pendant les cinq premières minutes. Deux segments d'acquisition sont alors programmés : le premier (de 0 à 2 minutes) correspond à des balayages en mode positif (détection du lyonirésinol) et le second (2 à 5 minutes) en mode négatif (détection des QTT).

Le flux chromatographique est envoyé vers la poubelle de 0 à 1 min et de 5 à 6.5 min. Les paramètres utilisés pour les deux segments d'acquisition sont présentés dans le tableau 42 ci-dessous.

Tableau 42 - Configuration de l'analyseur Orbitrap pour les deux segments de la méthode de quantification utilisée.

Segment	0-2 minutes	2-5 minutes
Mode	Positif	Négatif
Gamme de balayage	200-900 Th	600-1000 Th
SID (collision dans la source)	Aucun	30 V
Temps d'injection maximal	100 ms	
Contrôle automatique du gain	$3 \cdot 10^6$ ions ("High dynamic range")	
Calibrage	Externe	
Résolution	25 000 (à $m/z$ 200 Th) "Enhanced"	

### *Traitement des résultats*

L'analyse des résultats est effectuée grâce à l'application Quan Browser du logiciel Xcalibur, en utilisant l'algorithme Genesis. L'intégration automatique des signaux est utilisée.

La quantification est basée sur le rapport entre les aires du pic du composé étudié et de l'étalon interne.

Une fenêtre de masse de 5 ppm est utilisée pour la construction des chromatogrammes d'ions extraits.

### *Préparation des échantillons*

Le dosage des composés étudiés est réalisé dans deux types de matrices : vin blanc et eau-de-vie

La quantification est effectuée en injection directe, c'est-à-dire sans étape de purification préalable.

Les vins sont dilués au demi avec de l'eau milliQ et les eaux-de-vie au dixième. Les échantillons sont filtrés à 0.45 µm à l'aide d'un filtre-seringue. L'étalon interne (NHDC) est ajouté à tous les échantillons, à une concentration de 100 µg/L.

Les gammes-étalons sont réalisées dans un vin blanc et une eau-de-vie de raisin non boisés. Une solution éthanolique à 1 g/L est réalisée pour chacun des composés, puis les différentes concentrations sont obtenues par des dilutions successives ; elles sont identiques dans les deux matrices (tableau 43). Les ajouts sont réalisés après dilution de la matrice ; le facteur de dilution est pris en compte lors de l'expression des résultats des échantillons. Les injections en LC-FT/MS se font dans le sens des concentrations croissantes, afin d'éviter des éventuels phénomènes de « carry-over ».

Tableau 43 - Concentrations (C1, C2...C6) en Lyonirésinol et en quercotriterpénosides préparées pour les différents échantillons de la gamme-étalon.

Molécule	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Lyonirésinol	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1 mg/L	2 mg/L
QTT I	2 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 µg/L
QTT III	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L

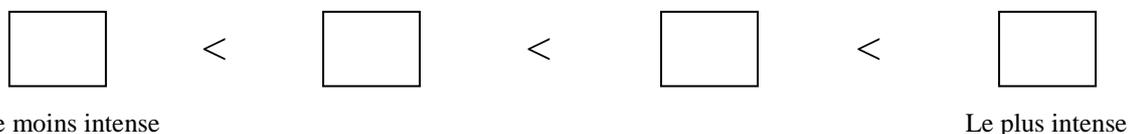
## ANNEXE 2 : Fiches de dégustation pour un test de classement par rangs et un test triangulaire

### DEGUSTATION DU 17 AVRIL 2009

Nom :

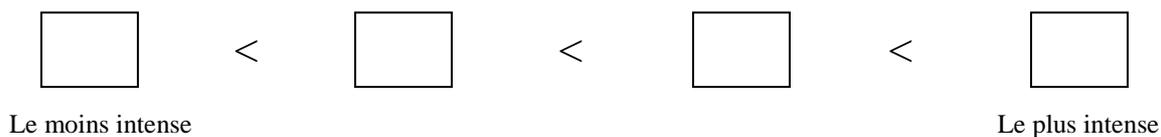
#### Série 1 : Test de classement.

Veillez vous servir des 4 vins proposés dans l'ordre suivant : **458, 511, 237, 709** et les classer par **ordre croissant** de sucrosité.



#### Série 2 : Test de classement.

Veillez vous servir des 4 vins proposés dans l'ordre suivant : **646, 183, 927, 693** et les classer par **ordre croissant** de sucrosité.



### Dégustation triangulaire

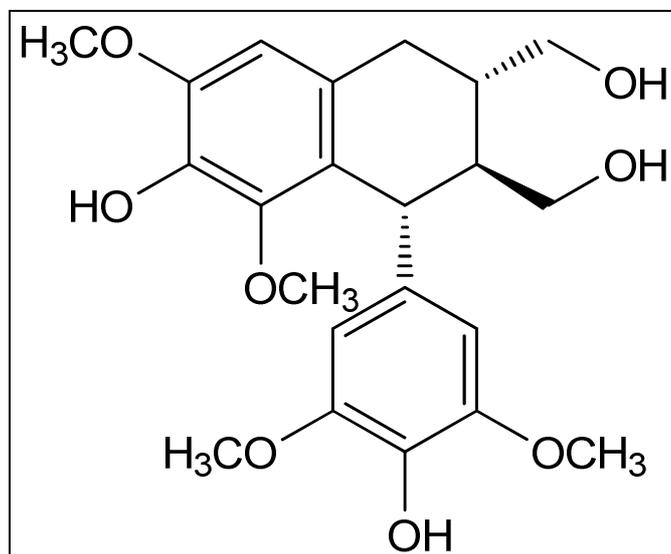
Nom :

#### Test triangulaire :

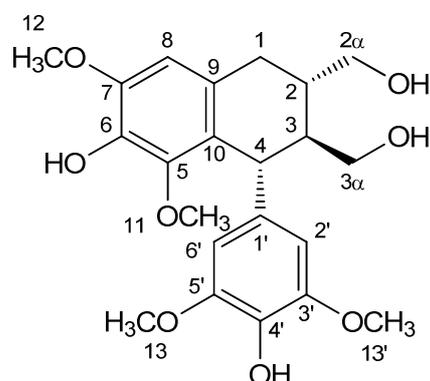
Parmi ces trois échantillons, lequel est gustativement différent ?

Lequel (lesquels) possède(nt) la saveur sucrée la plus intense ?

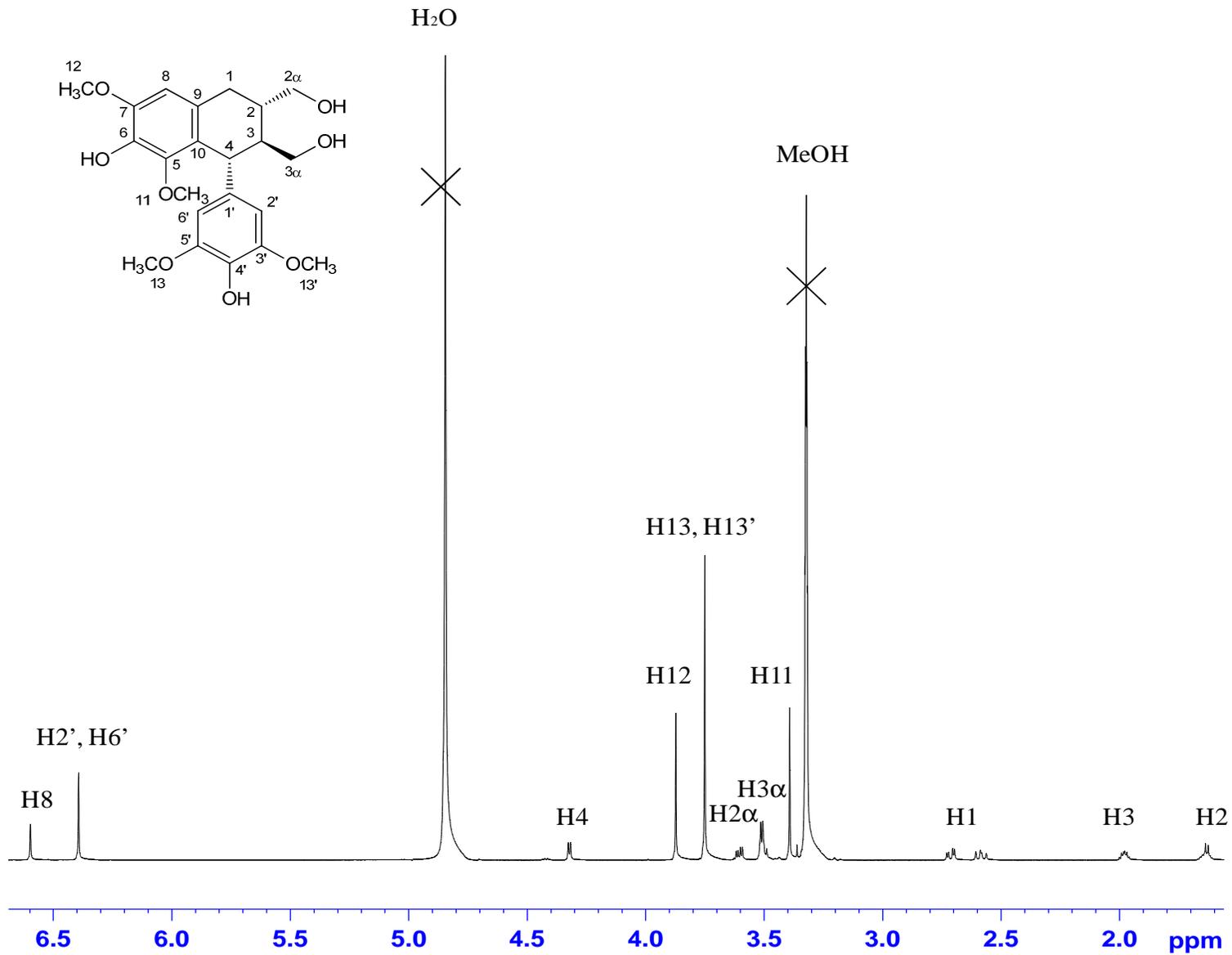
### ANNEXE 3 : Données RMN du lyonirésinol



**Annexe 3.1 : déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du lyonirésinol  
(dans le méthanol)**

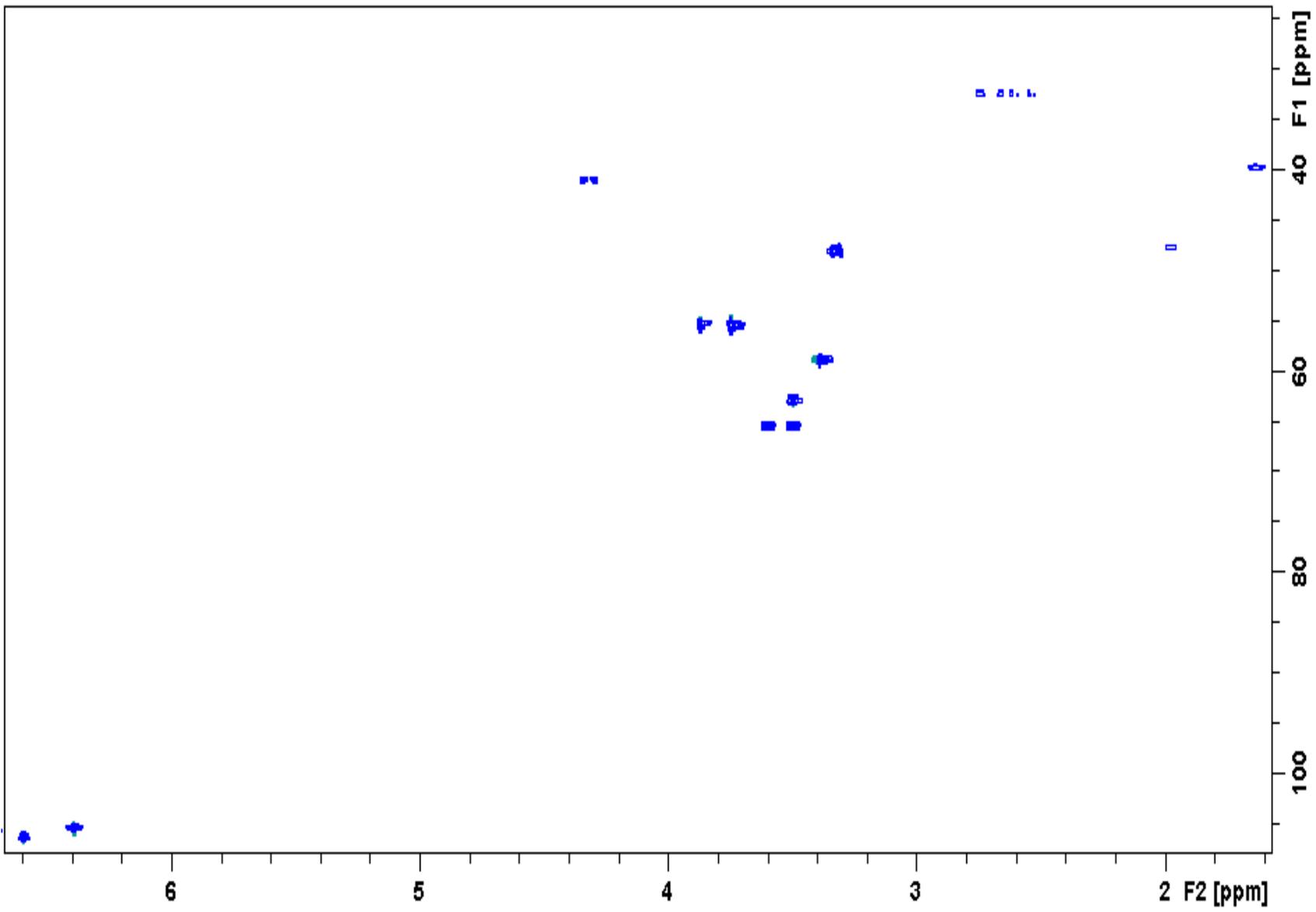


Numéro de l'atome	$\delta$ $^1\text{H}$ (en ppm) <i>multiplicité</i> (J)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (en ppm)
1	2.58 <i>dd</i> (11.8; 15.1 Hz) 2.71 <i>dd</i> (4.6; 15.1 Hz)	32.1
2	1.63 <i>m</i>	39.5
2 $\alpha$		65.4
3	1.99 <i>m</i>	47.5
3 $\alpha$		62.8
4	4.32 <i>d</i> (5.6 Hz)	40.9
5		146.3
6		137.5
7		147.3
8	6.6 <i>s</i>	106.4
9		128.8
10		124.9
11	3.39 <i>s</i>	58.7
12	3.87 <i>s</i>	55.3
1'		137.9
2', 6'	6.4 <i>s</i>	105.5
3', 5'		147.6
4'		133.2
13, 13'	3.75 <i>s</i>	55.2

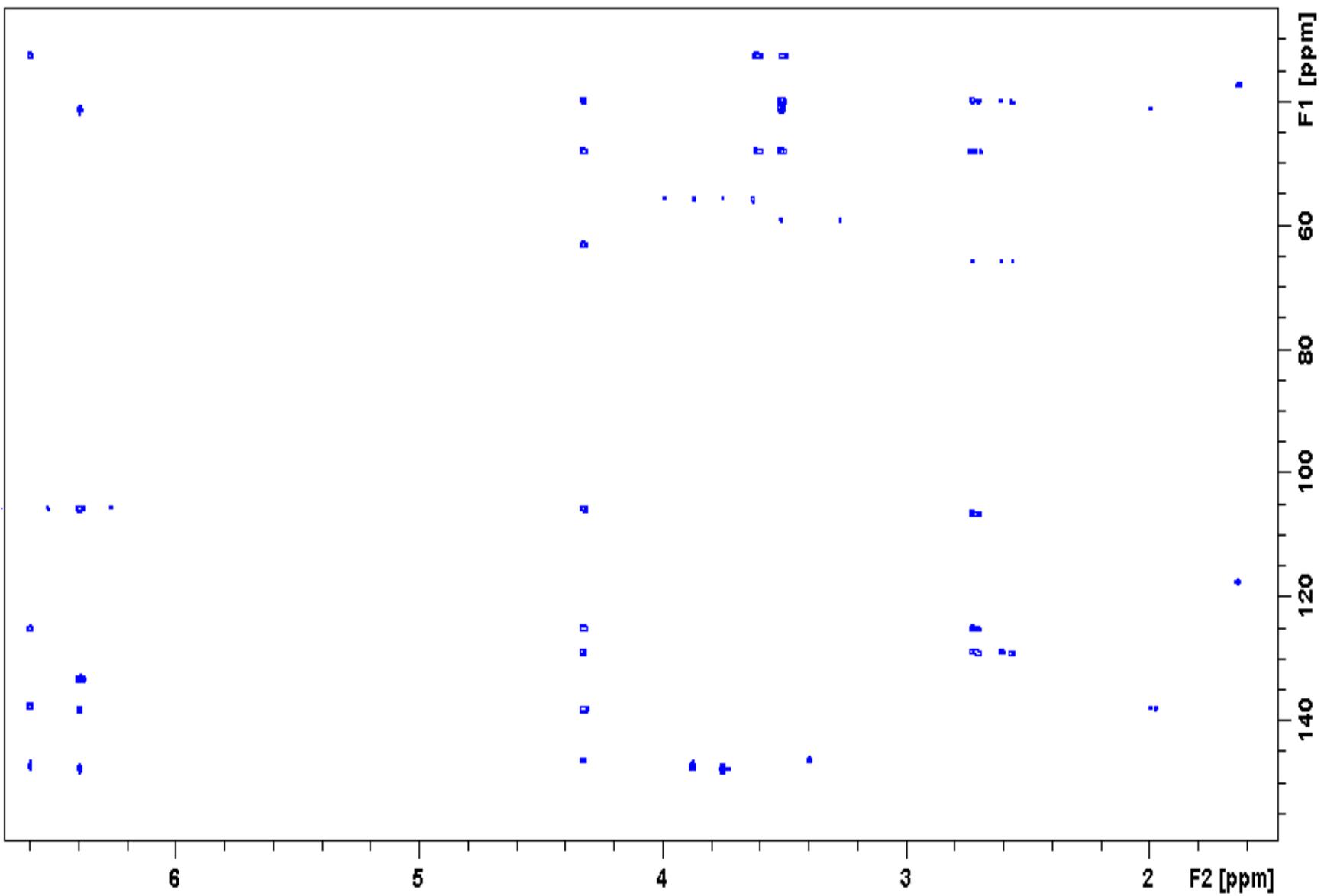


Annexe 3.2 : spectre RMN  $^1\text{H}$  du Lyoniresinol dans le  $\text{MeOH-}d_4$

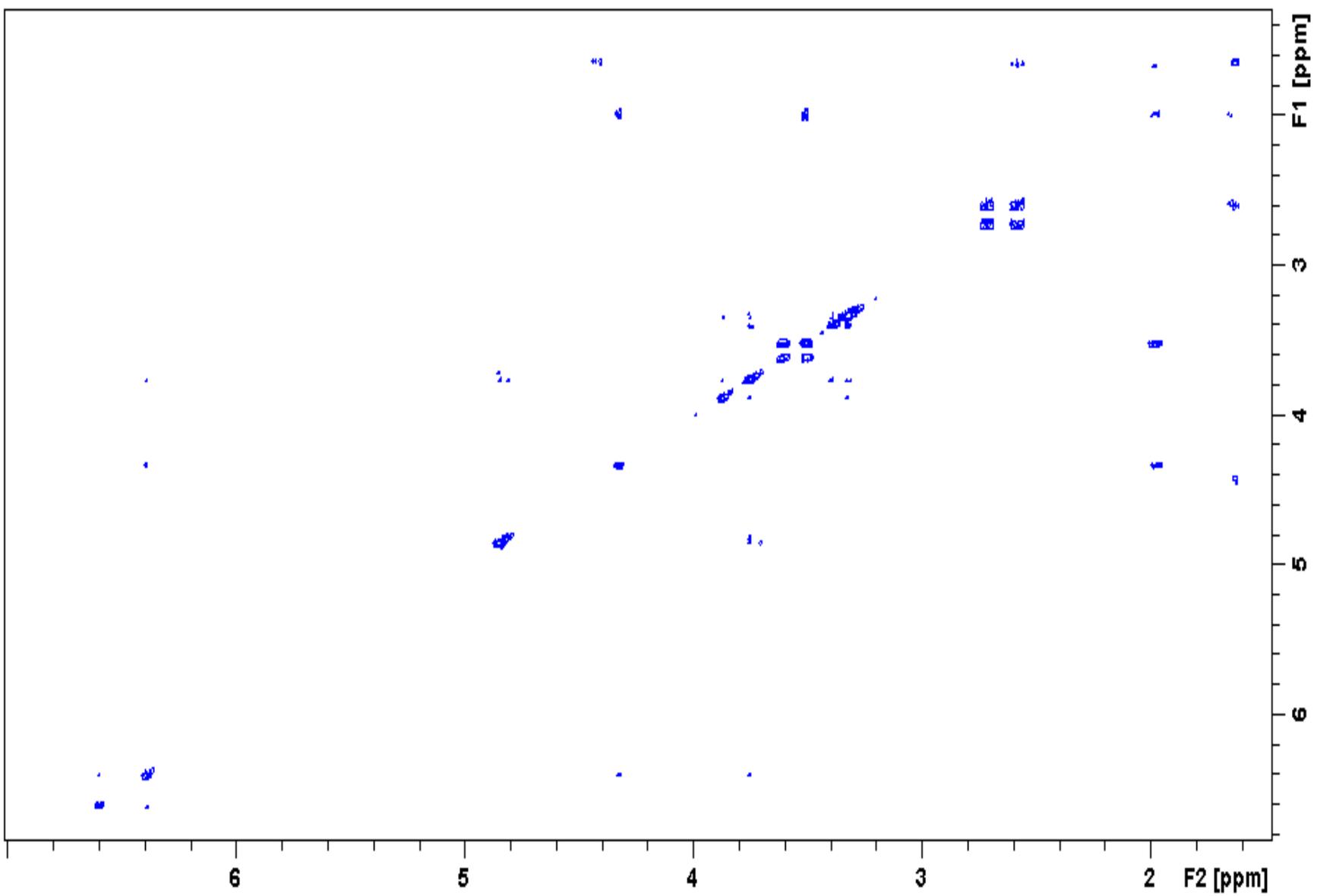
Annexe 3.3 : carte HSQC du Lyonirésinol dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



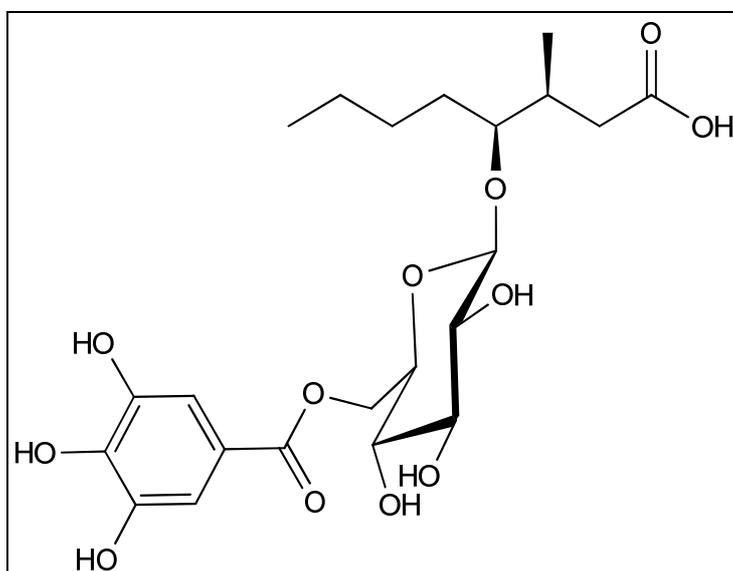
Annexe 3.4 : carte HMBC du Lyonirésinol dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



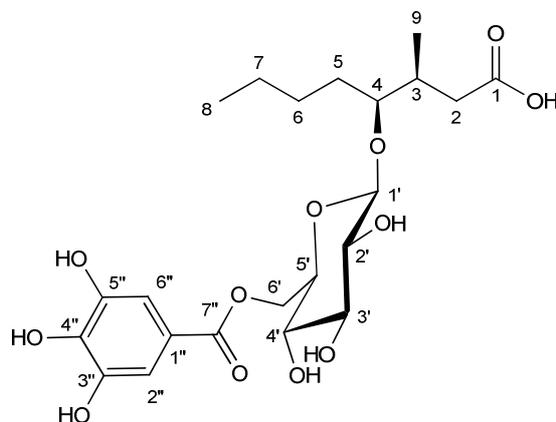
Annexe 3.5 : carte COSY du Lyonirésinol dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



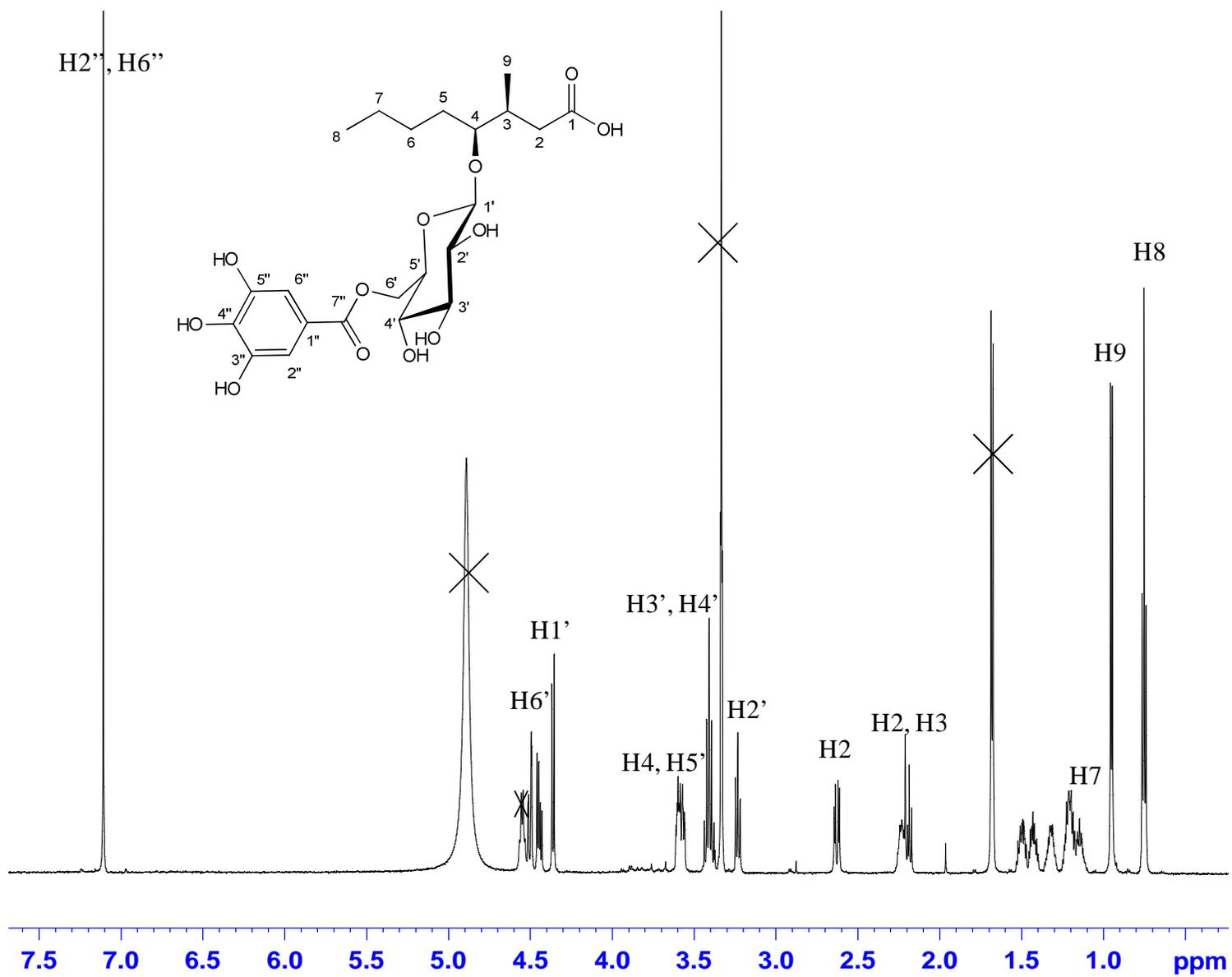
## ANNEXE 4 : Données RMN du P-WL



**Annexe 4.1 : déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du P-WL  
(dans le méthanol)**

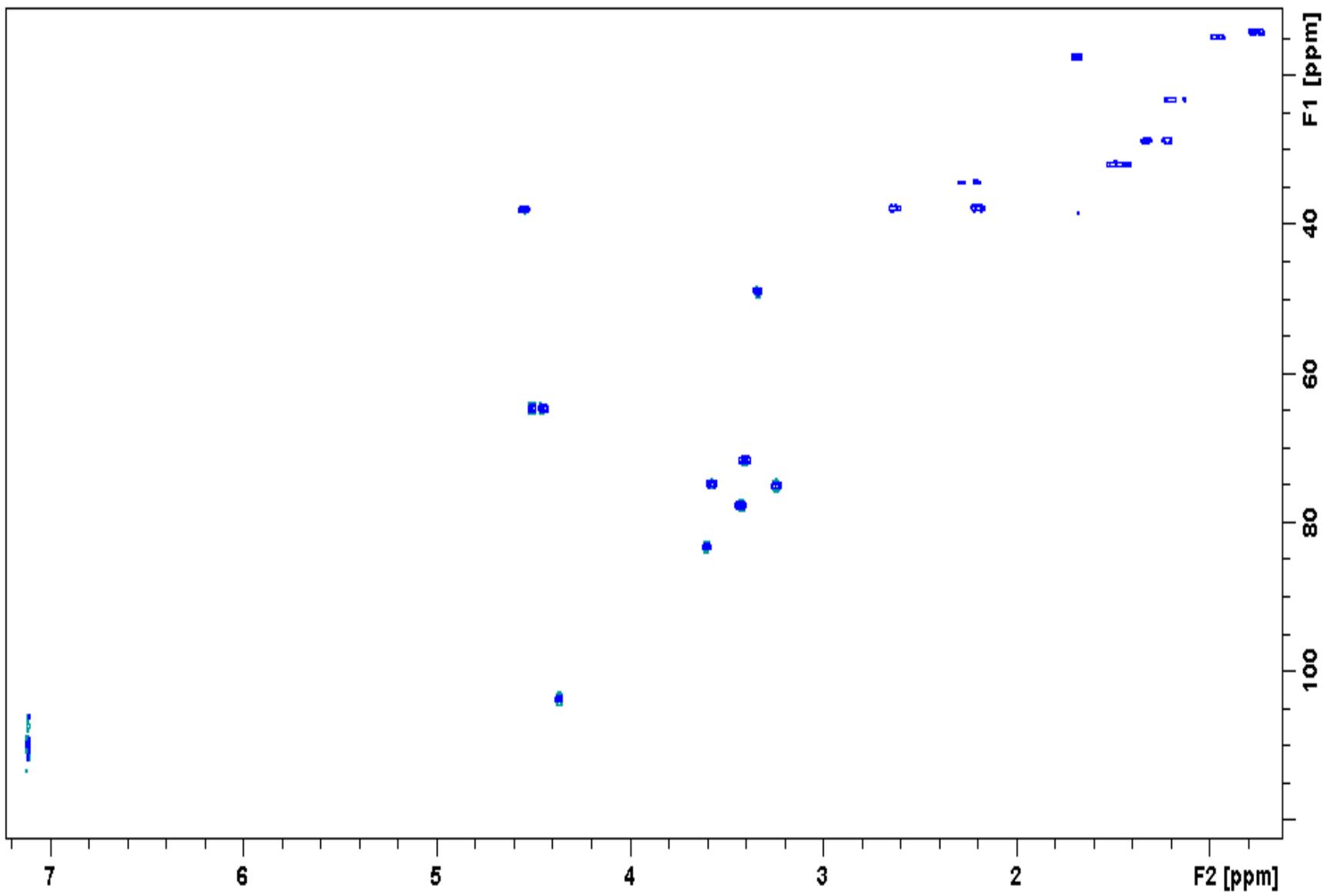


Numéro de l'atome	$\delta$ $^1\text{H}$ (en ppm) <i>multiplicité</i> (J)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (en ppm)
1		177.9
2	2.20 <i>m</i> 2.63 <i>dd</i> (5.1; 14.6 Hz)	38.4
3	2.23 <i>m</i>	34.6
4	3.60 <i>m</i>	83.9
5	1.43 <i>m</i> 1.5 <i>m</i>	32.3
6	1.21 <i>m</i> 1.33 <i>m</i>	29.1
7	1.15 <i>m</i> 1.19 <i>m</i>	23.7
8	0.75 <i>t</i> (7.2 Hz)	14.5
9	0.95 <i>d</i> (6.6 Hz)	15.1
<b>Glucopyranosyle</b>		
1'	4.37 <i>d</i> (7.7 Hz)	104.4
2'	3.23 <i>dd</i> (8.3; 9 Hz)	75.6
3'	3.42 <i>m</i>	78.3
4'	3.40 <i>m</i>	72.3
5'	3.58 <i>m</i>	75.4
6'	4.44 <i>dd</i> (6.1; 11.7) 4.51 <i>dd</i> (2.3; 11.7)	65.2
<b>Galloyle</b>		
1''		121.7
2''/6''	7.15 <i>s</i>	110.4
3''/5''		146.7
4''		139.9
7''		168.5

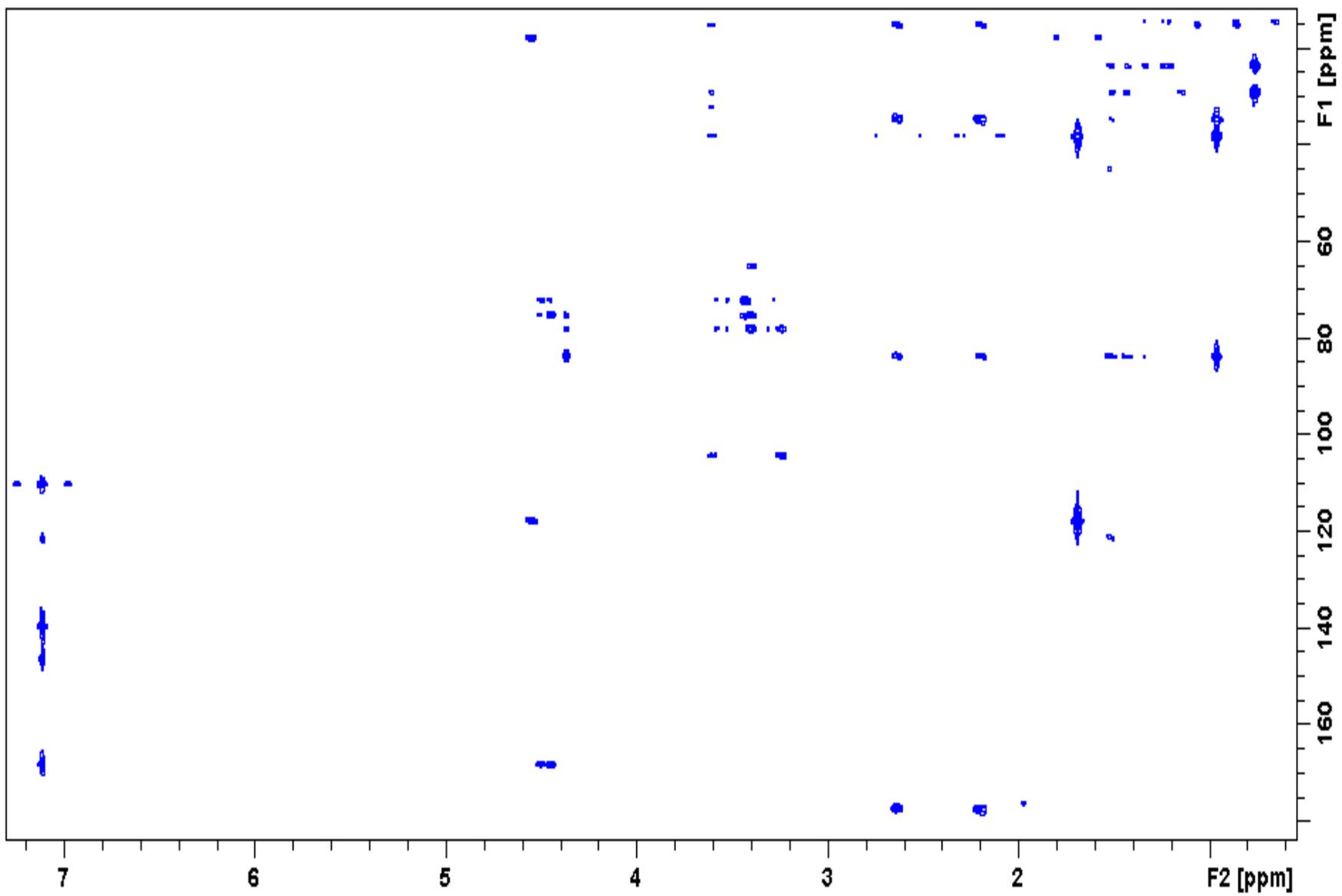


Annexe 4.2 : spectre RMN  $^1\text{H}$  du P-WL dans le  $\text{MeOH-}d_4$

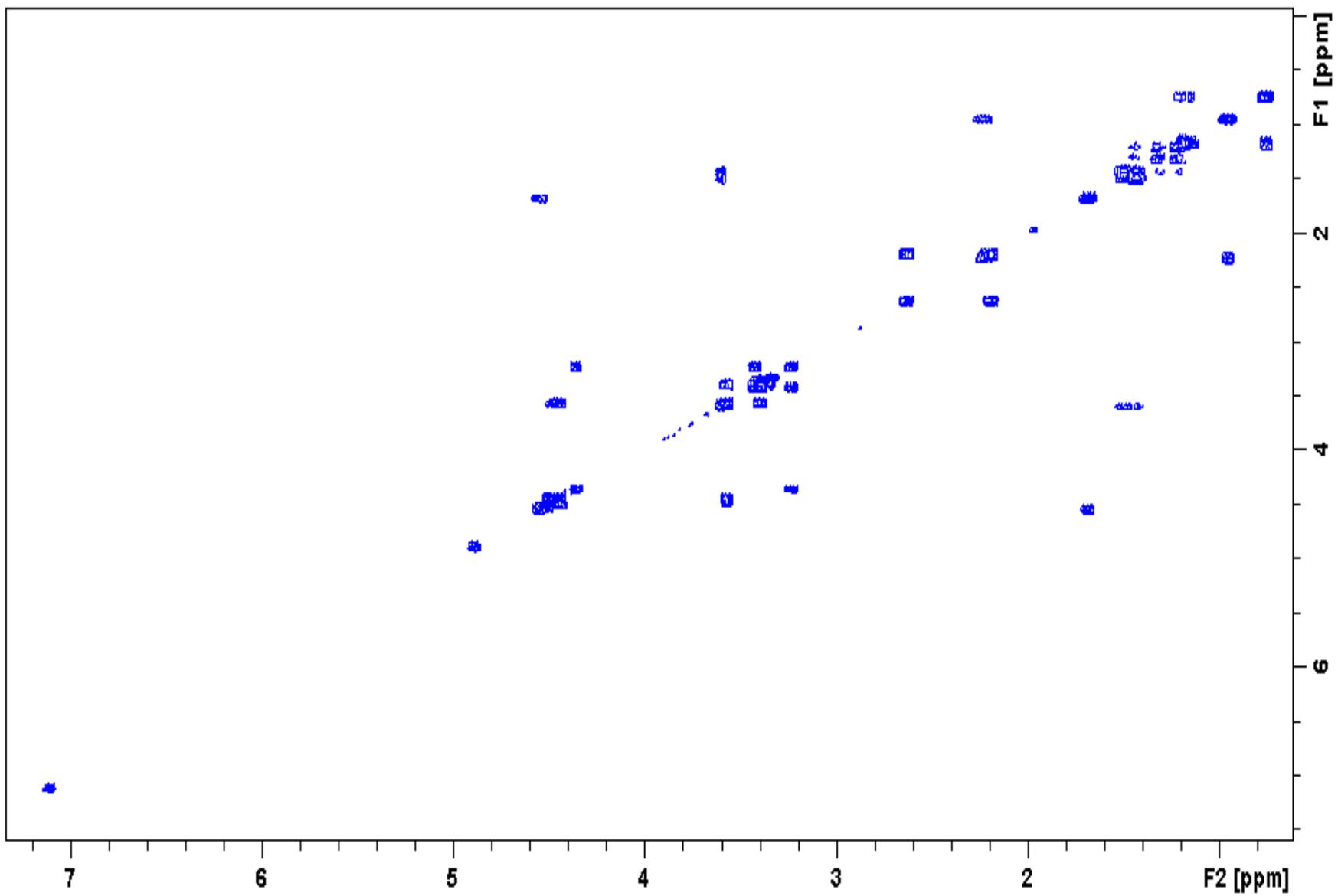
Annexe 4.3 : carte HSQC du P-WL dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



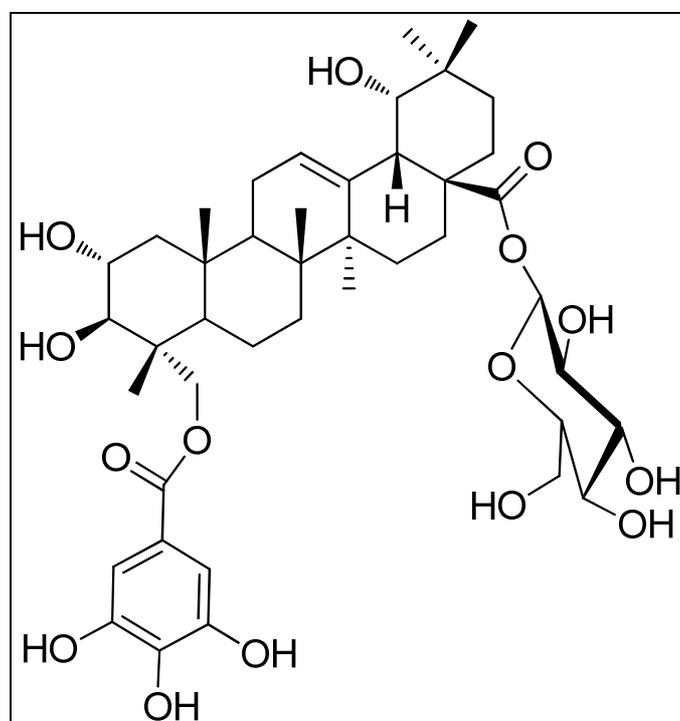
Annexe 4.4 : carte HMBC du P-WL dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



Annexe 4.5 : carte COSY du P-WL dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>

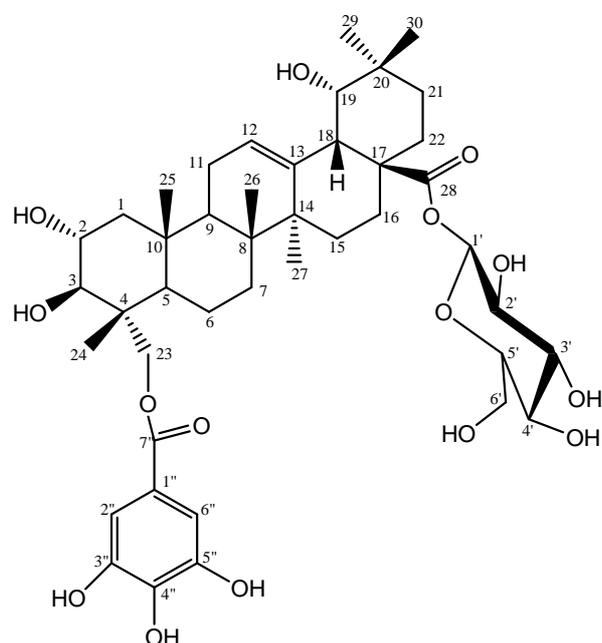


## ANNEXE 5 : Données RMN du Quercotriterpénoside I

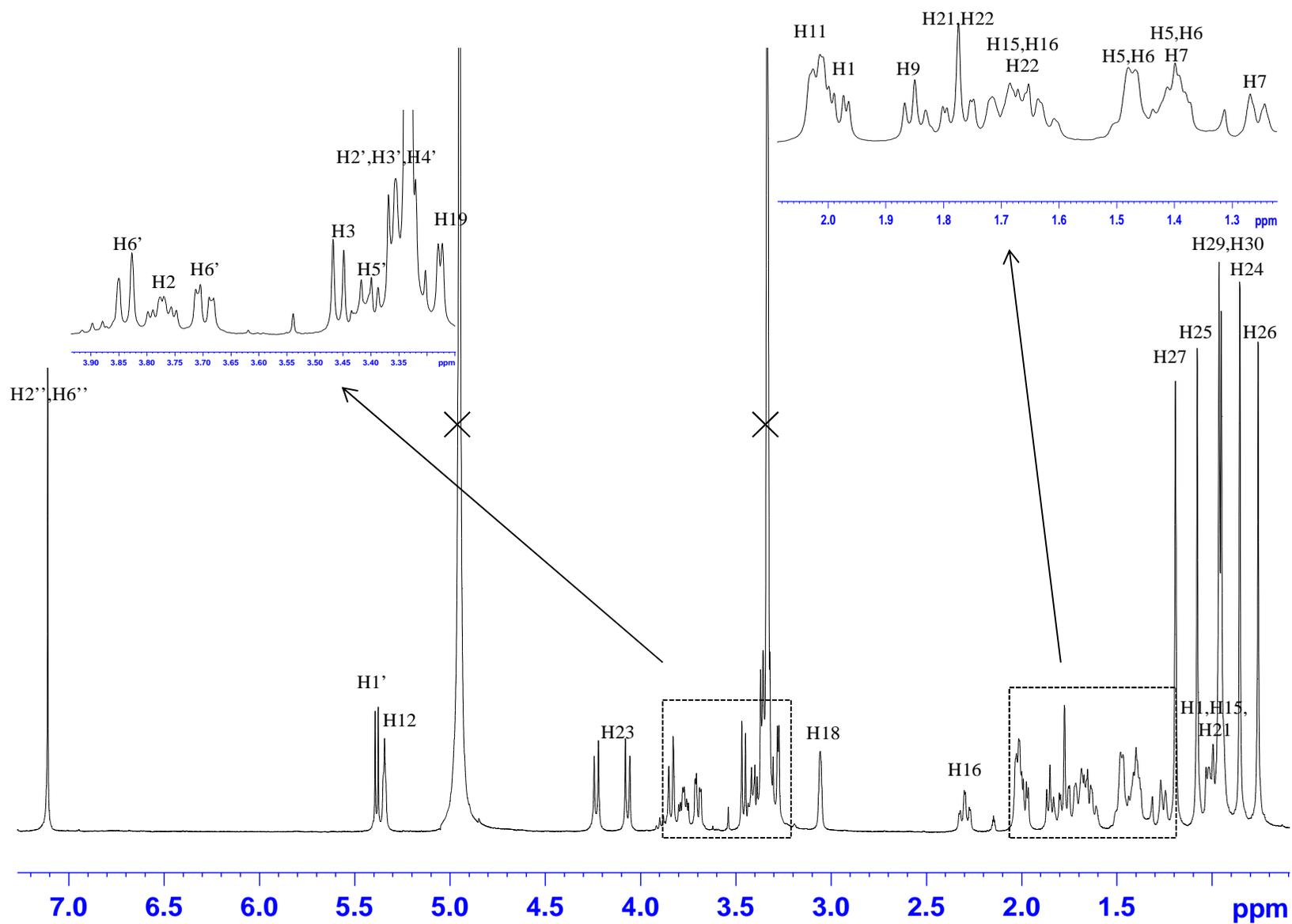


## Annexe 5.1 : déplacements chimiques $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du Quercotriterpénoside I (dans le méthanol)

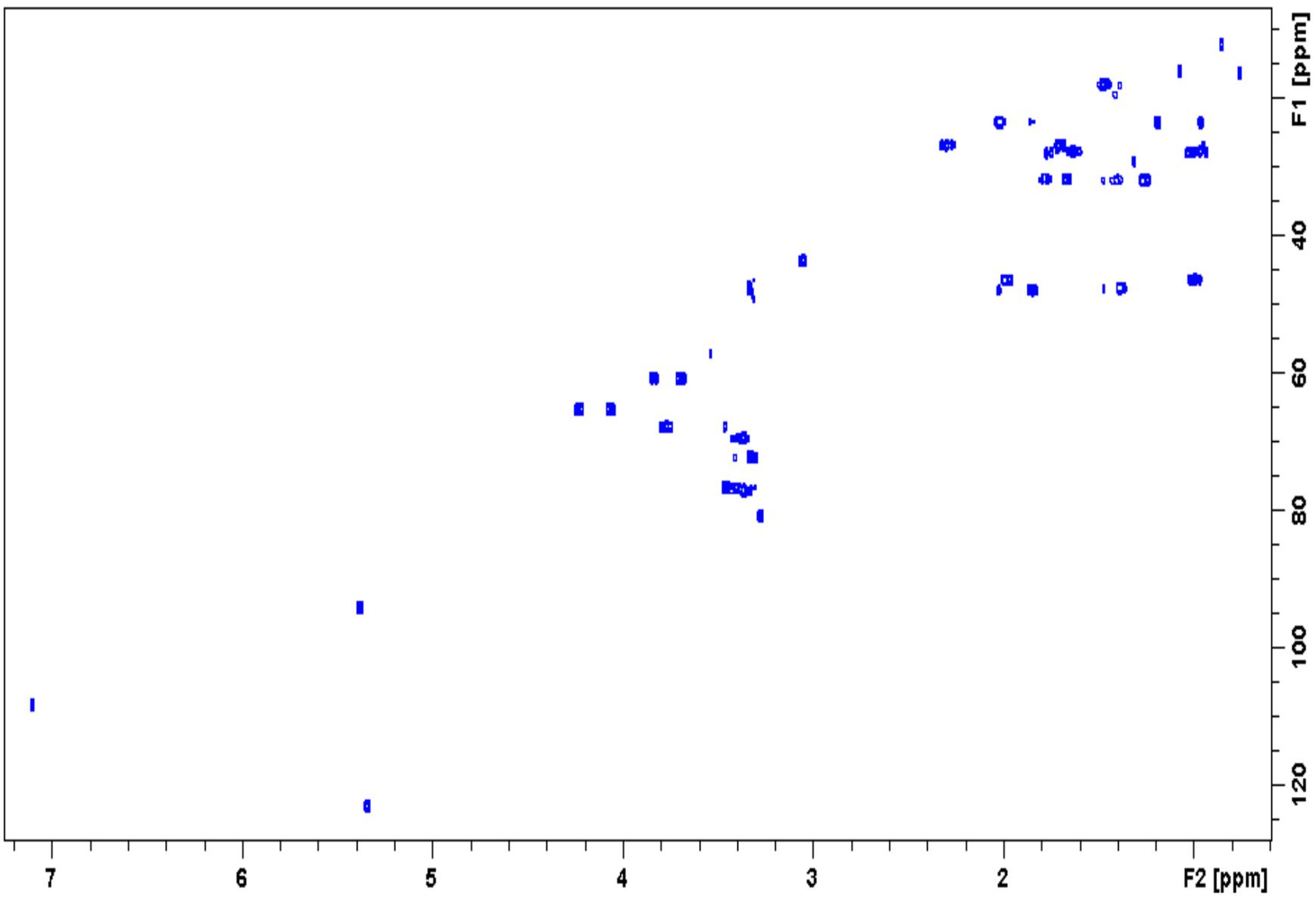
Numéro de l'atome	$\delta$ $^1\text{H}$ (en ppm) <i>multiplicité</i> (J)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (en ppm)
1	0.99 <i>m</i>	46.4
	1.98 <i>dd</i> (12.3; 4.3 Hz)	
2	3.76 <i>td</i> (9.9; 4.3 Hz)	67.9
3	3.45 <i>d</i> (9.9 Hz)	76.4
4		42.4
5	1.38 <i>m</i>	47.8
6	1.48 <i>m</i>	17.8
	1.39 <i>m</i>	
7	1.26 <i>m</i>	31.9
	1.42 <i>m</i>	
8		39.4
9	1.85 <i>t</i> (9.3 Hz)	48
10		37.7
11	2.02 <i>m</i>	23.6
12	5.33 <i>t</i> (3.3 Hz)	123.1
13		143.5
14		41.2
15	0.95 <i>m</i>	27.8
	1.62 <i>m</i>	
16	1.7 <i>m</i>	26.9
	2.3 <i>td</i> (13.7; 4.3 Hz)	
17		45.6
18	3.05 <i>d</i> (4.0 Hz)	43.7
19	3.27 <i>d</i> (4.0 Hz)	80.9
20		34.4
21	1.01 <i>m</i>	28
	1.76 <i>m</i>	
22	1.66 <i>m</i>	31.7
	1.76 <i>m</i>	
23	4.07 <i>d</i> (11.3 Hz)	65.2
	4.23 <i>d</i> (11.3 Hz)	
24	0.86 <i>s</i>	12.3
25	1.08 <i>s</i>	15.7
26	0.76 <i>s</i>	16.3
27	1.19 <i>s</i>	23.4
28		176.7
29	0.95 <i>s</i>	27.4
30	0.96 <i>s</i>	23.5
<b>Glucopyranosyle</b>		
1'	5.38 <i>d</i> (8.2 Hz)	94.5
2'	3.31 <i>d</i> (9.1 Hz)	72.6
3'	3.35 <i>m</i>	77.2
4'	3.36 <i>d</i> (8.1 Hz)	69.7
5'	3.44 <i>d</i> (9.1 Hz)	76.9
6'	3.69 <i>dd</i> (11.7; 4.1 Hz)	61.1
	3.82 <i>brd</i> (11.7 Hz)	
<b>Galloyle</b>		
1''		120.2
2''/6''	7.1 <i>s</i>	108.2
3''/5''		145.2
4''		138.7
7''		166.8



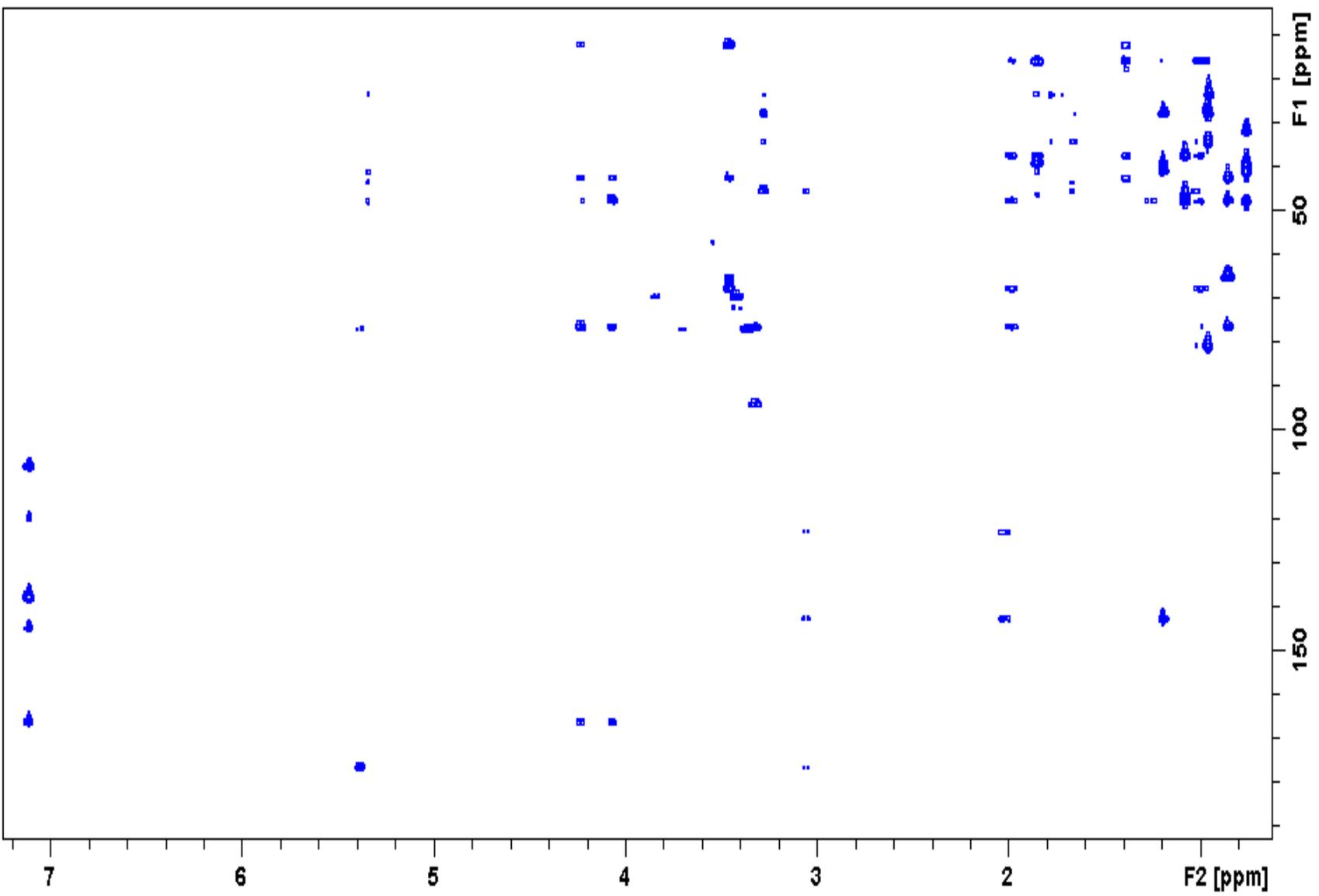
Annexe 5.2 : spectre RMN <sup>1</sup>H du Quercotriterpénoside I dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



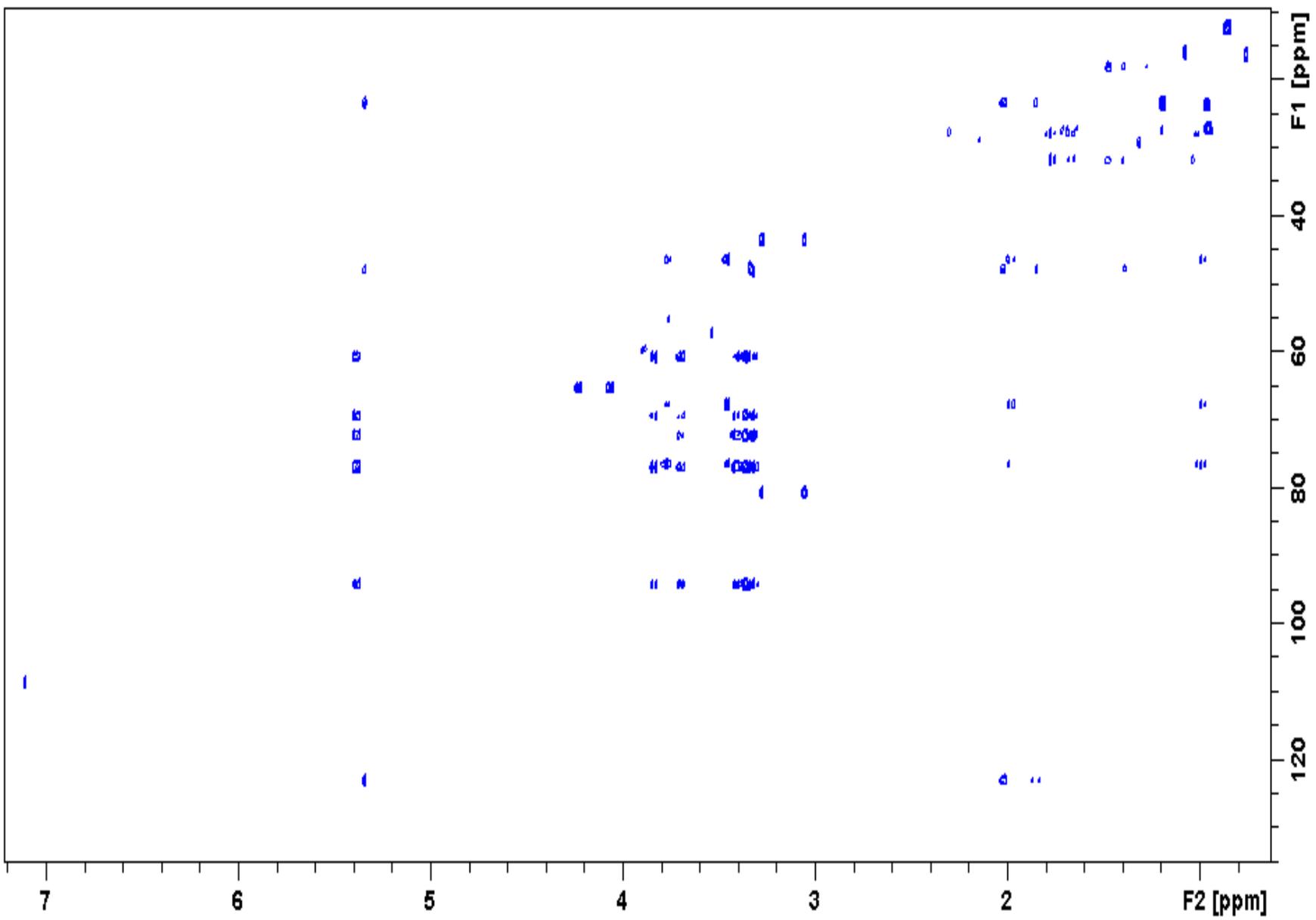
Annexe 5.3 : carte HSQC du Quercotriterpénoside I dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



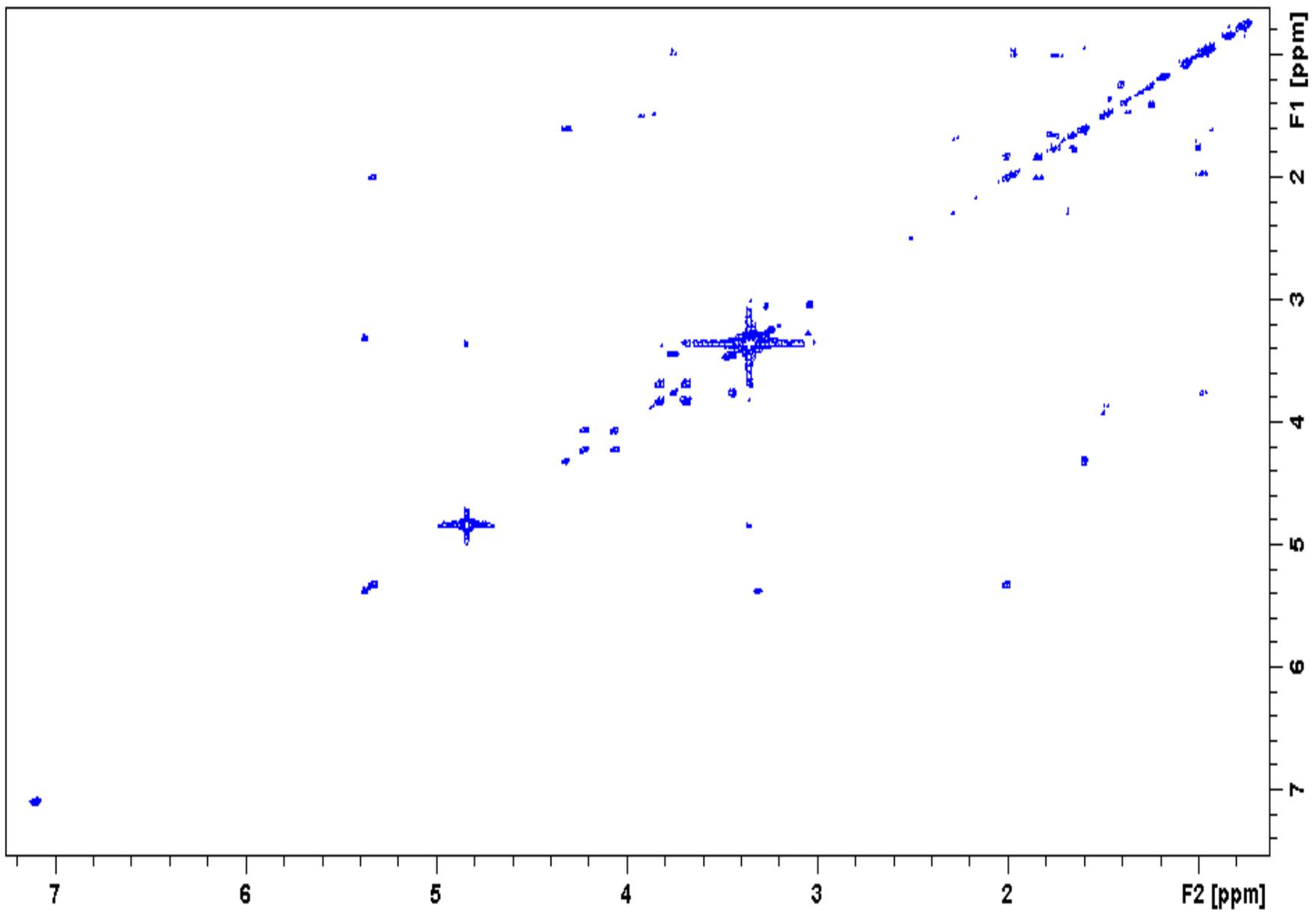
Annexe 5.4 : carte HMBC du Quercotriterpénoside I dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



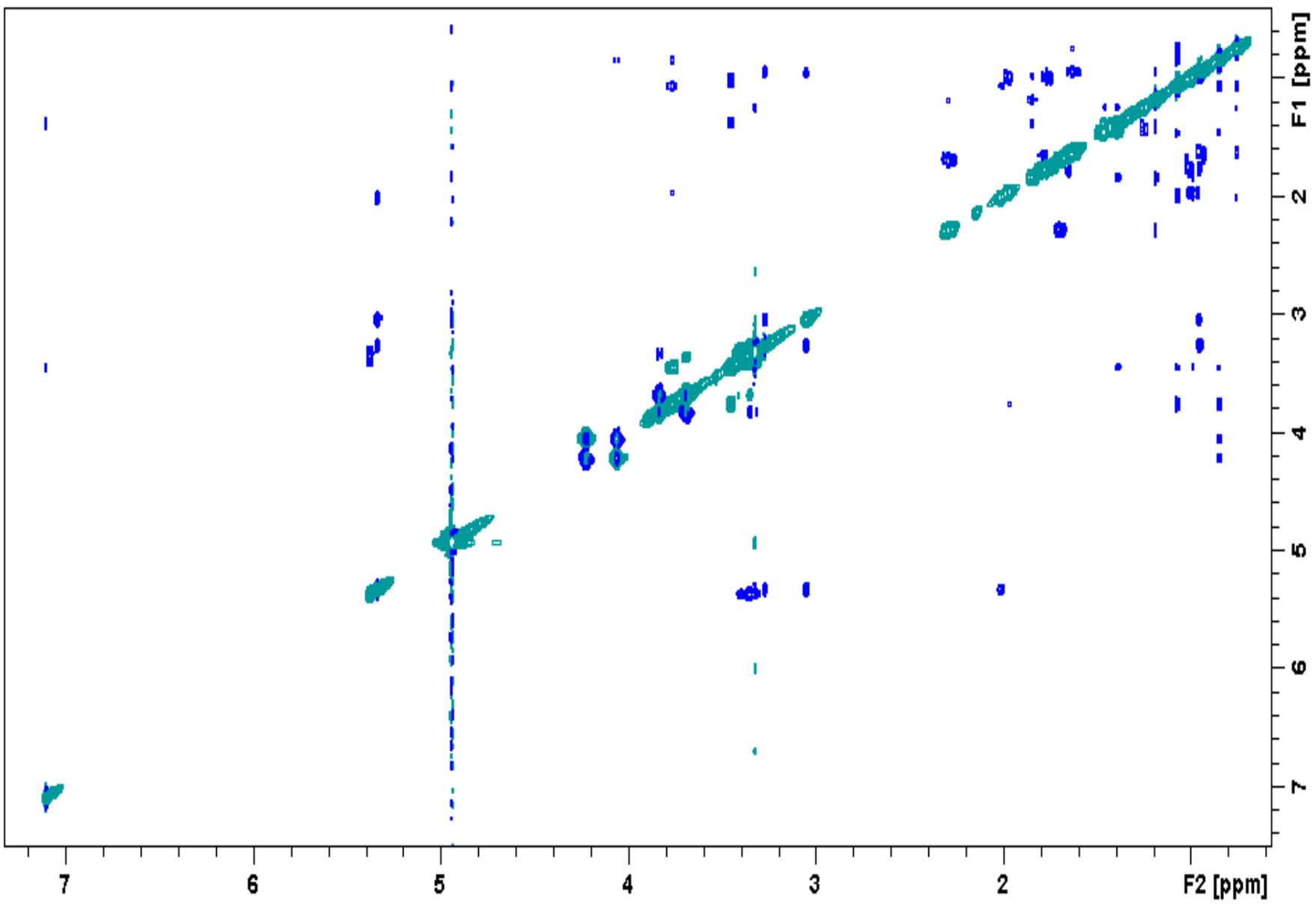
Annexe 5.5 : carte HSQC-TOCSY du Quercotriterpénoside I dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



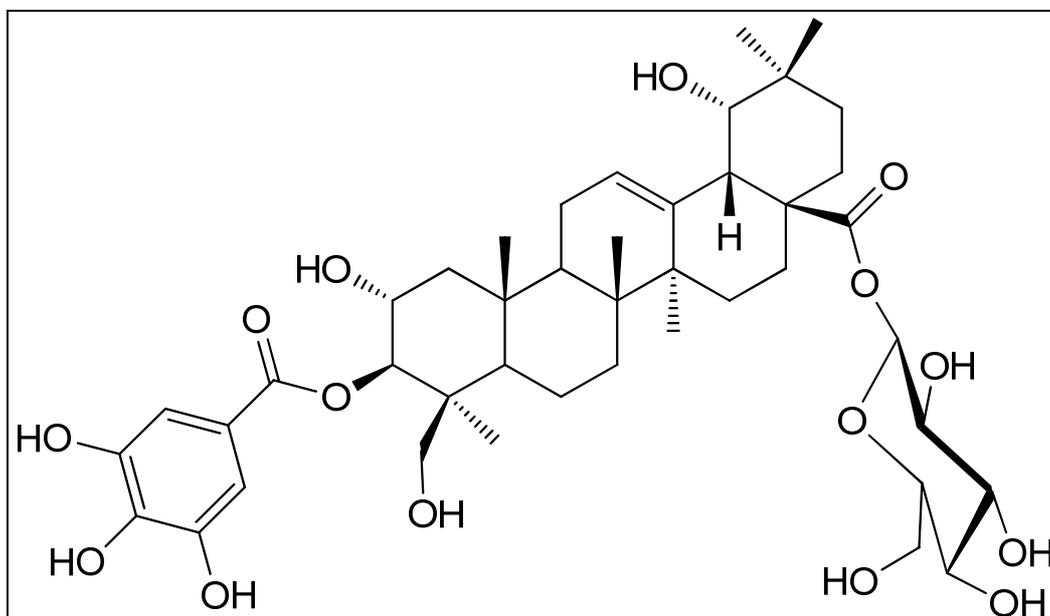
Annexe 5.6 : carte COSY du Quercotriterpénoside I dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



Annexe 5.7 : carte ROESY du Quercotriterpénoside I dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>

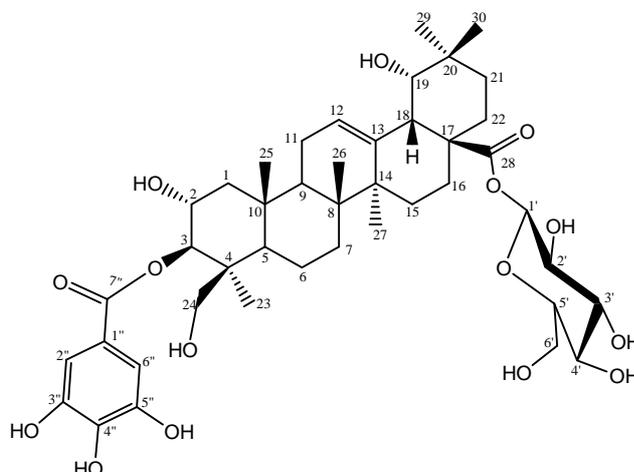


## ANNEXE 6 : Données RMN du Quercotriterpénoside II

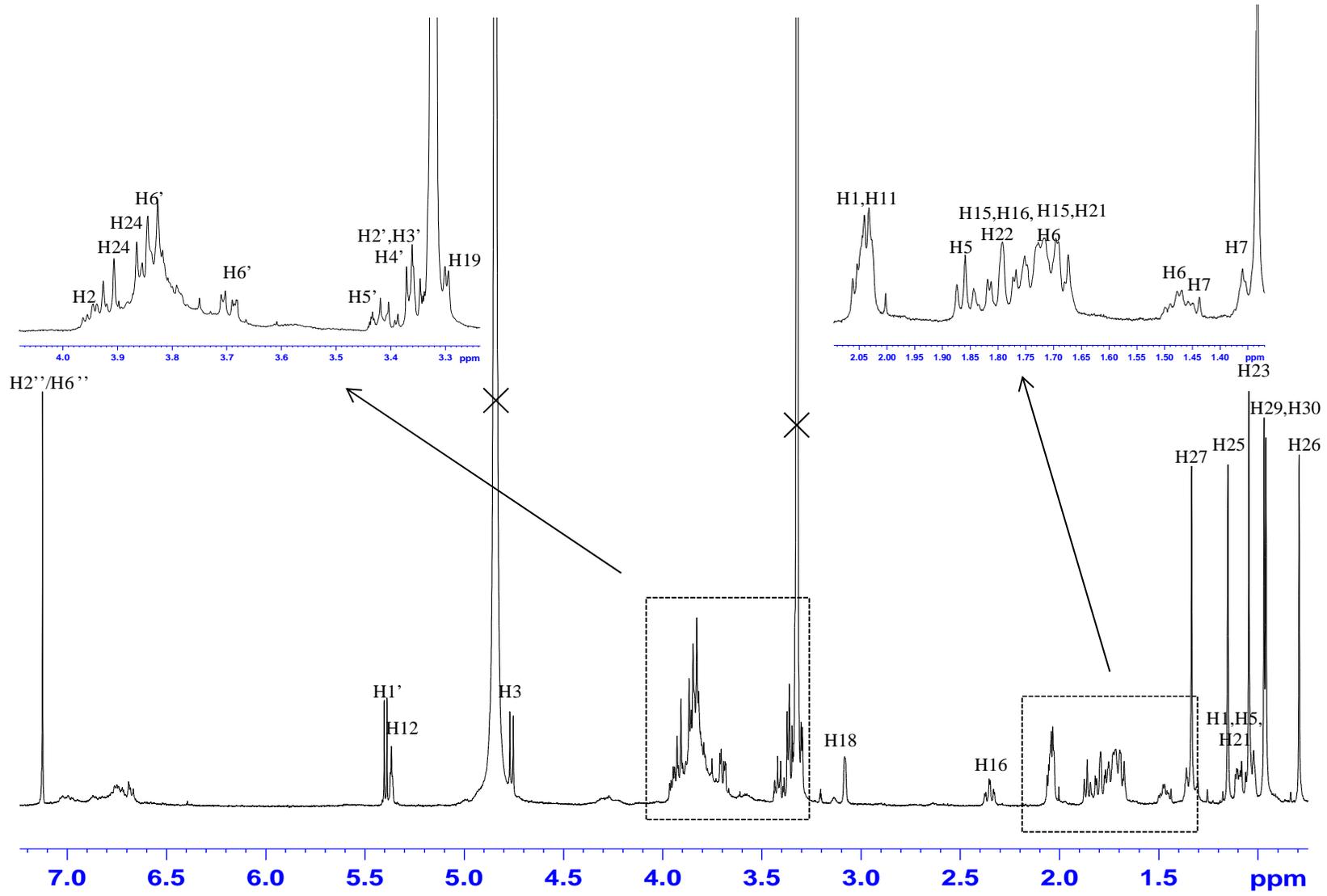


## Annexe 6.1 : déplacements chimiques $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du Quercotriterpénoside II (dans le méthanol)

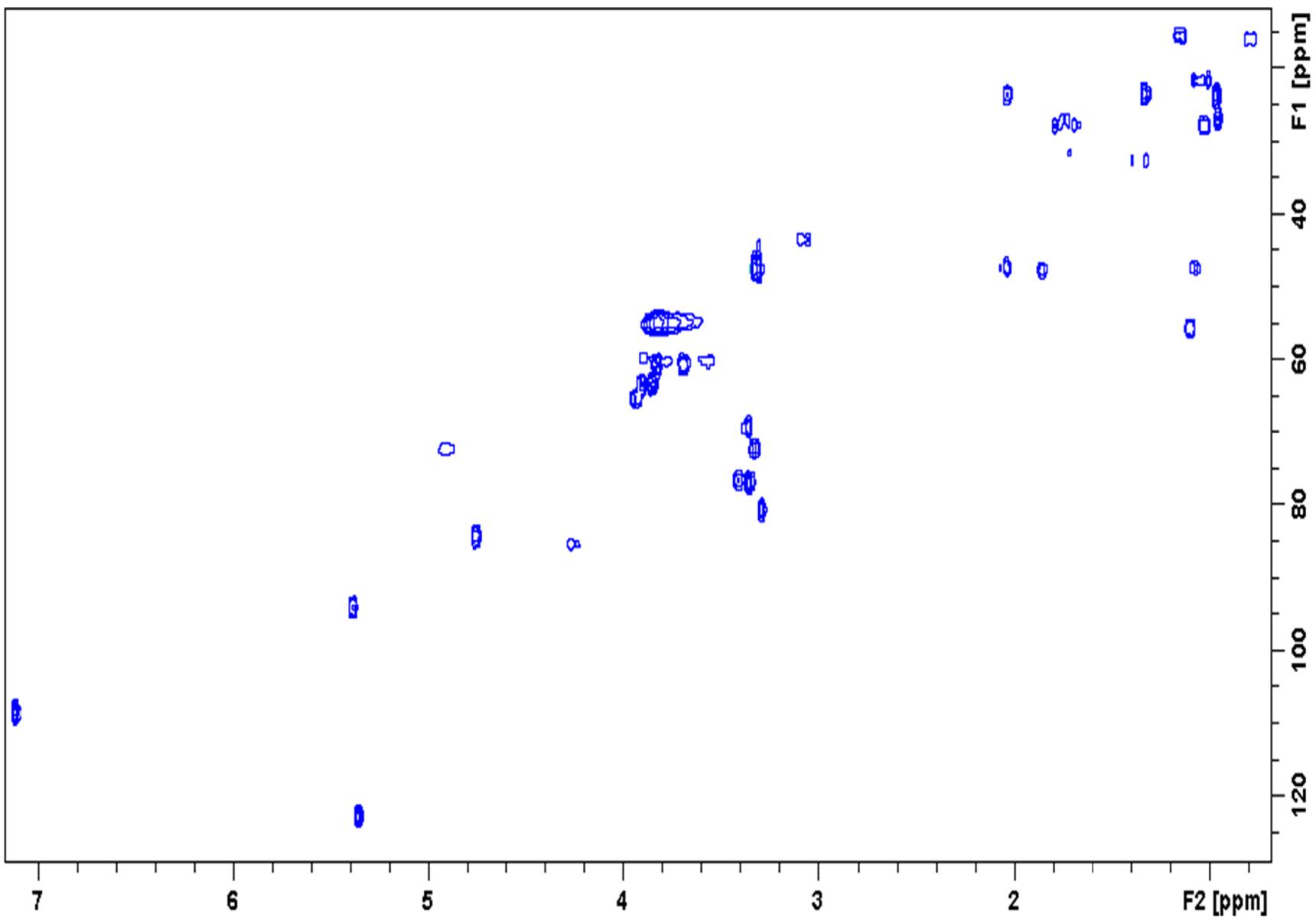
Numéro de l'atome	$\delta$ $^1\text{H}$ (en ppm) <i>multiplicité</i> (J)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (en ppm)
1	1.08 <i>m</i> 2.05 <i>m</i>	47.9
2	3.94 <i>td</i> (11 ; 4.6 Hz)	65.7
3	4.7 <i>d</i> (10.3 Hz)	84.8
4		44.3
5	1.09 <i>m</i>	56.1
6	1.49 <i>td</i> (13.3 ; 5.3 Hz)	19.8
7	1.72 <i>m</i> 1.30 <i>m</i> 1.46 <i>m</i>	32.8
8		40.3
9	1.87 <i>t</i> (9.0 Hz)	47.9
10		38.1
11	2.05 <i>m</i>	23.7
12	5.36 <i>t</i> (3.4 Hz)	123
13		143.2
14		44.9
15	1.69 <i>m</i> 1.79 <i>m</i>	27.8
16	1.76 <i>m</i> 2.35 <i>td</i> (13.4 ; 3.6 Hz)	26.4
17		45.3
18	3.08 <i>d</i> (3.5 Hz)	43.9
19	3.30 <i>d</i> (3.5 Hz)	81
20		34.3
21	1.02 <i>m</i> 1.70 <i>m</i>	28
22	1.66 <i>m</i> 1.76 <i>m</i>	32.1
23	1.06 <i>s</i>	21.8
24	3.85 <i>d</i> (11.6 Hz) 3.90 <i>d</i> (11.6 Hz)	63.9
25	1.15 <i>s</i>	15.7
26	0.79 <i>s</i>	16.5
27	1.33 <i>s</i>	23.8
28		177.5
29	0.97 <i>s</i>	27.2
30	0.96 <i>s</i>	23.8
<b>Glucopyranosyle</b>		
1'	5.39 <i>d</i> (8.2 Hz)	94.4
2'	3.32 <i>m</i>	72.3
3'	3.35 <i>m</i>	77.3
4'	3.37 <i>m</i>	69.6
5'	3.41 <i>d</i> (9.2 Hz)	77.1
6'	3.69 <i>dd</i> (12.1 ; 4.4 Hz) 3.83 <i>brd</i> (11.1 Hz)	61
<b>Galloyle</b>		
1''		120.3
2''/6''	7.13 <i>s</i>	108.3
3''/5''		144.9
4''		138.2
7''		167.1



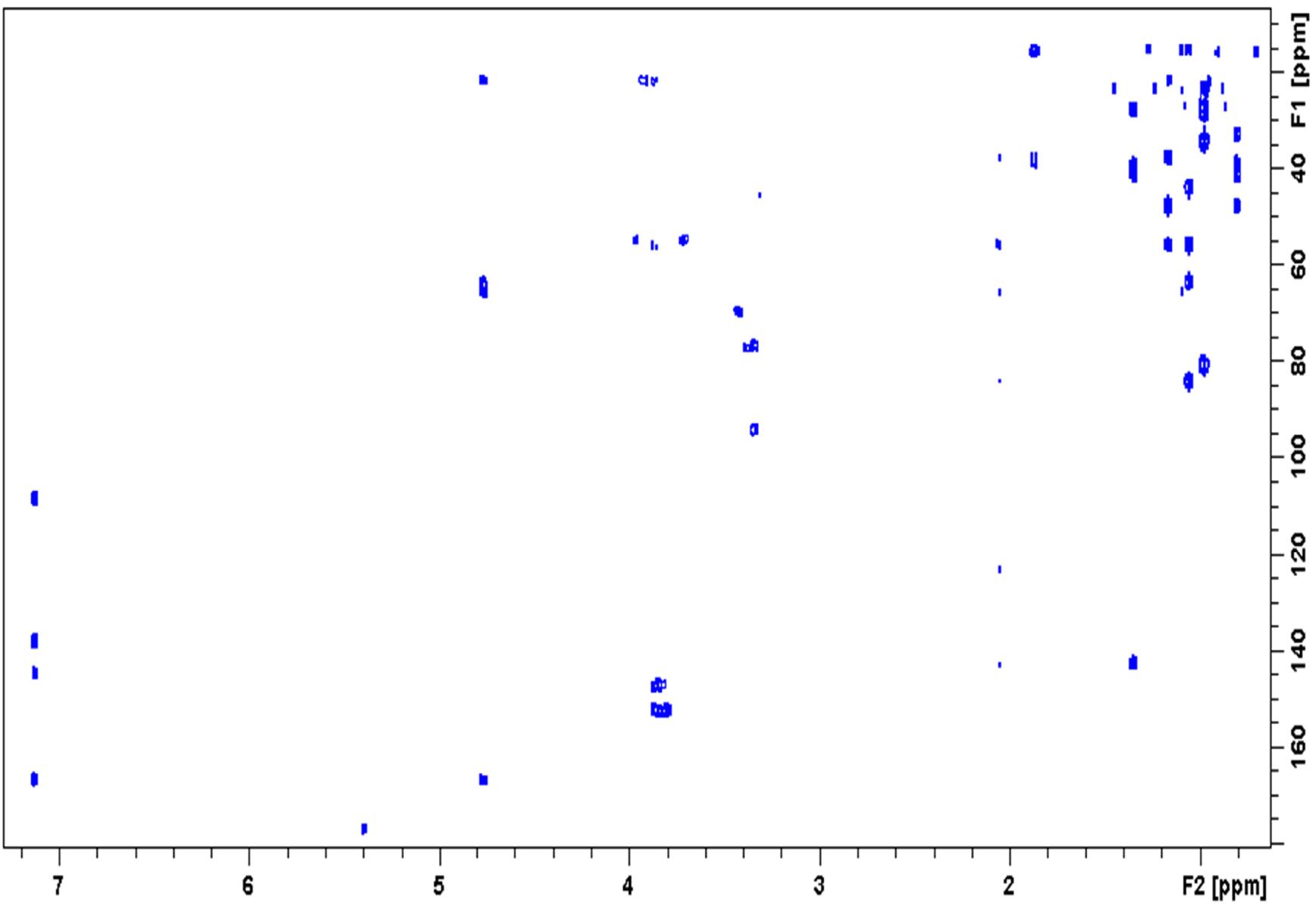
Annexe 6.2 : spectre RMN <sup>1</sup>H du Quercotriterpénoside II dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



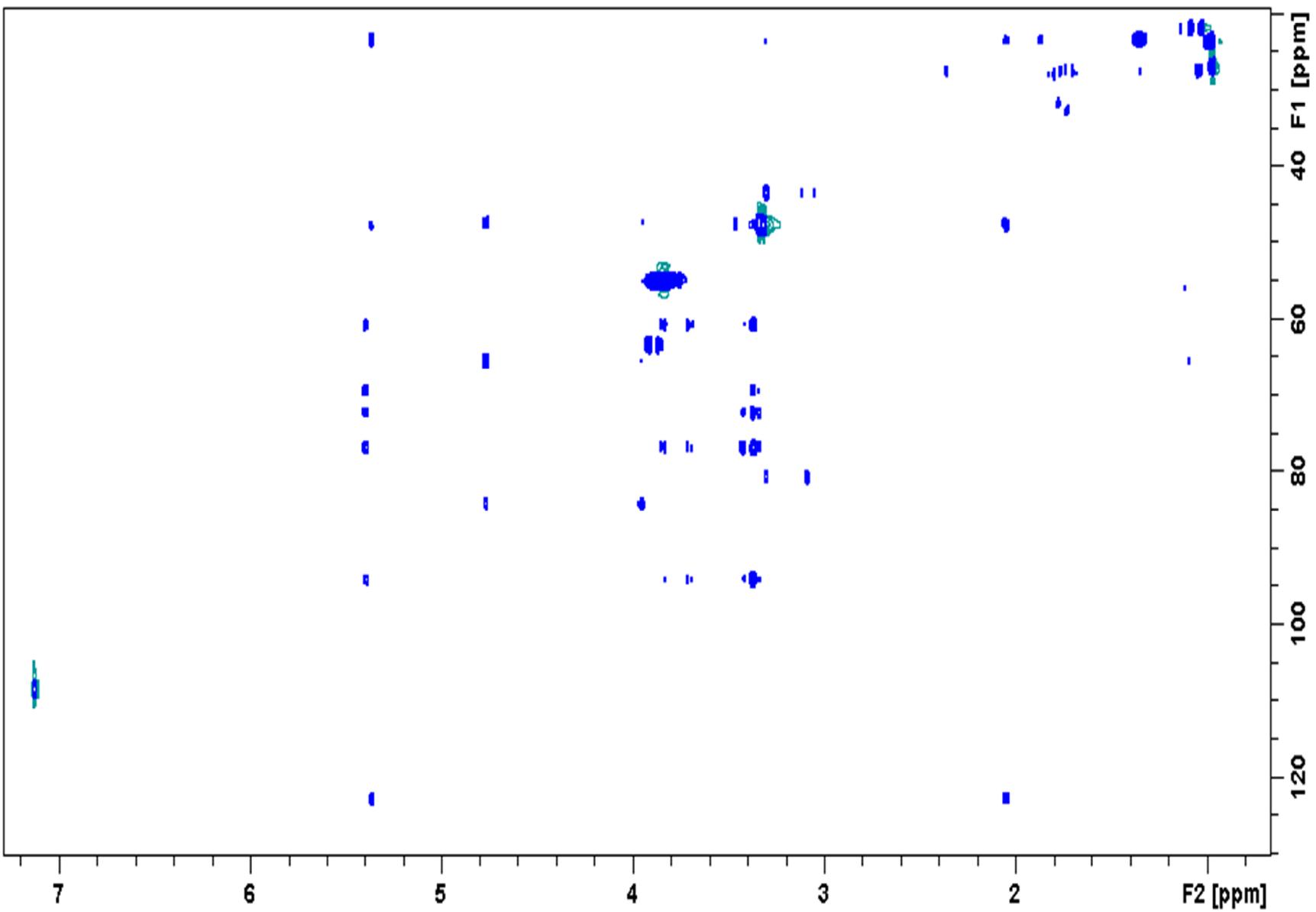
Annexe 6.3 : carte HSQC du Quercotriterpénoside II dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



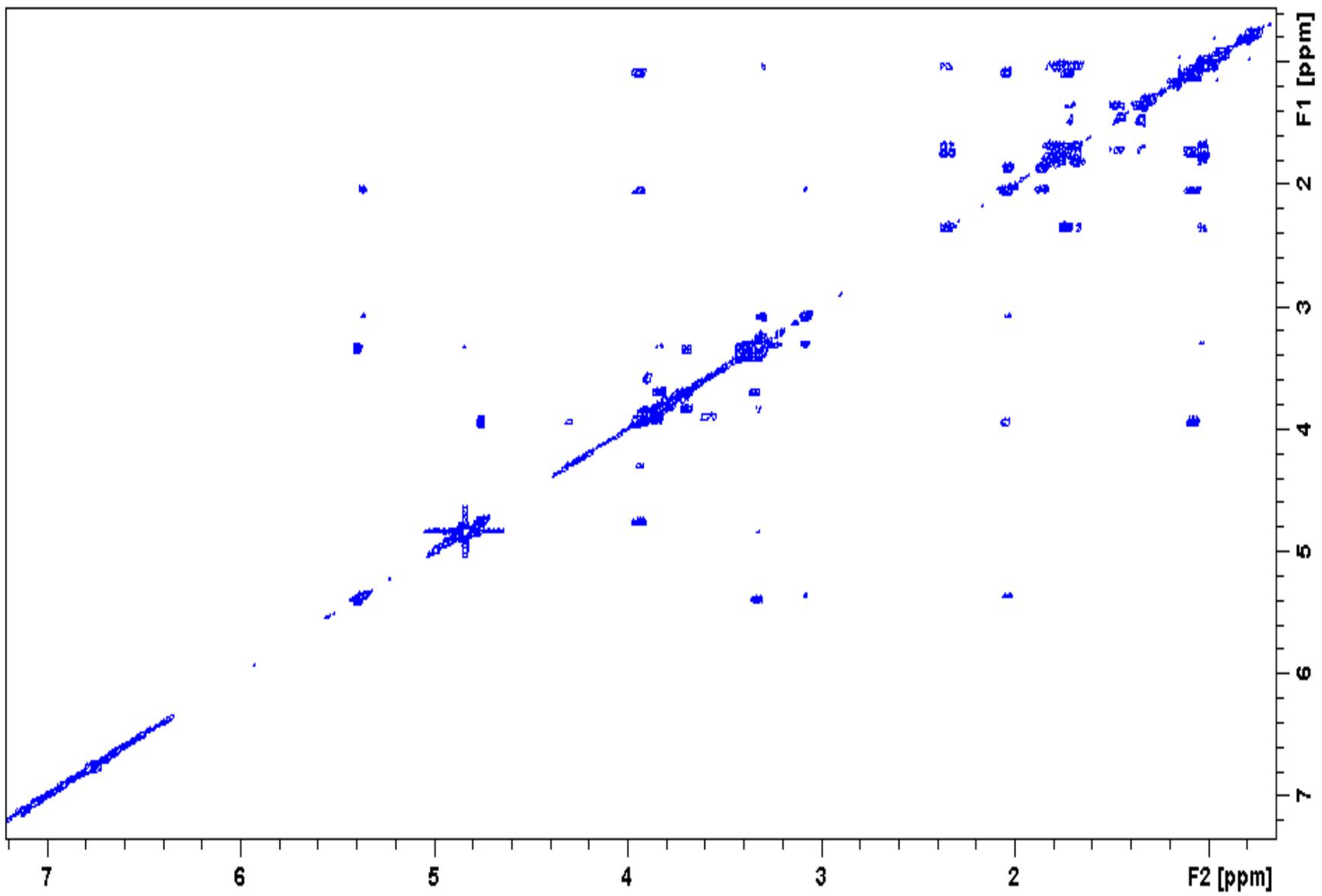
Annexe 6.4 : carte HMBC du Quercotriterpénoside II dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



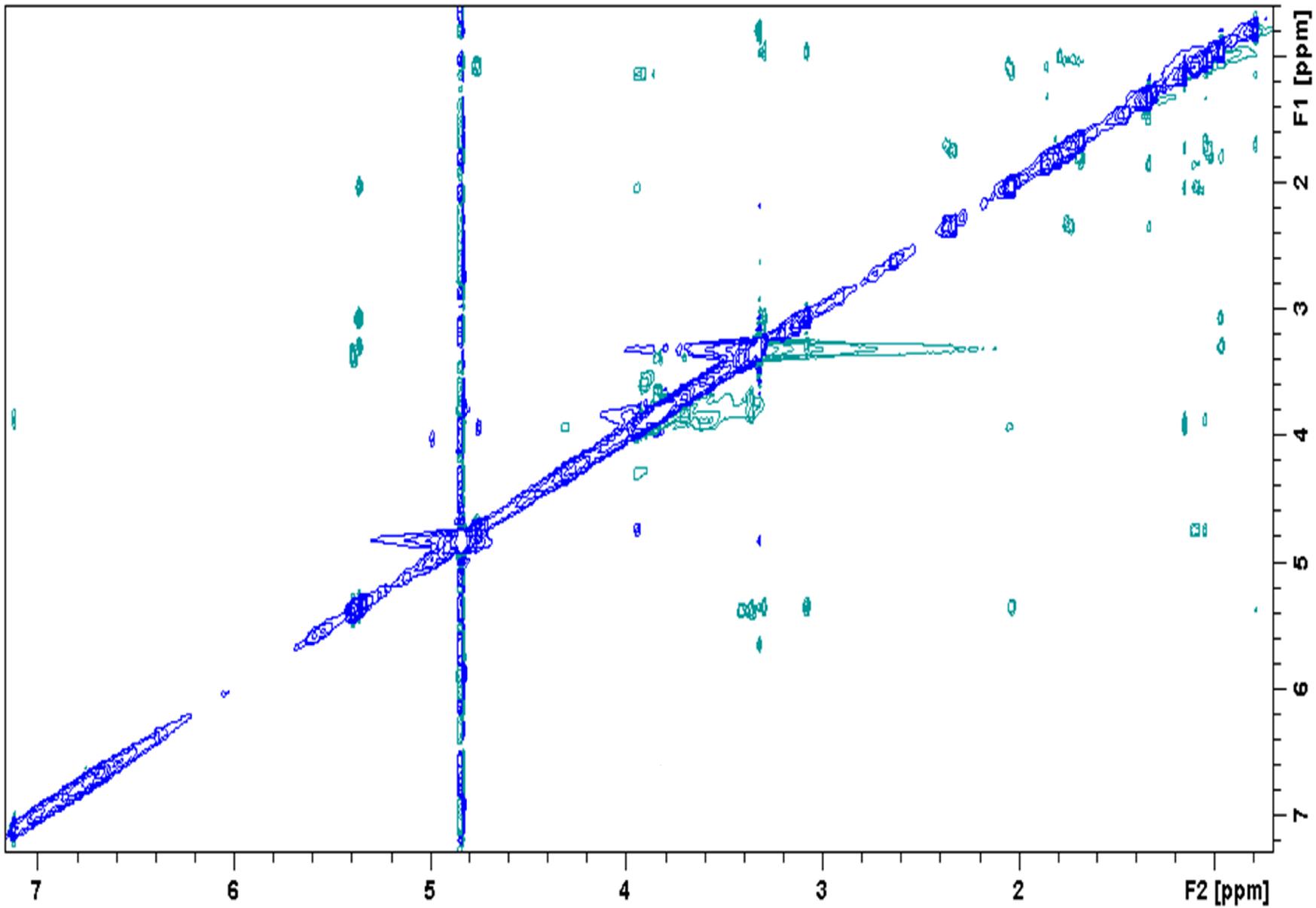
Annexe 6.5 : carte HSQC-TOCSY du Quercotrierpénoside II dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



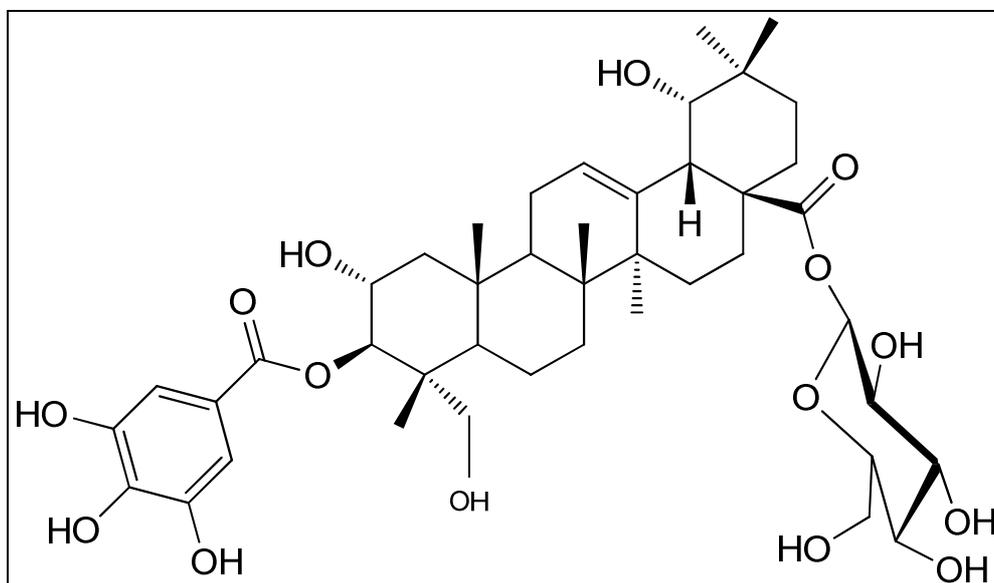
Annexe 6.6 : carte COSY du Quercotriterpénoside II dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



Annexe 6.7 : carte ROESY du Quercotriterpénoside II dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>

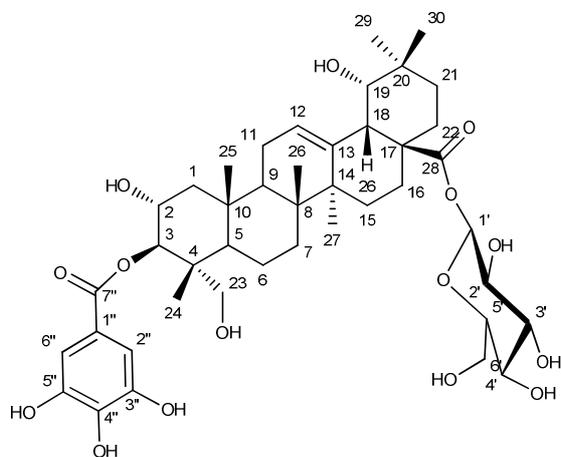


## ANNEXE 7 : Données RMN du Quercotriterpénoside III

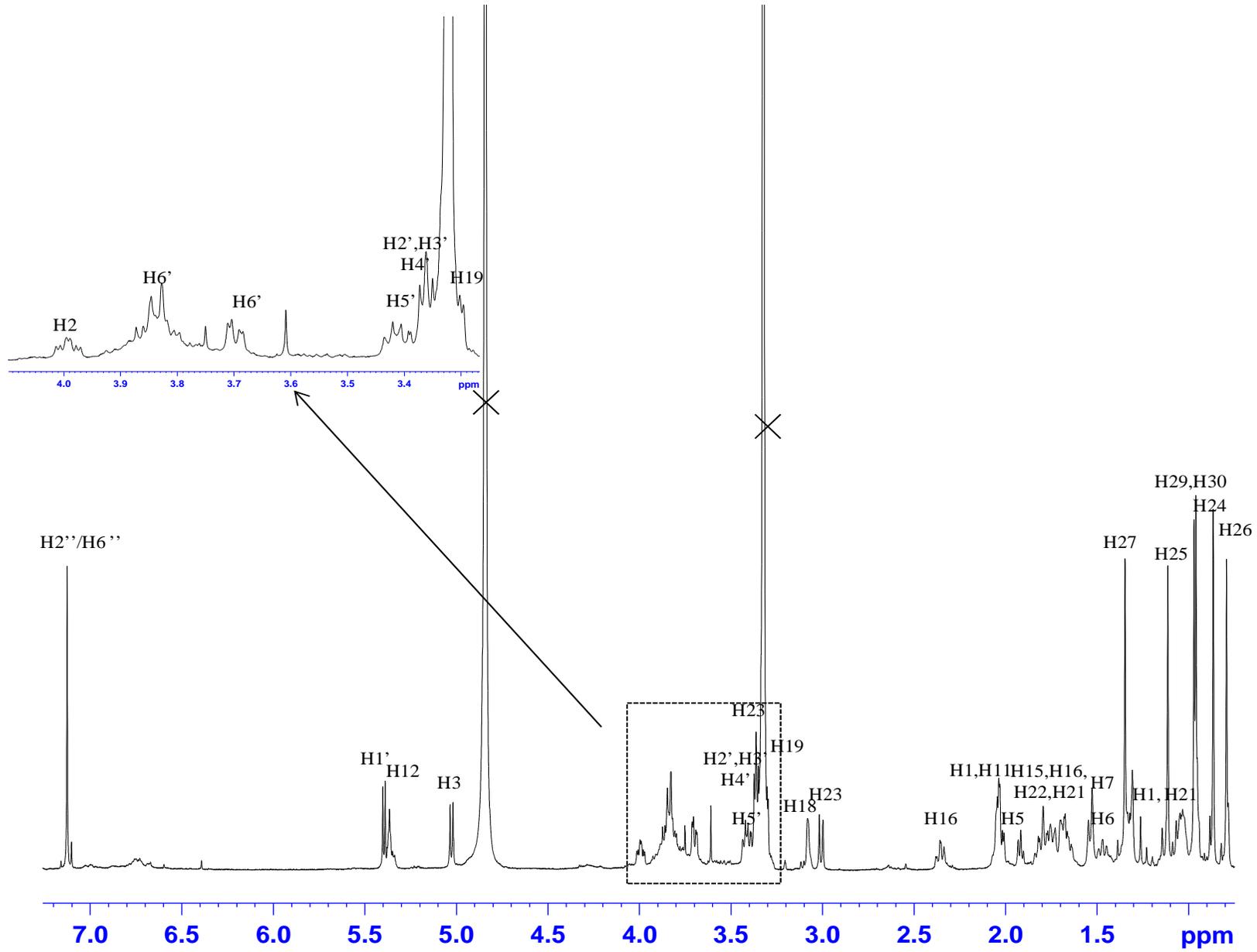


**Annexe 7.1 : déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du Quercotriterpénoside III  
(dans le méthanol)**

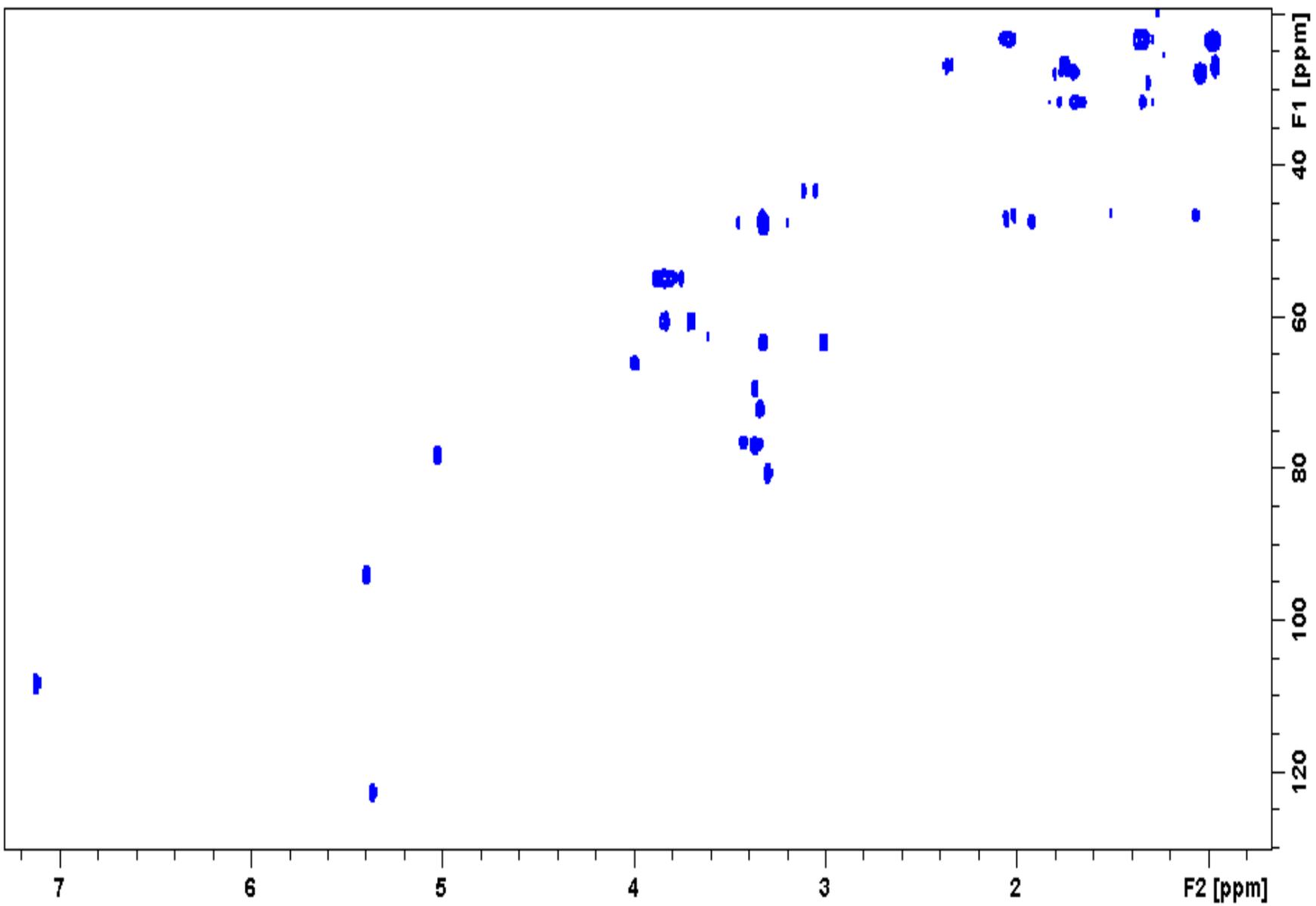
Numéro de l'atome	$\delta$ $^1\text{H}$ (en ppm) <i>multiplicité</i> (J)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (en ppm)
1	1.06 <i>m</i>	46.7
	2.01 <i>dd</i> (12.6; 4.7 Hz)	
2	3.99 <i>td</i> (9.9; 4.7 Hz)	66.4
3	5.05 <i>d</i> (9.9 Hz)	78.7
4		43.3
5	1.53 <i>brd</i> (11.4 Hz)	46.5
6	1.46 <i>td</i> (13.0; 2.7 Hz)	17.8
	1.53 <i>m</i>	
7	1.33 <i>m</i>	31.8
	1.69 <i>m</i>	
8		39.4
9	1.92 <i>t</i> (8.6 Hz)	47.6
10		37.6
11	2.04 <i>m</i>	23.2
12	5.36 <i>t</i> (3.3 Hz)	123.4
13		142.6
14		41.4
15	1.74 <i>m</i>	27.4
16	1.74 <i>m</i>	27.1
	2.35 <i>td</i> (13.4; 4.1 Hz)	
17		45.6
18	3.07 <i>d</i> (4.1 Hz)	43.7
19	3.29 <i>d</i> (4.1 Hz)	81.1
20		34.3
21	1.03 <i>m</i>	28
	1.70 <i>m</i>	
22	1.66 <i>m</i>	31.7
	1.76 <i>m</i>	
23	3.01 <i>d</i> (11.9 Hz)	63.7
	3.32 <i>d</i> (11.9 Hz)	
24	0.86 <i>s</i>	13.7
25	1.11 <i>s</i>	16.3
26	0.79 <i>s</i>	16.4
27	1.34 <i>s</i>	23.3
28		177.1
29	0.97 <i>s</i>	23.8
30	0.96 <i>s</i>	27.3
<b>Glucopyranosyle</b>		
1'	5.39 <i>d</i> (8.2 Hz)	94.4
2'	3.34 <i>m</i>	72.6
3'	3.34 <i>m</i>	77.9
4'	3.36 <i>m</i>	69.6
5'	3.36 <i>m</i>	77.3
6'	3.69 <i>dd</i> (11.8; 4.3 Hz)	60.9
	3.82 <i>brd</i> (11.8 Hz)	
<b>Galloyle</b>		
1''		120.4
2''/6''	7.12 <i>s</i>	108.2
3''/5''		145.1
4''		138.1
7''		167.5



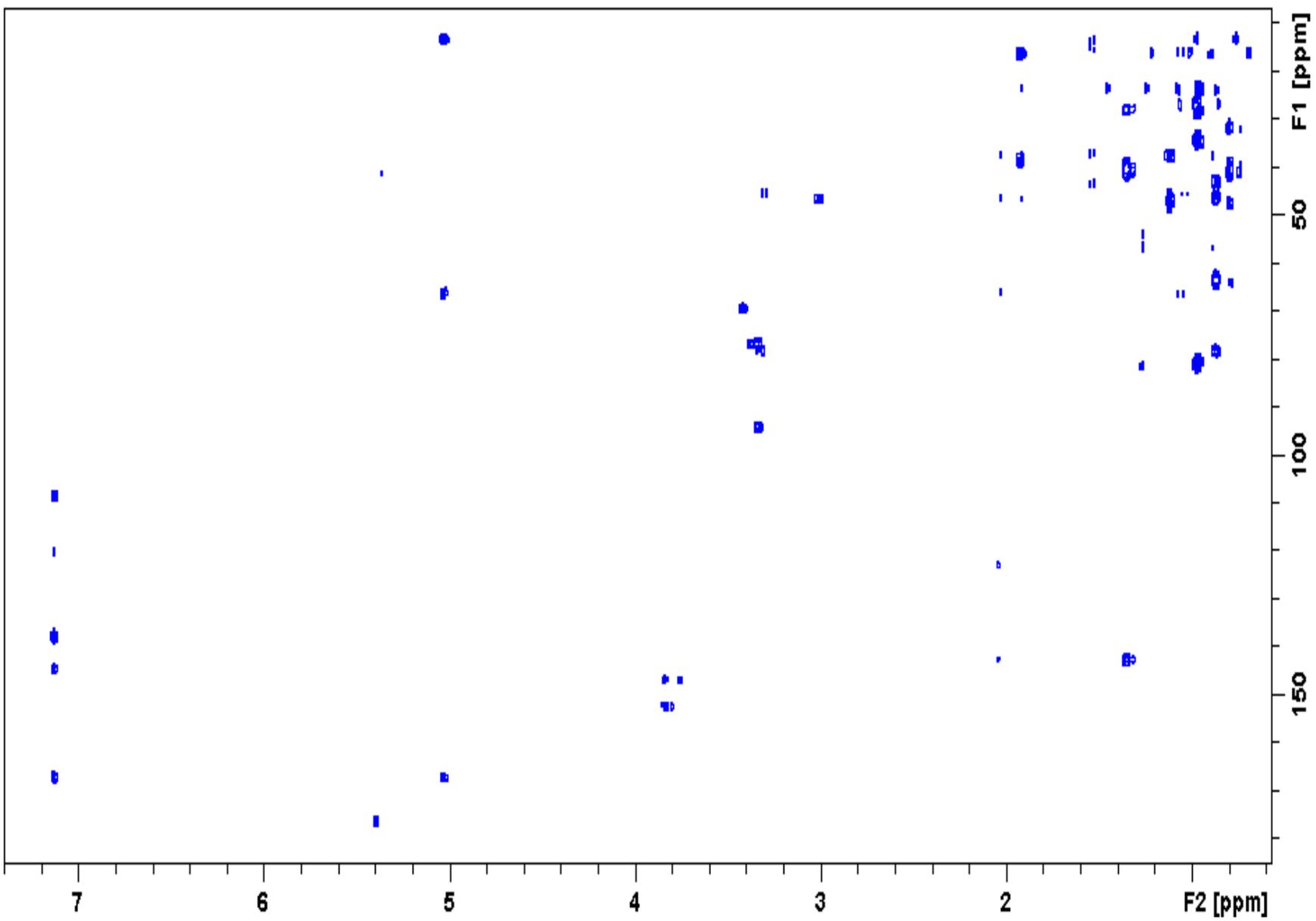
Annexe 7.2 : spectre RMN <sup>1</sup>H du Quercotriierpénoside III dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



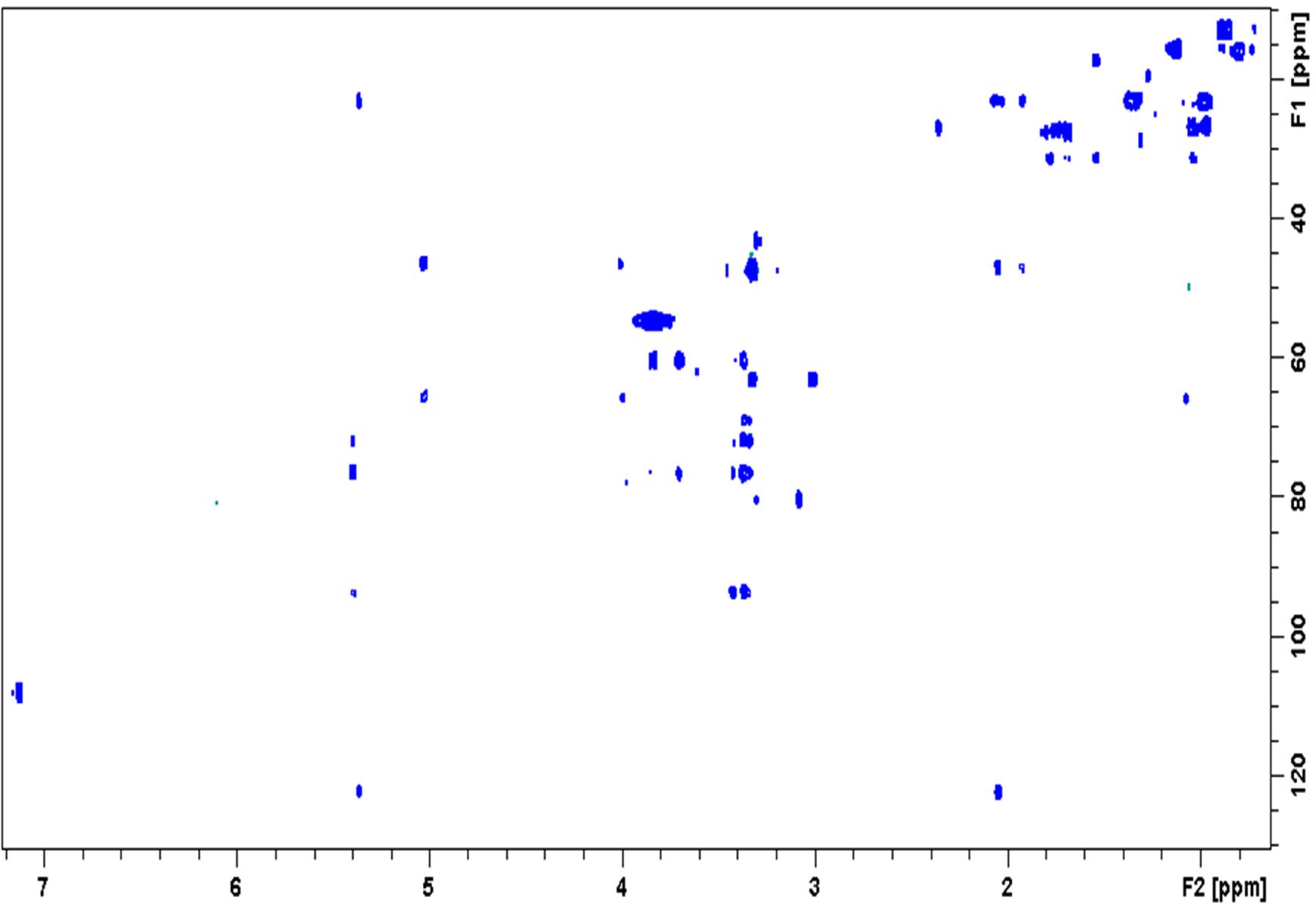
Annexe 7.3 : carte HSQC du Quercotriterpénoside III dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



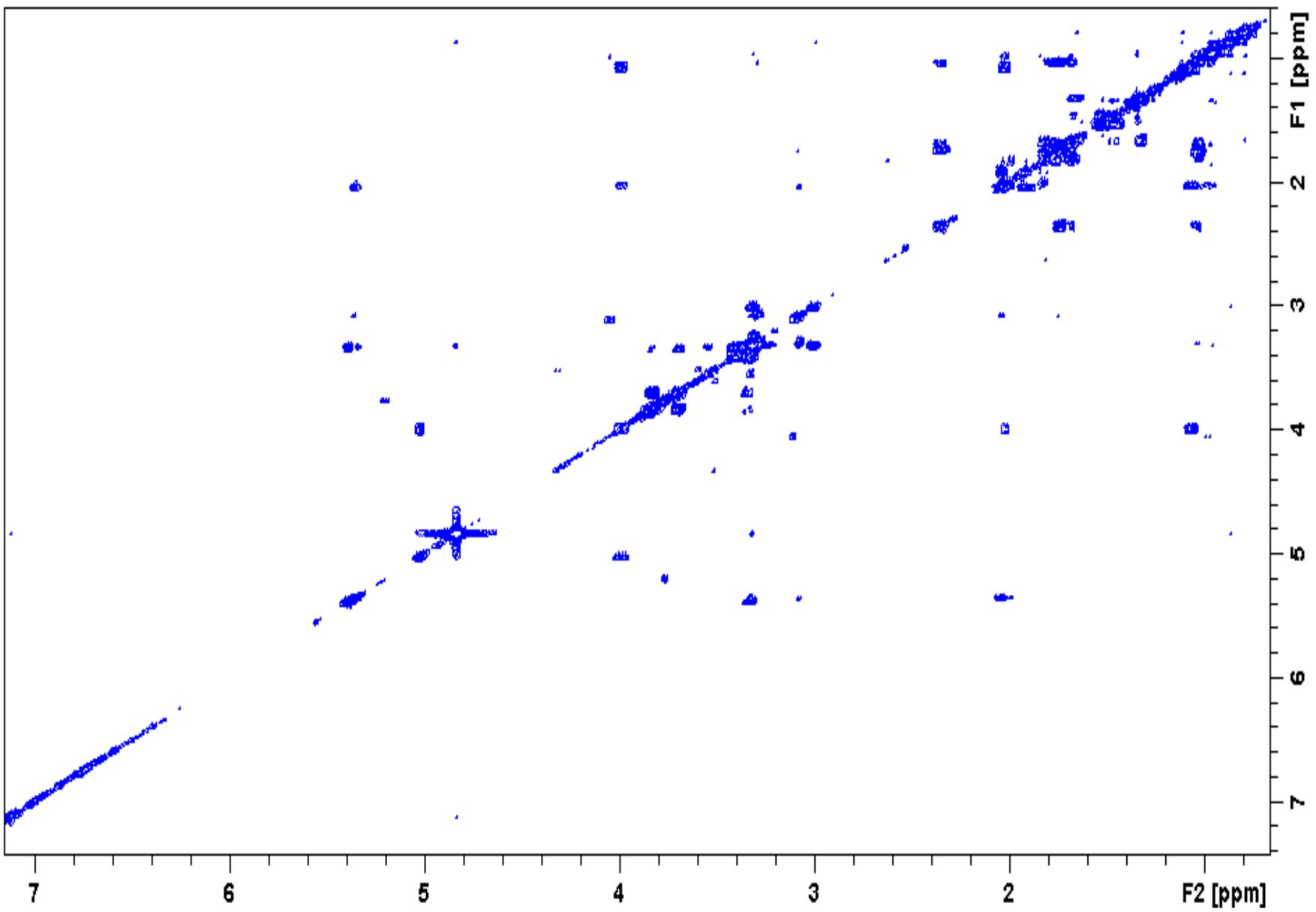
Annexe 7.4 : carte HMBC du Quercotriterpénoside III dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



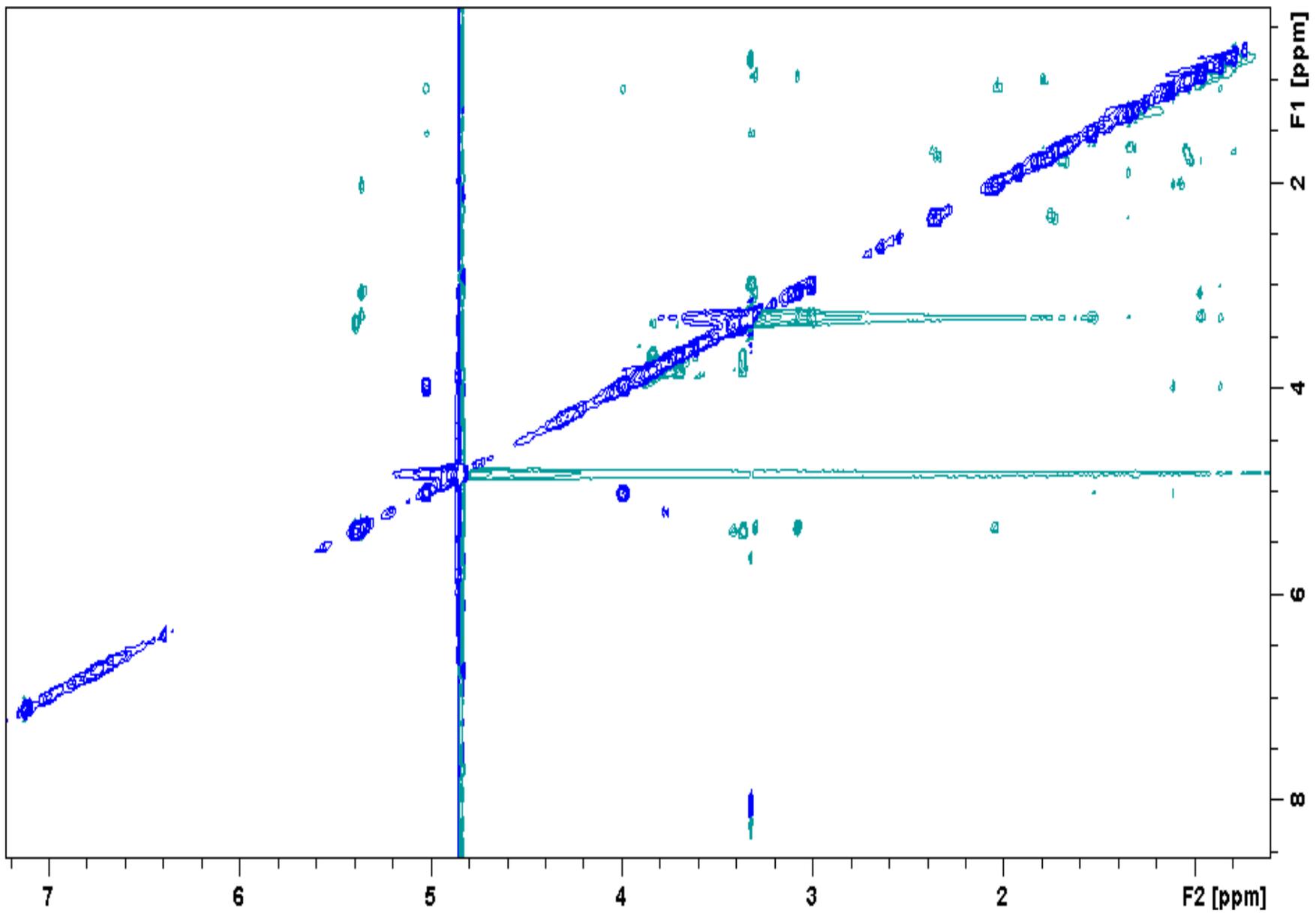
Annexe 7.5 : carte HSQC-TOCSY du Quercotriterpénoside III dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



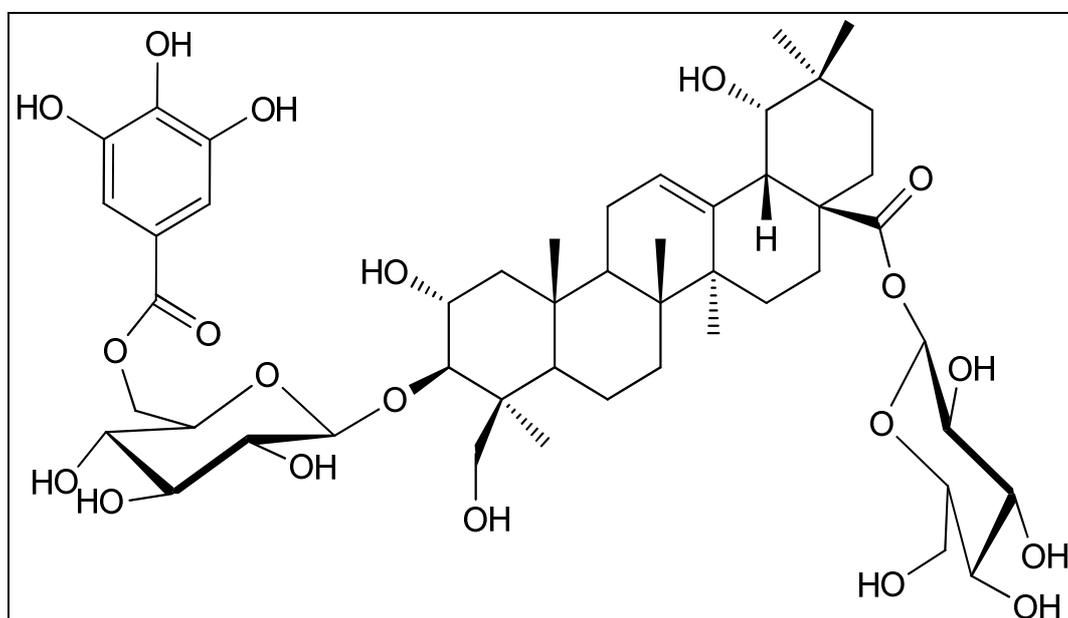
Annexe 7.6 : carte COSY du Quercotriterpénoside III dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



Annexe 7.7 : carte ROESY du Quercotriterpénoside III dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



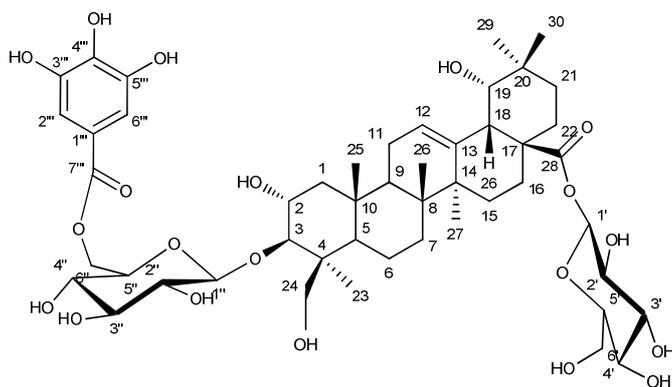
## ANNEXE 8 : Données RMN du Quercotriterpénoïde IV



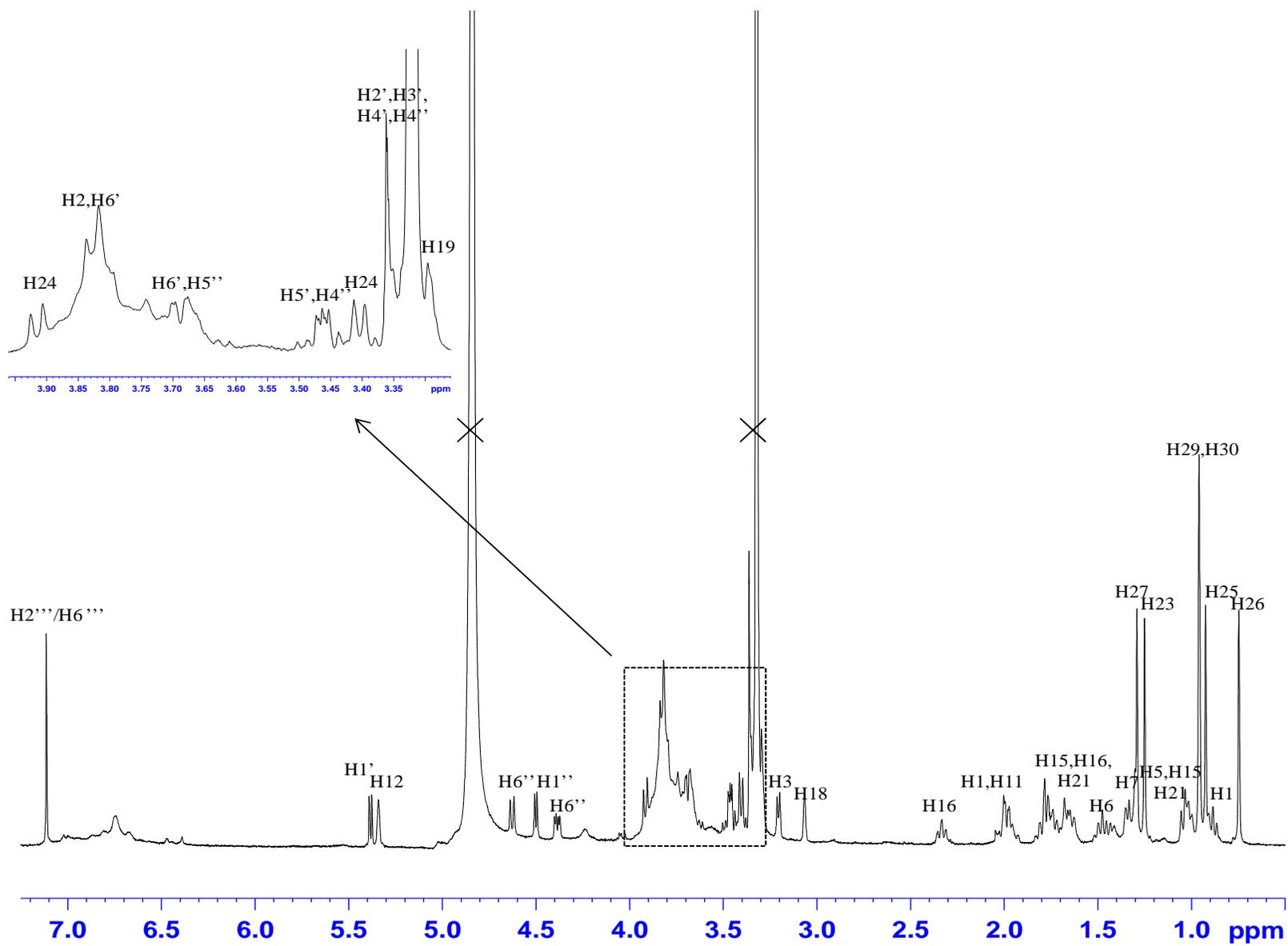
## Annexe 8.1 : déplacements chimiques $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du Quercotriterpénoside IV

Numéro de l'atome	$\delta$ $^1\text{H}$ (en ppm) <i>multiplicité</i> (J)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (en ppm)
1	0.87 <i>m</i>	45.4
	1.96 <i>dd</i> (13.2; 3.8 Hz)	
2	3.82 <i>m</i>	66.7
3	3.21 <i>d</i> (9.9 Hz)	94.4
4		44.9
5	1.05 <i>m</i>	55.7
6	1.46 <i>td</i> (13.2 ; 2.3 Hz)	18.4
	1.63 <i>m</i>	
7	1.33 <i>m</i>	32.8
	1.54 <i>m</i>	
8		39.6
9	1.77 <i>m</i>	47.5
10		37.1
11	1.76 <i>m</i>	23.8
	2.01 <i>m</i>	
12	5.34 <i>t</i> (3.3 Hz)	123.0
13		142.8
14		41.2
15	1.01 <i>m</i>	27.8
	1.68 <i>m</i>	
16	1.73 <i>m</i>	27.6
	2.33 <i>td</i> (13.5 ; 3.9 Hz)	
17		45.7
18	3.07 <i>d</i> (3.9 Hz)	43.9
19	3.29 <i>d</i> (3.9 Hz)	81.0
20		34.4
21	1.02 <i>m</i>	28
	1.79 <i>m</i>	
22	nd	nd
23	1.25 <i>s</i>	21.9
24	3.41 <i>d</i> (11.4 Hz)	63.1
	3.92 <i>d</i> (11.4 Hz)	
25	0.92 <i>s</i>	15.0
26	0.75 <i>s</i>	16.2
27	1.29 <i>s</i>	23.4
28		177.0
29	0.95 <i>s</i>	27.2
30	0.96 <i>s</i>	24.2
Glucopyranosyle 1		
1'	5.38 <i>d</i> (8.1 Hz)	94.2
2'	3.32 <i>m</i>	72.6
3'	3.35 <i>m</i>	77.3
4'	3.35 <i>m</i>	69.6
5'	3.41 <i>m</i>	77.0
6'	3.69 <i>dd</i> (11.9 ; 4.3 Hz)	60.9
	3.82 <i>brd</i> (11.9 Hz)	
Glucopyranosyle 2		
1''	4.51 <i>d</i> (8.2 Hz)	104.2
2''	3.30 <i>m</i>	74.3
3	3.46 <i>m</i>	76.4
4''	3.47 <i>m</i>	70.2
5''	3.68 <i>m</i>	74.4
6''	4.38 <i>dd</i> (12.1 ; 5.2 Hz)	62.7
	4.63 <i>dd</i> (12.1 ; 2.1 Hz)	

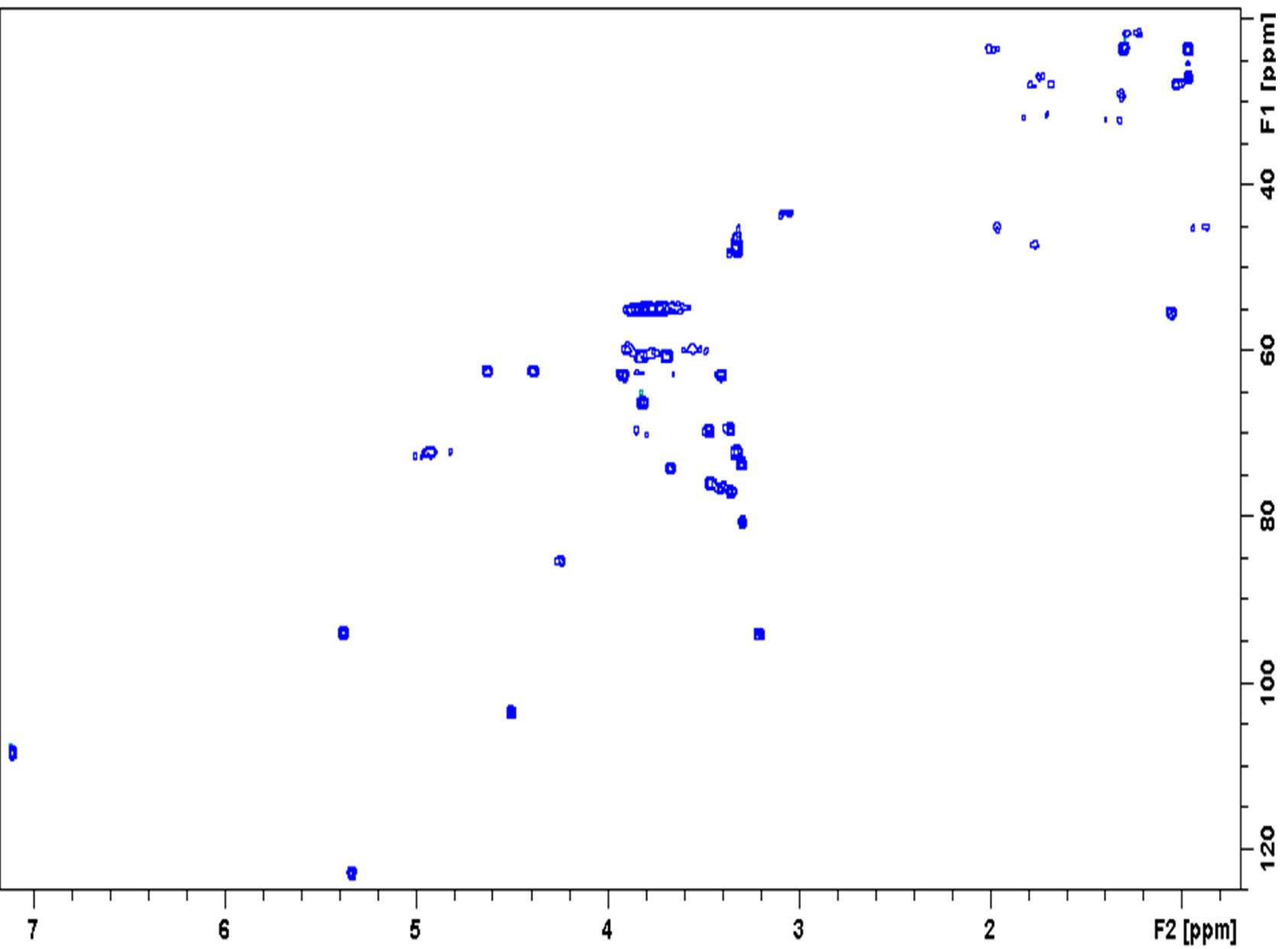
Numéro de l'atome	$\delta$ $^1\text{H}$ (en ppm) <i>multiplicité</i> (J)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (en ppm)
Galloyle		
1'''		119.3
2''' / 6'''	7.11 <i>s</i>	108.5
3''' / 5'''		144.8
4'''		138.7
7'''		166.4



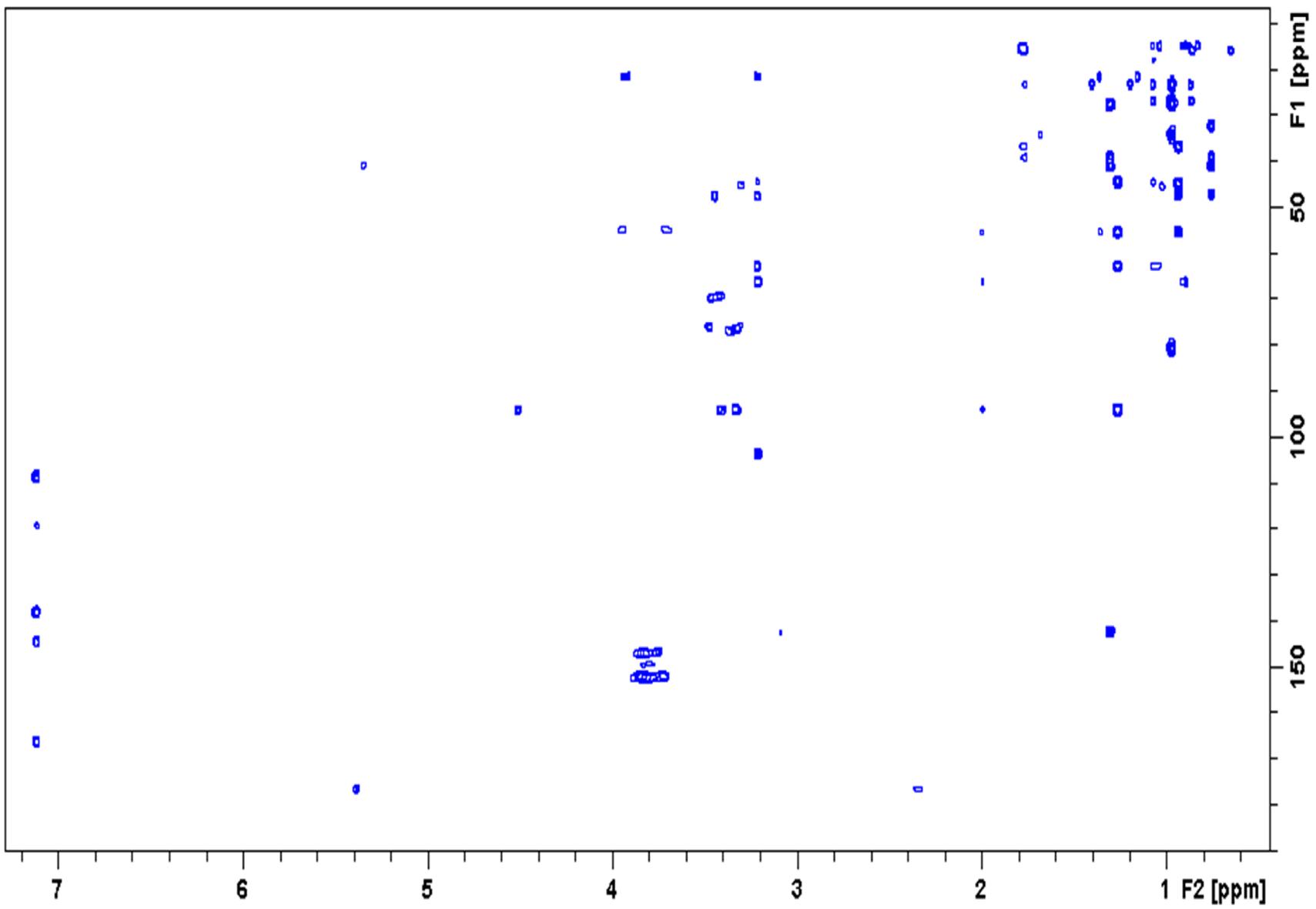
Annexe 8.2 : spectre RMN  $^1\text{H}$  du Quercotriterpénoside IV dans le MeOH- $d_4$



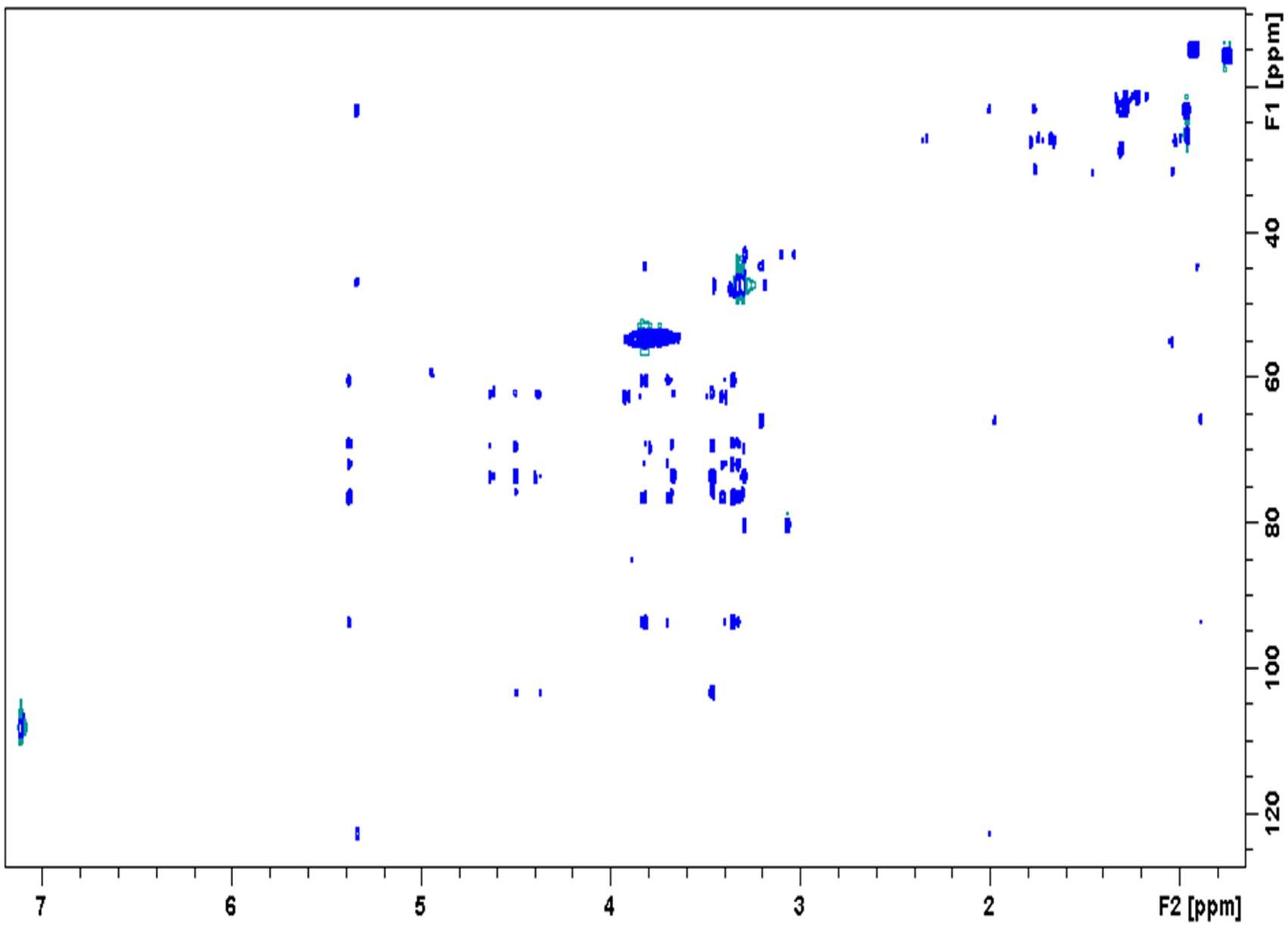
Annexe 8.3 : carte HSQC du Quercotriterpénoside IV dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



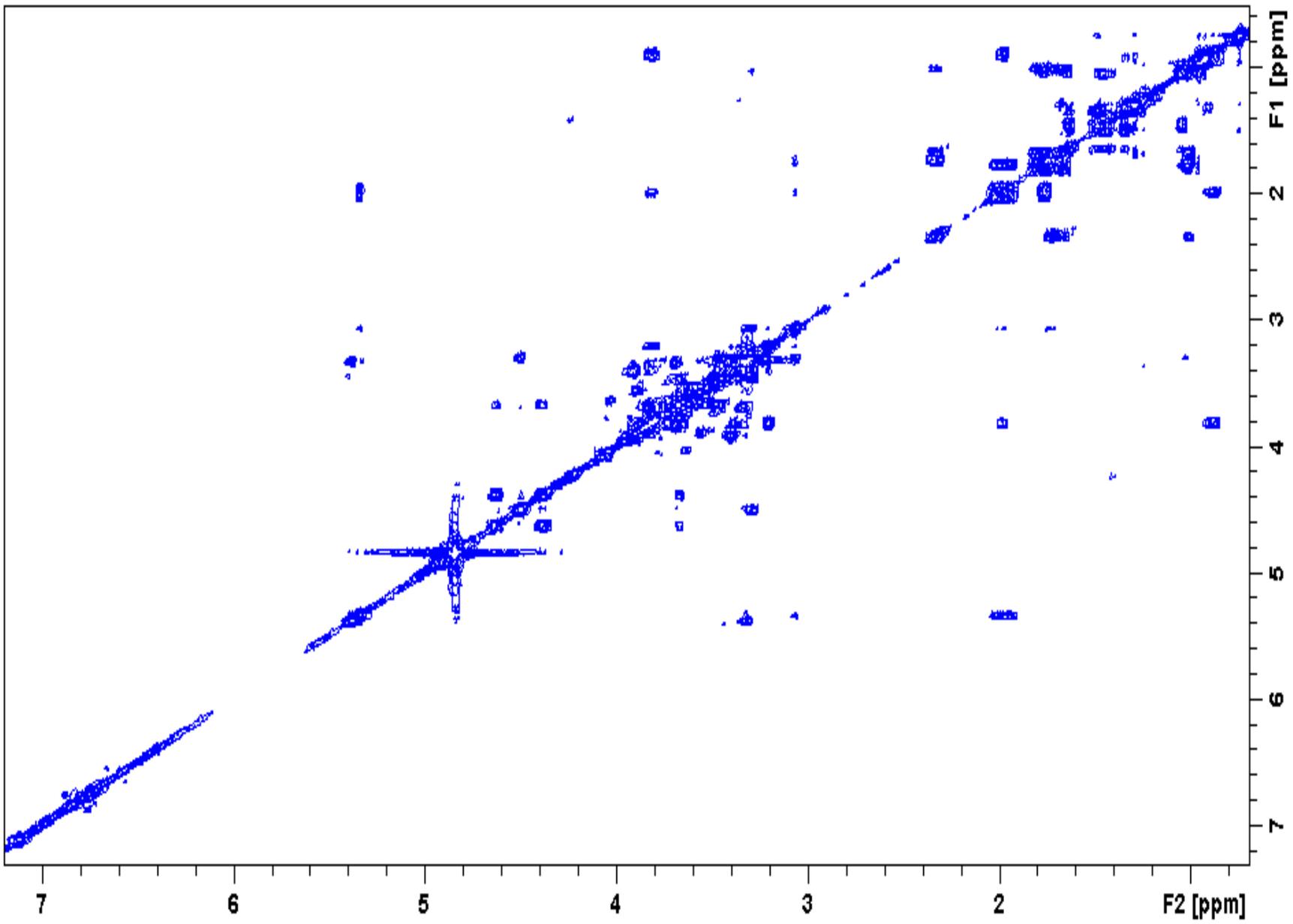
Annexe 8.4 : carte HMBC du Quercotriterpénoside IV dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



Annexe 8.5 : carte HSQC-TOCSY du Quercotriterpénoside IV dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



Annexe 8.6 : carte COSY du Quercotriterpénoside IV dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>



Annexe 8.7 : carte ROESY du Quercotriterpénoside IV dans le MeOH-*d*<sub>4</sub>

