

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1792

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Œnologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 décembre 2010

Par Guillaume ANTALICK

Né le 12 juin 1982 à Bordeaux

Bilan biochimique et sensoriel des modifications de la note fruitée des vins rouges lors de la fermentation malolactique : Rôle particulier des esters

Membres du Jury

Mr. A. Razungles, Professeur, Montpellier SUPAGRO Rapporteur
Mr. H.E. Spinnler, Professeur, AgroParisTech Rapporteur
Mme. A. Lonvaud-Funel, Professeur, Faculté d'Œnologie, Bordeaux ..Présidente
Mr. S. Hautier, Professeur, Ecole d'ingénieur de Changins. Examineur
Mr. G. de Revel, Professeur, Faculté d'œnologie, Bordeaux Directeur de thèse

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier très sincèrement Monsieur Gilles de Revel, professeur à la faculté d'Œnologie, qui m'a confié ce sujet de recherche aussi complexe que passionnant. Il m'a fait totalement confiance au cours de ces 3 ans en me laissant une grande liberté dans mon travail tout en distillant de nombreux conseils aussi utiles que précieux. Il m'a également donné la chance de découvrir l'Œnologie qui m'était inconnu jusqu'alors et qui est devenu une véritable passion. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Madame Aline Lonvaud, professeur à la faculté d'Œnologie et directrice de l'UMR 1219 Œnologie, m'a permis de réaliser ce travail en m'acceptant au sein de l'équipe Microboeno de la faculté d'Œnologie. Il y a 3 ans, sa réactivité et son intérêt dans sa réponse alors que je cherchais avec acharnement à faire une thèse, ont marqué le début de cette belle aventure. De plus, elle m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse. Pour tout cela, je lui exprime ma plus grande gratitude.

Messieurs Alain Razungles, professeur à l'école SUPAGRO de Montpellier, et Henry-Eric Spinnler, professeur à l'école AGROPARISTECH, ont accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. J'en suis très honoré et les remercie vivement.

Monsieur Serge Hautier, professeur à l'école d'agronomie de Changins, a permis d'éclairer ces travaux de recherche sous un angle aussi inattendu qu'intéressant. Notre collaboration s'est révélée passionnante aussi bien d'un point de vue scientifique qu'humain. Son accueil lors de notre visite en Suisse ainsi que sa gentillesse tout au long de nos échanges ont été d'une grande générosité. De plus, il a également accepté de juger mon travail. C'est pourquoi, je tiens à lui exprimer mes plus sincères et mes plus chaleureux remerciements.

Je remercie le Conseil Régional d'Aquitaine et le Conseil interprofessionnel des vins de Bordeaux, pour le financement et le soutien matériel de cette thèse.

Monsieur le professeur Bernard Donèche, doyen de la Faculté d'Œnologie de l'Université Bordeaux Segalen, a également permis que je réalise ce travail au sein de la Faculté d'Œnologie. Je l'en remercie vivement.

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance et mes plus sincères remerciements à Madame Marie-Claire Perello, technicienne de recherche au laboratoire de chimie analytique, qui m'a accompagné tout au long de ma thèse. Son aide, sa disponibilité, son écoute attentive ont été capitales dans le bon déroulement de ces travaux de recherche.

Je remercie vivement Madame Stéphanie Marchand-Marion, Maître de conférences à la faculté d'Œnologie, pour l'aide qu'elle m'a apporté sur la rédaction et la présentation d'un travail de recherche. Ses conseils précieux me serviront sans aucun doute pour la suite de ma carrière.

Un grand merci également à Monsieur John Almy, chercheur invétéré, pour ses conseils, sa grande disponibilité et tout le temps passé à corriger ma prose "Shakespearienne".

Il est vraiment agréable et appréciable de travailler dans une ambiance conviviale et sérieuse. Pour toute leur aide et les moments de rigolade passés ensemble, je remercie particulièrement Céline Franc, Laurent Riquier, Davide Slaghenaufi, Eléonore Cuzange, Audrey Bloem, Andrea Romano ainsi que toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire de chimie analytique.

Je tiens à remercier sincèrement l'équipe du laboratoire de microbiologie et Microflora pour leur aide et leur disponibilité. Je pense particulièrement à Julie Maupeu, Cécile Miot-Sertier et Olivier Claisse. L'apprentissage des bases de la biologie moléculaire n'était pas une mince affaire. Merci également à Monsieur Patrick Lucas et à l'ensemble des enseignants chercheur de ce laboratoire pour les conseils éclairés apportés en microbiologie.

Merci également à l'ensemble du laboratoire de Génie Œnologique et d'Amarante Process pour le soutien matériel durant ces trois ans.

Je n'oublie pas Ainoa, Benjamin, Marion et Chloé qui ont apporté leur bonne humeur et leur aide précieuse en tant que stagiaires. Qu'ils en soient remerciés.

Sans matière première ces travaux n'auraient pas pu être menés. C'est pourquoi je remercie sincèrement tous les châteaux qui ont participé aux essais durant la thèse avec une pensée toute particulière à Messieurs Cyril et Denis Noël du Château Tour Saint Germain et à Madame Bérangère Noël du château Haut-Mortefond.

Merci à Olivier Pillet de la société Lallemand, Vincent Renouf de la société Laffort et Anne-Claire Silvestri de l'école d'agronomie de Changins pour leur collaboration.

Avec Sophie Tempere, Philippe Renault et Axel Marchal, nous avons formé une équipe de choc durant ces 3 ans. Les parties de franchises rigolades, les jeudis endiablés et tous les moments agréables passés ensembles vont me manquer dans le midi. Cette thèse n'aurait certainement pas eu la même saveur sans ces rencontres. Je leur exprime ma plus grande reconnaissance.

Un énorme merci à Maria Silva et Grégory Pasquier pour leur extrême gentillesse, leur disponibilité sans failles et leur précieuse aide dans les moments fatidiques.

A Elodie Guittard, pour son aide et son amitié

Une pensée amicale à l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé à l'ISVV (chercheurs, administration, bibliothèque) durant ces 3 ans. Pour tous les bons moments passés ensemble et leur aide notamment au cours des séances d'analyse sensorielle, je leur exprime ma reconnaissance et ma sympathie.

A mes parents, pour leur soutien sans faille, et les longues heures de "comité de lecture".

A mes futurs beaux-parents, pour leur soutien et leur générosité.

A Noëllie pour son réconfort et sans qui cette période aurait été beaucoup plus difficile.

Enfin, à tous mes amis qui m'ont soutenu.

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. LA FERMENTATION MALOLACTIQUE.....	3
A. <i>Aspects microbiologiques de la fermentation malolactique</i>	3
1. Diversité des BL.....	3
2. Evolution des populations de BL au cours de la vinification	4
3. Interactions levures/BL	4
4. Techniques d'inoculation bactérienne	6
B. <i>Modifications biochimiques et organoleptiques du vin par l'activité des BL</i>	8
1. Réaction principale.....	8
2. Métabolismes secondaires	9
3. Influence de la co-inoculation levures/BL sur les propriétés sensorielles des vins	17
II. LA FML ET L'AROME FRUITE DES VINS ROUGES	18
A. <i>L'arôme fruité des vins rouges</i>	18
1. Les esters.....	21
2. Autres composés ayant un rôle dans l'arôme fruité des vins rouges	34
B. <i>Modification de l'arôme fruité des vins rouges par la FML : aspect sensoriel et biochimique</i> 41	
1. Aspect sensoriel	41
2. Aspect biochimique.....	43
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	52

I.	VINIFICATIONS	52
A.	<i>Essais en chais de FML spontanées.....</i>	52
B.	<i>Essais de microvinification.....</i>	52
C.	<i>Essais de co-inoculation.....</i>	55
II.	ANALYSES BIOCHIMIQUES ET ENZYMATIQUES	57
A.	<i>Dosages enzymatiques.....</i>	57
B.	<i>Mesure de la viabilité par épifluorescence.....</i>	57
C.	<i>Contrôle d'implantation par électrophorèse en champs pulsés d'O.oeni.....</i>	57
III.	ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES.....	60
A.	<i>Analyse par injection directe et par espace de tête.....</i>	60
1.	Alcools supérieurs par GC-FID.....	60
2.	Composés acétoïniques par GC-FID	60
3.	Composés soufrés légers par HS-GC-FPD.....	61
B.	<i>Analyse par extraction liquide/liquide.....</i>	62
1.	Composés dicarbonylés par GC/MS	62
2.	Composés polaires et linalol par GC/MS	62
C.	<i>Analyse par microextraction sur phase solide.....</i>	64
1.	C13-norisoprénoides et lactones par SBSE-GC/MS	64
2.	Thiols par SPE-SBSE-GC/MS	65
3.	Esters apolaires par HS/SPME-GC/MS	67
IV.	EVALUATION SENSORIELLE DES VINS	68
A.	<i>Tests triangulaires</i>	69

B.	<i>Tests de classement.....</i>	69
C.	<i>Profils sensoriels comparés.....</i>	69
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION		71
PARTIE 1 : COMPOSANTES FRUITEES DU VIN, DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DES TECHNIQUES DE MICROEXTRACTION SUR PHASE SOLIDE		71
I.	DOSAGE DE QUATRE C13-NORISPRENOÏDES (C13NI) ET SIX LACTONES DES VINS PAR SBSE-GC/MS	72
A.	<i>Bilan des méthodes existantes.....</i>	72
B.	<i>Développement et validation de la méthode</i>	73
II.	DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE CERTAINS THIOLS DANS LES VINS ROUGES PAR SPE-SBSE-GC/MS	80
A.	<i>Bilan des méthodes existantes.....</i>	80
B.	<i>Développement d'une méthode de dosage du 3SH, 2SPE et 3SPE par SPE-SBSE-GC/MS</i>	83
C.	<i>Discussion.....</i>	86
III.	DOSAGE SIMULTANE DE 32 ESTERS APOLAIRES PAR HS/SPME-GC/MS	88
A.	<i>Bilan des méthodes de dosage existantes.....</i>	88
B.	<i>Développement et validation de la méthode</i>	91
C.	<i>Etablissement d'une base de données esters des vins</i>	99
D.	<i>Discussion.....</i>	108
PARTIE 2: ETUDE DE L'ACTIVITE DES BL SUR LA FRACTION AROMATIQUE FRUITEE DES VINS ROUGES		111
I.	MODIFICATION DE L'AROME DES VINS ROUGES PAR LA FML.....	112
A.	<i>Modulation du profil aromatique.....</i>	112
B.	<i>Impact de la souche de BL.....</i>	116

C.	<i>Discussion</i>	117
II.	EVOLUTION DES COMPOSES DE LA FRACTION LACTIQUE AU COURS DE LA FML.....	119
A.	<i>Bilan analytique des variations en composés α-dicarbonylés</i>	119
1.	Le diacétyl et les composés issus de sa réduction.....	119
2.	Autres composés α -dicarbonylés et l'acétol	121
B.	<i>Implication de certains paramètres œnologiques sur les teneurs en diacétyl</i>	123
1.	Effet souche.....	123
2.	Effet "matrice"	125
C.	<i>Discussion</i>	126
III.	INFLUENCE DE LA FML SUR CERTAINS COMPOSES IMPLIQUES DANS LA PERCEPTION DE L'AROME FRUITE DES VINS ROUGES	127
A.	<i>Evolution de la teneur en certains composés variétaux</i>	127
1.	Les lactones.....	127
2.	C13-norisoprénoides et linalol	128
3.	Effet "souche" et effet "matrice"	130
B.	<i>Evolution au cours de la FML de la teneur en composés soufrés participant à la note fruitée des vins rouges</i>	131
1.	Les thiols.....	131
2.	Le DMS.....	133
C.	<i>Discussion</i>	134
IV.	MODIFICATION DE LA COMPOSITION EN ESTERS PAR L'ACTIVITE DES BL DU VIN	140
A.	<i>Influence globale de la FML sur la composition en esters des vins rouges</i>	140
1.	Evolution de la teneur globale en esters	140

2.	Evolution des différentes classes d'esters odorants au cours de la FML	143
B.	<i>Impact de certains paramètres œnologiques sur les variations de teneurs en esters au cours de la FML</i>	155
1.	Effet souche.....	155
2.	Effet matrice.....	158
C.	<i>Discussion</i>	160
PARTIE 3 : INFLUENCE DES INTERACTIONS LEVURES-BL SUR LES MODULATIONS DE LA NOTE FRUITEE DES VINS ROUGES APORTEES PAR LA FML		
		169
I.	IMPACT DE LA CO-INOCULATION SUR LA COMPOSITION DES VINS EN MARQUEURS AROMATIQUES IMPLIQUES DANS LES VARIATIONS DE LA NOTE FRUITEE DES VINS AU COURS DE LA FML	169
A.	<i>Modulation de la teneur en diacétyle</i>	170
B.	<i>Modification de la composition en esters et en lactones</i>	171
C.	<i>Discussion</i>	177
II.	IMPACT DES INTERACTIONS LEVURES/BL SUR LE PROFIL AROMATIQUE DES VINS	179
CONCLUSION GENERALE		183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		188
<i>Annexe 1 : Les esters étudiés</i>		207
<i>Annexe 2 : Bilan analytique de la FML sur les esters odorants</i>		210
<i>Annexe 3 : Bilan analytique de la FML sur les esters majeurs</i>		228
<i>Annexe 4 : Bilan analytique de la FML sur les C13NI, lactones et linalol</i>		230
<i>Annexe 5 : Bilan analytique de la FML sur les acides branchés</i>		236
<i>Annexe 6 : Bilan analytique de la FML sur les composés de la fraction lactique</i>		238
<i>Annexe 7 : Bilan analytique de la FML sur les composés soufrés légers, l'éthanal et les alcools supérieurs</i>		241

Liste des Abréviations

AAS	acétate d'alcool supérieur
ACP	analyse en composante principale
BL	bactéries lactiques
C13NI	C13-norsisoprénoïdes
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
EDTA	éthylène diamine tétra acétate de sodium
EEAB	esters éthyliques d'acide branché
EEAG	Esters éthyliques d'acides gras
EENIC	esters éthyliques à nombre impairs de carbone
EI	esters isoamyliques
EM	esters méthyliques
FA	fermentation alcoolique
FID	détecteur à ionisation de flamme
FML	fermentation malolactique
FPD	détecteur à photométrie de flamme
GC-MS	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GC-O	chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie
HS	head Space (espace de tête)
LOD	limite de détection
LOQ	limite de quantification
NAD	nicotineamide adénine dinucléotide
NADP	nicotineamide adénine dinucléotide phosphate
nq	non quantifié
PDMS	polydiméthylsiloxane
PFBbr	pentafluorobenzène bromide
SBSE	stir bar sorbative extraction
SIM	selected ion monitoring
SPE	solid phase extraction
SPME	solid phase microextraction
TE	tampon tris-EDTA
Tris	tris hydroxyméthyl aminométhane
UFC	unité formant colonie

C3C2	Propionate d'éthyle
iC4C2	Isobutyrate d'éthyle
C2C3	Acétate de propyle
C4C1	Butyrate de méthyle
C2iC4	Acétate d'isobutyle
C4C2	Butyrate d'éthyle
2mC4C2	2-methylbutyrate d'éthyle
iC5C2	Isovalerate d'éthyle
C2C4	Acétate de butyle
C2iC5	Acétate d'isoamyle
C5C2	Valérate d'éthyle
C6C1	Hexanoate de méthyle
C6C2	Hexanoate d'éthyle
C4iC5	Butyrate d'isoamyle
C2C6	Acétate d'hexyle
C7C2	Heptanoate d'éthyle
HexC2	trans-2-hexénoate d'éthyle
C6iC5	Hexanoate d'isobutyle
C8C1	Octanoate de méthyle
C8C2	Octanoate d'éthyle
C6iC5	Hexanoate d'isoamyle
C2C8	Acétate d'octyle
C9C2	Nonanoate d'éthyle
C10C1	Décanoate de méthyle
C10C2	Décanoate d'éthyle
C8iC5	Octanoate d'isoamyle
gerC1	trans-géranate de méthyle
PhC2C2	Phénylacetate d'éthyle
C2PhC2	Acétate de 2-phényléthyle
C12C2	Dodécanoate d'éthyle
dhCinC2	Dihydrocinnamate d'éthyle
CinC2	Cinnamate d'éthyle
3OHC4C2	3-hydroxybutyrate d'éthyle
3OHC6C2	3-hydroxyhexanoate d'éthyle
6OHC6C2	6-hydroxyhexanoate d'éthyle
LE	Lactate d'éthyle
SDE	Succinate de diéthyle
iC4	Acide isobutyrique
2mC4	Acide 2-méthylbutyrique
iC5	Acide isovalérique
2SPE	2-sulfanylpropionate d'éthyle
3SPE	3-sulfanylpropionate d'éthyle
3SH	3-sulfanylhexanol

INTRODUCTION

Introduction

Le procédé de vinification met en jeu différents processus microbiologiques dont la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les bactéries lactiques (BL), qui assurent la fermentation malolactique (FML), en sont les acteurs majeurs. La FML, dont l'espèce *Oenococcus oeni* est la principale responsable, est une étape essentielle pour l'amélioration de la qualité des vins rouges et de certains vins blancs. Elle permet un assouplissement du vin en abaissant l'acidité par transformation de l'acide malique en acide lactique. En outre, la FML est aussi le théâtre de divers métabolismes des BL entraînant des modifications aromatiques significatives des vins. Certains composés ainsi que les métabolismes associés sont maintenant connus. Il s'agit principalement des molécules issues du métabolisme des acides organiques, des sucres résiduels et de certains acides aminés comme la méthionine. Tous ces métabolites sont impliqués dans l'apparition de notes lactique, beurrée ou grillée.

En revanche, les connaissances concernant l'impact des BL sur l'arôme fruité des vins rouges sont beaucoup moins approfondies et surtout bien plus controversées. Empiriquement, la FML est souvent associée à une diminution de la note fruitée, dont le développement de la note lactique en serait la cause principale par un effet de “masque” aromatique. Cependant, les BL pourraient être capables soit de diminuer, soit d'augmenter l'intensité du caractère fruité des vins rouges. Il existe très peu de données sur les métabolismes des BL pouvant être impliqués dans ces variations. L'absence de données fondamentales sur les marqueurs de l'arôme des vins rouges est sans doute une raison de cette difficulté de consensus. Le manque d'études biochimiques, analytiques et sensorielles concomitantes pour aborder ce sujet empêche d'enrichir le débat sur cette question. Toutes ces divergences montrent la complexité du problème et la nécessité de travaux supplémentaires, la préservation de l'expression fruitée des vins étant devenue aujourd'hui un enjeu majeur de la qualité des vins et de leur acceptation par les consommateurs. Pour tenter de progresser sur ces questions œnologiques importantes, il a été choisi d'établir un bilan analytique et sensoriel de l'impact de l'activité des BL sur la composition en marqueurs aromatiques potentiellement impliqués dans la perception de la note fruitée des vins rouges.

La première partie bibliographique de ce travail présente les conditions microbiologiques et biochimiques de la FML, le rôle des bactéries lactiques dans les transformations organoleptiques du vin en mettant l'accent sur les modulations aromatiques apportées par la FML. Ce chapitre permet aussi de dresser un bilan complet des marqueurs aromatiques de la note fruitée des vins rouges, ainsi que des activités enzymatiques des BL pouvant moduler leur teneur. Le deuxième chapitre aborde la description des conditions expérimentales, et plus particulièrement des techniques d'analyse ayant permis d'étudier 70 molécules dans les vins rouges.

Le dernier chapitre est consacré à la présentation et à la discussion des résultats expérimentaux. Le développement et la validation de méthodes d'analyses par microextraction sur phases solides de haute performance se sont avérés indispensables à l'établissement d'un bilan fiable et complet des variations biochimiques constatées au cours de la FML. Un accent particulier est mis sur la méthode de dosage de 32 esters, composés clés de l'arôme fruité des vins rouges, avec l'établissement d'une "base de données esters" des vins à partir du dosage de près de 200 vins. L'influence de la FML sur l'arôme fruité des vins rouges est abordée par un bilan sensoriel. L'étude des mouvements des teneurs en composés caractérisant la note lactique et celle de la note fruitée des vins est ensuite développée. Pour ce faire, de nombreux marqueurs aromatiques (variétaux et fermentaires) sont suivis afin de rechercher quelles sont les voies métaboliques des BL les plus impliquées dans la modulation de la note fruitée des vins rouges. Les conséquences de la FML sur ces composés aromatiques sont décrites ainsi que l'influence de certains paramètres œnologiques liés à la FML. Une étude complète des mouvements dans les vins rouges des teneurs en ester est notamment réalisée. Grâce à la base de données esters des vins, une analyse poussée des résultats analytiques permet d'éclairer l'importance des activités estérases, peu étudiées jusqu'à présent chez les BL du vin. Enfin, l'influence des interactions levures/BL sur les nuances de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML est abordée par l'étude des modifications biochimiques et aromatiques engendrées par la co-inoculation levures/BL.

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La fermentation malolactique

La FML fut découverte à la fin du XIX^{ème} siècle par Pasteur qui la considéra d'abord comme une maladie du vin. Puis certains travaux du début du XX^{ème} siècle comme ceux de Müller-Thurgau (1891) firent évoluer cette idée en accordant de plus en plus d'importance à cette dégradation de l'acide malique des vins. Finalement, les travaux en œnologie de Ribéreau-Gayon et Peynaud entre 1937 et 1964 vont confirmer tout l'intérêt de cette fermentation en vinification dont la pratique se généralisera pour les vins rouges dans les années 60.

Elle permet ainsi une augmentation du pH mais aussi un enrichissement des vins en nuances et complexité aromatiques menant à un meilleur équilibre organoleptique du vin. La FML procure également une stabilisation microbiologique du vin par épuisement de substrats tels que l'acide malique, l'acide citrique et certains hexoses ou pentoses.

Aujourd'hui, la FML est pratiquée de façon quasi systématique dans l'élaboration des vins rouges, elle est même recherchée et souhaitable pour la vinification de certains vins blancs présentant une acidité élevée.

A. Aspects microbiologiques de la fermentation malolactique

1. Diversité des BL

Dans le moût, seule une dizaine d'espèces de BL peuvent être identifiées (Lonvaud-Funel, 1999). Les principaux genres représentés sont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Oenococcus*. A l'identique de l'ensemble des BL, celles isolées du vin sont Gram +, elles ne possèdent pas de chaîne respiratoire, mais elles tolèrent l'oxygène (anaérobie facultative). Selon les espèces rencontrées, la nature de leur métabolisme diffère (homofermentaire, hétérofermentaire). Une sélection naturelle s'opère tout au long de la FA et

seules les espèces les plus résistantes à l'environnement stressant du vin (pH faible, niveau en éthanol élevé, présence de SO₂) se maintiennent. Elles appartiennent généralement à l'espèce *Oe. oeni* (Lonvaud-Funel, 1991).

2. Evolution des populations de BL au cours de la vinification

La population des BL augmente généralement en début de FA pour atteindre un maximum de 10⁴ UFC/ml, avant de décroître rapidement jusqu'à 10² UFC/ml en fin de FA. Une période de latence plus ou moins longue intervient ensuite avant que la seconde phase de multiplication ne commence. La population atteint alors rapidement 10⁶ UFC/ml, nécessaire au départ de la FML. Quand l'acide malique est complètement dégradé, la population décroît progressivement, puis les vins pourront être stabilisés par sulfitage.

3. Interactions levures/BL

L'évolution des populations de BL au cours de la vinification est due en partie à l'antagonisme entre les levures et les bactéries, et dépend de plusieurs facteurs combinés. Bien que certains points restent à élucider, les nombreuses études menées depuis les années 60 ont permis de faire la lumière sur un certain nombre de paramètres pouvant expliquer cette sélection naturelle. Le premier d'entre eux est certainement l'éthanol, produit par les levures en cours de FA, qui inhibe la croissance bactérienne (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1961). En outre, il a été rapidement suggéré que d'autres métabolites synthétisés par les levures pouvaient avoir des effets antagonistes sur les bactéries, notamment le dioxyde de soufre (Fornachon, 1968; Henick-Kling et Acree, 1994). Par ailleurs, les acides gras de taille moyenne (de C6 à C12) peuvent également inhiber la croissance bactérienne (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988a) et réduire l'activité malolactique des BL (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). De plus l'effet simultané de plusieurs acides gras différents, du pH et de l'éthanol renforcent ce pouvoir inhibiteur (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988a). Quelques auteurs ont également suggéré l'implication de protéines et de peptides dans l'antagonisme des levures sur les bactéries (Dick *et al.*, 1992). Enfin, l'appauvrissement du milieu en nutriments par les levures a également été évoqué afin d'expliquer l'inhibition de la croissance bactérienne durant la FA (Fornachon, 1968).

Il est évident qu'un certain nombre de paramètres intervient dans les mécanismes d'inhibition des BL par les levures, augmentant ainsi de façon drastique la sélectivité du

milieu. *Oe. oeni* semble ainsi l'espèce de BL la mieux adaptée à survivre à toutes ces contraintes.

De même, la période de latence entre la fin de FA et le début de la FML est intimement liée à l'adaptation au vin des BL ayant résisté pendant la FA. Ce délai pourrait également dépendre de certains métabolites libérés dans le milieu par les levures, notamment en fin et après FA au cours de l'autolyse des levures. En effet, ces autolysats sont riches en nutriments potentiels pour les BL tels que des acides aminés, des peptides, des protéines, des glucanes et des mannoprotéines (Llaubères *et al.*, 1987; Charpentier et Feuillat, 1993; Alexandre *et al.*, 2001). Il a été montré au cours de divers travaux que certaines fractions peptidiques et mannoprotéines levuriennes pouvaient stimuler la croissance des BL du vin (Feuillat *et al.*, 1977; Guilloux-Benatier *et al.*, 1985; Lonvaud-Funel *et al.*, 1988b), limitant ainsi le temps de latence et augmentant la biomasse bactérienne (Guilloux-Benatier *et al.*, 1993; Guilloux-Benatier *et al.*, 1995). En outre, des activités protéases ont été mises en évidence chez *Oe. oeni* permettant l'hydrolyse de ces protéines levuriennes et une meilleure assimilation de ces nutriments (Guilloux-Benatier *et al.*, 1995).

Enfin, les mannoprotéines libérées par les levures au cours de leur autolyse présentent un double intérêt dans la stimulation de la croissance bactérienne. D'une part, ces macromolécules ont la propriété d'adsorber une partie des acides gras inhibiteurs synthétisés par les levures, permettant ainsi de détoxifier le milieu pour les BL (Guilloux-Benatier et Feuillat, 1991). D'autre part, certaines activités glycosydases et peptidases particulièrement mises en évidence chez *Oe. oeni* pourraient permettre l'hydrolyse de mannoprotéines ainsi que d'autres macromolécules comme des polysaccharides, menant à un enrichissement nutritionnel du milieu (Cavin, 1988; Guilloux-Benatier *et al.*, 1993).

Ainsi, l'activité des levures pourrait contribuer à une sélection des BL, non seulement au cours de la FA mais également après FA, en influençant la viabilité de la FML grâce à la libération de composés favorisant la croissance bactérienne.

Un certain nombre de pratiques œnologiques peuvent moduler la composition nutritionnelle du vin et la teneur en produits inhibiteurs de la FML. Elles peuvent alors permettre de limiter ou de favoriser la croissance bactérienne et l'activité malolactique.

4. Techniques d'inoculation bactérienne

Le temps de latence entre la fin de la FA et le déclenchement de la FML peut aller de quelques jours à plusieurs mois, même si les conditions optimales de pH (entre 3,2 et 3,8) et de température (entre 18 °C et 20 °C) sont réunies. Or, la FML ne doit pas être languissante afin de limiter les risques d'altération microbiologique du vin et de permettre la dégradation totale de l'acide malique. Cependant, la majorité des vinificateurs laisse encore la flore indigène effectuer la FML spontanément.

Les difficultés rencontrées pour l'élaboration de la FML ont été à l'origine du développement et de la production de levains malolactiques commerciaux. Il s'agit de préparations industrielles permettant une inoculation de masse d'une souche bactérienne préalablement isolée pour ses performances fermentaires. Cela a pour but de réduire le développement potentiel d'autres BL moins performantes. La sélection de ces souches doit répondre à certains critères : tolérance au pH bas ($\text{pH} < 3,8$) et à l'éthanol ($> 12 \text{ \% vol}$), activité malolactique permettant d'éviter les FML languissantes, absence de mauvais goûts et de composés non désirables comme les amines biogènes et, si possible, contribution positive aux qualités organoleptiques des vins (Lonvaud-Funel et Joyeux, 1994; Gindreau *et al.*, 1997). Cependant, l'adaptation au vin est très facilement perdue au stade de la production industrielle. L'induction de la FML par une méthode d'inoculation directe a été très vite recherchée et des levains efficaces à ensemencement direct (Nielsen *et al.*, 1996) sont maintenant commercialisés par un certain nombre de sociétés.

La principale espèce utilisée est *Oe. oeni* pour ses capacités d'adaptation exceptionnelles au milieu vin et dans une moindre mesure *Lactobacillus plantarum* pour son métabolisme homofermentaire. Les outils modernes de la biologie moléculaire permettent aujourd'hui d'aider à la sélection et à la production des levains malolactiques (Lonvaud-Funel, 1998). Toutefois, malgré tous les progrès réalisés pour un meilleur contrôle de la FML, il est encore courant de rencontrer des problèmes de réalisation rapide de FML y compris lors de l'utilisation de levains commerciaux. De plus, tous les levains alcooliques et malolactiques commerciaux ne sont pas forcément compatibles entre eux. Même si les souches utilisées ont été développées afin de limiter au maximum les possibilités d'antagonisme entre les levures et les BL, ces effets subsistent tout de même, d'autant plus qu'ils dépendent en partie de la composition du milieu. La viabilité des couples levures/bactéries utilisés pourrait notamment

dépendre de la capacité de production de SO₂ ainsi que de la consommation nutritionnelle des levures (Krieger et Arnink, 2003).

Afin de permettre une meilleure adaptation des BL et de limiter les effets d'antagonisme avec les levures, la problématique du temps d'inoculation des BL dans le vin a été soulevée assez rapidement au moment du développement des premiers "starters" commerciaux (Henick-Kling et Acree, 1994). Deux possibilités ont été alors envisagées : l'inoculation séquentielle classique après FA, et l'inoculation simultanée ou co-inoculation, consistant à introduire le levain malolactique à peu près en même temps que le levain alcoolique.

Cette deuxième technique présente des avantages non négligeables par rapport à la première. En effet, l'introduction des BL dans un milieu beaucoup moins concentré en éthanol et beaucoup plus riche en éléments nutritifs (début de FA) permet une meilleure adaptation des bactéries au vin. Ceci a pour conséquence non seulement d'augmenter la viabilité de la FML, mais également de réduire grandement le temps total de fermentation. Cela limite ainsi le risque de contamination par des microorganismes d'altération (Krieger et Arnink, 2003; Massera *et al.*, 2009).

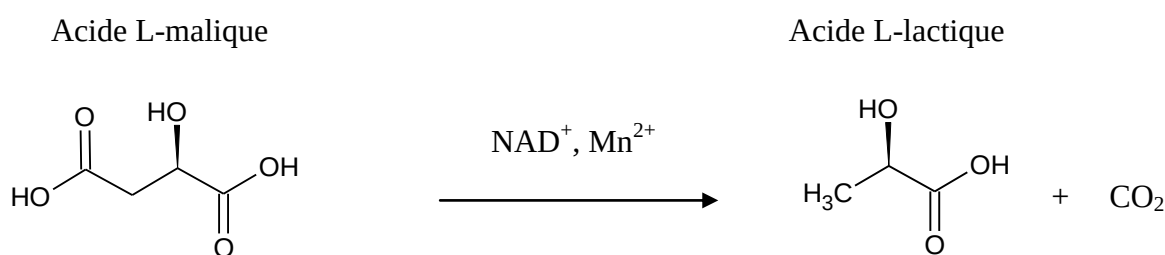
Malgré ces avantages, la co-inoculation levures/bactéries est restée pendant longtemps complètement délaissée par les vinificateurs. En effet, jusqu'à cette dernière décennie, il était considéré que la réalisation de la FML dans des milieux très concentrés en sucre était très risquée car cela pouvait aboutir à une très forte production d'acide acétique. Or, des études récentes (Krieger et Arnink, 2003; Jussier *et al.*, 2006; Massera *et al.*, 2009) ont montré que l'inoculation simultanée n'aboutissait pas spécialement à des niveaux d'acidité volatile significativement supérieurs à ceux obtenus en inoculation séquentielle. Cependant, les craintes des vinificateurs n'étaient pas forcément infondées car l'inoculation simultanée avec des souches de BL non adaptées peut entraîner un fort ralentissement ou un blocage de la FA avant la consommation complète des sucres. Dans ce cas, la présence en grand nombre de bactéries hétérofermentaires comme *Oe. oeni*, dans un milieu riche en sucres, a effectivement de grande chance d'engendrer une forte production d'acide acétique (Rasmussen *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1999). Toutefois, même si ces risques existent encore aujourd'hui et que la sélection des couples levures/BL doit être bien adaptée à la co-inoculation, les progrès qui ont été apportés dans le domaine des levains commerciaux ont largement contribué à les réduire.

De ce fait, depuis quelques années maintenant, la co-inoculation levures/BL a été en quelque sorte réhabilitée en grande partie sous l'impulsion des sociétés commercialisant les ferments. Elles ont utilisé ces dernières données pour justifier l'utilisation de la co-inoculation levures/BL, plus particulièrement par rapport à la forte diminution du temps total de fermentation et à la réduction du risque de contamination du vin par des microorganismes d'altération comme *Brettanomyces bruxellensis*.

B. Modifications biochimiques et organoleptiques du vin par l'activité des BL

1. Réaction principale

La réaction qui définit la FML est celle qui provoque la décarboxylation de l'acide L-malique en acide L-lactique, accompagnée d'un dégagement de CO_2 .



La décarboxylation est réalisée par l'enzyme malolactique avec NAD^+ et Mn^{2+} comme cofacteur (Lonvaud-Funel et de Saad, 1982; Spettoli *et al.*, 1984; Naouri *et al.*, 1990). Le gène codant pour cette enzyme fut séquencé pour la première fois chez une bactérie lactique chez *Lactococcus lactis* (Denayrolles *et al.*, 1994). Le principal effet de cette désacidification biologique est une diminution naturelle de l'acidité totale due au remplacement d'un diacide (acide L-malique) par un monoacide (acide L-lactique), entraînant une faible augmentation de pH.

D'un point de vue organoleptique, le remplacement de l'acide malique au goût acerbe par l'acide lactique beaucoup plus doux en bouche, apporte plus de rondeur et de souplesse au vin. Ceci est particulièrement recherché pour les vins rouges car l'acidité renforce la sensation d'astringence provoquée par les tanins.

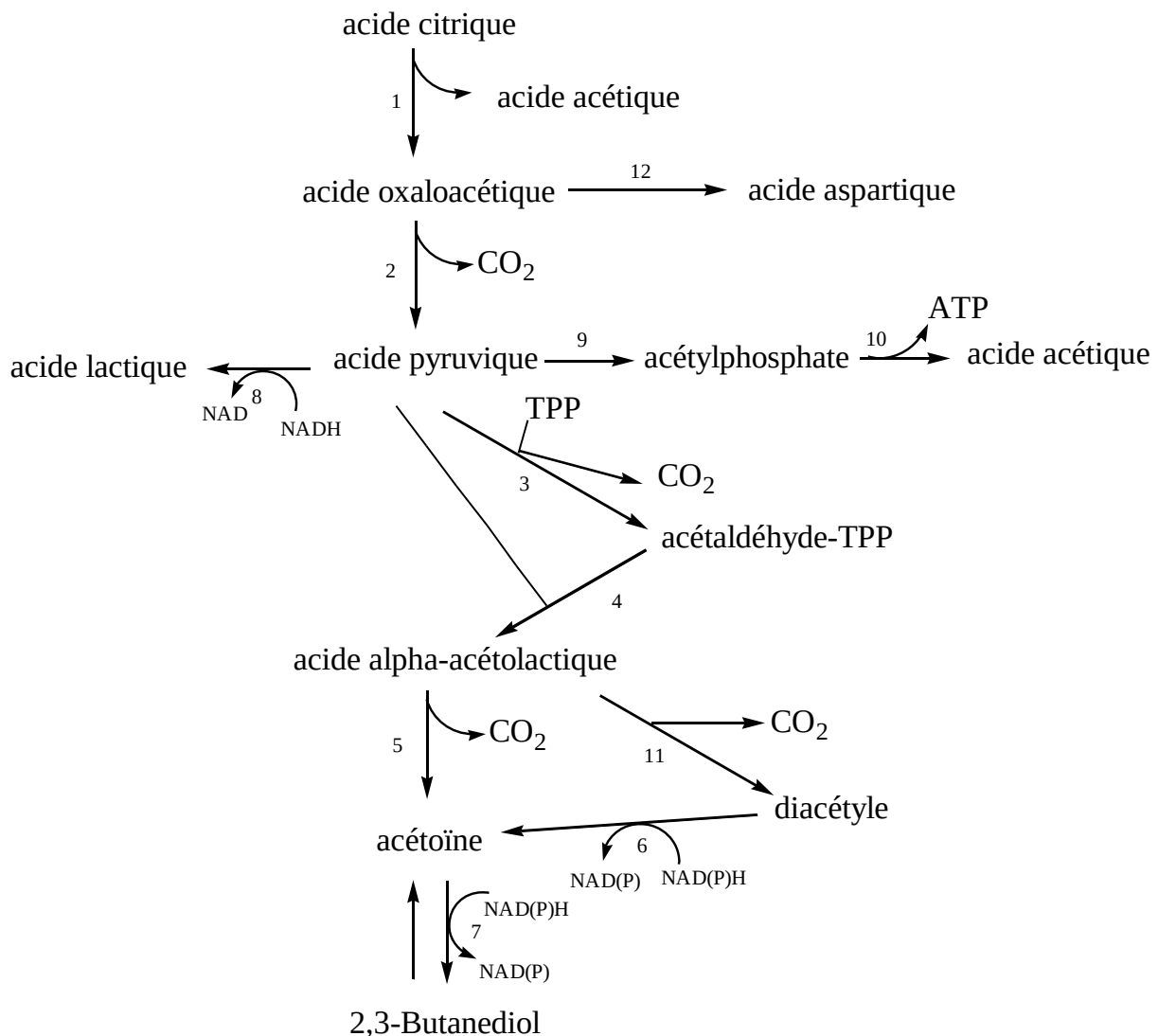
2. Métabolismes secondaires

Si l'influence de la FML sur le goût du vin, dans le sens strict du terme, est bien connue de par la désacidification malolactique, d'un autre côté elle est bien moins définie lorsqu'il s'agit de l'arôme du vin. En effet, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'impact de la FML sur l'arôme des vins menant à un certain nombre de résultats contradictoires. Si dans un premier temps, il a été établi que la FML n'influencait pas particulièrement la composante aromatique (Rankine, 1972; Kunkee, 1974), depuis il a été largement prouvé que l'activité des BL engendrait des modifications aromatiques significatives. Les progrès effectués dans le domaine de l'analyse sensorielle, et avec l'apparition de techniques d'analyses physico-chimiques de plus en plus performantes (GC-O, GC-MS), il est reconnu depuis les années 80 que la FML influence la composition en molécules volatiles des vins (Zeeman *et al.*, 1980). Toutefois, s'il existe un consensus concernant le fait que la FML complexifie l'arôme des vins, il n'y a pas de tendance établie dans la détermination de ces modulations aromatiques. D'un côté, les descripteurs les plus communs pour décrire les vins ayant subi une FML sont : "beurré", "lactique", "noisette", "boisé", "doux". Il est aussi reconnu que la FML améliore la structure du vin en augmentant sa longueur en bouche et en étant décrit comme "vins plus ronds" et "ayant plus de corps" (Henick-Kling et Acree, 1994; Keim *et al.*, 2002). D'un autre côté, l'impact de la FML sur les notes aromatiques "fruité", "végétal" ou encore "animal" est beaucoup plus sujet à controverse. Une des raisons qui pourrait expliquer cette absence de consensus est que de nombreux travaux s'accordent sur le fait que la modification aromatique du vin par les BL est très dépendante de la souche bactérienne impliquée (Davis *et al.*, 1985; Mc Daniel, 1987; Henick-Kling et Acree, 1994; Laurent, 1994). Les BL présentant une grande diversité dans leurs spécificités métaboliques, ces modifications organoleptiques vont ainsi être intimement liées à un certain nombre de métabolismes secondaires bactériens.

Impact de la FML sur la note beurrée

La note beurrée, plus généralement associée à l'arôme lactique des vins, est en grande partie due au diacétyle (butane-2,3-dione). Rankine *et al.* (1969) étudie l'impact organoleptique du diacétyle en montrant qu'à des faibles teneurs (< 4 mg/l), il peut augmenter la complexité et améliorer la qualité du vin, alors qu'à des niveaux plus élevés, il nuit plutôt à la qualité. Peynaud (1980) considère que le diacétyle formé pendant la FML est un élément intervenant dans l'affinement des arômes, alors que Bertrand *et al.* (1984) nuancent en

affirmant que selon les quantités, l'arôme de beurre dans les vins n'est pas toujours perçu comme agréable. Aujourd'hui, cette note beurrée est plus ou moins recherchée par le vinificateur en fonction du style de vin qu'il veut élaborer. D'un côté, il est bien établi que cela améliore la complexité du vin mais, d'un autre côté une note beurrée trop présente pourrait participer à un certain masque olfactif des arômes fruités et variétaux, acteurs majeurs des caractéristiques aromatiques des vins.



- (1) citrate lyase ; (2) oxaloacétate ; (3) pyruvate décarboxylase ; (4) α -acétolactate synthase, (5) α -acétolactate décarboxylase ; (6) diacétyle réductase ; (7) acétoïne réductase ; (8) lactate déshydrogénase ; (9) complexe de la pyruvate déshydrogénase ; (10) acétate kinase ; (11) décarboxylation non enzymatique de l' α -acétolactate ; (12) aspartate aminotransférase. TPP, thiamine PP_i.

Figure 1 : Métabolisme de l'acide citrique par *Oe. oeni* (adapté de Ramos *et al.* 1995)

Les levures sont capables de synthétiser le diacétyle au cours de la FA, soit par décarboxylation non enzymatique de l' α -acétolactate, soit par association d'une molécule de pyruvate et d'acétyl-coA (de Revel, 1992). Cependant, la majorité du diacétyle formé au cours de la FA par le métabolisme des sucres, est réduit en acétoïne (3-hydroxybutanone) et en butane-2,3-diol (Postel et Meier, 1983; de Revel *et al.*, 1989), composés beaucoup moins odorants (de Revel *et al.*, 1989).

Ainsi, la FML demeure la principale origine de ce composé dans les vins. Le diacétyle y est principalement produit par la dégradation de l'acide citrique. Plusieurs travaux abordent ce métabolisme en décrivant les voies de synthèse (**Figure 1**) (Bertrand *et al.*, 1984; Davis *et al.*, 1985; de Revel, 1992; Bartowsky et Henschke, 2004). Le diacétyle correspond au produit de la décarboxylation oxydative de l' α -acétolactate principalement dérivé de la dégradation de l'acide citrique. L'acide acétique, l'éthanol, l'acide lactique, le diacétyle, l'acétoïne et le butane-2,3-diol sont les produits de dégradation du citrate. La formation et la dégradation du diacétyle au cours de la FML sont intimement liées à la croissance des BL et aux métabolismes des sucres, de l'acide malique et de l'acide citrique (Shimazu *et al.*, 1985). Le métabolisme de l'acide citrique est généralement déclenché lorsque la moitié de l'acide malique a été consommé. La concentration de diacétyle formé atteint son maximum lorsque environ 95 % de l'acide malique a été transformé en acide lactique et que 75 % de l'acide citrique a été consommé. La teneur en diacétyle diminue ensuite, principalement par réduction (**Figure 2**), jusqu'à la dégradation complète de l'acide citrique puis au-delà (de Revel, 1992).

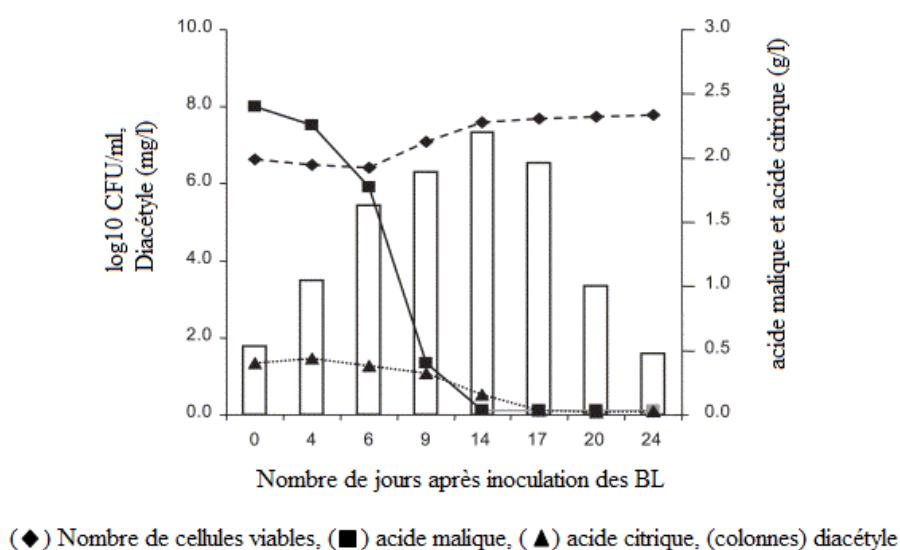


Figure 2 : Suivi analytique de FML effectué avec une couche commerciale d'*Oe. oeni* dans un vin de Cabernet Sauvignon (Bartowsky et Henschke, 2004).

De nombreux facteurs peuvent influencer la production de diacétyl au cours de la FML : la souche de BL et son niveau d'inoculation, le pH, la température, la teneur initiale en acide citrique, la présence de sucres résiduels (Fornachon et Lloyd, 1965; Lonvaud-Funel et al., 1984; de Revel et al., 1989; Bartowsky et Henschke, 2004). En outre, les niveaux de diacétyl sont plus importants dans les vins rouges que dans les vins blancs (de Revel, 1992; Bartowsky et Henschke, 2004).

Différentes pratiques œnologiques peuvent également avoir un impact dans les teneurs rencontrées dans les vins. En effet, le diacétyl n'étant pas un métabolite très stable notamment vis à vis des activités microbiennes, le fait de stabiliser le vin par sulfitage va en quelque sorte fixer la teneur en diacétyl (Bartowsky et Henschke, 2004). Or, la pratique courante étant de sulfiter lorsque la teneur d'acide malique est en-dessous de 0,2 g/l (sulfitage précoce), cela correspond à des moments où la teneur en diacétyl est en pleine évolution, souvent proche de son maximum. Donc, le moment choisi va certainement avoir une influence non négligeable sur la teneur finale en diacétyl (Nielsen et Richelieu, 1999; Bartowsky et Henschke, 2004). Le fait d'oxygéner le moût et le vin durant la fermentation favorise aussi la production de diacétyl (Nielsen et Richelieu, 1999). Enfin, le contact des lies de levures permet de réduire une partie du diacétyl en acétoïne et 2,3-butanediol (de Revel, 1992).

Cependant, s'il est évident que le diacétyl est en grande partie responsable de cet arôme beurré, la relation entre la teneur en diacétyl et l'intensité de la note "beurrée" est beaucoup moins claire. En effet, le diacétyl est un composé dicarboxylé très réactif, notamment avec le SO₂ qui va le complexer très facilement, limitant ainsi sa volatilisation dans l'espace de tête (de Revel *et al.*, 1989; Nielsen et Richelieu, 1999). Il s'agit d'interactions réversibles, semblable à celles entre le SO₂ et l'éthanal. Ainsi, l'ajout de SO₂ réduit fortement la teneur en diacétyl libre et par la même occasion l'intensité de la note beurrée, car il s'agit de la seule forme de diacétyl perceptible car volatilisé dans l'espace de tête (de Revel *et al.*, 1989; Bartowsky et Henschke, 2004). La perception de l'arôme beurré n'est donc pas directement liée à la concentration totale en diacétyl mais plutôt à celle en diacétyl libre. Elle est également liée à la concentration en SO₂ libre, dépendant du niveau de sulfitage et de la composition du vin, qui peut plus ou moins le complexer (Martineau *et al.*, 1995). La réaction entre le SO₂ et le diacétyl étant réversible et dépendante de divers paramètres (température, pH) (Nielsen et Richelieu, 1999), le diacétyl est souvent fortement complexé

dans les jours qui suivent le sulfitage avant d'être libéré par la suite, au fur et à mesure, notamment sous l'action du pH du vin (Nielsen et Richelieu, 1999). C'est pourquoi, empiriquement il faut souvent attendre plusieurs semaines après la fin de la FML, voir plusieurs mois, avant de pouvoir percevoir ou craindre l'arôme beurré des vins.

D'autres molécules α -dicarboxylées (du C2 au C5) sont susceptibles de nuancer l'arôme beurré du vin (**Figure 3**). Il s'agit notamment du méthylglyoxal et de ses produits de réduction (acétol et 1,2-propanediol) synthétisés en partie au cours de la FML (de Revel et Bertrand, 1993). Il semblerait que tous ces composés dicarboxylés forment des systèmes red-ox avec leurs produits de réduction, permettant ainsi aux bactéries et aux levures de diminuer leur toxicité et de régénérer les niveaux de NAD et NADP, éléments essentiels de leur métabolisme (de Revel et Bertrand, 1994). Le méthylglyoxal apporte des notes beurrées plus légères, plus fraîches, plus douces (crème fraîche) alors que ses produits de réduction ne sont que très peu odorants.

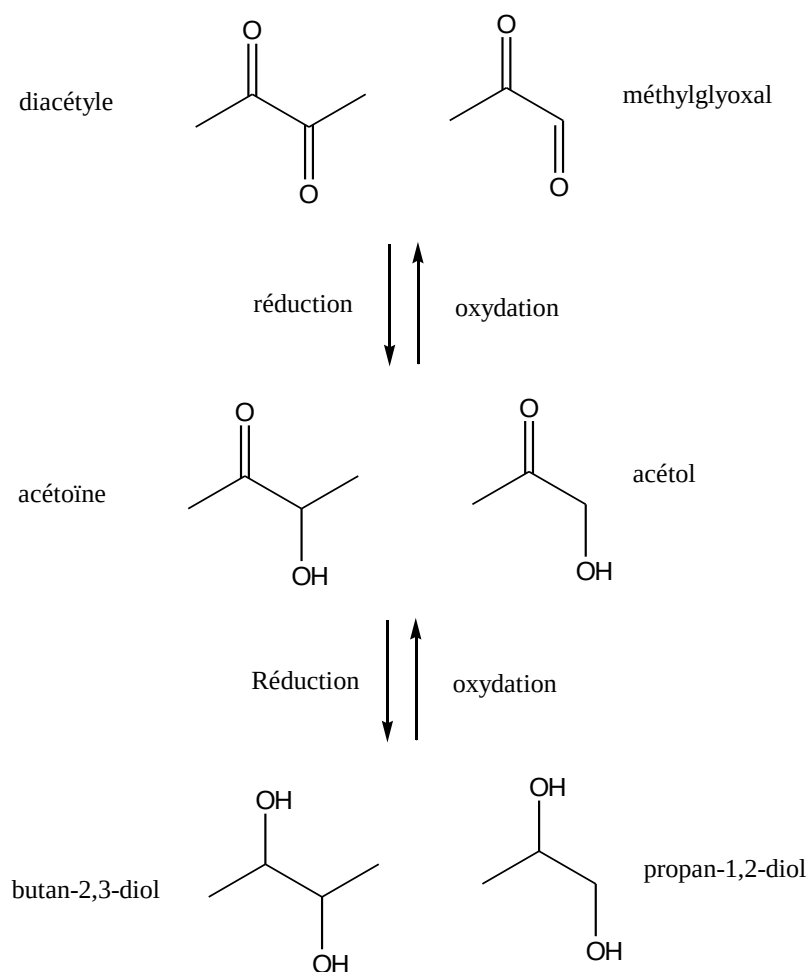


Figure 3 : Composés dicarboxylés et leurs produits de réduction

En outre, la présence de ces molécules dicarboxylées dans le vin n'est pas neutre vis-à-vis des arômes de vieillissement et sont certainement à l'origine du bouquet du vin (de Revel, 1992). En effet, il s'agit de composés pouvant réagir avec de nombreux substrats dont certains acides aminés, en particulier la cystéine, pour former des thiazoles et d'autres hétérocycles décrits par des odeurs d'aliments cuits, grillés avec des notes de type noisette et café (Marchand *et al.*, 2000; Pripis-Nicolau, 2000; Pripis-Nicolau *et al.*, 2000). Ces notes aromatiques se développent au cours du vieillissement du vin (arômes tertiaires) et participent au bouquet des vins d'une certaine évolution.

Métabolisme des acides aminés

Certains groupes d'acides aminés peuvent être potentiellement à l'origine de la synthèse de composés aromatiques. Il s'agit des acides aminés branchés (leucine, valine, isoleucine), des acides aminés aromatiques comme la phénylalanine et des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine). Ces métabolismes ont notamment été étudiés dans l'industrie du fromage (Berger *et al.*, 1999; Bonnarme *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001) mais beaucoup moins en œnologie. Les voies métaboliques des acides aminés par les BL ont surtout été étudiées pour la synthèse de composés indésirables mettant en jeu les conditions d'hygiène du vin (carbamate d'éthyle, amines biogènes).

Plus certainement, les acides aminés branchés, aromatiques et soufrés sont des précurseurs potentiels d'aldéhydes, d'alcools, d'acides et d'autres composés volatils. L'implication des acides aminés dans la synthèse de ces composés dans le vin reste encore mal connue. Des études ont montré que la FML pouvait modifier la composition en certains alcools, acides et esters (Maicas, 1999; Ugliano et Moio, 2005; Izquierdo Cañas *et al.*, 2008; Boido *et al.*, 2009) sans qu'aucune relation n'ait été établie entre ces observations et la dégradation des acides aminés. Cependant, les résultats restent contradictoires, car ils sont très aléatoires suivant le composé et la souche de BL testée. Par ailleurs, les variations enregistrées restent souvent minimales, plus particulièrement pour les alcools supérieurs, ce qui limite leur implication dans les modifications aromatiques apportées par la FML. D'autres études ont montré qu'il n'y avait pas de modifications significatives de la teneur en alcools supérieurs et en certains acides branchés (de Revel, 1992; de Revel, 2002; Pozo-Bayon *et al.*, 2005).

En revanche, les voies métaboliques des acides aminés soufrés ont été plus étudiées, car ces composés peuvent générer des composés soufrés volatils (CSV), aux odeurs caractéristiques et au pouvoir odorant élevé. Des études ont en effet mis en évidence la synthèse au cours de la FML, de composés comme le méthionol, le méthional, l'acide 3-méthylthiopropionique (MTPA) et son ester, ainsi que d'autres CSV (Anocibar-Beloqui, 1995; Maicas, 1999; Pripis-Nicolau *et al.*, 2004; Vallet, 2007). La majorité de ces composés sont issus du catabolisme par les BL de la méthionine dont les voies métaboliques ont été mises en évidence dernièrement (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004; Vallet *et al.*, 2008). Les variations de ces CSV au cours de la FML ne sont cependant pas systématiques et dépendent des souches de BL (Vallet, 2007). Elles peuvent certainement avoir un impact sur l'arôme des vins en apportant une certaine complexité. Il ne faut pas que les CSV soient présents en trop grande quantité car cela pourrait être perçu comme un défaut avec des odeurs de réduction masquant notamment l'arôme fruité des vins. En outre, l'éventualité de la cystéine, comme précurseur des CSV intéressants dans les vins a été écartée, elle est essentiellement à l'origine d'une production supplémentaire d'H₂S (Pripis-Nicolau, 2002).

Au final, l'implication de la dégradation des acides aminés par les BL peut avoir un impact sur l'arôme du vin mais cela reste très dépendant de la souche impliquée et des caractéristiques de chaque vin avant la FML.

FML et arômes boisés

La pratique de la FML en barriques modifie les caractéristiques organoleptiques du vin en lui apportant souvent plus de couleur, de souplesse, de gras, d'amplitude et de rondeur. Mais, l'intérêt de la FML en barriques est également dû à son effet aromatique car elle va permettre de "boiser" le vin en rendant son bouquet plus harmonieux (Vivas *et al.*, 2004). Les vins ayant réalisé leur FML en barriques sont perçus plus toastés, épicés, fumés, beurrés et vanillés que les vins logés dans les fûts seulement après FML (de Revel *et al.*, 1999). La FML participe activement au phénomène de "boisage" qui n'est donc pas issu que d'une simple extraction hydroalcoolique des composés aromatiques du bois de chêne.

Il a été montré que les BL étaient alors capables d'enrichir le vin en ces composés marqueurs de l'arôme boisé (vanilline, whiskylactone, eugénol, isoeugénol,...) (de Revel *et al.*, 1999; de Revel *et al.*, 2005; Bloem *et al.*, 2006). Simultanément au phénomène d'extraction, une libération enzymatique a lieu au cours de la FML en barriques, notamment pour la vanilline (Bloem, 2005). Ces travaux ont également permis d'identifier des activités

glycosidases chez les BL (*Oe. oeni*) comme source de cette libération de composés aromatiques. Ce phénomène dépend de la souche bactérienne, des paramètres de vinification ainsi que de la nature de l'aglycone (Gagné *et al.*, 2010).

Autres impacts de la FML sur les propriétés sensorielles du vin

D'après Sauvageot et Vivier (1997), la FML a plutôt tendance à augmenter la note végétale des vins issus du cépage Pinot Noir. Au contraire, d'autres auteurs (Henick-Kling et Acree, 1994; Laurent *et al.*, 1994; Keim *et al.*, 2002) ont trouvé que l'activité des BL tendait à diminuer les notes herbacées du vin. Les aldéhydes volatils comme l'éthanal peuvent participer à cette note végétale (Liu et Pilone, 2000). Or, Osborne *et al.* (2000) met en évidence l'aptitude des BL (*Lactobacillus* et *Enococcus*) à réduire l'éthanal en éthanol. L'implication de ce métabolisme dans la diminution des notes végétales au cours de la FML est suggérée par Liu (2002).

D'autres notes aromatiques peuvent être modulées par la fermentation malolactique. C'est le cas notamment des odeurs de fromage qui sont caractéristiques des vins ayant complètement réalisé la FML, d'après une étude sensorielle réalisée par Eschenbruch *et al.* (1984). Ces notes sont souvent associées à certains acides gras volatiles comme les acides aliphatiques (acide butyrique, acide hexanoïque, acide octanoïque, acide décanoïque) et certains petits acides branchés (acide isobutyrique, acide 2-méthylbutyrique, acide isovalérique) qui participent ainsi à la complexité du vin. Certaines études ont montré que la teneur en acides gras du vin pouvait augmenter au cours de la FML (Maicas, 1999; Izquierdo Cañas *et al.*, 2008; Boido *et al.*, 2009). Cependant, d'autres auteurs indiquent que les variations observées restent souvent faibles bien que significatives, et souche-dépendantes (Pozo-Bayon *et al.*, 2005; Ugliano et Moio, 2005). En outre, certains de ces travaux concluent aussi à une certaine stabilité de l'arôme fromage au cours de la FML (Ugliano et Moio, 2005). L'activité lipase générant les acides gras aliphatiques est bien connue chez les BL isolées du fromage, mais beaucoup moins pour celles présentes dans le vin (Matthews *et al.*, 2004). Les acides gras branchés sont issus du métabolisme des acides aminés. Mais il a été indiqué précédemment que le catabolisme de ces acides aminés par les BL du vin n'a été que très peu étudié jusqu'à maintenant. Il est à rapprocher ce caractère "fromage" dans le vin de la note lactique et de la note soufrée rappelée précédemment.

Certaines notes "animales" peuvent apparaître après FML (Sauvageot et Vivier, 1997). Ces arômes sont souvent apportés dans les vins par des molécules de la famille des phénols volatils (4-éthylphénol, 4-éthylguaïacol). En excès, ces composés altèrent l'arôme des vins en masquant dans un premier temps les arômes fruités et variétaux, puis en apportant à plus forte concentration des notes animales intenses ("sueur de cheval"). Toutefois, le seuil de perception de ces molécules dans les vins, et plus particulièrement dans les vins rouges, est très dépendant de la matrice associée (Romano *et al.*, 2009). L'ensemble de ces composés est principalement produit par les levures (*Brettanomyces bruxellensis*) (Chatonnet *et al.*, 1992) mais les BL sont aussi capables de les synthétiser, en particulier l'espèce *Lactobacillus plantarum* (Cavin *et al.*, 1993). Ces éthylphénols sont issus de la réduction des vinylphénols (4-vinylphénol et 4-vinylguaïacol), eux-mêmes venant de la décarboxylation des acides féruliques et p-coumariques. Des études ont montré que les BL du vin étaient capables de métaboliser ces composés phénoliques pour générer des phénols volatils (Cavin *et al.*, 1993).

3. Influence de la co-inoculation levures/BL sur les propriétés sensorielles des vins

Très peu d'études ont été menées jusqu'à maintenant sur l'impact de la co-inoculation levures/bactéries vis-à-vis de la composition aromatique des vins. Les rares analyses sensorielles ayant été réalisées ne montrent pas de modifications significatives du profil aromatique des vins selon le mode d'inoculation. Il est simplement évoqué une note fruitée un peu plus intense (non significative) pour les vins issus de co-inoculation par rapport à ceux issus d'inoculation séquentielle (Krieger et Arnink, 2003; Massera *et al.*, 2009).

Ceci pourrait s'expliquer par une diminution en co-inoculation des teneurs en diacétyle, réduisant ainsi son effet masque sur l'arôme fruité (Krieger et Arnink, 2003). En effet, la pratique de la FML en présence de lies et de levures actives engendre une diminution significative de la teneur en diacétyle grâce au fort pouvoir réducteur de celles-ci (Martineau *et al.*, 1995; Krieger et Arnink, 2003). Ainsi, la co-inoculation levures/BL pourrait influencer la teneur des vins en diacétyle par la présence de levures actives au cours de la FML (Krieger et Arnink, 2003; Bartowsky et Henschke, 2004). Cependant, aucune étude n'a encore réellement prouvé cette hypothèse. De plus, comme il a été précisé précédemment, le lien entre la teneur en diacétyle et l'intensité de la note lactique est compliqué. C'est pourquoi, il n'est pas forcément évident d'attribuer l'augmentation de la note fruitée à une diminution de la note lactique. Ce cas est observé dans l'étude de (Massera *et al.*, 2009) où l'augmentation de la

note fruitée en co-inoculation (non significative) n'est pas accompagnée d'une augmentation de la note lactique. Ainsi, il pourrait être envisagé que la co-inoculation puisse aboutir également à des variations de la teneur en certains marqueurs de l'arôme fruité mais ceci n'a jamais été étudié.

Il a également été montré que la co-inoculation ne modifiait pas la teneur finale en éthanal (Jussier *et al.*, 2006). En revanche, la co-inoculation engendre une diminution plus rapide de l'éthanal (Jussier *et al.*, 2006) qu'en inoculation séquentielle, car les BL sont capables de réduire l'éthanal produit par la levure. Ainsi, en co-inoculation l'éthanal produit par la levure est directement réduit, ce qui diminue la possibilité de complexation avec les tannins des vins rouges, menant à une couleur souvent moins intense. Ceci est un facteur à prendre en compte dans le cadre de l'utilisation de la co-inoculation pour l'élaboration des vins rouges à la robe moyennement soutenue, comme par exemple certains vins de Pinot Noir.

II. La FML et l'arôme fruité des vins rouges

A. L'arôme fruité des vins rouges

A ce jour, contrairement aux cépages blancs dits "aromatiques", aucune expression variétale fruitée n'a véritablement pu être mise en évidence à partir de cépages noirs. L'existence même d'une expression fruitée propre aux vins rouges était encore sujette à controverse il n'y pas si longtemps (Piombino *et al.*, 2003), même si empiriquement elle était bien établie. Depuis, Pineau (2007) a pu enfin montrer l'existence d'un arôme fruité spécifique aux vins rouges par l'intermédiaire de dégustations affranchies de toute subjectivité liée à la couleur des vins. Ces travaux ont pu également révéler l'existence d'une typicité olfactive des vins rouges de Bordeaux de type "fruits noirs"/"fruits confiturés".

Pineau *et al.* (2009) ont également pu isoler par fractionnement HPLC les fractions aromatiques responsables du caractère fruité des vins rouges. Les composés aromatiques responsables de 20 d'entre elles ont pu être identifiés et correspondent en grande partie à des esters éthyliques et acétates qui ne présentent pas d'impact direct sur l'arôme fruité des vins rouges. En revanche, ces travaux ont pu clairement établir par le biais de reconstitutions

aromatiques, qu'en mélange ils pouvaient conduire à des nuances fruitées de type fruits rouges ou fruits noirs.

Ainsi, pendant des années de nombreux travaux ont essayé de mettre en évidence l'existence de molécules aromatiques "clés" pouvant être responsables de la typicité de la note fruitée des vins rouges, sans grand succès. Il n'est pas exclu que ce type de marqueur puisse effectivement être présent dans les vins rouges. Cependant, les travaux de (Pineau, 2007) confirment que l'arôme fruité des vins rouges serait en grande partie le reflet d'interactions perceptives entre différents composés aromatiques du vin, même présents à des teneurs largement inférieures à leur seuil de perception (Ferreira *et al.*, 2002; Segurel *et al.*, 2004; Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2009).

Ainsi, en plus des esters, il est établi que d'autres composés aromatiques peuvent également participer à la note fruitée des vins rouges, via notamment des effets synergiques, comme certains composés variétaux (C13-norisoprénoides, lactones, linalol, Furanéol®, Homofuranéol®) ou encore certains composés soufrés variétaux et fermentaires (thiols, DMS) **(Figure 4)**.

En outre, il semble également que la composition de la matrice non-volatile puisse influencer la perception de la note fruitée des vins. En effet, Jones *et al.* (2008) ont démontré que la composition en protéine et glycérol pouvait influencer la perception aromatique d'un vin blanc modèle. Saenz-Navajas *et al.* (2010) ont confirmé ces données en faisant sentir à un panel entraîné un vin blanc comme un vin rouge (notes fruits rouges, fruits noirs au lieu de fruits blancs, fruits jaunes, fruits tropicaux, agrumes) à partir de reconstitutions aromatiques supplémentées avec une base de composés non-volatiles issue de vins rouges. Des nuances aromatiques sont également perçues entre des vins rouges issus de la même base aromatique mais avec une matrice non volatile différente.

Ces résultats peuvent être expliqués par des phénomènes de rétention des composés aromatiques par la matrice non-volatile, et sont très variables selon la nature des molécules volatiles et non-volatiles. La nature de la matrice non-volatile va moduler la composition de l'espace de tête en retenant plus ou moins les composés aromatiques selon les interactions mises en jeu (type force de Van der Waals et liaisons hydrogènes), engendrant ainsi des différences significatives dans la perception aromatique des vins (Saenz-Navajas *et al.*, 2010). Ces phénomènes avaient déjà été abordés auparavant notamment avec l'étude des interactions

entre des composés volatils et des composés non-volatils du vin comme les anthocyanes (Dufour et Sauvaire, 2000), les polysaccharides (Dufour et Bayonove, 1999a), les composés phénoliques (Dufour et Bayonove, 1999b; Rocha *et al.*, 2001; Aronson et Ebeler, 2004) ou le dioxyde de soufre et les catéchols (Ferreira *et al.*, 2003).

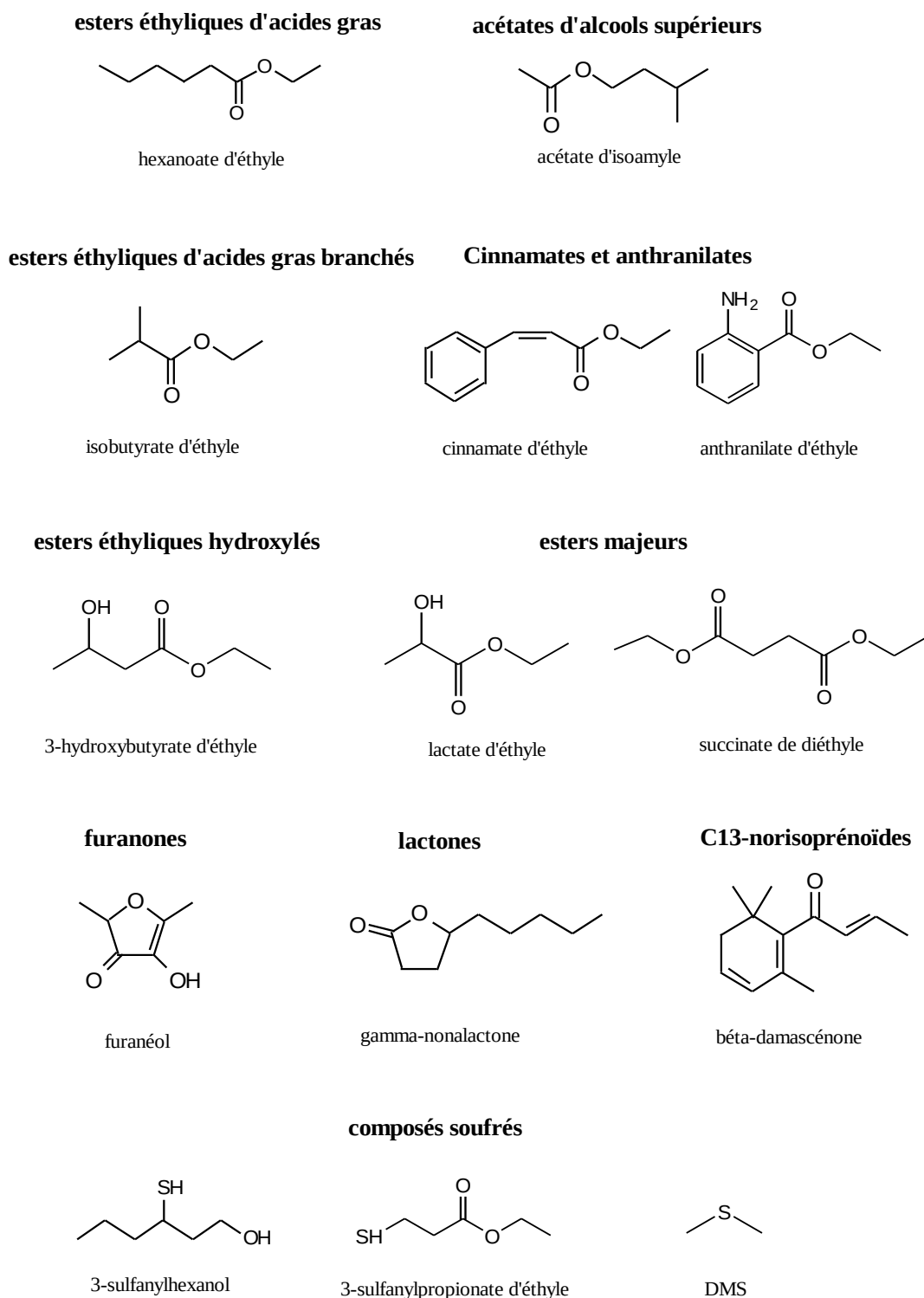


Figure 4 : Classes de composés participant à la note fruitée des vins rouges

Ces données démontrent à quel point la perception de l'arôme fruité des vins rouges est complexe. Toutefois, les marqueurs aromatiques évoqués précédemment restent les acteurs principaux de sa modulation. Les données et les propriétés principales sont reprises ci-dessous.

1. Les esters

Les esters représentent un des principaux groupes de composés aromatiques des vins. Ils ont toujours été considérés comme la famille principale marquant l'arôme fruité des vins jeunes, en particulier les esters éthyliques d'acides gras et les acétates d'alcools supérieurs. Les esters se retrouvent dans beaucoup de produits fermentés et possèdent en grande majorité des odeurs fruitées bien marquées (**Tableau 1**) mais souvent beaucoup moins typiques que certains marqueurs variétaux des vins.

Toutefois, malgré leur présence à des niveaux bien inférieurs à leur seuil de perception, les esters sont au cœur des phénomènes de synergie, actuellement à la base des travaux sur la typicité de l'arôme fruité des vins rouges (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2009).

En outre, depuis 30 ans, de nouveaux esters ont été découverts dans le vin dont certains ont un pouvoir olfactif plus important (cinnamates, esters branchés, esters hydroxylés) (**Tableau 1**).

Au final, d'un point de vue qualitatif, tous les vins sont à peu près composés des mêmes esters mais leur proportion varie très fortement d'un vin à l'autre (López *et al.*, 1999). Ce sont ces variations de concentrations relatives d'esters qui, par le biais d'effets synergiques, vont avoir un rôle majeur dans la perception de la note fruitée des vins et en particulier, des vins rouges (plus complexes que les vins blancs).

Plus d'une centaine d'esters sont présents dans les vins à des niveaux de concentration très différents. Ils peuvent être rangés dans différentes catégories suivant leurs origines ou leurs pertinences aromatiques : esters majeurs à faible pouvoir odorant (lactate, succinate,...), principaux esters aromatiques (esters éthyliques d'acides gras et acétates d'alcools supérieurs), esters éthyliques d'acides gras branchés, cinnamates, esters hydroxylés, esters mineurs.

Tableau 1 : Principaux esters odorants des vins étudiés dans la littérature

Composés	Abbréviations	Odeurs	Seuils de perception (µg/l)
<i>Esters éthyliques d'acides gras majeurs</i>			
propionate d'éthyle	C3C2	solvant, fraise mure	2100 (3)
butyrate d'éthyle	C4C2	kiwi mure, fraise mure, fromage	20 (4)
hexanoate d'éthyle	C6C2	ananas, fruit, pomme	14 (4)
octanoate d'éthyle	C8C2	cireux, peau de pomme, fruité	580 (5)
décanoate d'éthyle	C10C2	cireux, savon, fruité	200 (4)
dodécanoate d'éthyle	C12C2	cireux, savon	
<i>Acétates d'alcools supérieurs</i>			
acétate d'éthyle	C2C2	solvant, dissolvant	100 000 (7)
acétate de propyle	C2C3	solvant, fruité	65000 (8)
acétate d'isobutyle	C2iC4	solvant, fruité	1600 (1)
acétate de butyle	C2C4	solvant, fruité	1800 (5)
acétate d'isoamyle	C2iC5	banane	30 (4)
acétate d'octyle	C2C8	cireux, fruité	800 (3)
acétate de 2-phényléthyle	C2PhC2	floral, rose, vineux	250 (2)
<i>Esters éthyliques d'acides gras branchés</i>			
isobutyrate d'éthyle	iC4C2	fraise, kiwi, fruité, solvant	15 (4)
2-méthylbutyrate d'éthyle	2mC4C2	fruité, kiwi	18 (4)
isovalérate d'éthyle	iC5C2	fromage, fruité	3 (4)
phénylacétate d'éthyle	PhC2C2	floral, mimosa, fruité, olive	73 (6)
<i>Cinnamates et anthranilates</i>			
cinnamate d'éthyle	Cin	cerise, figue, fruité, floral	1,6 (4)
dihydrocinnamate d'éthyle	dhCin	fruité, ananas, amande	1,1 (4)
anthranilate d'éthyle	AnC2	fruité, mandarine, camphré	
anthranilate de méthyle	AnC1	fraise des bois, mandarine, camphré	
<i>Esters éthyliques hydroxylés</i>			
3-hydroxybutyrate d'éthyle	3OHC4C2	fruité, fraise	1800 (3)
4-hydroxybutyrate d'éthyle	4OHC4C2	fruité	
lévulinate d'éthyle	2OHiC5C2	fraise, pomme	350 (3)
2-hydroxyhexanoate d'éthyle	2OHC6C2	mûre	2400 (3)
6-hydroxyhexanoate d'éthyle	6OHC6C2	fruité	1200 (3)
<i>Esters d'acides fixes</i>			
lactate d'éthyle	LE	fruité, lacté	154 000 (5)
succinate de diéthyle	SDE	fruité	200 000 (5)

Ref 1 (Aznar *et al.*, 2003) : solution hydroalcoolique (10 %) avec 5 g/l d'acide tartrique à pH 3,2.

Ref 2 (Guth *et al.*, 1997) : solution hydroalcoolique (10 %).

Ref 3 (Pineau, 2007) : vin rouge désaromatisé.

Ref 4 (Ferreira *et al.*, 2000) : solution hydroalcoolique (11 %) avec 7 g/l glycérol et 5 g/l acide tartrique, pH 3,4 ajusté avec NaOH 1M.

Ref 5 (Etievant, 1991) : vin

Ref 6 (Tat *et al.*, 2007) : vin

Ref 7 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) : vin

Ref 8 (Moreno *et al.*, 2005) : solution hydroalcoolique (14 %)

Esters majeurs à faible pouvoir odorant

Les esters formés au cours du vieillissement par estérification des principaux acides organiques du raisin (acide tartrique, acide malique, acide citrique) n'ont qu'un rôle très limité dans les qualités organoleptiques des vins. La bonification liée au vieillissement ne leur est pas imputable (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

D'autres esters contenus dans le vin à des teneurs importantes peuvent toutefois participer aux propriétés sensorielles globales du vin. C'est le cas de certains esters fermentaires, en particulier du lactate d'éthyle qui peut être présent à des teneurs allant jusqu'à plusieurs centaines de milligrammes par litre. Les levures sont en effet capables de synthétiser du lactate d'éthyle au cours de la FA essentiellement à partir de l'acide D-lactique qui provient du catabolisme du pyruvate. Mais la synthèse enzymatique du lactate d'éthyle la plus importante intervient au cours de la FML suite à la transformation de l'acide L-malique en acide L-lactique. Le lactate d'éthyle est un ester qui marque avant tout l'activité des BL, mais une grande partie est formée très rapidement au cours de l'élevage par estérification chimique de l'acide L-lactique avec l'éthanol (Boido *et al.*, 1999). Il semblerait que cet ester contribue plutôt à la note diffuse lactée des vins, avec une odeur décrite comme crémeuse et légèrement fruitée. Son seuil de perception reste toutefois élevé puisqu'il est d'environ 150 mg/l dans le vin. Son implication dans la note fruitée des vins a pu être évoquée (Boido *et al.*, 1999; Gambaro *et al.*, 2001; Lloret *et al.*, 2002) mais jamais étudiée car elle semble toutefois minime.

Le succinate de diéthyle issu de la di-estérification de l'acide succinique est un autre ester présent en quantité importante dans les vins. Il peut être formé par l'activité des levures et des BL mais son origine principale reste l'estérification chimique au cours du vieillissement du vin. La mono-estérification qui conduit au succinate de monoéthyle est majoritaire, ce composé étant présent dans les vins à des teneurs de plusieurs dizaines de milligrammes par litre (Boido *et al.*, 2009). Toutefois, sa faible volatilité ne conduit certainement pas à un impact sur l'arôme des vins. Les teneurs des vins en succinate de diéthyle restent beaucoup plus faibles que celles en succinate de monoéthyle (quelques mg/l). Avec un seuil de perception dans les vins autour de 200 mg/l, son impact dans l'arôme des vins est peu probable même s'il n'a également jamais été étudié.

Esters éthyliques d'acides gras (EEAG) et acétates d'alcools supérieurs (AAS)

Cette catégorie d'esters est présente dans les vins en plus faibles quantités que les esters majeurs puisqu'en moyenne leur somme dépasse rarement la dizaine de milligrammes par litre. Toutefois, ils sont en grande partie responsables de l'arôme fruité de nombreux vins blancs et rosés ainsi que des vins jeunes en général. Leur implication dans la typicité de l'arôme fruité des vins rouges a été mise en valeur avec les derniers travaux sur les interactions perceptives (Escudero *et al.*, 2007; Pineau, 2007). Il s'agit donc de composés essentiels dans la perception de la note fruitée de tout type de vins.

Ces esters sont formés en grande partie durant la fermentation alcoolique et sont issus du métabolisme levurien, via des activités enzymatiques alcool acyltransférase, estérase et lipase.

Ces esters sont hydrolysés au cours du vieillissement du vin, car ils sont présents en fin de FA à des teneurs plus importantes que celles permises par l'équilibre thermodynamique dans les conditions du vin (teneurs en acides gras correspondant, pH, milieu hydro-alcoolique,...). Cette hydrolyse va dépendre en particulier du couple acide/esters, du pH et de la température. Ces esters sont ainsi directement perceptibles dans les vins jeunes, et caractérisent les arômes fruités fermentaires.

En revanche, même si les esters éthyliques et les acétates d'alcools supérieurs ont des points communs, ils n'ont pas la même voie de synthèse et présentent quelques propriétés aromatiques différentes. Parmi eux, l'acétate d'éthyle fait exception puisqu'il s'agit à la fois d'un ester éthylique et d'un acétate, et se trouve dans les vins en bien plus grande quantité que tous les autres (d'une dizaine à quelques centaines de mg/l). Toutefois, il ne s'agit pas d'un marqueur de l'arôme fruité des vins mais plutôt d'un défaut en apportant des notes marquées de solvant ("dissolvant"). Cette acescence est particulièrement marquée lorsqu'un vin subit une piqûre acétique car l'acétate d'éthyle n'est autre que le produit de réaction de l'acide acétique avec l'éthanol. Le défaut d'acescence est donc souvent associé à une acidité volatile importante.

– Esters éthyliques d'acides gras (EEAG)

Il s'agit essentiellement des esters éthyliques des acides butyrique, hexanoïque, octanoïque, décanoïque et à un degré moindre de l'acide dodécanoïque. Les esters éthyliques

des acides à chaîne carbonée plus longue étant trop lourds et trop gras, ils ne participent certainement pas à la note fruitée des vins. Le propionate d'éthyle peut être ajouté à cette catégorie même si le nombre de carbone est impair et que l'acide propionique n'est pas un acide gras.

Pris individuellement, ils ont des odeurs fruitées variées (**Tableau 1**) qui ne sont que faiblement typées et plus le nombre de carbone augmente plus leurs notes tendent vers des odeurs savonneuses dites "stéariques". Leurs seuils de perception sont variés et relativement élevés dans les vins (**Tableau 1**). Toutefois, ils peuvent participer à la note fruitée fermentaire des vins blancs les plus simples en apportant une certaine finesse aromatique.

Dans les vins rouges, ils participent à la note fruitée même si leurs teneurs sont souvent bien inférieures à leurs seuils de perception (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2009). En effet, il s'agit de composés majeurs rentrant en jeu dans des phénomènes synergiques responsables de la typicité de la note fruitée des vins rouges. Il a été ainsi montré que certaines molécules comme la β -damascénone (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2007), la β -ionone (Escudero *et al.*, 2007) et le DMS (Segurel *et al.*, 2004; Escudero *et al.*, 2007) intensifiaient clairement l'arôme fruité de ces esters. Pineau *et al.* (2009) ont également montré que le butyrate, l'hexanoate et l'octanoate d'éthyle participaient certainement à la note "fruit rouge"/"fruit frais" et que le propionate d'éthyle était impliqué dans la note "fruit noir"/"fruit confituré" des vins rouges. Les EEAG semblent donc avoir un rôle central dans la perception de la note fruitée des vins rouges.

Les EEAG sont essentiellement produits durant la FA par le métabolisme des levures. Il est maintenant prouvé que cette synthèse est catalysée par des éthanol O-acyltransférases (Eeb1, Eht1 chez *Saccharomyces cerevisiae*) (Saerens *et al.*, 2006; Saerens *et al.*, 2008) (**Figure 5**).

La synthèse de ces esters est très dépendante de la souche de levures qui ont chacune leurs propres activités enzymatiques, variant avec la contribution du milieu. Par ailleurs, il a été montré que le facteur limitant de la synthèse des EEAG était la disponibilité des acides gras précurseurs (Saerens *et al.*, 2006; Saerens *et al.*, 2008; Sumby *et al.*, 2010).

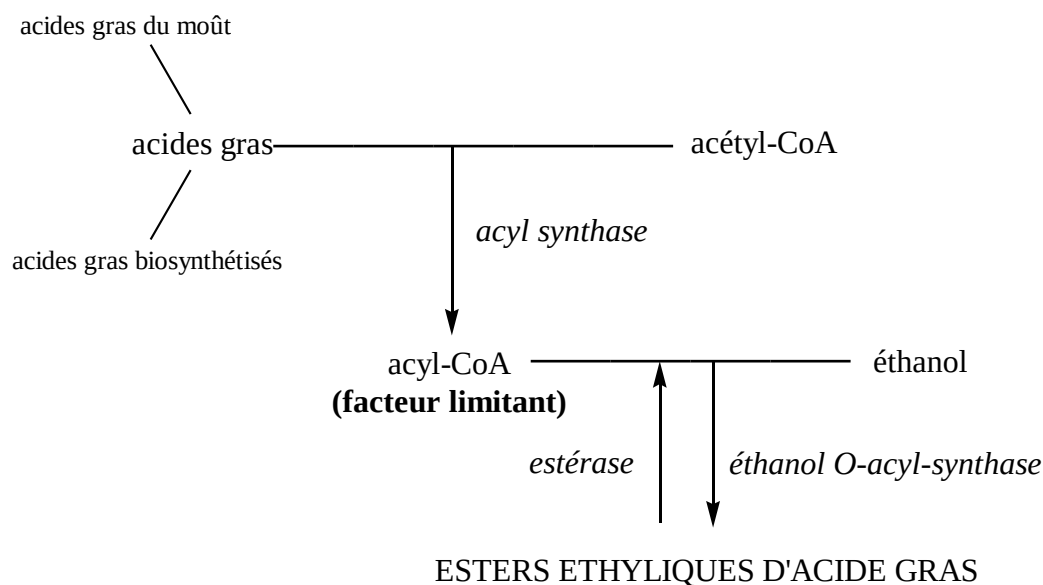


Figure 5 : Voie de synthèse des Esters éthyliques d'acides gras chez *Saccharomyces cerevisiae*

Ces acides gras précurseurs peuvent être issus du moût (extrait des pellicules) ou provenir du métabolisme des levures (Saerens *et al.*, 2008). Ce sont des substances plutôt toxiques pour la levure, et leur utilisation dans la synthèse des esters correspondants pourrait avoir un rôle de détoxification (Mason et Dufour, 2000; Sumby *et al.*, 2010). Cette estérification pourrait également permettre de rééquilibrer le rapport acetylCoA/CoA qui est essentiel pour le métabolisme levurien (Mason et Dufour, 2000; Sumby *et al.*, 2010).

D'autres facteurs ont un rôle dans la production des EEAG comme la température de fermentation, la composition nutritive du milieu (éléments azotés, particules solides du moût), le niveau d'oxygène, la teneur en acides gras insaturés et en stérols. Ces 3 derniers éléments limitent particulièrement la synthèse d'esters par les levures (Sumby *et al.*, 2010).

Comme indiqué précédemment, les EEAG sont hydrolysés au cours du vieillissement du vin. Cela est d'autant plus rapide que la chaîne carbonée est longue, car l'effet inductif sur la fonction carbonyle est plus marqué, ce qui favorise l'hydrolyse de l'ester. Toutefois, certains composés antioxydants comme des acides phénols (acide caféique, acide gallique) (Roussis *et al.*, 2005; Lambropoulos et Roussis, 2007), le glutathion, la N-acétylcystéine (Papadopoulou et Roussis, 2008) ou encore le dioxyde de soufre (Garde-Cerdán et Ancín-Azpilicueta, 2007)

pourrait limiter cette hydrolyse et conduire ainsi à une certaine préservation de l'arôme fruité des vins.

– Acétates d'alcools supérieurs (AAS)

Ils correspondent aux esters de l'acide acétique formés avec les alcools supérieurs, c'est-à-dire ceux ayant un nombre de carbone plus élevé que l'éthanol. Il s'agit principalement de l'acétate de propyle, de l'acétate d'isobutyle, de l'acétate de butyle, de l'acétate d'isoamyle et de l'acétate de 2-méthylbutyle, de l'acétate d'hexyle, de l'acétate d'octyle et de l'acétate du 2-phényléthyle.

Ils possèdent des odeurs un peu plus lourdes que les esters d'acide gras avec quelques notes de solvant, qui peuvent masquer l'arôme variétal du vin lorsque ces composés sont présents en trop grande quantité. Cependant, ils participent grandement à la note fruitée des vins jeunes, blancs et rosés. Les AAS sont moins impliqués dans la perception de l'arôme fruité des vins rouges que les EEAG, ce qui n'empêche pas leur participation aux effets synergiques précédemment décrits (Pineau, 2007). Leur descripteur va du fruité/solvant pour les plus petits, en passant par la banane/bonbon anglais caractéristique de l'acétate d'isoamyle, par la poire de l'acétate d'hexyle ou encore le caractère vineux/floral de l'acétate de 2-phényléthyle.

L'arôme de l'acétate d'isoamyle est souvent reconnaissable dans le bouquet "fermentaire" des vins. Il s'agit de l'acétate d'alcool supérieur présent en plus forte proportion. Des autres acétates, seuls l'acétate d'hexyle et l'acétate de 2-phényléthyle peuvent atteindre des teneurs directement perceptibles dans les vins blancs ou rosés.

Comme les EEAG, les AAS sont produits en grande majorité par les levures au cours de la fermentation alcoolique. Ils sont formés à partir d'acétylCoA et des alcools supérieurs correspondants, par l'intermédiaire d'activités alcool acétyltransférases (ATF1, ATF2 chez *Saccharomyces cerevisiae*) (**Figure 6**) (Sumbly *et al.*, 2010).

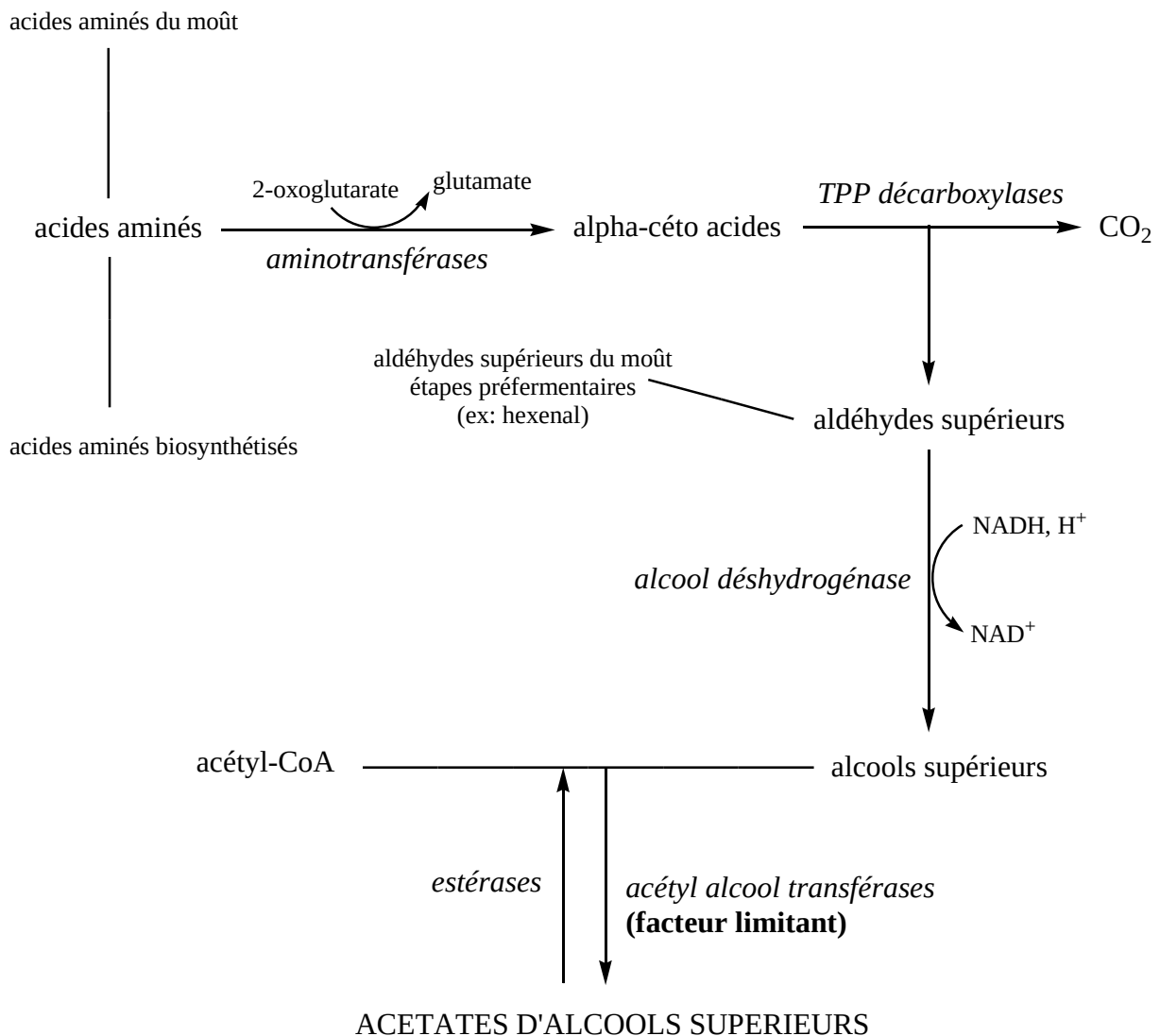
Leur synthèse dépend à peu près des mêmes facteurs que les EEAG : nature de la souche, composition nutritionnelle du milieu, favorisée par les hautes teneurs en précurseurs (alcools supérieurs) et les basses températures, mais inhibée par l'oxygène et les acides gras insaturés/stérols. Le facteur limitant est ici génétique et dépend de l'expression des gènes codant pour les enzymes de synthèse (ATF1, ATF2 chez *Saccharomyces cerevisiae*) (Sumbly

et al., 2010). Ainsi, la synthèse des AAS est certainement encore plus dépendante de la souche de levure.

Malgré le fort caractère fermentaire des AAS, leurs teneurs peuvent être dépendantes aussi du cépage (Ferreira *et al.*, 2000).

Enfin, ces esters sont aussi hydrolysés au cours du vieillissement du vin. Ce phénomène est également limité par l'action antioxydante de certains composés comme des acides phénols (acide caféique, acide gallique) (Roussis *et al.*, 2005; Lambropoulos et Roussis, 2007), le glutathion, le N-acétylcystéine (Papadopoulou et Roussis, 2008) ou encore le dioxyde de soufre (Garde-Cerdán et Ancín-Azpilicueta, 2007).

Figure 6 : Voie de synthèse des acétates d'alcools supérieurs chez *Saccharomyces cerevisiae*



Esters éthyliques d'acide branché (EEAB)

Il s'agit principalement des esters éthyliques de l'acide isobutyrique, 2-méthylbutyrique et isovalérique, auxquels il peut être ajouté le phénylacétate d'éthyle (ester éthylique de l'acide phénylacétique). Ce dernier composé n'est pas à proprement parlé un ester d'acide gras branché mais son origine dans le vin reste la même.

L'impact de ces esters dans l'arôme des vins a longtemps été considéré comme négligeable (Etievant, 1991). Ce n'est qu'à la fin des années 90 que des travaux par GC/olfactométrie ont révélé le fait qu'il s'agissait de composés ayant un fort pouvoir odorant (Guth, 1997a; Guth, 1997b; Ferreira *et al.*, 1998; Kotseridis, 1999; Aznar *et al.*, 2001). Les 3 esters d'acides gras branchés ont individuellement l'odeur fruitée de fraise et de kiwi avec quelques nuances de solvant et de fromage rappelant les odeurs "butyrique", alors que le phénylacétate d'éthyle possède une odeur plus florale (mimosa) évoquant également l'olive, tout en gardant le côté fruité caractéristique des esters (**Tableau 1**). Au regard de leur teneur dans les vins et de leur seuil de perception, ces esters ne sont probablement pas directement perceptibles dans les vins mais pourraient participer activement à la note fruitée via les effets de synergie (Escudero *et al.*, 2007; Pineau, 2007). (Pineau, 2007) a également montré que l'isobutyrate d'éthyle et le 2-méthylbutyrate d'éthyle étaient impliqués dans la perception de la note "fruit noir"/"fruit confituré" de l'arôme des vins rouges.

Par ailleurs, ces 4 esters constituent de bons marqueurs d'arôme de vieillissement. En effet, si les levures en synthétisent directement une petite partie, ils sont en grande majorité formés par estérification des acides correspondant avec l'éthanol au cours du vieillissement du vin (Ferreira *et al.*, 2001; Diaz-Maroto *et al.*, 2005). (Ferreira *et al.*, 2001) font des observations semblables en ce qui concerne la formation du phénylacétate d'éthyle à partir de l'acide phénylacétique.

La synthèse des acides branchés et de l'acide phénylacétique au cours de la FA n'a pas été beaucoup étudiée. Toutefois, la principale voie de synthèse est cependant connue puisqu'il s'agit de la même que celle formant les alcools supérieurs (voie de Ehrlich) (Diaz-Maroto *et al.*, 2005), (**Figure 7**). La teneur en esters d'acides branchés peut donc dépendre de la variété du raisin comme les acétates d'alcools supérieurs (Ferreira *et al.*, 2000).

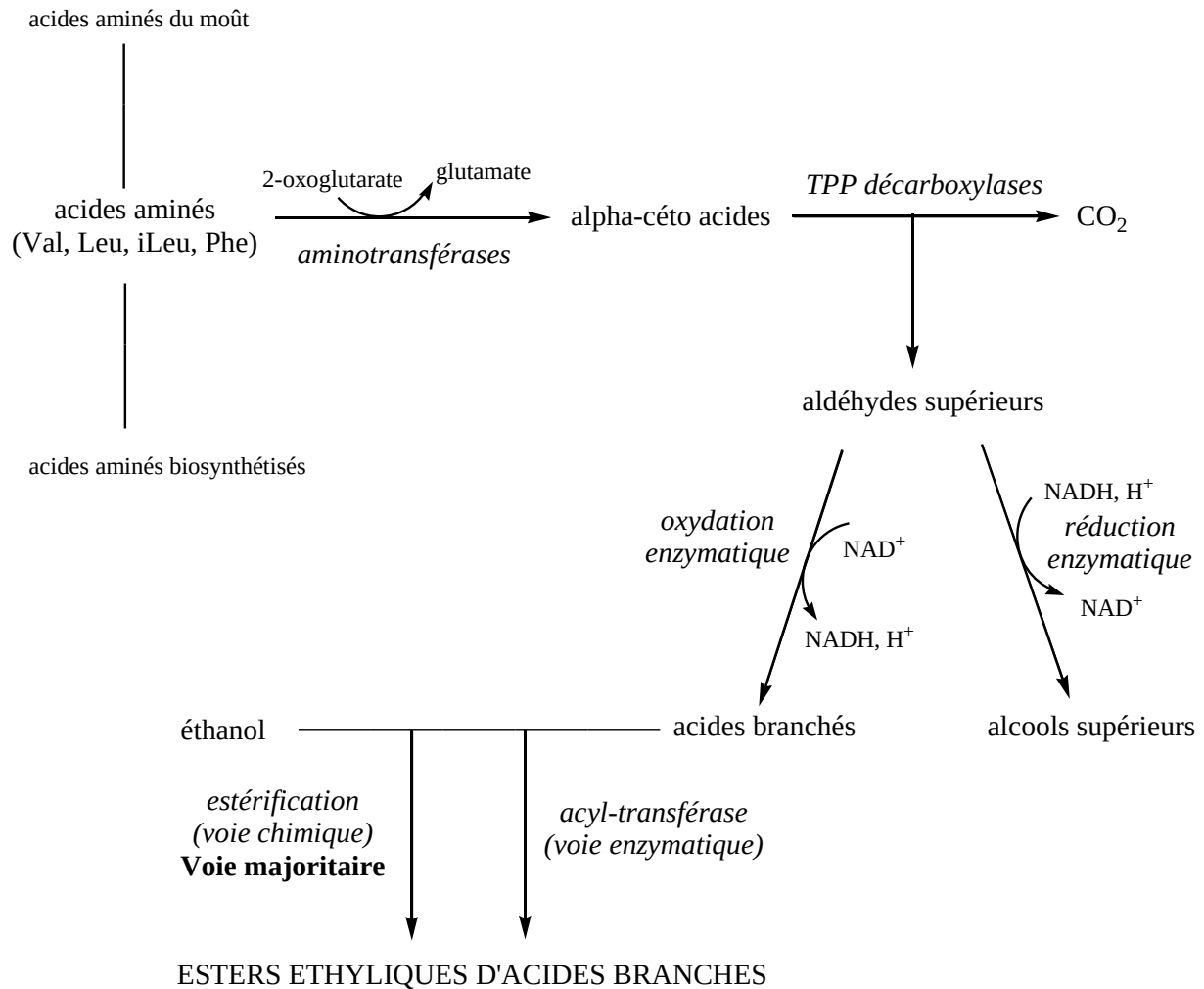


Figure 7 : Voies de synthèse des esters éthyliques d'acides branchés du vin avec *Saccharomyces cerevisiae*.

Cinnamates et anthranilates

Le cinnamate d'éthyle, le dihydrocinnamate d'éthyle, l'anthranilate d'éthyle et l'anthranilate de méthyle font figure d'exception dans la famille des esters du vin, car ils comptent parmi les rares esters d'origine variétale, notamment avec la famille des vanillates. Le vanillate d'éthyle et de méthyle n'ont pas d'odeur particulièrement fruitée et leur éventuelle implication dans la note fruitée des vins par des effets synergiques est peu probable (Escudero *et al.*, 2007).

En revanche, les descripteurs "cerise", "figue", "fraise", "fruit rouge" sont utilisés pour décrire l'odeur des cinnamates, alors que les anthranilates ont des odeurs un peu plus

pharmaceutiques offrant des nuances de "fraise des bois". L'anthranilate d'éthyle et de méthyle sont connus pour marquer l'odeur particulièrement florale des vins de cépages hybrides comme ceux issus de *Vitis labrusca* (Nelson *et al.*, 1977) mais ont cependant été aussi identifiés dans des vins de Pinot Noir avec le cinnamate d'éthyle ainsi que le dihydrocinnamate d'éthyle (Moio et Etievant, 1995). Toutefois, bien qu'ayant des seuils de perception relativement bas (**Tableau 1**), leur faible teneur dans les vins (de quelques centaines de ng/l à quelques µg/l) restent en-dessous de leur seuil de perception. Ces esters, en particulier les cinnamates, pourraient participer de façon synergique à la note fruitée des vins rouges. (Pineau *et al.*, 2007) ont en effet montré qu'un composé comme la β -damascénone pouvait exhauster l'odeur fruité du cinnamate d'éthyle. Versini *et al.* (1984) avaient émis l'hypothèse que le cinnamate d'éthyle pouvait être le composé responsable de la note fraise/framboise des vins de macération carbonique.

La voie de formation des cinnamates est encore mal connue aujourd'hui. Tesnières *et al.* (1991) indique que le cinnamate d'éthyle pourrait dériver de l'acide shikimique via des acides aminés comme la phénylalanine ou encore la tyrosine. L'origine variétale des cinnamates est confirmée par Loscos *et al.* (2007) qui trouvent un enrichissement en ces composés dans les vins supplémentés par des fractions de précurseurs d'arômes inodores extrait de différents cépages. Enfin, (Ugliano et Moio, 2008) proposent la formation de ces composés à partir des réactions acide-catalysées au cours de la fermentation alcoolique impliquant des précurseurs variétaux.

Esters hydroxylés et esters fermentaires mineurs

Un certain nombre d'esters éthyliques hydroxylés sont retrouvés dans les vins dans des proportions très variables. Il s'agit notamment du 3-hydroxybutyrate d'éthyle à l'odeur fruité de fraise, rencontré dans les vins à des teneurs comprises entre 0,1 et 1 mg/l. Son seuil de perception relativement élevé (1,8 mg/l dans un vin désaromatisé) (Pineau, 2007) rend peu probable l'impact direct sur l'arôme des vins. Cependant, il peut participer à la note fruitée des vins rouges (fruit rouge/fruit frais) via des interactions perceptives (Pineau, 2007). Son origine dans les vins n'a jamais été étudiée mais il semblerait qu'il soit plus présent dans les vins rouges que dans les vins blancs (Pineau, 2007).

Le 4-hydroxybutyrate d'éthyle est également présent dans les vins à des teneurs un peu plus importantes que son isomère (entre 0,5 et 5 mg/l). Il possède une odeur également

fruitée, mais son pouvoir odorant et son impact dans l'arôme des vins n'a jamais été étudié. Le 4-hydroxybutyrate d'éthyle provient de l'estérification de l'acide γ -hydroxybutyrique (GHBA) qui dérive du catabolisme de l'acide glutamique (voie d'Erlich) (Ugliano et Moio, 2005).

D'autres esters éthyliques hydroxylés ont été identifiés dans les vins comme le 2-hydroxyhexanoate d'éthyle et le 6-hydroxyhexanoate d'éthyle, isolés dans des fractions aromatiques fruitées obtenues à partir d'extrait de vins de Merlot et de Cabernet Sauvignon (Pineau, 2007). Le premier présente une odeur fruitée de confiture de mûre alors que le second présente une odeur fruitée moins bien définie. Leurs seuils de perception dans un vin rouge désaromatisé sont respectivement de 2,4 mg/l et 1,2 mg/l (Pineau, 2007). La teneur des vins en 6-hydroxyhexanoate d'éthyle est de l'ordre de quelques microgrammes par litre alors que le 2-hydroxyhexanoate d'éthyle n'a jamais été dosé. Ceci exclut leur participation directe à l'arôme des vins. Leur origine n'est pas bien connue mais ces composés semblent présents uniquement dans les vins rouges. Leur absence dans les moûts et les vins blancs indique une origine fermentaire et l'implication probable de précurseurs pelliculaires (Pineau, 2007).

Le 4-oxopentanoate d'éthyle (lévulinate d'éthyle) semble également être un composé plutôt retrouvé dans les vins rouges (Pineau, 2007). Il possède une odeur de fraise et de pomme, avec un seuil de perception dans un vin rouge désaromatisé plus bas que les 2 esters précédents (350 μ g/l) (Pineau, 2007). Cependant, les teneurs dans les vins (quelques μ g/l) restent loin de ce seuil, ce qui exclut la participation directe de ce composé à l'arôme des vins. Son origine dans les vins semble similaire à celle du 6-hydroxyhexanoate d'éthyle.

Le vin contient un grand nombre d'alcools et d'acides différents, le nombre d'esters possibles est donc important. C'est pourquoi la liste des esters présentés dans cette étude bibliographique n'est pas exhaustive. Il pourrait exister de nombreux esters présents dans les vins certainement à des teneurs plus faibles que ceux cités précédemment. Leur impact sur l'arôme des vins est certainement négligeable mais ils représentent une base potentielle pour des interactions perceptives. Parmi ces composés, un certain nombre ont déjà été identifié dans les vins mais ils n'ont jamais été étudiés ni même souvent quantifiés dans les vins. Il s'agit notamment d'esters méthyliques, d'esters isoamyliques ou encore d'esters éthyliques d'acides gras à nombre impair de carbone.

Tableau 2 : Composés volatiles (non esters) impliqués dans la note fruité des vins rouges

Composés	Abbreviations	Descripteurs	Seuils de perception (µg/l)
<i>Furanones</i>			
furanéol®		caramel, confiture de fraise	60 (9)
homofuranéol®		caramel	40 (9)
<i>C13-norisoprénoides</i>			
β-damascénone	β-d	pomme cuite, tabac, floral, miel	0.05 (2)
β-ionone	β-i	violette, framboise	0,09 (10)
α-ionone	α-i	violette, framboise	0,4 (11)
<i>Lactones</i>			
γ-octalactone	γ-C8	coco	nd
γ-nonolactone	γ-C9	coco, pêche	30 (4)
γ-décalactone	γ-C10	coco, pêche	88 (12)
γ-undécalactone	γ-C11	pêche, coco	nd
γ-dodécalactone	γ-C12	pêche,	nd
δ-décalactone	δ-C10	pêche, coco	386 (4)
<i>Terpénol</i>			
linalol		graine de coriandre, muscat, floral	25 (4)
<i>Composés soufrés</i>			
sulfure de diméthyle	DMS	soufré, oignon, fruit de mer	30 (13)
3-sulfanylhéxanol	3MH	pamplemousse, fruit de la passion	0,06 (14)
2-sulfanylpropionate d'éthyle	2MPE	empyreumatique, roquette, rhubarbe	0,50 (15)
3-sulfanylpropionate d'éthyle	3MPE	Animal, foxé, roquette, rhubarbe	0,20 (16)

Ref 9 (Sarrazin *et al.*, 2003)
 Ref 2 (Guth *et al.*, 1997)
 Ref 10 (Kotseridis, 1999)
 Ref 4 (Ferreira *et al.*, 2000)
 Ref 11 (Fazzalari, 1978)
 Ref 12 (Santos *et al.*, 2010)
 Ref 13 (Anocibar-Beloqui, 1995)
 Ref 14 (Tominaga *et al.*, 2006)
 Ref 15 (Teranishi *et al.*, 1961)
 Ref 16 (Tominaga *et al.*, 2003)

2. Autres composés ayant un rôle dans l'arôme fruité des vins rouges

La perception de l'arôme fruité des vins rouges est donc un phénomène complexe dont les esters semblent être la base. Néanmoins, d'autres composés peuvent jouer un rôle important à travers de nombreux effets synergiques. Beaucoup d'entre eux semblent d'origine variétale comme le furanéol® et l'homofuranéol®, certains C13-norisoprénoides (β -damascénone et ionones), lactones (gamma et delta lactones) et composés soufrés (3-sulfanylhexanol). D'autres composés soufrés volatils plus probablement d'origine fermentaire (DMS, mercaptopropionates d'éthyle) peuvent également être impliqués dans la perception de la note fruitée des vins rouges (**Figure 4**). Pris individuellement ces composés n'ont pas forcément une odeur fruitée marquée (**Tableau 2**) mais en mélange, notamment avec d'autres marqueurs fruités (esters), il peuvent participer à la complexité de l'arôme fruité des vins rouges.

Furanéol® et Homofuranéol®

Le 2,5-diméthyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone ou furanéol® et le 2-éthyl-5-méthyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone ou homofuranéol® sont parmi les composés présents dans les vins qui présentent les facteurs de dilution (AEDA) les plus élevés (Cullere *et al.*, 2004). Ce sont donc des composés importants de l'arôme des vins (Kotseridis et Baumes, 2000). Ils possèdent des odeurs de caramel très marquées avec quelques nuances fruitées de fraise confiturée pour le furanéol®. Ils sont connus pour marquer l'arôme de certains cépages hybrides comme le Noah. Cependant, ils ont également été découverts dans des cépages de *Vitis vinifera* comme le Merlot pour qui les concentrations en ces composés peuvent dépasser leur seuil de perception respectivement de 37 $\mu\text{g/l}$ (furanéol®) et 10 $\mu\text{g/l}$ (homofuranéol®) (Kotseridis, 1999). Ces composés pourraient être potentiellement impliqués dans les variations de notes de fruits rouges (Kotseridis, 1999; Piombino *et al.*, 2003; Cullere *et al.*, 2004). Des tests d'omission réalisés sur des reconstitutions en solution modèle d'arômes de vins rouges espagnols montrent qu'il existe une action synergique du furanéol® et de l'homofuranéol® (Ferreira *et al.*, 2002). Ces composés sont aussi des marqueurs clé de l'arôme des vins blancs botrytisés (Sarrazin *et al.*, 2007). En outre, ces composés étant carbonylés, ils sont susceptibles d'être complexés dans les vins, notamment avec le dioxyde de soufre (Aznar *et al.*, 2003; Sarrazin *et al.*, 2007), ce qui peut modifier leur pouvoir odorant. Les voies de formation du furanéol® et de l'homofuranéol® dans la baie de raisin ne sont pas connues.

Composés issus de précurseurs glycosylés et lactones

De très nombreuses études ont permis d'identifier plus d'une centaine d'aglycones principalement classés comme des dérivés d'acide shikimique, des terpénoïdes et des norisoprénoïdes (Gunata *et al.*, 1985; Schneider *et al.*, 2001). En ce qui concerne l'arôme fruité des vins rouges, nous pouvons distinguer 3 types de molécules : les C13-norisoprénoïdes, les lactones et le linalol.

Ces composés, présents en grande partie sous forme de précurseurs glycosylés non volatils inodores dans la baie de raisin, sont libérés dans le vin par activité enzymatique ou hydrolyse acide au cours de la vinification.

– Les C13-norisoprénoïdes (C13NI)

Il s'agit principalement de la β -damascénone (β -d), de la β -ionone (β -i) et de l' α -ionone (α -i) (**Figure 4**). La β -d a une odeur à la fois florale, fruitée et épicée avec des notes particulières de pommes cuites, de tabac et de miel. Ce composé possède un très fort pouvoir odorant avec un seuil de perception de 2 ng/l dans l'eau (Kotseridis, 1999). Sa puissance aromatique en fait un des composés du vin ayant le plus grand indice OAV, le rendant important dans la perception de l'arôme des vins (Pineau *et al.*, 2007). Il a été identifié dans de nombreux cépages blancs et noirs.

Cependant, sa puissance aromatique dépend énormément de la matrice puisque son seuil de perception passe de 50 ng/l en solution modèle eau/éthanol à 7 μ g/l dans les vins rouges (Pineau *et al.*, 2007). Généralement rencontrée dans les vins entre 1 et 1,5 μ g/l, la β -d est donc difficilement perceptible directement dans les vins rouges (Pineau *et al.*, 2007). La β -d semble avoir une importance particulière dans l'expression du caractère fruité des vins. Ce composé pourrait participer activement aux effets synergiques responsables en grande partie de l'arôme fruité des vins rouges. Des interactions perceptives avec les esters ont notamment été mises en évidence (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2007).

Les ionones ont une odeur plus florale que la β -d avec des notes marquées de violette et des nuances de framboise fraîche. Comme pour cette dernière, le seuil de perception des ionones est bas (90 ng/l pour la β -i et 400 ng/l pour l' α -i) et dépend fortement de la matrice (Etievant et Bayonove, 1983; Buttery *et al.*, 1997; Kotseridis, 1999). Toutefois, les ionones, en particulier la β -ionone, ont certainement des seuils de perception dans les vins rouges

proches des teneurs usuellement rencontrées (Kotseridis, 1999). Il s'agit donc de composés pouvant participer à l'arôme fuité des vins, notamment par le biais d'interactions perceptives (Escudero *et al.*, 2007).

Il est clairement montré maintenant que l'action des levures au cours de la fermentation alcoolique permet de libérer les C13-NI dans le vin (Segurel *et al.*, 2009). Cependant, cela n'est probablement pas dû qu'à une simple hydrolyse suite à une activité glycosidase fermentaire. En effet, il semblerait que la libération des composés aromatiques variétaux soit régulée de façon complexe par le métabolisme des levures (Loscos *et al.*, 2010). Cependant, ces composés peuvent être aussi libérés au cours du vieillissement du vin à la suite d'une hydrolyse et de réarrangements chimiques catalysés en milieu acide. La β -d est ainsi associée au vieillissement de certains vins blancs comme le Riesling (Strauss *et al.*, 1987) et le muscadet (Schneider *et al.*, 2001). Toutefois, certains auteurs ont aussi constaté une diminution de la teneur en β -d au cours du vieillissement du vin suite à des réactions de dégradation catalysées en milieu acide dans les conditions du vin (Mc Daniel, 1987; Guth, 1999).

– Les lactones

La γ -butyrolactone, issue de la lactonisation de l'acide 4-hydroxybutyrique, est la lactone la plus présente dans les vins (plusieurs dizaines de mg/l) mais présente une faible odeur crémeuse un peu caustique et légèrement fruitée. Elle ne participe probablement pas à l'arôme fruité mais plutôt à l'arôme lactique des vins. De plus, son origine n'est pas variétale mais fermentaire.

En revanche, les lactones les plus intéressantes par rapport à l'arôme fruité des vins correspondent à un certain nombre de γ -lactones, de C8 à C12. Elles ont une odeur caractéristique de coco avec des notes de pêche, de plus en plus marquées lorsque la chaîne carbonée augmente. Le vin contient également des δ -lactones dont les odeurs varient de la même façon de la noix de coco vers la pêche. Toutefois, elles sont bien moins odorantes que les γ -lactones qui ont des seuils de perception souvent bien inférieurs (**Tableau 2**) (Ferreira *et al.*, 2000). Les lactones sont présentes dans les vins à des teneurs inférieures à leur seuil de perception mais de façon relativement proche pour certaines d'entre elles (γ -nonalactone). Ce composé peut donc vraisemblablement participer de façon synergique à l'expression fruitée de

certains vins. Des interactions perceptives mettant en jeu un mélange de lactones ont été observées dans des reconstitutions aromatiques en solution modèle (Loscós *et al.*, 2007).

En outre, les vins rouges sont plus riches que les vins blancs secs en lactones qui semblent aussi marquer le vieillissement des vins. Ainsi, la γ -nonalactone pourrait être un composé important dans la note fruitée des vins rouges évolués (López *et al.*, 2004).

La voie de formation de ces lactones est beaucoup moins connue que celle des C13-norisoprénoïdes. Des petites quantités de lactones ont été trouvées dans des hydrolysats acides de fractions de précurseurs aromatiques (López *et al.*, 2004; Ugliano et Moio, 2008), et des vins ont été enrichis en lactones suite à l'ajout, dans le moût avant FA, de fractions de précurseurs d'arômes extraits de cépages non aromatiques (Loscós *et al.*, 2007). De plus Ferreira *et al.* (2000) ont montré que la teneur des vins en certaines lactones pouvait être liée au cépage. Toutes ces données montrent certainement l'origine variétale de ces composés ainsi que l'existence de certains précurseurs plus ou moins spécifiques. Certains auteurs suggèrent que les acides hydroxylés, précurseurs des lactones, sont présents dans la baie de raisin sous forme de précurseurs glycosylés comme c'est le cas pour la whisky-lactone dans le bois de chêne (Segurel *et al.*, 2009). Toutefois, ces précurseurs pourraient être des acides hydroxylés libres formés par oxydation préalable d'acides gras insaturés, ou encore des esters de glycérol hydroxylés (Loscós *et al.*, 2007) qui sont lactonisés par le métabolisme levurien comme cela a été observé dans le whisky (Wanikawa *et al.*, 2000) (**Figure 8**).

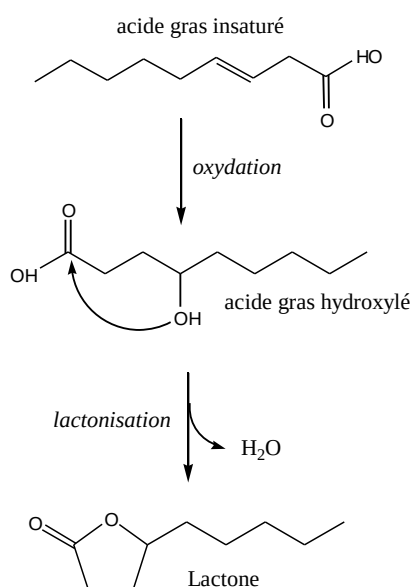


Figure 8 : Voie possible de formation des lactones dans les vins (butyrolactone et whisky-lactone exceptés) (Loscós *et al.*, 2007).

– Le linalol

Le linalol fait partie de la famille des terpénols qui sont, parmi les odorants variétaux du vin, les plus étudiés. Le linalol marque de façon très claire l'arôme des vins de Muscat. Le descripteur aromatique "muscat" est d'ailleurs souvent employé pour décrire le linalol car se trouvant en grande quantité sous forme libre dans les baies de raisins de Muscat, il confère à ce cépage ses notes aromatiques bien typiques. Il s'agit aussi du composé marquant l'arôme des grains de coriandre qui de ce fait constitue également un de ses descripteurs. Son odeur est à la fois florale et fruitée. Dans les vins rouges non muscatés, sa présence est aussi constatée mais à des teneurs très largement inférieures à celles rencontrées dans les vins muscatés (quelques $\mu\text{g/l}$ contre plusieurs centaines de $\mu\text{g/l}$), et bien en-dessous de son seuil de perception. Cependant, la teneur des vins rouges en linalol varie en fonction du cépage (Ferreira *et al.*, 2000; Sabon *et al.*, 2002). Les terpénols peuvent aussi être, en partie, responsables de différences rencontrées dans des profils aromatiques de certains vins rouges non muscatés (Ferreira *et al.*, 2001; Guth et Sies, 2002).

Le linalol est donc présent sous forme libre, directement dans la baie de raisin, mais la majeure partie est présente sous forme de précurseurs glycosylés. Les voies de libération des terpénols au cours de la vinification ont largement été étudiées (Williams *et al.*, 1980; Gunata *et al.*, 1985). Le linalol existe directement sous forme d'aglycones et une simple hydrolyse de la liaison glycosidique suffit à libérer la molécule aromatique dans le milieu. Il s'agit donc d'un modèle simple pour étudier l'activité glycosidase des micro-organismes du vin, ce qui contribue aussi au fait que ce sujet soit largement étudié. La forme hydrolysable par les levures la plus répandue est la β -glycosylée (Gunata *et al.*, 1985).

Composés soufrés

Certains composés soufrés qui ne possèdent pas individuellement des odeurs fruités peuvent néanmoins participer de façon synergique à la note fruitée des vins rouges. Il suffit d'ajouter un peu de cuivre dans un vin rouge pour s'en rendre compte car ce dernier complexe les thiols qui par conséquent sont moins présents dans l'espace de tête. Les notes fruitées du vin rouge supplémenté en cuivre paraissent alors bien moins intenses que dans le vin témoin (Blanchard, 2000). Les composés les plus impliqués sont le sulfure de diméthyle (DMS) et certains thiols.

– Le DMS

Pris individuellement, le DMS a une odeur particulièrement soufrée rappelant un peu l'oignon et certains produits dérivés de fruits de mer (bâtonnet de Crabe). Son seuil de perception est relativement bas (30 µg/l) (Anocibar-Beloqui, 1995). Sa teneur dans les vins est variable mais dépasse fréquemment ce seuil dans certains vins rouges. Dans les vins, le DMS peut être considéré comme un défaut ou comme un composé contribuant favorablement à l'arôme du vin en fonction de sa teneur. Ainsi, sa contribution à l'arôme des vins de Cabernet Sauvignon a été décrite comme positive (de Mora *et al.*, 1987), alors que dans les vins de Pinot Noir, sa présence, même à l'état de trace, est perçue comme totalement négative et assimilée à un défaut (Spedding et Raut, 1982). Anocibar Beloqui *et al.* (1996) ont montré que sa forte présence dans des vieux vins de Syrah pouvait renforcer leur caractère fruité. Cette dernière observation a été récemment confirmée dans des vins de Grenache et de Syrah (Segurel *et al.*, 2004) ainsi que dans des vins rouges espagnols (Escudero *et al.*, 2007). Le DMS y joue un rôle net d'exhausteur d'arôme fruité. Toutefois, Escudero *et al.* (2007) ont remarqué qu'à concentration trop importante, il devient plutôt un défaut avec des notes soufrées bien marquées. Par ailleurs, le DMS peut conférer au vin rouge certaines notes de truffe et d'olives vertes (Segurel *et al.*, 2004).

Le DMS a été retrouvé dans des vins issus de nombreux cépages mais son origine n'est pas encore complètement élucidée. Plusieurs auteurs ont démontré la capacité des levures à produire du DMS au cours de la FA à partir de divers acides aminés ou de leurs dérivés (de Mora *et al.*, 1986), ainsi qu'à partir du sulfoxyde de diméthyle (DMSO) (Anocibar Beloqui *et al.*, 1996). Les teneurs en DMS dans les vins juste mis en bouteilles restent faibles et la plus grande partie du DMS est formée au cours d'élevage en fonction des conditions de conservation (de Mora *et al.*, 1986; Anocibar Beloqui *et al.*, 1996; Segurel *et al.*, 2004). Ainsi, le DMS est à l'image des esters d'acides branchés, plutôt un marqueur d'arôme de vins vieillies. Les voies chimiques menant à la formation du DMS au cours du vieillissement du vin pourraient venir de la réduction du DMSO (Segurel *et al.*, 2004), de la dégradation du sulfoxyde de méthionine (MSO), de l'acide propanoïque dimethylsulphonique (DMSPA) et en grande partie de la S-méthylméthionine (SMM) (Segurel *et al.*, 2004; Loscos *et al.*, 2008).

– Les thiols

Les études menées jusqu'à présent ont permis de mettre en évidence la présence de divers thiols volatils dans les vins rouges dont le 3-sulfanylhexanol (3SH) semble être le plus intéressant du point de vue des arômes fruités de ces vins (Bouchilloux *et al.*, 1998; Tominaga *et al.*, 1998; Blanchard, 2000). Identifié au départ dans les vins blancs, il est également présent dans les vins de nombreux cépages noirs (Grenache, Merlot, Cabernet Sauvignon, Cabernet-Franc) (Bouchilloux *et al.*, 1998; Blanchard, 2000; Murat, 2001; Ferreira *et al.*, 2002).

L'arôme du 3SH rappelle celui du pamplemousse, mais diffère légèrement en fonction de l'énantiomère; la forme R évoquant plutôt le zeste de pamplemousse alors que la forme S plutôt le fruit de la passion. Il possède également un très fort pouvoir odorant avec un seuil de perception en solution modèle autour de 60 ng/l (50 ng/l pour la forme R et 60 ng/l pour la forme S) (Tominaga *et al.*, 2006). Il participe grandement aux notes d'agrumes et de fruit de la passion des vins blancs secs (Tominaga *et al.*, 1998b) et constitue un marqueur clé de l'arôme des vins blancs doux de "pourriture noble" (Tominaga *et al.*, 1998; Sarrazin *et al.*, 2007). Dans les vins rouges, il renforce plutôt le caractère fruits rouges (Ferreira *et al.*, 1998).

Absent du moût, le 3SH est libéré pendant la fermentation alcoolique sous l'action du métabolisme de la levure, à partir de précurseurs non-volatils inodores, notamment liés à la cystéine et au glutathion (Tominaga *et al.*, 1998b; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002). Ces deux voies métaboliques mettent en jeu l'activité β -lyase des levures qui vont permettre la libération du thiol suite à la rupture de la liaison soufre avec la cystéine. Cette enzyme serait responsable de la libération de 40% du 3SH présent dans les vins (Thibon *et al.*, 2008). Une troisième voie de formation a également été démontrée à partir du (E)-2-hexène-1-al (Schneider *et al.*, 2006), mais d'autres voies de formation encore inconnues peuvent être envisagées.

Deux autres thiols pourraient potentiellement participer à la note fruitée des vins. Il s'agit des 2-sulfanylpropionate d'éthyle et du 3-sulfanylpropionate d'éthyle qui ont été identifiés dans les vins (Kolor, 1983; Blanchard, 2000; Tominaga *et al.*, 2003). Ils ont tous les deux des notes empyreumatiques de roquette avec des nuances fruitées de rhubarbe. Leur seuil de perception en solution modèle est respectivement de 500 ng/l et de 200 ng/l. Le 2-sulfanylpropionate d'éthyle a été identifié dans la fraise (Teranishi *et al.*, 1963) mais son

niveau dans les vins (300 ng/l) exclut un impact aromatique direct. Toutefois, un effet synergique avec d'autres composés volatils ne peut être exclu (Blanchard, 2000). Le 3-sulfanylpropionate, à l'odeur proche de son isomère, est un marqueur important de l'arôme l'arôme fruité foxé particulier du cépage hybride Concorde (*Vitis labrusca*) (Kolor, 1983). Il semblerait aussi qu'il marque l'arôme des vins de champagne ayant une certaine évolution (Tominaga *et al.*, 2003). Cependant, il existe encore très peu de données sur l'impact réel de ces composés sur l'arôme des vins et plus particulièrement sur le caractère fruité des vins rouges.

B. Modification de l'arôme fruité des vins rouges par la FML : aspect sensoriel et biochimique

1. Aspect sensoriel

Empiriquement, de nombreux viticulteurs et chercheurs ont longtemps associé la FML avec une certaine diminution de l'arôme fruité des vins (Henick-Kling et Acree, 1994). Cependant, la réalité scientifique est bien plus controversée. Ainsi, les études menées depuis une trentaine d'années sur les conséquences de la FML sur l'arôme fruité des vins, et particulièrement des vins rouges, se révèlent souvent contradictoires. En effet, certains auteurs affirment que la FML peut engendrer une augmentation de certaines notes fruitées des vins rouges. C'est le cas de Mc Daniel (1987) qui trouve que certaines souches de BL peuvent intensifier la note fruitée des vins de Pinot Noir. Henick-Kling *et al.* (1994) obtient les mêmes résultats sur des vins de Cabernet Sauvignon qui voient les notes de cassis et de framboise augmenter au détriment des notes végétales de poivron vert. De même, Keim *et al.* (2002) observent que la FML menée sur des vins de Merlot amène une augmentation globale de la note "fruits rouges", mais également une intensification de zones odorantes d'olfactogrammes (GC-O) décrites comme "framboise, cerise, pomme". Précédemment, Acree *et al.*, (1976) et Acree *et al.* (1984) avait justement montré que des zones d'olfactogrammes décrites comme "fruité" pouvaient s'intensifier après FML. Laurent *et al.* (1994) évoquent une augmentation de la note fruitée des vins de Chardonnay au cours de la FML. Cependant, il a également été

suggéré que cette note fruitée pouvait aussi diminuer ou ne pas être affectée par l'activité des BL. Ces résultats soulignent bien l'ambiguïté du sujet et si les auteurs précédemment cités évoquent des augmentations de la note fruitée des vins, d'autres au contraire montrent que la FML peut clairement diminuer cette note aromatique. C'est notamment le cas de Sauvageot et Vivier (1997) qui indiquent des diminutions des notes de fruits rouges/fruits noirs pour des vins de Pinot Noir ainsi qu'une baisse d'intensité des notes de pomme et d'agrumes pour des vins de Chardonnay. Gambaro *et al.* (2001) observent aussi des baisses d'intensité d'arômes fruités tels que "cassis" et "abricot" sur des vins de Tannat, tandis que du Plessis *et al.* (2002) évoque une note fruitée moins intense après FML sur les vins servant de base à l'élaboration du Brandy ainsi que sur leur distillat. Boido *et al.* (2009) observent également des baisses d'intensité de certaines notes fruitées de vins de Tannat tels que "framboise", "mûre", "abricot", "cerise", "figue sèche", "prune", tout en évoquant que certaines souches peuvent augmenter les notes de "coing" ou "d'abricot". Ces nouvelles contradictions montrent une nouvelle fois toute la complexité du problème d'autant plus que la note fruitée des vins peut également ne pas être influencée par la FML (Mc Daniel, 1987; Laurent *et al.*, 1994; Henick-Kling et Acree, 1994).

Un des principaux facteurs pouvant expliquer ces divergences est l'existence d'un important effet souche concernant l'impact de la FML sur l'arôme fuité des vins. En effet, de nombreux auteurs ont évoqué des résultats qui étaient très dépendants de la souche bactérienne impliquée (Davis, 1985; Mc Daniel, 1987; Laurent *et al.*, 1994; Henick-Kling et Acree, 1994; Boido *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'absence de données sur les marqueurs de l'arôme des vins subissant généralement la FML est une autre raison de cette absence de consensus sur cette question œnologique importante. Les vins blancs aux notes variétales fruitées très typées dont les marqueurs ont bien été identifiés comme le Muscat, le Sauvignon ou encore le Gewürztraminer n'ont ainsi quasiment jamais été utilisés lors des études sur la FML (de Revel *et al.*, 1999) car les viticulteurs ne pratiquent généralement pas la FML sur ces vins. En revanche, sur les vins rouges pour lesquels la FML est systématiquement pratiquée, comme cela a été vu précédemment, l'étude des facteurs impliqués dans la perception de leurs arômes fruités est beaucoup plus complexe.

2. Aspect biochimique

Peu de travaux traitant de l'impact de l'activité des BL sur les composés impliqués dans la perception de l'arôme fruité des vins ont été menés. Ce constat est sans doute aussi une des principales limites à la compréhension du sujet.

Ces études concernent en grande majorité les esters ainsi que certains composés variétaux (C13-norisoprénoides, linalol). Les travaux traitant des lactones et des thiols sont très rares et même inexistantes en ce qui concerne le DMS et les furanones (furanéol® et homofuranéol®).

Activités enzymatiques liées à la modification bactérienne de la composition en esters

La synthèse ou l'hydrolyse des esters au cours de la FML ont surtout été étudiées par le biais de bilan des teneurs rencontrées dans des vins. Les voies métaboliques mises en jeu dans ces phénomènes chez les BL du vin sont peu connues. En revanche, les activités enzymatiques liées aux esters (estérases, lipases) sont bien plus documentées pour les BL utilisées dans l'industrie fromagère.

L'ester le plus affecté par la fermentation malolactique est sans conteste le lactate d'éthyle dont l'origine principale est l'activité des BL. D'une part les BL forment beaucoup plus de lactate d'éthyle que les levures car elles sont liées à l'activité malolactique (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). D'autre part, la plus grande partie du lactate d'éthyle se forme au cours du vieillissement du vin par estérification de l'acide lactique avec l'éthanol (Boido *et al.*, 2009). La proportion formée par les BL est essentiellement du (S)-lactate d'éthyle synthétisé à partir de l'acide L-lactique alors que les levures forment plutôt du (R)-lactate d'éthyle à partir de l'acide D-lactique dérivé des sucres (Lloret *et al.*, 2002). Le (S)-lactate d'éthyle est donc majoritaire dans les vins (70 à 80 %) et possède une odeur plus fruitée que son isomère et un seuil de perception dans les vins plus bas (110 mg/l) (Lloret *et al.*, 2002). Au regard des teneurs trouvées dans les vins pouvant dépasser le seuil de perception, le lactate d'éthyle pourrait avoir dans certaines situations un impact aromatique (Gambaro *et al.*, 2001).

De façon générale les esters du vin proviennent essentiellement du métabolisme des levures. Toutefois, il est maintenant bien établi que les BL peuvent aussi affecter les teneurs de ces esters "levuriens". En effet, de nombreuses études ont fait état de variations du niveau des esters du vin au cours de la FML (Sumby *et al.*, 2010). Avec le lactate d'éthyle, seul le

succinate de diéthyle semble augmenter de façon régulière au cours de la FML (Sumbly *et al.*, 2010). Ce composé est connu pour être dérivé de l' α -cétooglutarate chez les levures, mais sa voie de formation chez les BL isolées du vin n'a pas été beaucoup étudiée, excepté dans des cas d'altération du vin comme la dégradation de l'acide tartrique (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Dès 1966, Pilone *et al.* (1966) remarquent que certaines souches de BL (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) peuvent augmenter la teneur en certains esters comme le lactate d'éthyle, le succinate de diéthyle ou encore le décanoate d'éthyle, sans affecter l'octanoate d'éthyle. Meunier et Bott (1979) observent l'augmentation de la teneur en certains esters volatils au cours de la FML et suggèrent même que cette synthèse ait lieu avec la flore indigène ou lors des inoculations (*Leuconostoc oenos*). Ces résultats sont confirmés par Avedovech *et al.* (1992) qui montrent que certaines souches d'*Oe. oeni* synthétisent de l'hexanoate d'éthyle, de l'octanoate d'éthyle, du décanoate d'éthyle et de l'acétate d'hexyle au cours de la FML. Ugliano et Moio (2005) montrent également l'augmentation globale de la teneur en nombreux esters au cours de la FML, tout en précisant que les résultats sont très dépendants de la souche utilisée et de l'ester considéré.

De nombreux auteurs confirment ces effets "souche" et "substrat" très important en observant pour un même vin, différentes tendances (augmentation, diminution, pas de mouvement) selon les souches utilisées. Ces résultats sont également observables pour une même souche en considérant des esters différents (Boido *et al.*, 1999; Maicas, 1999; Pozo-Bayon *et al.*, 2005; Izquierdo Cañas *et al.*, 2008; Boido *et al.*, 2009). Enfin, d'autres auteurs ont plutôt trouvé dans leur travaux que la FML induisait globalement une diminution nette de la teneur en esters (Zeeman *et al.*, 1980; Gambaro, 2001; Du Plessis, 2002).

Sensoriellement, Gambaro *et al.* (2001) évoquent des diminutions de la note fruit rouge en même temps qu'une diminution des Esters éthyliques d'acides gras. Du Plessis *et al.* (2002) évoque une diminution globale de la note fruitée de vins de Brandy à la suite d'une hydrolyse globale d'esters constatée au cours de la FML. Enfin, plus récemment, Boido *et al.* (2009) observent de nouveau des liens entre la diminution de notes fruitées (framboise, mûre, abricot) de vins de Tannat avec l'hydrolyse de certains esters.

Les estérases et les lipases, responsables de ces variations, sont des hydrolases d'esters carboxyliques capables de synthétiser ou d'hydrolyser des esters selon les conditions

physicochimiques du milieu. Les estérases montrent plus de spécificité pour les substrats monomériques en condition aqueuse, avec une longueur de chaîne carbonée plutôt comprise entre 2 et 10 carbones. Les lipases ont plus de spécificité pour les dimères et les trimères aux longueurs de chaînes carbonées dépassant 10 carbones et agissent à l'interface des régions hydrophiles et hydrophobes (Yahya *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 2005).

Il semblerait que dans la famille des BL du vin, les souches de l'espèce *Oe. oeni* présentent les plus fortes activités estérases (Matthews *et al.*, 2006). Les souches appartenant au genre *Lactobacillus* semblent également montrer une activité estérase mais de façon moins prononcée, alors que peu de *Pediococcus* semblent présenter cette activité (Matthews *et al.*, 2006). En outre, ces activités estérases semblent être très dépendantes de la souche de BL (Matthews *et al.*, 2006 ; Sumby *et al.*, 2010), ce qui pourrait en partie expliquer l'absence de consensus dans les résultats présentés.

Il existe de nombreuses données sur la présence de gènes chez les BL alimentaires codant pour des estérases (Sumby *et al.*, 2010), mais beaucoup moins chez les BL isolées du vin. Toutefois, le séquençage complet du génome d'une souche d'*Oe. oeni* (PSU-1) a permis de cibler 4 gènes pouvant potentiellement coder une activité estérase chez cette souche (Mills *et al.*, 2005). Ces régions du génome de PSU-1 sont très semblables à celles correspondant aux gènes codant des activités estérases chez d'autres BL (Sumby *et al.*, 2010). En outre, Sumby *et al.* (2009) ont récemment caractérisé une estérase intracellulaire chez une souche d'*Oe. oeni*.

En revanche, Matthews *et al.* (2006) n'ont observé d'activité lipase que sur des souches de *Lactobacillus* et aucune sur des souches d'*Oe. oeni* et de *Pediococcus*. Dans l'industrie agro-alimentaire, l'activité lipase des *Lactobacillus* est connue pour contribuer à la synthèse de composés aromatiques, en particulier dans les fromages (Collins *et al.*, 2003).

Il semblerait donc que les activités estérases soient beaucoup plus présentes chez les BL du vin que les activités lipases. Ceci pourrait induire le fait que les BL du vin aient plus de spécificité à hydrolyser et synthétiser des esters avec un nombre de carbones limités (acide correspondant de C2 à C10).

La synthèse des esters par les BL est gérée par les mêmes enzymes que celles qui les hydrolysent (estérases). Il existe ainsi un équilibre entre l'hydrolyse et la synthèse qui dépend

des conditions physicochimiques du milieu. Il y a deux voies possibles: par estérification d'un acide avec un alcool ou par réaction d'un ester avec un alcool (alcoololyse), l'acidolyse et la transestérification n'ayant pas été encore constatées chez les BL (Abeijón Mukdsi *et al.*, 2009).

La synthèse d'esters en milieu aqueux par les BL alimentaires semble principalement être due à des réactions de transférase (alcoololyse) dans lesquels le groupe acyle gras est directement transféré d'un glycéride vers un alcool sans cofacteur (Inoue *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004). Ainsi, de nombreuses BL alimentaires sont capables de synthétiser des esters éthyliques du butyrate au décanoate d'éthyle, plutôt à partir des monoglycérides voir des diglycérides que des triglycérides (Gobbetti *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004).

Toutefois, il a été trouvé dernièrement que des souches de BL isolées de lait de chèvre et de brebis synthétisaient les Esters éthyliques d'acides gras (C2C2 au C10C2) plutôt par estérification que par alcoololyse (Abeijón Mukdsi *et al.*, 2009). Cependant, le vin étant un milieu hydroalcoolique, la grande disponibilité de l'éthanol y renforce l'activité transférase. De ce fait, l'alcoololyse est probablement la voie principale de formation des esters par les BL du vin (Holland *et al.*, 2005).

Outre la nature de la souche, un des principaux paramètres qui influence l'équilibre hydrolyse/synthèse des esters est l'activité de l'eau. Plus l'activité de l'eau est grande, plus l'hydrolyse sera favorisée et inversement (Liu *et al.*, 2004). Un autre facteur ayant un rôle important pour l'impact de l'activité des BL sur la composition en esters du vin est la disponibilité des substrats, comme les acides gras et l'éthanol pour les Esters éthyliques d'acides gras (Sumby *et al.*, 2010).

Les lipides du vin ont principalement 2 sources. Ils peuvent être dérivés de la baie de raisin (pellicule, pépins, pulpe) et provenir de l'autolyse des levures en fin de FA avec une composition variant notamment selon le cépage (Pueyo *et al.*, 1999).

En outre, la FML pourrait également avoir un impact indirect sur la composition en esters des vins, notamment à la suite de leur élevage. En effet, il a été vu dans un paragraphe précédent que l'hydrolyse des esters au cours du vieillissement du vin pouvait être limitée par la présence de composés antioxydants tels que certains composés phénoliques (Roussis *et al.*, 2005; Lambropoulos et Roussis, 2007) ou le glutathion (Papadopoulou et Roussis, 2008). Or,

il a également été vu que les BL du vin possédaient des activités tannases pouvant légèrement modifier le profil en composés phénoliques des vins (Matthews *et al.*, 2006). Cette modification pourrait alors potentiellement avoir une influence sur la cinétique d'hydrolyse des esters au cours de l'élevage des vins. De même, il a été montré dernièrement que le niveau de glutathion total (forme oxydée + forme réduite) pouvait diminuer après FML (Marchand et de Revel, 2010). Cela indique que les BL du vin ont la capacité à consommer ou retenir le glutathion sans phénomène d'oxydation, ce qui pourrait également avoir une incidence sur l'hydrolyse des esters au cours du vieillissement du vin. Enfin, des phénomènes physicochimiques de rétention de certains esters, dont l'hexanoate d'éthyle, sur les parois cellulaires de BL alimentaires ont été mis en évidence dernièrement (Ly *et al.*, 2008). Ces propriétés des BL pourraient potentiellement avoir aussi une influence sur la composition finale en esters des vins.

Activités β -glycosidase

La présence de ces activités chez les BL isolées du vin a été mise en évidence dans les années 90 par Guilloux-Benatier *et al.* (1993). Des études plus récentes ont montré que les souches d'*Oe. oeni* impliquées dans la FML possédaient des activités β -glucosidase, β -xylosidases, β -arabinosidases, α -arabinosidases et β -rhamnosydases (Grimaldi *et al.*, 2000; Mansfield *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2010). Les activités glycosidases varient beaucoup selon les souches et les genres (Barbagallo *et al.*, 2004; Grimaldi *et al.*, 2005). Une telle variabilité indiquerait la présence d'enzymes multiples (Grimaldi *et al.*, 2005). La plupart des souches d'*Oe. oeni* ont des activités glycosidases élevées pour des pH entre 3 et 4 (pH du vin) et optimales à 40 °C (Barbagallo *et al.*, 2004; Grimaldi *et al.*, 2005). Cependant, une part de ces activités est conservée à 20-25 °C, ce qui correspond aux températures de la FML. L'effet stimulant de l'éthanol a été mis en évidence pour de faibles concentrations de l'ordre de 4 % (Grimaldi *et al.* 2000; Grimaldi *et al.* 2005). Enfin, les sucres réduisent les activités glycosidases dans la majorité des cas exception faite de l'activité arabinosidase stimulée par le fructose (Grimaldi *et al.*, 2005).

Mansfield *et al.* (2002) ont d'abord détecté la production d'enzymes β -glucosidases chez des souches d'*Oe. oeni* sans qu'elles puissent hydrolyser des glycosides natifs du raisin. L'absence de glycosidases spécifiques pourrait expliquer ce résultat. Dans le même temps,

Boido *et al.* (2002) ont montré que la FML diminuait le niveau des composés aromatiques glycosylés du cépage Tannat dont le linalol et un précurseur de la β -damascénone, prouvant ainsi l'activité β -glucosidase d'*Oe. oeni* sur ces composés dans les conditions œnologiques. Parallèlement à cette hydrolyse, les teneurs en terpénols comme le linalol augmentent légèrement alors que celles en composés norisoprénoïdiques restent constantes. Les auteurs ont alors suggéré que cette libération très limitée d'aglycones pouvait être expliquée par des phénomènes d'adsorption et d'occlusion de ces composés volatils avec les macromolécules polysaccharidiques produites par *Oe. oeni* durant la FML. Ce phénomène de rétention de molécules volatiles avec des polysaccharides du vin ont déjà été mis en évidence par (Dufour et Bayonove, 1999b).

Par la suite, (Ugliano *et al.*, 2003) confirment en milieu modèle l'hydrolyse des précurseurs glycosylés des terpénols et de la β -damascénone, avec cette fois ci une augmentation de la teneur en composés aromatiques correspondants. Ces auteurs notent toutefois une augmentation limitée de la teneur en linalol qui subit très probablement un réarrangement acide-catalysé en α -terpinéol.

D'Inecco *et al.* (2004) trouvent eux aussi des activités β -glycosidases produites par *Oe. oeni* durant la FML capables d'hydrolyser des aglycones à partir de leurs précurseurs glycosylés, présents dans un extrait glycosidique de Chardonnay.

Très récemment, Hernandez-Orte *et al.* (2009) montrent pour la première fois en milieu modèle que des activités β -glycosidases chez des souches de *Lactobacillus* peuvent libérer des aglycones. Ils confirment également cette activité avec plusieurs souches d'*Oe. oeni* pour des composés comme le linalol, la β -d et la β -i. Ces auteurs constatent que le niveau de libération des aglycones est très dépendant de la souche, et que ces variations peuvent être olfactivement perceptibles avec l'établissement de profils aromatiques différents. En outre, ces auteurs montrent également que des BL présentes dans le vin mais n'effectuant pas la FML, sont capables de libérer des composés aromatiques pouvant potentiellement avoir un impact sur l'arôme du vin.

D'un point de vue génétique, il existe peu d'informations sur la capacité des BL du vin à hydrolyser des composés glycosylés durant la FML. Spano *et al.* (2005) ont caractérisé un gène codant pour une enzyme β -glucosidase putative de *Lactobacillus plantarum* et d'une

souche commerciale d'*Oenococcus oeni*. Le gène est largement répandu chez les BL et son expression semble être modulée par des stress tels que le pH, l'éthanol et la température.

Activités oxydases

Si l'origine des terpénols et des C13-norisoprénoïdes est bien établi, il a été vu précédemment qu'elle était un peu moins pour les lactones. Il semblerait d'après Hernandez-Orte *et al.* (2009) que les BL soient capables de les libérer. Dans le cas où les lactones seraient issus de précurseurs glycosylés, l'activité β -glycosidase des BL pourraient avoir un rôle dans ce phénomène. Un tel processus n'a jamais été montré. En revanche, Wanikawa *et al.* (2000) ont montré qu'au cours de la fabrication du whisky, des BL étaient capables d'oxyder de façon enzymatique des acides gras insaturés, générant ainsi des acides gras hydroxylés lactonisés par la suite par les levures. Dans l'étude de Hernandez-Orte *et al.* (2009), la lactonisation n'a pas pu être réalisée par des levures mais pourrait se faire par voie chimique. Ceci est d'autant plus possible, qu'Alewijn *et al.* (2007) ont montré que la formation de γ - et δ -lactones dans des fromages de Gouda se faisait par voie chimique via une lactonisation par transestérification directe d'acides gras hydroxylés estérifiés en triglycérides. Il ne s'agit donc pas d'une voie enzymatique, les transestérifications enzymatiques n'ayant jamais encore été observées chez les BL (Abeijon Mukdsi *et al.*, 2009). Il semblerait aussi que les BL n'aient pas la capacité de transformer en lactones des acides gras hydroxylés libres (via des activités estérases), contrairement aux levures. Ainsi, plutôt que des activités glycosidases, la libération des lactones dans le vin par les BL pourrait provenir d'activités oxydases, générant des acides gras hydroxylés à partir d'acides gras insaturés. La lactonisation pourrait alors se faire par voie chimique.

Activité des BL sur certains composés soufrés

Enfin, de rares travaux n'ayant pas donné lieu à publication ont été effectués sur l'impact de la FML sur la composition en thiols des vins, et plus particulièrement celle en 3-sulfanylhéxanol. Des travaux effectués sur 10 vins rosés et de Clairets de Bordeaux ont montré que la teneur en 3SH diminuait significativement au cours de la FML (Murat, 2001). Cependant, ces travaux ont été réalisés avec une seule souche de BL, ce qui est insuffisant pour toute conclusion au regard de la grande variabilité inter-souches des différentes activités enzymatiques des BL. De plus, ces résultats ne permettent pas de savoir si cette diminution est due à une oxydation chimique ou au métabolisme des BL. Cependant, d'autres travaux (de

Revel, 2005) ont confirmé que la FML avait plutôt tendance à diminuer la teneur en 3SH. En effet, des FML menées sur des vins de Sauvignon blanc ont amené des diminutions significatives de l'intensité odorante de la zone olfactive correspondant au 3SH après analyse par GC-olfactométrie, confirmées plus tardivement par les dosages.

Par ailleurs, le 3-sulfanylpropionate d'éthyle a été identifié dernièrement dans des fromages de Munster et de Camembert (Sourabié *et al.*, 2008). C'est la première fois que ce composé est identifié dans les fromages. Une voie de synthèse a été proposée par les auteurs qui suggèrent que le 3SPE serait issu du catabolisme de l'homocystéine (**Figure 9**). Or, cet acide aminé a été identifié dernièrement dans 36 vins bulgares à des teneurs comprises entre 0,09 et 0,64 mg/l pour les vins blancs, et entre 0,10 et 1,37 mg/l pour les vins rouges (Benkova *et al.*, 2009). La possibilité que le 3SPE puisse être formé au cours de la FML pourrait donc être envisagée. Cependant, aucune étude n'a encore étudié le catabolisme de l'homocystéine chez les BL du vin.

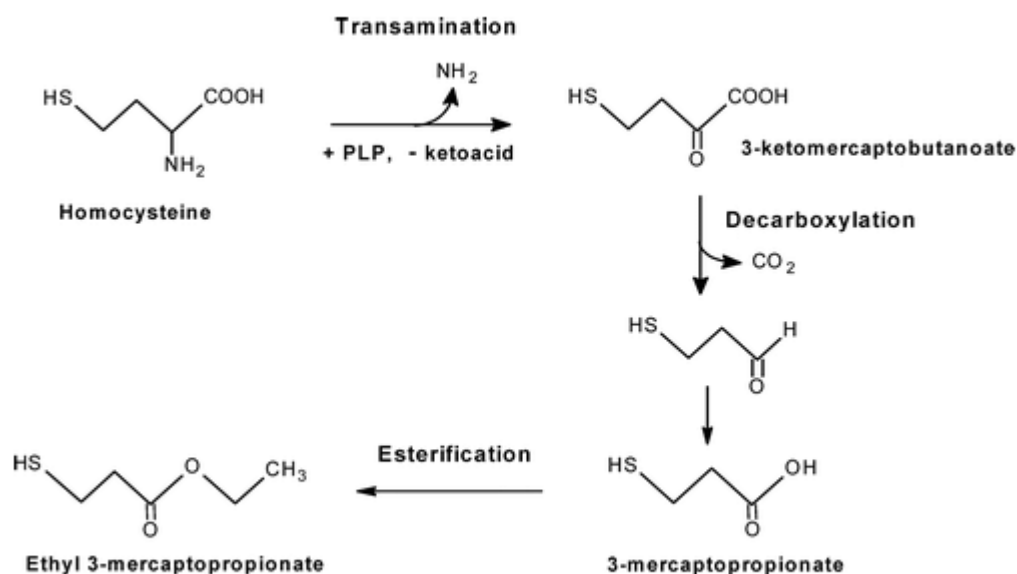


Figure 9 : Voie de formation hypothétique du 3-mercaptopropionate d'éthyle chez les BL (Sourabié *et al.*, 2008)

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Tableau 3 : caractéristiques des vins des essais "avant/après FML".

Vin	origine	Cépage	Millésime	Acide malique (g/l)	pH avant FML	Température FML (°C)
Msg1807	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2007	2,5	3,7	22
Mhm1207	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2007		3,6	
CSsg507	Blaye (Bordeaux)	Cabernet Sauvignon	2007	3,4		22
Mmc07	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2007		3,7	
Msg1007	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2007	2,6	3,5	22
Msg707	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2007	2,7	3,5	22
Msg807	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2007	3		22
Mhm1307	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2007		3,7	
Mhm607	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2007		3,6	
Msg307	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2007	3	3,6	22
CShm908	Bourg (Bordeaux)	Cabernet Sauvignon	2008			
Mhm1008	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2008			
CSsg1808	Blaye (Bordeaux)	Cabernet Sauvignon	2008	4,8	3,6	21
Msg408	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2008	2,6		21
Msg308	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2008	2,4	3,6	21
Msg208	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2008	2,9	3,5	21
Msg109	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2009	1,5	3,5	22
Msg609	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2009	1,7	3,5	22
Msg1009	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2009	1,5	3,5	22
Msg1609	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2009	1,4	3,5	22
Msg1409	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2009	1,4	3,5	22
Msg809	Blaye (Bordeaux)	Merlot	2009	1,2	3,5	22

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Vinifications

A. Essais en chais de FML spontanées

Pour étudier l'impact global de la FML, un nombre conséquent de vins rouges ont été prélevés dans des chais lors des 3 millésimes (2007, 2008, 2009), avant FML puis après FML. Dans ces essais, toutes les FML ont été réalisées spontanément par les BL indigènes. Les vins récupérés avant FML ont été sulfités à 50 mg/l puis placés à 12 °C en attendant le prélèvement des vins après FML. Au cours de ce délai d'attente, les vins avant FML ont fait l'objet d'un soutirage pour éliminer une grande partie des lies. Une fois récupérés, les vins après FML ont été sulfités à 50 mg/l et placés quelques jours à 12 °C afin de les décanter et d'éliminer une grande partie des lies. Les vins des deux modalités ont ensuite été échantillonnés et congelés en attendant les analyses. Les caractéristiques des vins ainsi que certains paramètres de FML sont regroupés dans le **Tableau 3**.

B. Essais de microvinification

Pour étudier l'influence des souches de BL sur les marqueurs de l'arôme fruité des vins rouges, différents vins ayant achevé la FA ont été utilisés au cours de 2 millésimes (2008 et 2009). Un contrôle de la teneur en acide lactique a été effectué avant ensemencement sur les vins du millésimes 2008 (Mmv08 et CSmv08) afin de s'assurer que la FML n'avait pas démarrée. Pour les vins du millésime 2009, ce contrôle a été effectué avec une évaluation des niveaux de populations par épifluorescence. Les populations étaient alors présentes à des niveaux inférieurs au seuil de quantification de la méthode (10^4 - 10^5 cellules/ml), empêchant tout déclenchement spontané de FML. Une fois les contrôles effectués, les vins témoins ont été sulfités à 50 mg/l, puis placés avec les autres vins à température souhaitée (20 °C ou 25 °C selon les essais). Après 24 h, les vins (témoins exceptés) ont étéensemencés par inoculation directe avec des levains malolactiques commerciaux fournis par différentes sociétés. Chaque essai de souche a été réalisé en triplicat dans un volume de 5L, les témoins étant aussi en

volume de 5L. Lesensemencements sont réalisés à 10^6 cellules/ml selon les instructions données par le fabricant. Des prélèvements sont effectués sur les vins "test" et les témoins afin de contrôler la dégradation ou la stabilisation (témoin) de l'acide malique. Ces dosages sont effectués par kit enzymatique. Lorsque l'acide malique initiale a été dégradé de moitié, un prélèvement pour le contrôle d'implantation a été mené (**Tableau 4**). Pour minimiser l'oxydation, à chaque prélèvement, le niveau du flacon est réajusté grâce à des billes stériles. A la fin de la FML, les vins sont sulfités à 50 mg/l puis placés à 12 °C quelques jours pour décantation. Les vins, témoins compris, sont ensuite soutirés puis échantillonnés pour analyse sensorielle, et congelés à – 20 °C pour analyse chromatographique plus tardive. Les caractéristiques des vins ainsi que certains paramètres de FML (température, souche de BL, implantation) sont regroupés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : caractéristiques des vins des essais de microvinification

Vins	Origine	Cépage	Millésime	Acide malique (g/l)	pH avant FML	Température FML (°C)	Souche inoculée	implantation	Durée FML (jours)
Mmv08D	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2008	1,2	3,5	25	D	Non	16
Mmv08A	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2008	1,2	3,5	25	A	Oui	16
Mmv08C	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2008	1,2	3,5	25	C	Oui	16
Mmv08E	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2008	1,2	3,5	25	E	Oui	16
Mmv08B	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2008	1,2	3,5	25	B	Oui	16
Mmv08 Si	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2008	1,2	3,5	25	Indigène		16
CSmv08O	Blaye (Bordeaux)	Cabernet Sauvignon	2008	2,4	3,6	25	D	Oui	15
CS v08A	Blaye (Bordeaux)	Cabernet Sauvignon	2008	2,4	3,6	25	A	Non	15
CSmv08C	Blaye (Bordeaux)	Cabernet Sauvignon	2008	2,4	3,6	25	C	Non	15
CSmv08E	Blaye (Bordeaux)	Cabernet Sauvignon	2008	2,4	3,6	25	E	Oui	11
CSmv08B	Blaye (Bordeaux)	Cabernet Sauvignon	2008	2,4	3,6	25	B	Oui	15
Mmv09H	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2009	1,2	3,6	20	H	Non	71
Mmv09I	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2009	1,2	3,6	20	I	Non	71
Mmv09J	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2009	1,2	3,6	20	J	Oui	28
Mmv09F	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2009	1,2	3,6	20	F	Oui	25
Mmv09K	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2009	1,2	3,6	20	K	Oui	11
Mmv09L	Bourg (Bordeaux)	Merlot	2009	1,2	3,6	20	L	Oui	64

C. Essais de co-inoculation

Tous les essais de co-inoculation ont été effectués dans des chais ou dans des conditions proches par les viticulteurs concernés. Pour tous ces essais, excepté pour le vin PN08, des témoins sans FML inhibés par sulfitage ont été récupérés et placés à 12 °C en attendant les vins des modalités "séquentielle" et "co-inoculation". Les ensemencements ont généralement été faits par inoculation directe de levains commerciaux. Seuls les essais Ms08P1, Ms08P2, gar07P3 et gar07P4 ont été ensemencés avec des souches du genre *Pediococcus* (P1, P2, P3 et P4) issus d'une pré-culture. Les modalités Ms08FM et gar07mel ont été ensemencées avec une pré-culture et un levain commercial par inoculation directe. Dans tous les cas, excepté pour le vin Ms08, des contrôles d'implantation ont été faits. Dans le cas des vins Ms08 et gar07, un suivi des populations bactériennes distinguant les souches du genre *pediococcus* de celles de l'espèce *Oe. oeni*, a permis de contrôler l'implantation des pré-cultures (étalement sur MRS malique pimarinine). Seules les souches P1 et P2 ne se sont pas implantées en inoculation séquentielle et en co-inoculation. Dans le cas des mélanges de souches, la FML a été réalisée par la souche commerciale co-inoculée. Les paramètres de vinification sont regroupés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : caractéristiques des essais de co-inoculation levures/BL.

Vin	Origine du vin	Cépage	Millésime	Acide malique (g/l)	pH avant FML	Couple levure/BL	Durée fermentation séquentielle (jours)	Durée fermentation co-inoculation (jours)	FML/FA en co-inoculation
gar07P3	Suisse	Garanoir	2007	1,6	3,6	W/P3	non réalisée	6	simultanée
gar07P4	Suisse	Garanoir	2007	1,6	3,6	W/P4	non réalisée	6	simultanée
gar07F	Suisse	Garanoir	2007	1,6	3,6	W/F	non réalisée	6	simultanée
gar07mel	Suisse	Garanoir	2007	1,6	3,6	W/F+P3+P4	non réalisée	6	simultanée
Ms08P1	Suisse	Merlot	2008	4	3,3	W/P1	48	48	séquentielle
Ms08P2	Suisse	Merlot	2008	4	3,3	W/P2	48	48	séquentielle
Ms08F	Suisse	Merlot	2008	4	3,3	W/F	34	21	séquentielle
Ms08FM	Suisse	Merlot	2008	4	3,3	W/F+P1+P2	21	21	séquentielle
PN08	Allemagne	Pinot Noir	2008	6,1	3,3	X/G	35	35	séquentielle
Mlaf09	Bordeaux	Merlot	2009	2,1	3,6	Y/F	54	19	simultanée
Mbeaum09	Bordeaux	Merlot	2009	2,4	3,6	Z/B	36	18	simultanée
Mlev09	Bordeaux	Merlot	2009	1,6	3,8	Z/B	44	14	simultanée
Msol09	Bordeaux	Merlot	2009	2,1	3,7	Z/I	78	28	séquentielle

II. Analyses biochimiques et enzymatiques

A. Dosages enzymatiques

Les dosages des acides L-malique et L-lactique ont été réalisés en utilisant des kits de dosage par réaction enzymatique (Boehringer-Mannheim).

B. Mesure de la viabilité par épifluorescence

La méthode utilisée a été mise au point par Chemunex (Ivry-sur-Seine, France). Elle consiste à retenir par filtration les microorganismes sur une membrane dont les pores ont un diamètre de 0,4 μm (Chemfilter CB04). Le volume passé est en général un ml. Les cellules retenues à la surface du filtre sont incubées en présence de 5,5 mg/l d'acétate de fluorescéine (ChemChrome V6) et 550 μl de tampon de réaction (ChemSol B16). Le mélange réactionnel (tampon et substrat) parvient aux microorganismes par capillarité à travers la membrane puis diffuse dans les cellules. Les cellules vivantes, possédant une activité enzymatique, hydrolysent ce substrat en fluorescéine, molécule fluorescente sous UV. Après action de l'acétate de fluorescéine pendant 30 min à 4 °C dans le noir, la membrane, placée entre lame et lamelle, est observée au microscope, en utilisant un grossissement de 1000 et un éclairage aux UV, générés par une lampe au mercure au travers d'un filtre vert interférentiel (excitation à 480 nm et émission à 515 nm).

C. Contrôle d'implantation par électrophorèse en champs pulsés d'*O.oeni*

La première étape de cette technique, mise en place par Gindreau *et al.* (1997), relativement longue à mettre en œuvre, consiste à emprisonner les cellules dans une matrice semi solide d'agarose, appelée « plug », pour les protéger des forces de cisaillements, susceptibles d'endommager l'ADN. De plus, ces cellules dont on souhaite analyser les échantillons d'ADN doivent également être incluses dans ce plug puisqu'il n'est pas possible d'utiliser les méthodes classiques pour analyser cet ADN de longueur d'environ 50 kb.

Ensuite vient la lyse “*in situ*” des membranes et des protéines afin de garder intact le matériel génétique. S’ensuit une étape de digestion avec une ou plusieurs enzymes coupant peu fréquemment au sein du génome ; chaque souche ayant des sites reconnus par *Not 1* situés différemment, les empreintes génétiques obtenues, appelées dans ce cas pulsotypes, seront donc uniques pour chaque souche et permettront le typage.

A partir de cultures d’une dizaine de jours, l’ensemble de la biomasse bactérienne est récupérée après raclage de la boîte de Pétri, préalablement inondée de 4mL de TE (Tris 10mM pH 8-EDTA 1mM pH 8), avec un râteau. Cette suspension est récupérée puis dosée à 600nm afin de déterminer la quantité à prélever pour préparer chaque plug. Le calcul du volume à prélever (en mL) s’effectue en divisant 5 par dix fois la densité optique mesurée, en tenant compte de la dilution effectuée lors du dosage. Ce volume ainsi calculé, transféré dans un eppendorf est alors centrifugé 5 minutes à 10000 rpm et le surnageant éliminé. Le culot est remis en suspension dans 1,5mL de TE, puis centrifugé 5 minutes à 10000 rpm ; cette étape est effectuée deux fois de suite. Une fois le surnageant bien éliminé, le culot, bien égoutté est repris dans 50µL de T₁₀₀E (Tris 10mM pH 8-EDTA 100mM pH 8) et le tube mis à 50 °C. En effet cette température permet de maintenir les 50µL d’agarose (à 1g pour 100mL TE), dans son état liquide. Le mélange, une fois bien homogénéisé est ensuite coulé dans le moule dont la base a été obturée. Après un quart d’heure à 4°C les plugs peuvent être démoulés puis conservés à 4 °C dans 500µL de TE.

Ils sont ensuite transférés dans 1mL de T₁₀₀E auquel ont été ajoutés 10mg de lysozyme et la préparation laissée 2 à 3 heures à 37 °C. Cette étape permet au lysozyme de perforer les membranes cellulaires. Les plugs sont ensuite transférés dans 1mL de T₁₀₀E auquel a été rajouté 2mg de pronase et du N-lauryl sarcosyl à 1,5% puis laissés 16 heures à 37 °C ; cette étape permet la digestion des protéines. Les plugs peuvent ensuite être conservés dans 500µL de T₁₀₀E à 4 °C pendant une année.

Pour la digestion, les plugs sont lavés avec 1,5mL de TE par contact une demi heure à température ambiante et sous agitation douce. Ce temps écoulé le TE est rejeté et cette opération renouvelée 3 fois. Après un bref passage dans de l’eau milliQ, les plugs sont coupés en deux au scalpel et la première moitié est transférée dans un tube eppendorf contenant le mélange de digestion, la seconde moitié conservée dans du T₁₀₀E à 4 °C pour une utilisation future éventuelle.

Le mélange de digestion abouti à un volume final de 100µL comprenant 1µL d'enzyme *Not 1* (BioLabs®), 10µL de Tampon 3 à 10X (BioLabs®), correspondant à l'enzyme utilisée, 1µL de BSA à 100 mg.mL⁻¹, facilitant la digestion, et le volume est complété à 100µL par de l'eau milliQ. Après s'être assuré que le plug est entièrement recouvert de mélange de digestion, celle-ci peut s'effectuer à 25 °C pendant 16h.

Pour la migration, une cuve doit être remplie de TEB 0,5X (Tris, EDTA, Acide Borique) obtenu par dilution de TEB 10X (Tris 108 g.L⁻¹, Acide borique 55 g.L⁻¹ et 40mL d'EDTA à 0,5M pH 8), et maintenue à une température de 15 °C. Le gel de migration est préparé avec du TEB 0,5X à 1% d'agarose spécial gel champs pulsés, permettant la séparation de fragments d'ADN de plus de 20kb (kilo paires de bases). Une petite quantité de gel, environ 1,5mL, est réservée à 50 °C pour sceller les plugs. Après polymérisation les puits sont remplis de TE et les plugs, récupérés du milieu de digestion, sont passés rapidement dans du TE avant d'être introduits dans les puits. Une fois tous les plugs ainsi que le marqueur de poids moléculaire (*MidRange PFG Marker*, BioLabs®) spécifique des fragments de grandes tailles, sont introduits dans les puits, ceux ci sont scellés avec l'agarose réservé à 50 °C.

Le programme de migration pour *O. oeni* comprend un temps de pulse de 1 à 25 secondes, un temps de run de 22h, tout ceci sous un voltage de 6 volts et avec un angle fixe de 120 °C.

Le principe de cette électrophorèse consiste à changer l'orientation et/ou la polarité du champ électrique alternativement au cours du temps. A chaque modification du champ, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ. Le temps nécessaire à la réorientation est proportionnel à la longueur de la molécule. Lorsque le champ est rétabli dans son sens initial, la molécule doit une nouvelle fois se réorienter. Ces temps de réorientation provoquent un retardement de la migration nette qui est proportionnel à la taille de la molécule. Une fois ce programme effectué, le gel est mis en contact dans 100 mL d'eau milliQ contenant 60µl de Bromure d'éthidium (Eurobio®) pendant 20 minutes pour la révélation sous UV.

III. Analyses chromatographiques

A. Analyse par injection directe et par espace de tête

1. Alcools supérieurs par GC-FID

Il s'agit de la méthode officielle J.O. des Communautés européennes (29 décembre 2000). La méthode permet de déterminer d'une part le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'éthanal, d'autre part les alcools supérieurs : propan-1-ol, 2-méthylpropanol, butan-1-ol et les alcools isoamyliques.

Préparation de l'échantillon :

Principe : injection directe

Etalon interne : 4-méthylpentan-2-ol à 10 g/l en solution hydroalcoolique

Mode opératoire : 50 μ l de la solution d'étalon interne sont ajoutés à 5 ml de vin et l'ensemble est homogénéisé.

Conditions chromatographiques :

Appareil : Agilent 6890N

Colonne : CPWAX 57 CB 50 m x 0,25 mm; 0,2 μ m d'épaisseur de film

Injecteur : injection split rapport de division 1/60, volume injecté : 0,5 μ l, température 200 °C,

Gaz vecteur : hydrogène 5.5, débit : 2 ml/min

Programmation de température : 40 °C pendant 5 min, puis 4 °C/min jusqu'à 200°C.

Détecteur : ionisation de flamme (FID), température : 240 °C

2. Composés acétoïniques par GC-FID

Par ce dosage, nous déterminons l'acétoïne, l'acétol et le butan-2,3-diol D(-) et méso (de Revel, 1992).

Préparation de l'échantillon :

Principe : injection directe

Etalon interne : butan-1,4-diol à 1 g/l en solution hydroalcoolique (40 % vol)

Mode opératoire : 50 μ l de la solution d'étalon interne sont ajoutés à 1 ml de vin, le tout est dilué avec 2 ml de méthanol.

Conditions chromatographiques :

Appareil : Agilent 6890N

Colonne : BP 21, 50 m x 0,32 mm; 0,25 µm d'épaisseur de film

Injecteur : injection split rapport de division 1/60, volume injecté : 0,5 µl, température 200 °C,

Gaz vecteur : hydrogène 5.5, débit : 2 ml/min

Programmation de température : 80°C pendant 5 min, puis 3°C/min jusqu'à 200°C maintenu 15 min

Détecteur : ionisation de flamme (FID), température : 240 °C

3. Composés soufrés légers par HS-GC-FPD

Les composés soufrés dits "légers" ont un point d'ébullition inférieur à 90°C. La méthode de dosage a été développée et validée par Anocibar-Beloqui (1998). Parmi tous les composés soufrés (H_2S , Méthanethiol, Ethanethiol, DMDS, DMS, sulfanylethanol), deux molécules sont quantifiées : l'hydrogène sulfuré (H_2S) et le sulfure de diméthyle (DMS).

Préparation de l'échantillon :

Appareil : HP5890

Principe : injection par espace de tête (HS)

Etalon interne : thiophène à 100 mg/l en solution hydroalcoolique

Mode opératoire : dans un flacon d'une capacité de 125 ml, 100 ml de vin sont additionnés de 100 µl de la solution d'étalon interne. Le flacon est fermé hermétiquement par un bouchon perforable et serti avec une capsule métallique. Après 24 heures à une température de 22 °C et à l'abri de la lumière, 1 ml de phase gazeuse est injecté selon la technique de l'espace de tête.

Conditions chromatographiques :

Colonne : HP5, 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm d'épaisseur de film

Injecteur : température : 70 °C

Gaz vecteur : hydrogène 5.0

Programmation de température : 28 °C pendant 1 min, puis 2 °C/min jusqu'à 80 °C, puis 10 °C/min jusqu'à 180 °C.

Détecteur : photométrie de flamme (FPD), température : 200 °C

B. Analyse par extraction liquide/liquide

1. Composés dicarboxylés par GC/MS

Il s'agit du dosage du diacétyle, du méthylglyoxal et de la pentan-2,3-dione par la méthode développée et validée par de Revel *et al.* (2000).

Préparation de l'échantillon :

Principe : extraction liquide-liquide après dérivation dans le vin

Etalon interne : hexan-2,3-dione à 1,2 g/l en solution hydroalcoolique (50 %)

Mode opératoire : 50 µl de la solution d'étalon interne sont ajoutés à 50 ml de vin et 5 ml de solution aqueuse de 1,2-diaminobenzène à 6,5 g/l (agent de dérivation), le pH est ajusté à 8 avec de la soude (10N). Après 3 heures à 60 °C, le mélange est acidifié à pH 2 avec une solution d'acide sulfurique 2M, puis extrait 2 fois avec 5 ml de dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium

Conditions chromatographiques :

Appareil : Agilent 6890N

Colonne : HP5, 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm d'épaisseur de film

Injecteur : splitless (30 s), température : 250 °C

Gaz vecteur : He N55

Programmation de température : 60 °C pendant 1 min, puis 2 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu pendant 20 min

Détecteur : spectrométrie de masse, impact électronique (70 eV), température : 280 °C, quantification avec les ions totaux

2. Composés polaires et linalol par GC/MS

Cette méthode, adaptée de celle de Falcao *et al.* (2008), a été développée et validée au cours de ces travaux. Elle vise à quantifier par une méthode simple un ensemble de composés aromatiques du vin dits "polaires" ainsi que le linalol. Les composés polaires correspondent à des composés dont le coefficient de partage log p est faible (< 1) ou négatif. Il s'agit d'acides gras branchés (AB) : acide isobutyrique (iC4), acide 2-méthylbutyrique (2mC4) et acide isovalérique (iC5); et d'esters polaires : lactate d'éthyle (LE), succinate de diéthyle (SDE), succinate de monoéthyle (SME), 3-hydroxybutyrate d'éthyle (3OHC4C2), 3-

hydroxyhexanoate d'éthyle (3OHC6C2), 6-hydroxyhexanoate d'éthyle (6OHC6C2) et du lévulinate d'éthyle (LevC2).

Préparation de l'échantillon :

Principe : extraction liquide-liquide

Étalon interne : octan-2-one à 1,1 g/l en solution hydroalcoolique (50 %)

Mode opératoire : 10 µl de la solution d'étalon interne sont ajoutés à 50 ml de vin. Le mélange est extrait successivement une fois avec 4 ml puis 2 fois avec 2 ml de dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium

Conditions chromatographiques :

Appareil : Agilent 5890

Colonne : BP21, 50 m x 0,32 mm; 0,25 µm d'épaisseur de film

Injecteur : splitless (45 s), température : 250 °C

Gaz vecteur : He N55

Programmation de température : 60 °C pendant 5 min, puis 3 °C/min jusqu'à 200 °C maintenu pendant 50 min

Détecteur : par spectrométrie de masse, impact électronique (70 eV), température : 280 °C, détection en mode SIM, ions répertoriés dans le **Tableau 6**.

Validation de la méthode :

Pour l'étude de la linéarité, une droite d'étalonnage est réalisée pour chaque composé dans un vin rouge (**Tableau 6**).

Pour l'étude de répétabilité, 10 analyses d'un même vin permettent de calculer le coefficient de variation de chaque composé (**Tableau 6**).

Pour l'étude de justesse, des ajouts dosés à des teneurs en milieu de gamme dans 4 vins différents permettent de calculer les taux de recouvrements, le taux de recouvrement moyen étant donné dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Ions spécifiques (ions de quantification en gras) et données de validation (linéarité, répétabilité, justesse) de la méthode de dosage des composés polaires et du linalol.

Composés	Ions (m/Z)	Gamme linéarité (µg/l)	R ²	CV (%) (n = 10)	Recouvrement (%)
3OHC4C2	87 , 71, 88	2 à 1000	0,9968	8,6	86
6OHC6C2	88 , 97, 101, 115	1 à 500	0,9968	16,3	86
3OHC6C2	117 , 89, 71	0,1 à 50	0,9995	7,6	95
LevC2	99 , 102, 109	0,1 à 50	0,9982	11,5	76
LE	45 , 75	0,1 à 50	0,998	6,3	92
SDE	101 , 128	0,1 à 50	0,9991	4,6	92
SME	101 , 129	100 à 50000	0,9933	10,9	75
iC4	73 , 43, 88	100 à 50000	0,9927	7,2	82
2mC4	60 , 87	100 à 50000	0,9997	2,6	89
iC5	74 , 87	10 à 5000	0,999	6,8	86
linalol	81 , 93, 121	10 à 5000	0,9992	8,3	59
octan-2-one	58 , 71, 43				

C. Analyse par microextraction sur phase solide

1. C13-norisoprénoides et lactones par SBSE-GC/MS

Cette méthode, a été développée et validée au cours de ces travaux. Les étapes de développement et de validation sont décrites au chapitre III-1-I-B. Les lactones concernées par l'étude sont la γ -octalactone, γ -nonalactone, γ -décalactone, δ -decalactone, γ -undécalactone, tandis que les norisoprénoides sont la β -damascone, β -damascénone, la β -ionone et l' α -ionone.

Préparation de l'échantillon :

Principe : microextraction sur phase solide, SBSE

Etalon interne : cinnamate d'éthyle-d5 à 20 mg/l en solution alcoolique (100 %)

Mode opératoire : 25 µl de la solution d'étalon interne sont ajoutés à 25 ml de vin. Le mélange est homogénéisé, puis un prélèvement de 20 ml est placé dans un pilulier adapté (20 ml). Le barreau twister[®] de 126 µl de volume de phase stationnaire est ensuite placé dans le pilulier pour agitation pendant une heure. Le barreau est récupéré, rincé à l'eau milliQ, séché sur papier absorbant et placé dans le tube de désorption.

Conditions chromatographiques :

Appareil : HP6890

Colonne : BP21, 50 m x 0,32 mm, 0,25 μ m d'épaisseur de film

Injecteur (Gerstel) :

- TDS : température initiale de 50°C puis 60°C/min jusqu'à 280°C maintenu 10 min, cryofocalisation des composés dans le CIS à -100°C avec ligne de transfert TDS-CIS à 300°C. TDS en mode splitless.
- CIS : 12°C/s jusqu'à 290°C maintenu 5 min
- GC : mode "solvent vent" (45 s)

Gaz vecteur : He N55

Programmation de température : 60 °C tenu 6 min, puis 6°C/min jusqu'à 164 °C, puis 1 °C/min jusqu'à 190°C et 4 °C/min jusqu'à 220 °C tenu 20 min

Détecteur : par spectrométrie de masse (MS5872), impact électronique (70 eV), température : 280 °C, détection en mode SIM, ions répertoriés dans le **Tableau 7** au chapitre III-1-I-B.

Validation de la méthode : données dans le **Tableau 10** au chapitre III-1-I-B

Pour l'étude de la linéarité, une droite d'étalonnage est réalisée pour chaque composé dans un vin rouge.

Pour l'étude de répétabilité, 14 analyses d'un même vin rouge dopé à 1 μ g/l en C13NI et lactones, permettent de calculer le coefficient de variation de chaque composé.

Pour l'étude de reproductibilité, 10 analyses d'un même vin rouge dopé à 1 μ g/l en C13NI et lactones effectués des jours différents sur une période de deux semaines, permettent de calculer le coefficient de variation de chaque composé.

Pour l'étude de justesse, des ajouts dosés à des teneurs en milieu de gamme dans 7 vins différents permettent de calculer les taux de recouvrements, le taux de recouvrement moyen avec le coefficient de variation étant donné dans le **Tableau 10**.

2. Thiols par SPE-SBSE-GC/MS

Cette méthode, a été développée au cours de ces travaux. Les étapes de développement sont décrites au chapitre III-1-II-B. Les thiols concernés par l'étude sont le 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH), le 2-sulfanylpropionate d'éthyle (2SPE) et le 3-sulfanylpropionate d'éthyle (3SPE).

Préparation de l'échantillon :

Principe : microextraction sur phase solide après extraction et dérivation sur phase solide, SPE-SBSE

Etalon interne : 2-méthyle-3-tétrahydrofuranthiol (MTHF) à 400 mg/l en solution alcoolique (100 %)

Mode opératoire : 50 µl de la solution d'étalon interne sont ajoutés à 50 ml de vin ajusté à pH 7 avec de la soude (10N). Le mélange est percolé sur la phase stationnaire d'une cartouche SPE Bond-Elut® (500 mg) préalablement conditionné avec 5 ml de dichlorométhane, 5 ml de méthanol et 5 ml d'eau milliQ. 5 ml de solution aqueuse de DBU à 6,7 %, puis 1 ml d'une solution de PFBBBr à 400 mg/l dans l'isohexane sont passés sur la cartouche. La réaction de dérivatisation est réalisée sur la cartouche à température ambiante pendant 20 min. Un ml d'une solution de thioglycérol préparée dans le DBU à 6,7 % (solution aqueuse) est chargée dans la cartouche. Cette nouvelle réaction est également réalisée à température ambiante pendant 20 min. L'élimination de tous les réactifs est réalisée en passant 20 ml d'un mélange méthanol/H₃PO₄ (0,2 M) (60 : 40). Après un rinçage de la cartouche à l'eau, les thiols dérivés synthétisés sont ensuite élués par un mélange éther diéthylique/isohexane (3 : 1). L'éluat contenant les thiols dérivés est décanté afin de limiter la phase aqueuse restante. La phase organique est récupérée puis évaporée à l'évaporateur rotatif, en évitant d'amener complètement à sec. L'extrait est ensuite repris avec 20 ml d'eau pour analyse SBSE-GC/MS avec un barreau twister de 126 µl de volume de phase stationnaire.

Conditions chromatographiques :

Appareil : HP6890

Colonne : BP21, 50 m x 0,32 mm; 0,25 µm d'épaisseur de film

Injecteur (Gerstel) :

- TDS : température initiale de 50°C puis 60°C/min jusqu'à 280°C maintenu 10 min, cryofocalisation des composés dans le CIS à -100°C avec ligne de transfert TDS-CIS à 300°C. TDS en mode splitless.
- CIS : 12°C/s jusqu'à 290°C maintenu 5 min
- GC : mode "solvent vent" (45 s)

Gaz vecteur : He N55

Programmation de température : 60 °C tenu 6 min, puis 6°C/min jusqu'à 164 °C, puis 1 °C/min jusqu'à 190°C et 4 °C/min jusqu'à 220 °C tenu 20 min

Détecteur : spectrométrie de masse (MS5872), impact électronique (70 eV), température : 280°C, détection en mode SIM, ions répertoriés dans le **Tableau 11** au chapitre III-1-II-B.

Optimisation : Des thiols dérivés ont été synthétisés de la façon suivante :

40 mg de chaque thiol (3SH, 3SPE, 2SPE) sont dilués dans 100 ml d'éther/isohexane (3 : 1), puis 2 ml de DBU sont ajoutés. Après homogénéisation, 650 µl de bromure de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyle (PFBBBr) sont introduit avec précaution (produit lacrymogène). Le mélange est mis sous légère agitation pendant 1 h à température ambiante, puis lavé avec 100 ml de HCl à 0,5 M. Après décantation, la phase organique est récupérée, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. Le produit final est ensuite dilué dans 100 ml d'éthanol pour constituer une solution de thiols dérivés (environ 750 mg/l).

Validation de la méthode : une partie a été effectuée et les données sont décrites au chapitre III-1-II-B

3. Esters apolaires par HS/SPME-GC/MS

Cette méthode, a été développée et validée au cours de ces travaux. Les étapes de développement et de validation sont décrites au chapitre III-1-III-B. La liste des 32 esters concernés par ce dosage est regroupée dans le **Tableau 13** (n° 1 à 32) au chapitre III-1-III-B.

Préparation de l'échantillon :

Principe : microextraction sur phase solide, HS-SPME

Etalon interne : butyrate d'éthyle-d5, hexanoate d'éthyle-d5, octanoate d'éthyle-d5 et cinnamate d'éthyle-d5 à 20 mg/l en solution alcoolique (100 %)

Mode opératoire : 20 µl de la solution d'étalon interne sont ajoutés à 25 ml de vin. Le mélange est homogénéisé, puis un prélèvement de 10 ml est placé dans un vial SPME préalablement rempli avec 3,5 g de NaCl. Le vial est serti avec une capsule métallique recouverte d'un septum en caoutchouc, puis agité quelques secondes pour homogénéiser le tout.

Conditions chromatographiques :

Appareil : Agilent 5890

Colonne : BP21, 50 m x 0,32 mm; 0,25 µm d'épaisseur de film

Injecteur :

- Paramètres d'adsorption : fibre en PDMS d'épaisseur de film 100 µm, adsorption à 40 °C pendant 30 min avec une vitesse d'agitation de 500 tr/min
- Paramètres désorption : température injecteur 250 °C, désorption pendant 15 min, injecteur en mode splitless (45 s)

Gaz vecteur : He N55

Programmation de température : 40 °C tenu 5 min, puis 5 °C/min jusqu'à 220 °C tenu 30 min

Détecteur : par spectrométrie de masse (MS5872), impact électronique (70 eV), température : 280 °C, détection en mode SIM, ions répertoriés dans le **Tableau 13** au chapitre III-1-III-B.

Validation de la méthode : données dans le **Tableau 14** au chapitre III-1-III-B

Pour l'étude de la linéarité, une droite d'étalonnage est réalisée pour chaque composé dans un vin rouge.

Pour l'étude de répétabilité, 10 analyses d'un même vin rouge dopé à 50 µg/l en C4C1, C2C4, C5C2 et C2C8 car leurs teneurs dans les vins sont souvent inférieures aux LOQ respectives.

Pour l'étude de reproductibilité, 5 analyses d'un même vin rouge ont été faites des jours différents sur une période d'un mois.

Pour l'étude de justesse, des ajouts dosés à des teneurs en milieu de gamme dans 3 vins différents (rouge, blanc sec et blanc doux) et un mélange hydroalcoolique (12 %), permettent de calculer les taux de recouvrements. Le taux de recouvrement moyen avec le coefficient de variation est donné dans le **Tableau 14**.

Dans le cadre de l'établissement de la base de données esters des vins, quelques dosages ont été menés dans des milieux fermentés synthétiques. Le milieu synthétique utilisé est semblable à un moût blanc, il a été mis au point par Bely *et al.* (1990 a et b) et modifié par Marullo *et al.*, (2006). Les principaux composés nécessaires à la fermentation y sont réunis : sources de carbone et d'azote, sels minéraux, oligo-éléments, vitamines.

IV. Evaluation sensorielle des vins

Les évaluations sensorielles ont été réalisées dans la salle de dégustation de l'ISVV. Le groupe d'évaluation était variable selon l'expérimentation. Les vins ont été dégustés dans des verres noirs ISO, correspondants à la norme ISO 3591 : 1977.

A. Tests triangulaires

Cette épreuve discriminante permet de voir s'il existe des différences significatives entre les vins proposés. Chaque poste comporte trois verres dont deux sont identiques. Le dégustateur doit reconnaître l'échantillon différent. La mise en place et l'interprétation statistique par la loi Binomiale sont conformes à la norme ISO 4120 : 2003. Pour valider statistiquement le test, le seuil de confiance est fixé à 5 %.

B. Tests de classement

Il s'agit d'une épreuve descriptive qui compare les échantillons au niveau de l'intensité d'un ou plusieurs critères sensoriels. Dans le cadre de cette étude, le critère jugé olfactivement est l'intensité de la note fruitée des vins présentés. Les dégustateurs sont invités à classer les vins par ordre croissant d'intensité du descripteur fruité perçu. La mise en place et l'interprétation statistique par les tests de Friedman sont conformes à la norme ISO 8587 : 1995. Dans le cas où une différence globale entre échantillons est statistiquement démontrée, un test supplémentaire de comparaisons multiples de moyennes, peut permettre d'identifier des différences significatives entre échantillons deux à deux, par le calcul de la plus petite différence significative (PPDS).

C. Profils sensoriels comparés

Il s'agit de la norme ISO 13299 : 2003. Selon l'expérimentation, une liste de 4 ou 5 descripteurs a été pré-établie au laboratoire et proposée aux dégustateurs pour différencier les modalités. Les descripteurs choisis sont simples et peu nombreux afin de ne pas perdre le dégustateur dans son évaluation et d'éviter au maximum les phénomènes de saturation olfactive. Il s'agit également d'utiliser des descripteurs qui soient familiers aux dégustateurs afin que l'évaluation soit la plus fiable possible. Les descripteurs sont caractéristiques de l'arôme fruité des vins rouges (fruité ou fruit frais et fruits confiturés), de la FML (lactique) et d'arômes globaux des vins pouvant interagir avec la note fruité (végétal, fumé/grillé, épicé), selon Keim *et al.* (2002). Une analyse de variances (ANOVA) à deux facteurs (facteur produit

et facteur juge) a été réalisée sur les notes obtenues pour chaque descripteur. Pour chaque source de variation, un indicateur statistique (F de Fisher) est calculé et associé à une probabilité, pour rendre compte de la significativité de chaque effet. Nous avons fixé un risque de première espèce à 5 % (*), les deux autres niveaux étant 1 % (**) et 0,1 % (***). Les niveaux de risque correspondent aux seuils de confiance, c'est-à-dire à la probabilité de se tromper en concluant à une différence significative alors qu'il n'y en a pas. Différents cas sont alors possibles:

- Pas d'effet produit mais un effet juge : les juges ne différencient pas les vins et ont du mal à s'accorder sur ces descripteurs
- Pas d'effet produit et pas d'effet juge : les vins ne sont pas perçus comme différents et les juges utilisent l'échelle de notation de manière relativement homogène.
- Effet produit et effet juge : il existe une différence significative pour les descripteurs mais les juges ne sont pas d'accord entre eux.
- Effet produit et pas d'effet juge : il s'agit du cas idéal. Le descripteur différencie les vins et les juges utilisent une échelle de notation homogène.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1 : Composantes fruitées du vin, développement et validation des techniques de microextraction sur phase solide

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1 : Composantes fruitées du vin, développement et validation des techniques de microextraction sur phase solide

Notre étude qui consiste en grande partie à mesurer des variations dans les teneurs de nombreux composés aromatiques, doit s'appuyer sur des méthodes d'analyses performantes. De plus, le nombre d'échantillons analysés étant conséquent (+/- 120 vins), les méthodes doivent avoir un débit rapide et nécessiter des étapes simplifiées de manipulation.

Jusqu'à présent, le laboratoire ne disposait pas de ce type de méthode pour le dosage des marqueurs de la note fruitée. L'absence de telles méthodes est sans aucun doute un frein à l'étude plus approfondie des phénomènes biochimiques à la base des variations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML. Le développement de nouvelles méthodes sensibles, précises, justes, robustes et rapides s'est donc avéré indispensable à l'étude de l'impact de la FML sur l'arôme fruité des vins rouges, à l'image des récentes méthodes développées pour la détection des principaux défauts olfactifs du vin (Franc *et al.*, 2009).

Trois nouvelles méthodes utilisant les nouvelles techniques de microextraction sur phase solide couplée à la GC/MS ont donc été développées pour le dosage de nombreux marqueurs de la note fruitée des vins. Il s'agit, d'une méthode permettant de quantifier quatre C13-norisoprénoides et six lactones par SBSE-GC/MS, d'une autre pour le dosage de 3 thiols par SPE-SBSE-GC/MS et enfin d'une dernière permettant de doser 32 esters apolaires par HS/SPME-GC/MS. Les esters ayant une importance toute particulière dans la perception de la note fruitée des vins rouges, une base de données sur l'ensemble des esters des vins a été établie.

I. Dosage de quatre C13-norisoprénoïdes (C13NI) et six lactones des vins par SBSE-GC/MS

Les lactones et surtout certains C13NI sont des composés reconnus pour participer de façon synergique à la note fruitée des vins rouges, alors qu'ils sont généralement présents dans les vins à des faibles teneurs. Il s'est donc avéré nécessaire de pouvoir doser avec fiabilité ces composés.

A. Bilan des méthodes existantes

Les C13NI sont des composés aromatiques variétaux qui ont été étudiés de façon relativement importante durant la dernière décennie. De ce fait, un certain nombre de méthodes de dosage plus ou moins spécifiques peuvent être recensées dans la littérature. La grande majorité de ces méthodes utilise la GC/MS mais les techniques d'extraction varient selon les travaux. Ainsi, l'utilisation d'extraction liquide/liquide à l'éther (Kotseridis *et al.*, 1998) ou au dichlorométhane (Falcao *et al.*, 2008) sont possibles. La SPE peut également permettre d'isoler certains C13NI du vin pour pouvoir les quantifier (López *et al.*, 2002). En outre, depuis quelques années, des techniques par microextraction sur phase solide comme l'HS-SPME et la SBSE ont également été utilisées pour doser certains C13NI dans les vins (Alves *et al.*, 2005). Cependant, ces méthodes ne sont pas toujours spécifiques.

La grande majorité des dosages effectués dans la littérature correspondent à des méthodes permettant de quantifier de nombreux composés aromatiques des vins dont certaines lactones. Ces méthodes font appel à différentes techniques d'extraction comme l'extraction liquide/liquide (Rocha *et al.*, 2006) ou encore la SPE (López *et al.*, 2002). A notre connaissance, une seule méthode (SPE-GC/MS) développée spécifiquement pour l'analyse des lactones aliphatiques des vins est recensée dans la littérature (Ferreira *et al.*, 2004).

Les méthodes par microextraction sur phase solide étant souvent plus sensibles et surtout plus rapides, et faciles à mettre en œuvre, il a été choisi de développer une méthode de dosage simultanée des C13NI et des lactones par cette technique.

B. Développement et validation de la méthode

Les lactones concernées par l'étude sont la γ -octalactone, γ -nonalactone, γ -décalactone, δ -décalactone, γ -undécalactone, tandis que les norisoprénoides sont la β -damascone, β -damascénone, la β -ionone et l' α -ionone. La γ -octalactone et la β -damascone ont été inclus dans la liste des composés dosés après l'optimisation des paramètres d'extraction. Les principaux paramètres GC/MS sont regroupés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Paramètre chromatographique et spectrométrique des C13NI et lactones. Temperature d'ébullition (* à 15 mm Hg, ** à 5 mm Hg), coefficient de partage eau/octanol, et ions utilisés en détection SIM (en gras les ions de quantification).

Composés	Abbréviation	T _{eb} (°C)	Log p	Ions (m/Z)
β -damascone	β -dam	200 °C	4,4	192 (123, 177)
β -damascénone	β -d	275 °C	3,3	190 (121, 69)
α -ionone	α -i	238 °C	3,85	136 (121, 93)
β -ionone	β -ia	268 °C	3,75	177 (192)
γ -octalactone	γ -C8	234 °C	1,32	85 (100)
γ -nonalactone	γ -C9	243 °C	1,85	85 (99)
γ -décalactone	γ -C10	153 °C *	2,72	85 (128)
δ -décalactone	δ -C10	281 °C	2,42	99 (70, 114)
γ -undécalactone	γ -C11	281 °C	3,06	85 (128)
γ -dodécalactone	γ -C12	145 °C **	3,45	85 (100, 128)
Cinnamate d'éthyle-d ₅	cinC2-d5	-	-	181 (131)

La première étape a consisté à vérifier la compatibilité de ces méthodes par microextraction sur phase solide pour le dosage des C13NI et des lactones du vin. Une comparaison du rendement d'extraction a été menée entre différents modes d'extraction : 2 extractions liquide/liquide (éther/isohexane et dichlorométhane), 7 fibres SPME différentes et technique SBSE.

Cette dernière s'est avérée être la technique permettant d'avoir le meilleur rendement. Le **Tableau 8** résume les gains de rendement d'extraction de la SBSE par rapport à l'extraction liquide/liquide au dichlorométhane, couramment utilisée pour ces composés, puis par rapport au meilleur mode d'extraction non SBSE (éther/isohexane pour les lactones et SPME avec fibre en carbowax-divinylbenzène pour les C13NI).

Le **Tableau 8** montre l'intérêt d'un développement de la méthode par SBSE, notamment pour les C13NI. En effet, sur ces composés, il existe presque un facteur 100 entre la SBSE et l'extraction au dichlorométhane. Or, il est courant que les teneurs dans les vins, notamment pour l' α -ionone et la β -ionone soient aux limites de détection de la méthode à l'aide du dichlorométhane. Ainsi, la SBSE pourrait permettre de baisser les limites de quantification jusqu'à quelques ng/l. Même si l'effet est moins flagrant, la technique d'extraction-injection par SBSE permet aussi d'améliorer le rendement d'extraction des lactones, en particulier pour les plus apolaires d'entre elles comme l'undécalactone.

Ceci s'explique par le fait que moins le composé est polaire (fort log p), plus il présente d'affinité pour le PDMS qui est la seule phase stationnaire commercialisée pour la SBSE. Les coefficients log p vont de 3,3 à 3,85 pour les C13NI alors que ceux des lactones sont plus faibles (de 1,85 pour la γ -nonalactone à 3,1 pour la γ -undécalactone).

Tableau 8 : Gain de rendement de différents modes d'extraction par rapport à la SBSE. Le meilleur mode (autre que SBSE) correspond à l'extraction à l'éther/isohexane (a) et à l'HS-SPME avec la fibre CW-DVB (b)

Composés	gain SBSE/dichlorométhane	gain SBSE/meilleur mode
γ -nonalactone	4	2,5 (a)
γ -décalactone	15	5,2 (a)
δ -décalactone	6	3,5 (a)
γ -undécalactone	46	13 (a)
β -damascénone	60	9,2 (b)
β -ionone	84	13,3 (b)
α -ionone	92	5,7 (b)

Le développement de la méthode de dosage des C13NI et des lactones du vin a donc été mené par SBSE-GC/MS. Les paramètres d'extraction ont été optimisés. N'existant qu'un seul type de phase stationnaire pour les twisters (PDMS), ce travail a consisté à choisir la taille du barreau SBSE, le temps d'absorption, le volume et le niveau de dilution des échantillons.

La première étape a permis de tester la taille du barreau (twister®) correspondant aux différents volumes de phases stationnaires disponibles. La **Figure 10** montre l'effet de cette taille sur le rendement d'extraction de l'ensemble des composés. Le test a été pratiqué sur des échantillons de 20 ml de vin rouge non dilué dopé à 2,5 μ g/l pour tous les composés. Par ailleurs, le temps d'absorption a été fixé à 1h. Ainsi, il est aisé de remarquer que le twister

avec le plus gros volume de phase stationnaire (126 μl de PDMS) est celui qui offre les meilleurs rendements d'extraction. D'autre part, ce phénomène est une constante quelque soit le composé.

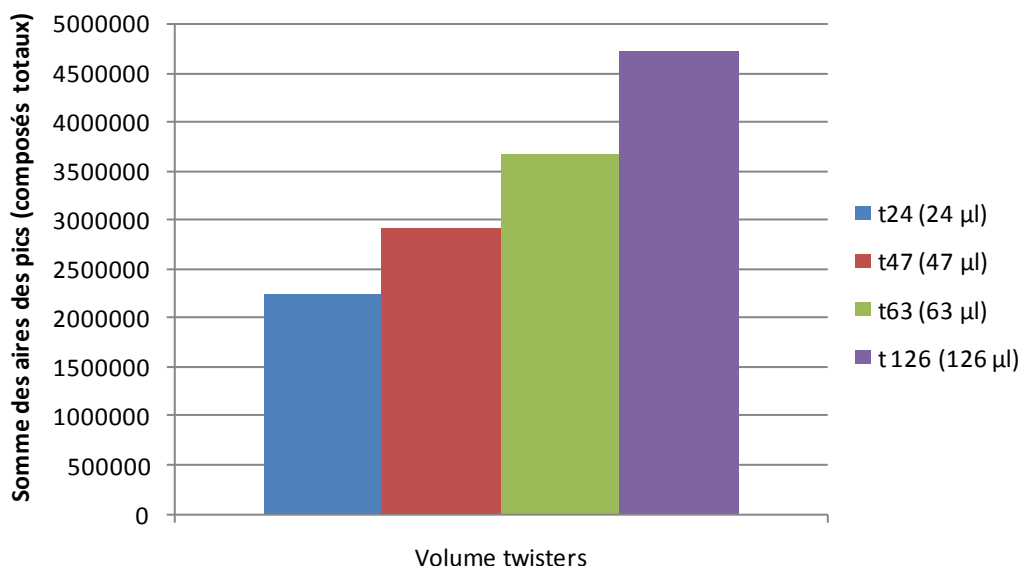


Figure 10 : Effet de la taille du twister (volume de phase stationnaire) sur le rendement d'extraction de l'ensemble des composés

Différents temps d'absorption ont été testés sur les mêmes échantillons de vins rouges (30, 60, 90 et 120 min) avec les grands barreaux SBSE choisis précédemment (126 μl). Il s'est avéré que la durée optimale d'absorption est de 60 minutes. En effet, ce temps permet un meilleur rendement d'extraction que 30 minutes, par ailleurs les gains de rendement obtenus avec des temps supérieurs à 60 minutes sont faibles par rapport à la perte de temps de manipulation. C'est pourquoi, il a été choisi d'utiliser un temps d'absorption d'une heure.

Différents volumes de prise d'essais ont également été évalués (10, 15 et 20 ml). Il s'est avéré qu'il n'y avait pas beaucoup de différences entre ces 3 volumes avec toutefois pour l'ensemble des composés un signal un peu plus important pour un volume d'échantillon de 20 ml.

Enfin, l'effet de dilution a également été testé, en comparant un échantillon non dilué avec un autre dilué au $\frac{1}{2}$. La dilution permet de diminuer la teneur en éthanol pouvant perturber l'extraction du composé par la phase stationnaire du twister. Cependant, dans ce cas, l'échantillon dilué donne un signal 15 à 20 % plus faible que l'échantillon non dilué. La

dilution entraîne ainsi plus, une perte des C13NI et des lactones, qu'elle ne favorise leur extraction.

Les paramètres de désorption n'ont pas été à optimiser car il s'agit des données conseillées par le constructeur (chapitre II-III-C-1).

Le choix de l'étalon interne est un moment très important dans le développement d'une méthode car il est indispensable qu'il soit bien adapté aux composés dosés. Ceci est encore plus vrai avec les techniques de microextraction comme la SBSE et l'HS-SPME qui sont très sensibles aux différences de propriétés physiques et chimiques entre les différentes classes de composés. L'utilisation de composés deutérés analogues aux molécules dosées comme étalon interne est devenue courante en chimie analytique car ils remplissent tous les critères de sélection. Dans le cas des C13-norisoprénoides et des lactones, il était difficile pour des raisons économiques d'utiliser les composés analogues deutérés comme étalon interne. C'est pour cette raison que le choix s'est porté sur des composés déjà présents au laboratoire. Il s'agit du cinnamate d'éthyle-d₅ présentant une structure chimique proche des C13-norisoprénoides, de l'hexanoate d'éthyle-d₅ et de l'octanoate d'éthyle-d₅ qui sont des esters comme les lactones. L'octan-3-ol qui est très souvent utilisé pour l'analyse de composés volatils du vin a également été testé.

Le **Tableau 9** regroupe les coefficients de variation correspondant à des essais de répétabilité sur 10 échantillons de vins dopés à 100 ng/l en lactones et en C13-norisoprénoides. Ces données montrent bien que seul le cinnamate d'éthyle-d₅ donne des résultats globaux satisfaisants (RSD < 12 %). Ce composé a donc été choisi pour être le seul étalon interne de la méthode de dosage des C13-norisoprénoides et des lactones du vin par SBSE-GC/MS.

Tableau 9 : Coefficient de variation (%) lors des essais de répétabilité menés sur 10 échantillons de vin dopé à 100 ng/l pour tous les composés.

	Cinnamate-d ₅	octan-3-ol	Octanoate-d ₅	Hexanoate-d ₅
β -ionone	6,8	29,2	15,8	18,2
β -damascone	7,1	25,0	9,9	21,0
α -ionone	5,8	27,3	11,8	19,6
γ -octalactone	12,1	18,3	21,4	25,6
γ -nonalactone	5,6	22,2	11,5	21,3
γ -decalactone	7,8	26,9	15,6	22,8
γ -undecalactone	8,6	30,5	15,3	22,3
γ -dodecalactone	9,3	30,5	14,4	23,5
δ -decalactone	8,8	27,4	16,4	23,7
β -damascénone	7,4	18,8	8,1	21,6

Tous les paramètres de validation de la méthode sont regroupés dans le **Tableau 10**. La linéarité a été évaluée dans deux vins rouges différents et dans un vin blanc sur une gamme représentative des concentrations en C13NI et lactones généralement retrouvées dans les vins. Les gammes sont linéaires pour l'ensemble des composés avec des coefficients de corrélation allant de 0,9987 à 0,9999. La reproductibilité des gammes est également satisfaisante car les coefficients de variation sont inférieurs à 10 % pour l'ensemble des composés à l'exception de la γ -octalactone (23,7 %).

Les limites de détection et de quantification ont été évaluées manuellement à partir des rapports des hauteurs des pics sur celle du bruit de fond entourant les pics. Ces limites analytiques varient selon le composé considéré avec, par exemple, des LOQ qui s'étendent de 250 ng/l à 8 ng/l. Elles sont toutes inférieures aux seuils de perception des composés correspondants.

La répétabilité de la méthode a été calculée sur 14 échantillons identiques d'un vin rouge dopé (chapitre II-III-C-1). Les coefficients de variation sont inférieurs à 10 % pour tous les composés, excepté pour la γ -octalactone (36 %).

La reproductibilité a été mesurée sur 10 échantillons identiques à ceux analysés lors de l'essai de répétabilité. Ils ont été analysés sur une période de deux semaines. Les résultats du **Tableau 10** montrent que les coefficients de variation sont tous inférieurs à 10 %, excepté pour la γ -décalactone (12 %) et la γ -octalactone (30 %).

Enfin, la justesse de la méthode a été évaluée en calculant les taux de recouvrements à partir d'une addition de C13NI et de lactones à des niveaux connus. La spécificité de la méthode a également été testée en appliquant des essais de justesse à différents types de matrices (vin rouge, vin blanc sec, vin blanc liquoreux, solution hydroalcoolique). Les taux de recouvrements sont satisfaisants car ils sont tous proches de 100 %.

La méthode de dosage de quatre C13NI et de six lactones du vin est donc validée avec toutefois une approximation pour la γ -octalactone. Toutefois, cette méthode se révèle être performante et fiable car elle est sensible, linéaire, répétable, reproductible et juste pour différents types de vins sur tous les composés dosés à l'exception de la γ -octalactone.

Tableau 10 : données de validation de la méthode de dosage des C13NI et lactones : linéarité (n =3), limites analytiques, répétabilité (n = 14), reproductibilité (n = 10), justesse (n = 7).

Composés	Gamme linéarité (µg/l)	R ²	CV (%) linéarité	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)	CV (%) répétabilité	CV (%) reproductibilité	Recouvrement (%)	CV (%) recouvrement
β-ionone	0,01 à 10	0,9990	8,6	2	8	4,3	3	94	5
β-damascone	0,01 à 10	0,9996	5,7	5	15	5,3	6	100	5
α-ionone	0,01 à 10	0,9992	9,9	5	15	5,9	9	95	5
γ-octalactone	0,25 à 250	0,9992	23,7	85	250	36,0	30	100	20
γ-nonolactone	0,25 à 250	0,9998	7,5	16	50	4,3	3	100	15
γ-décalactone	0,25 à 250	0,9999	6,9	7	20	4,6	12	101	4
γ-undécalactone	0,005 à 5	0,9998	6,7	3	10	4,4	6	105	6
γ-dodécalactone	0,005 à 5	0,9996	5,1	3	10	3,8	4	103	5
δ-décalactone	0,25 à 250	0,9997	2,3	25	70	5,4	9	96	8
β-damascénone	0,01 à 10	0,9987	7,6	10	35	6,7	3	96	10

II. Développement d'une méthode de dosage de certains thiols dans les vins rouges par SPE-SBSE-GC/MS

Très important dans l'arôme typique de nombreux vins blancs, certains thiols participent également activement dans la complexité aromatique des vins rouges et tout particulièrement celle de la note fruitée. Le principal composé impliqué est le 3-sulfanylhexanol (3SH) qui est présent dans les vins rouges à des niveaux largement supérieurs à son seuil de perception (Blanchard, 2000). Cependant, les interactions physico-chimiques et perceptives sont telles dans les vins rouges, que le 3SH n'est pas directement perçu dans ces vins mais plutôt de façon indirecte en relevant la note fruitée (Ferreira *et al.*, 1998).

Deux autres thiols sont intéressants dans le cadre de ces travaux. Il s'agit du 2-sulfanylpropionate d'éthyle (2SPE) identifié dans les vins rouges (Blanchard, 2000) et du 3-sulfanylpropionate d'éthyle (3SPE) identifiés dans les vins de cépage hybride Concorde (*Vitis labrusca*), et dont la synthèse par certaines BL du fromage a été récemment montrée (Sourabié *et al.*, 2008).

Il s'est avéré nécessaire de pouvoir doser ces 3 composés dans les vins rouges étudiés et, une méthode spécifique a dû être mise au point.

A. Bilan des méthodes existantes

De nombreux travaux ont été consacrés ces dernières années au développement de méthodes de dosage des thiols dans les vins. Cependant, étant à la fois très réactifs et présents à des niveaux très faibles dans les vins, la quantification de ces composés est souvent difficile et finalement peu de méthodes utiles sont présentées.

Les premières méthodes utilisées se sont basées sur l'extraction des mercaptans du vin par la formation d'un complexe réversible entre les thiols et du *p*-hydroxymercurybenzoate (Tominaga *et al.*, 1998a) ou par rétention sur une phase stationnaire (Schneider *et al.*, 2003). Le principal inconvénient de ces méthodes est que les protocoles sont longs et complexes avec certaines étapes qui restent délicates. De plus, elles nécessitent de gros volumes de solvant, ce qui avec l'utilisation de composés carcinogènes, comme les dérivés mercuriques,

est une limite importante du point de vue environnemental et sanitaire. Tous ces inconvénients et le fait qu'un grand volume d'échantillon (500 ml) soit également nécessaire, rendent ces méthodes incompatibles avec notre cadre de travail.

D'autres auteurs ont développés plus récemment différentes méthodes en dosant les thiols par extraction SPE, SPME ou Purge and Trap couplée à la GC/MS en mode d'ionisation par impact électronique (IE) (Fedrizzi *et al.*, 2007; Fedrizzi *et al.*, 2008). Cependant, les LOQ de ces méthodes s'avèrent bien au-dessus du seuil de perception de ces composés.

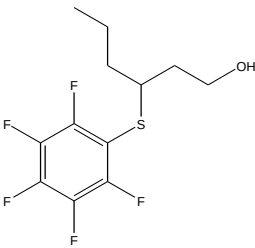
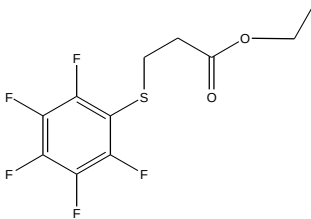
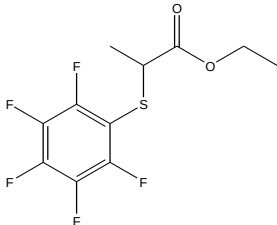
Une nouvelle approche analytique a également été développée ces dernières années en utilisant la dérivation chimique des thiols par le PFBBBr. Cet agent de dérivation est connu depuis longtemps pour former de manière sélective, des dérivés stables de molécules volatiles de faible poids moléculaire instables, présentes à l'état de traces dans des matrices complexes (Knapp, 1979). De plus, les dérivés formés sont généralement très bien adaptés à la détection par spectrométrie de masse (Knapp, 1979). De nombreux travaux ont été menés sur cette voie de dérivation. Une méthode simple et automatisée de dérivation sur fibre SPME a notamment été développée mais les résultats n'ont pas été performants pour certains thiols comme le 3SH (Mateo-Vivaracho *et al.*, 2006). Ce problème a été résolu avec le développement d'une méthode par extraction liquide/liquide au benzène avant dérivation dans le solvant d'extraction (Mateo-Vivaracho *et al.*, 2007). Bien que la sensibilité soit nettement améliorée pour des composés comme le 3SH (au-dessous du seuil de perception), l'utilisation en laboratoire d'un solvant cancérigène comme le benzène est interdit en France.

L'utilisation de l'extraction sur phase solide (SPE) a permis de régler certains de ces problèmes d'ordre environnemental tout en conservant la performance analytique. Mateo-Vivaracho *et al.* (2008) ont ainsi développé une méthode permettant de retenir les thiols de façon spécifique sur phase adsorbante SPE et de les dériver avec le PFBBBr directement sur la cartouche SPE. Cette méthode permet notamment de limiter l'excès de réactifs dans l'extrait final, ce qui a pour effet non seulement d'améliorer la sensibilité mais aussi de préserver beaucoup mieux l'appareillage (colonne GC et chambre d'ionisation MS). Cependant, les auteurs ont rapporté la persistance de certains effets de matrice entraînant des problèmes de linéarité et de répétabilité. D'autres auteurs ont finalement pu s'affranchir de ces problèmes de matrice en couplant l'extraction et la dérivation sur cartouche SPE avec la sélectivité de la SPME (Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2009). De plus, cette méthode limite la prise d'essai à 100 ml et elle a été notamment validée pour le 3SH dans tout type de vin (blanc, rouge, rosé).

Cependant, la spectrométrie de masse par ionisation chimique (IC) utilisée dans ces méthodes, est un facteur important pour l'obtention de basses LOQ nécessaires pour le dosage des thiols dans les vins. Or, n'ayant pas la possibilité d'utiliser ce mode d'ionisation, il a fallu trouver un moyen de compenser le manque de sensibilité de détection pour espérer obtenir des LOQ satisfaisantes au dosage du 3SH, 2SPE et 3SPE dans les vins rouges étudiés.

Comme cela a été évoqué précédemment, l'utilisation de la SBSE s'avère tout à fait bien adaptée au dosage de composés apolaires en matrice aqueuse. Or, les thiols dérivés par le PFBBBr forment des composés de très faibles polarités comme en témoignent leurs coefficients $\log p$ estimés par un logiciel disponible en ligne sur internet (<http://www.molinspiration.com/services/logp.html>) (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Caractéristiques physico-chimiques, chromatographiques et spectrométriques des thiols dérivés par le PFBBBr. Les conditions expérimentales de l'analyse sont décrits au chapitre 2-III-C-3. Colonne CPG polaire (BP21), et les ions de quantifications sont représentés en gras, les autres ions servant à l'identification.

Nom du composé non dérivé	Structure chimique du composé dérivé	M (g/mol)	$\log p$	Tr (min)	Ions
3SH		314	4,026	55,6	314 227 181
3SPE		314	3,163	47,3	133 314 181
2SPE		314	3,564	41,2	102 241 314 181

Bien que les 2SPE et 3SPE n'aient pas été étudiés lors du développement de cette méthode, elle demeure toutefois la plus adaptée à notre cadre de travail. Il a donc été choisi d'adapter la méthode de dosage développée par Rodriguez-Bencomo *et al.* (2009) en utilisant la SBSE et la spectrométrie de masse par IE en lieu et place de la SPME et de la spectrométrie de masse par IC.

B. Développement d'une méthode de dosage du 3SH, 2SPE et 3SPE par SPE-SBSE-GC/MS

La première étape a été de synthétiser les dérivés pour pouvoir les injecter directement dans le but de connaître leurs caractéristiques chromatographiques (Tr) et spectrométriques (spectre de masse) nécessaires à leur identification. Le protocole de synthèse est décrit au chapitre II-III-C-2 et certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques, chromatographiques et spectrométriques sont regroupées dans le **Tableau 11**.

Les coefficients log p étant proches de ceux des C13NI et en fonction des résultats précédemment obtenus, nous avons estimé que la taille de barreau SBSE la mieux adaptée pour récupérer les thiols dérivés était celle de 126 µl. De la même façon, le volume et le temps d'agitation ont été respectivement fixés à 20 ml et 1h.

Pour vérifier l'intérêt de la SBSE au regard des coefficients log p calculés, un mélange des 3 thiols dérivés a été analysé afin d'estimer les limites analytiques potentielles de ces composés (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Limites de quantifications (LOQ) des 3SH, 3SPE, 2SPE et de leurs dérivés.

Composés	LOQ des composés dérivés (ng/l)	LOQ estimée des composés (ng/l)
3-SH	110	20
3-SPE	45	10
2-SPE	25	5

Les LOQ potentielles estimées correspondent aux LOQ atteintes pour un rendement d'extraction, de réaction et de récupération post dérivation de 100 %. Elles sont toutes au-dessous de leurs seuils de perception, respectivement de 60 ng/l (3SH), 200 ng/l (3SPE) et 500 ng/l (2SPE).

Ces premiers résultats montrent que la technique SBSE-GC/MS est très bien adaptée à la récupération des 3 thiols dérivés, à des niveaux compatibles avec les données olfactives et à aux teneurs respectives généralement rencontrées dans les vins rouges (Blanchard, 2000).

La dérivation des thiols directement sur la cartouche SPE a ensuite été testée en solution hydroalcoolique à 12 %. Le protocole a été conçu par Mateo-Vivaracho *et al.* (2008) mais l'adaptation des quantités de réactifs percolées par rapport aux volumes des cartouches, ici utilisées, a été initiée par Rodriguez-Bencomo *et al.* (2009).

Le principe de cette synthèse consiste tout d'abord à percoler les thiols sur la phase stationnaire qui est un copolymère polystyrène-divinylbenzène avec une faible surface spécifique. Le DBU qui est une base organique forte est ensuite ajouté afin de déprotonner la fonction thiol. Le DBU est dilué à 6,7 % dans l'eau car l'eau va permettre de stabiliser l'ion thiolate formé (Mateo-Vivaracho *et al.*, 2008). L'agent de dérivation (PFBBBr), dilué dans l'isohexane, est ensuite percolé. La réaction de dérivation est réalisée rapidement à température ambiante (20 min), par substitution nucléophile SN_2 de l'ion thiolate sur le PFBBBr. Les thiols dérivés formés, l'étape suivante consiste à éliminer l'agent de dérivation en excès en utilisant la même réaction avec un autre thiol. Ainsi, une solution de thioglycérol préparée dans le DBU à 6,7 % dans l'eau est chargée dans la cartouche. Cette nouvelle réaction est également réalisée à température ambiante, pendant 20 min. L'élimination de tous les réactifs est réalisée en passant un certain volume d'un mélange Méthanol/ H_3PO_4 (0,2 M) (60 : 40). Après un rinçage de la cartouche à l'eau, les thiols dérivés synthétisés sont ensuite élués par un mélange éther diéthylique/isohexane (3 : 1), l'isohexane remplaçant là-aussi l'hexane initialement utilisé, pour les raisons de moindre toxicité.

Dans notre cas le principe de la synthèse reste le même, mais il a fallu adapter la fin du protocole à l'utilisation de la SBSE. Pour ce faire, l'éluat contenant les thiols dérivés est décanté afin de limiter la phase aqueuse restante. La phase organique est récupérée puis évaporée à l'évaporateur rotatif, en évitant d'amener complètement à sec. L'extrait est ensuite repris avec 20 ml d'eau pour analyse SBSE-GC/MS.

Des essais ont été menés pour voir l'influence de l'évaporation ainsi que la présence de petites quantités de solvant organique dans le milieu d'absorption du barreau SBSE. L'évaporation mène à une certaine perte des dérivés mais qui reste raisonnable si elle est menée de manière relativement douce (pas de chauffage, vide limité à 250 mbar et pas d'évaporation à sec). En outre, la présence de petites quantités de solvant organique (environ 500 µl) présent dans la solution aqueuse de thiols dérivés n'a pas d'influence sur le rendement d'absorption en SBSE.

Les essais sur cartouche SPE ont d'abord été réalisés à partir de 10 ml de solution hydroalcoolique de thiols à 50 µg/l afin de vérifier si la synthèse des dérivés sur phase stationnaire était effective. Dans ces essais, il est important que les solutions utilisées soient aqueuses et non alcooliques sous peine de diminuer fortement le rendement de la réaction. La synthèse des dérivés des 3 thiols initialement introduits en solution modèle est effective. Les essais ont pu alors être réalisés à partir de 10 ml de vin rouge supplémenté avec 50 µg/l de thiols.

La présence dans le vin rouge de nombreux composés, comme des acides gras, pouvant interagir sur la synthèse des thiols dérivés induit la nécessité de réaliser certaines étapes supplémentaires préalablement à la réaction de dérivatisation. Le vin doit initialement être mis à pH 7 afin de déprotonner le plus possible les acides gras qui pourraient venir perturber la réaction de dérivatisation. Pour s'assurer de l'élimination la plus complète de ces composés, un rinçage après percolation de la cartouche SPE avec le vin est réalisé par un mélange méthanol/tampon phosphate (pH 7,7; 0,2 M) (40 : 60). Le protocole ainsi adapté mène bien à la synthèse des dérivés. Ces essais réalisés dans le vin permettent d'effectuer le choix des ions de quantification et de qualification en spectrométrie de masse (**Tableau 11**).

Afin de simplifier le protocole, des essais ont été réalisés sans le rinçage avec le mélange méthanol/tampon phosphate préalable à la réaction de dérivatisation. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'impact sur la quantité de thiols dérivés récupérés. Ainsi, cette étape de rinçage a été supprimée du mode opératoire. De plus, pour limiter le volume d'échantillon à percoler, la prise d'essai est diminuée à 50 ml au lieu de 100 ml initialement préconisés. Un essai réalisé dans un vin rouge commercial non dopé indique que le protocole adapté permet d'avoir une sensibilité suffisante pour quantifier les 3 thiols étudiés dans les vins rouges.

Les étalons internes les plus adaptés pour ce type de méthode d'analyse sont sans conteste les thiols deutérés analogues des composés dosés. Il s'agit d'ailleurs des étalons internes utilisés par Rodriguez-Bencomo *et al.* (2009) et Mateo-Vivaracho *et al.* (2008). Cependant, pour des raisons économiques leur synthèse n'a pas pu être effectuée. Le choix s'est donc porté sur deux thiols non présents dans les vins : le 4-méthoxy-2-méthylbutan-2-thiol (MMBT) et le 2-méthyl-3-tétrahydrofuranthiol (MTHF). Le MMBT est utilisé comme étalon interne dans la méthode de dosage des thiols développée par Tominaga *et al.* (1998) alors que le MHTF a été testé comme étalon interne au cours du développement de méthode fait par Mateo-Vivaracho *et al.* (2008). Ils ont tous les deux été testés en étant introduits dans le vin à une concentration de 40 µg/l. En conduisant à une meilleure répétabilité d'analyse du 3SH, le MHTF s'est révélé être le composé le plus adapté (RSD = 22,4 % contre 38,7 % pour le MMBT). En effet, le 3SH étant le thiol certainement le plus impliqué dans la perception de la note fruitée des vins rouges, il a été choisi de développer la méthode pour qu'elle soit la plus fiable possible pour la quantification de ce composé.

Par manque de temps et surtout à cause de nombreux problèmes de sensibilité, la validation de la méthode développée n'est pas complète. Toutefois, une étude de linéarité entre 0,2 µg/l et 20 µg/l a néanmoins été menée afin de pouvoir estimer les concentrations des 3 thiols dans les vins rouges étudiés. Les problèmes analytiques rencontrés ont fait que la linéarité n'a porté que sur 3 points pour le 3SH et le 3SPE et sur 4 points pour le 2SPE. Les coefficients de corrélation obtenus sont de 0,9239 pour le 3SH, 0,9764 pour le 3SPE et 0,9361 pour le 2SPE.

C. Discussion

Malgré tous les problèmes analytiques rencontrés induisant un certain manque de fiabilité, cette méthode de dosage a été utilisée sur quelques vins rouges de l'étude afin d'évaluer l'influence de la FML sur le 3SH, le 3SPE et le 2SPE. Le 3SH a pu ainsi être dosé, les teneurs en 3SPE et 2SPE paraissant moins fiables, il a été préféré d'estimer les variations de ces composés sur les rapports d'aires plutôt que sur leur concentration.

Cette difficulté de dosage ne remet pas en cause l'intérêt de la SBSE pour quantifier les thiols des vins rouges après dérivation au PFBBBr. En effet, nous avons montré que les LOQ potentielles avec cette technique d'extraction étaient tout à fait satisfaisantes, même en

mode d'ionisation IE. Le problème vient très probablement de la synthèse des dérivés sur la phase stationnaire SPE qui nécessite vraisemblablement une certaine expérience comme c'est souvent le cas pour l'analyse des thiols.

En outre, la difficulté de dosage des thiols dans les vins rouges est récurrente. En effet, de nombreux travaux ont été menés pour déterminer les teneurs en thiols dans les vins blancs secs ou liquoreux. En revanche, il existe très peu de données sur les teneurs dans les vins rouges. Vu l'importance dans la qualité aromatique de ces vins, ce constat n'est certainement pas dû à un manque d'intérêt, mais plutôt à des difficultés analytiques.

Il a été montré que le 3SH était très facilement oxydé par certains composés phénoliques en présence d'oxygène et de fer (III) (Blanchard, 2000; Nikonantolaki *et al.*, 2010). D'autres composés comme le dioxyde de soufre et les anthocyanes peuvent limiter cette oxydation (Blanchard, 2000; Nikolantonaki *et al.*, 2010). Les vins rouges étant plus riches en polyphénols, l'extraction des thiols est certainement beaucoup plus soumise à des effets de matrice que dans les vins blancs. Ceci conduit à plus de problèmes analytiques lorsqu'il s'agit de les quantifier.

III. Dosage simultané de 32 esters apolaires par HS/SPME-GC/MS

Les études les plus récentes sur la perception de l'arôme fruité des vins rouges montrent que les esters ont un rôle central dans les phénomènes de synergie qui semblent gouverner la perception de cette note aromatique (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2009). Des petites variations de certains de ces esters (quelques µg/l) peuvent être perçues lorsqu'ils sont en mélange même à des niveaux bien inférieurs à leur seuil de perception (Pineau *et al.*, 2009).

Un certain nombre d'esters sont étudiés dans les vins depuis de nombreuses années, d'autres plus récemment, mais finalement une vingtaine d'entre eux font l'objet de dosages réguliers dans la littérature. Les familles concernées sont les esters éthyliques d'acides gras (EEAG), les acétates d'alcools supérieurs (AAS), les esters d'acides branchés (EEAB), les cinnamates ainsi que les esters d'acides fixes tels le lactate d'éthyle (LE) et le succinate de diéthyle (SDE), ces derniers présentant moins d'intérêt au niveau olfactif. Cependant, il existe de nombreux autres esters qui ont seulement été identifiés, mais très peu quantifiés et surtout jamais étudiés dans les vins. Bien que la plupart de ces esters peu connus, soient à des niveaux de concentration bien plus faibles que les esters précédemment cités, ils pourraient néanmoins participer aux phénomènes synergiques responsables de la note fruitée des vins rouges. Parmi eux, nous pouvons citer les esters méthyliques (EM), les esters éthyliques d'acides gras à nombre impair de carbone (EENIC) ou encore certains esters isoamyliques (EI).

Ainsi, toutes ces données et les recherches poursuivies dans ce travail, induisent la nécessité de pouvoir doser un maximum d'esters avec la plus grande fiabilité à de faibles niveaux de concentration.

A. Bilan des méthodes de dosage existantes

De nombreuses méthodes permettant de quantifier ces composés peuvent être recensées dans la littérature. Des esters comme certains EEAG, AAS ou encore le LE et le SDE sont présents dans les vins à des teneurs supérieures au milligramme par litre. Pour les doser, des méthodes utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection

par ionisation de flamme (GC-FID) ont été souvent utilisés (Bertrand A., 1981; Ortega *et al.*, 2001; Falcao *et al.*, 2008). Depuis quelques années, la plupart des méthodes dosant les esters dans les vins utilisent le couplage GC-MS. En revanche, le mode d'extraction utilisé varie selon les études. Le plus répandu est l'extraction liquide-liquide utilisant différents solvants. Cela peut être un mélange éther diéthylique/isoheptane (1 : 1) (Bertrand, 1981), le dichlorométhane (Kotseridis et Baumes, 2000), ou encore le Fréon 113 (Ferreira *et al.*, 1993). Mais depuis quelques années, de nouvelles techniques plus sensibles ont été développées. Il s'agit de méthodes comme l'extraction sur phase solide (SPE) (López *et al.*, 2002) ou encore les techniques de microextraction sur phase solide comme la SPME (Rocha *et al.*, 2001; Vianna et Ebeler, 2001; Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2008) et la SBSE (Alves *et al.*, 2005).

De toutes ces techniques d'extraction, la SPME et la SBSE sont les plus sensibles, précises et rapides. De plus, elles réduisent largement le temps de manipulation et la consommation de solvant.

Cependant, la grande majorité des méthodes recensées dans la littérature ne sont pas spécifiques à l'analyse des esters. Il s'agit souvent de méthodes dosant une large gamme de composés de familles différentes dont les esters font partie. Les étalons internes alors employés ne sont pas spécifiques aux esters, ce qui entraîne un manque de précision et de robustesse certain (Siebert *et al.*, 2005). Ce constat est encore plus vrai, lorsqu'il s'agit de méthodes employant les techniques de microextraction sur phase solide. En outre, la plupart des méthodes utilisant ces techniques (SPME, SBSE) sont semi-quantitatives et ne permettent pas de doser réellement les esters (Alves *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008). Les rares études dosant spécifiquement les esters ne concernent finalement que les esters les plus abondants soit une douzaine (Vianna et Ebeler, 2001; Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2002).

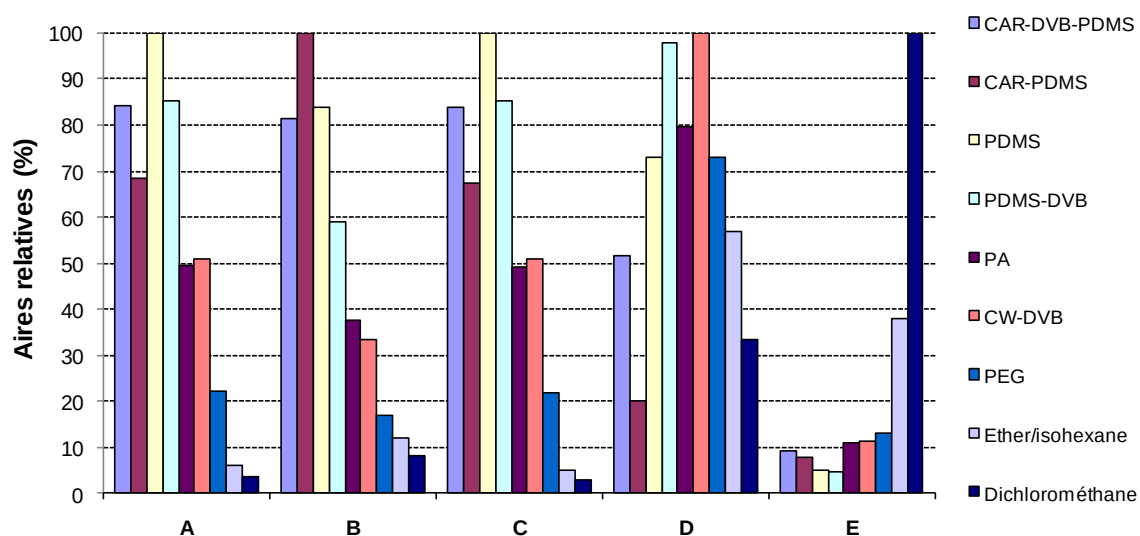
Une méthode sensible, juste, précise, robuste et rapide permettant de doser un nombre plus important d'esters a donc été développée.

Tableau 13 : Paramètre chromatographique et spectrométrique des esters étudiés. Indice de rétention (sur colonne BP21), température d'ébullition (* à 14 mm Hg), coefficient de partage eau/octanol (* calculée), et ions utilisés en détection SIM (en gras les ions de quantification)

N°	Esters	Abbréviation	IR (BP21)	T _{eb}	log p	Ions (m/Z)
1	Propionate d'éthyle	C3C2	987	99 °C	1.21	102/57/75
2	Isobutyrate d'éthyle	iC4C2	992	112 °C	1.77	116/88/71
3	Acétate de propyle	C2C3	995	102 °C	1.24	61/43
4	Butyrate de méthyle	C4C1	1002	102 °C	1.29	74/87/71
5	Acétate d'isobutyle	C2iC4	1017	116 °C	1.78	56/43
6	Butyrate d'éthyle	C4C2	1034	120 °C	1.85	88/71/60
7	2-methylbutyrate d'éthyle	2mC4C2	1046	133 °C	1.59	102/57/85
8	Isovalerate d'éthyle	iC5C2	1064	132 °C	2.26	88/85/57
9	Acétate de butyle	C2C4	1070	125 °C	1.78	56/43
10	Acétate d'isoamyle	C2iC5	1114	142 °C	2.26	70/55/43
11	Valérate d'éthyle	C5C2	1119	145 °C	2.34	85/88/101
12	Hexanoate de méthyle	C6C1	1175	151 °C	2.34	74/87/99
13	Hexanoate d'éthyle	C6C2	1226	167 °C	2.83	88/99/60
14	Butyrate d'isoamyle	C4iC5	1250	179 °C	3.25	71/70/55
15	Acétate d'hexyle	C2C6	1258	171 °C	2.83	56/43
16	Heptanoate d'éthyle	C7C2	1320	189 °C	3.32	88/101
17	trans-2-hexénoate d'éthyle	HexC2	1331	183 °C	2.91	99/97/55
18	Hexanoate d'isobutyle	C6iC5	1340	177 °C	3.71	99/56/71
19	Octanoate de méthyle	C8C1	1363	195 °C	3.32	74/87/127
20	Octanoate d'éthyle	C8C2	1420	207 °C	3.81	88/101/127
21	Hexanoate d'isoamyle	C6iC5	1437	220 °C	4.23	99/70
22	Acétate d'octyle	C2C8	1450	210 °C	3.81	56/43
23	Nonanoate d'éthyle	C9C2	1508	229 °C	4.43	88/101
24	Décanoate de méthyle	C10C1	1542	224 °C	4.41	74/87
25	Décanoate d'éthyle	C10C2	1591	243 °C	4.96	88/101
26	Octanoate d'isoamyle	C8iC5	1607	268 °C	5.31	127/70
27	trans-geranate de méthyle	gerC1	1647	248 °C	3.97	114/69
28	Phenylacetate d'éthyle	PhC2C2	1753	229 °C	2.50	91/105
29	Acétate de 2-phényléthyle	C2PhC2	1789	239 °C	2.27	104/91/43
30	Dodécanoate d'éthyle	C12C2	1832	271 °C	5.71	88/101
31	Dihydrocinnamate d'éthyle	dhCinC2	1871	248 °C	2.73	104/91/178
32	Cinnamate d'éthyle	CinC2	2122	272 °C	2.99	176/131
33	3-hydroxybutyrate d'éthyle	3OHC4C2	1485	173 °C	0.31	87/88/117/71
34	2-hydroxyhexanoate d'éthyle	2OHC6C2	1554		1.9*	69/87
35	3-hydroxyhexanoate d'éthyle	3OHC6C2	1637	102 °C*	1.04	117/89/71
36	6-hydroxyhexanoate d'éthyle	6OHC6C2	2026		1.3*	88/97/101/115
37	Lactate d'éthyle	LE	1344	154 °C	- 0.18	45/75
38	Succinate de diéthyle	SDE	1652	218 °C	1.26	101/129
39	Butyrate d'éthyle-d5	C4C2D	1032			93/106
40	hexanoate d'éthyle-d5	C6C2D	1221			106/93
41	Octanoate d'éthyle-d5	C8C2D	1412			106/93
42	Cinnamate d'éthyle-d5	CinC2D	2117			181/131

B. Développement et validation de la méthode

Un premier essai effectué dans un vin rouge par HS/SPME-GC/MS avec une fibre PDMS a permis de recenser un certain nombre d'esters. Une liste de 41 composés a ainsi été dressée comprenant les principaux esters du vin (EEAG, AAS, EEAB, Cinnamates, LE, SDE), certains esters polaires rarement étudiés (MSE, 3OHC4C2) et une quinzaine d'esters pratiquement jamais quantifiés dans les vins (EM, EENIC, EI, hexanoate d'isobutyle, hexénoate d'éthyle, géranoate de méthyle et certains esters hydroxylés). Les différents paramètres chromatographiques et spectrométriques sont regroupés dans le **Tableau 13**. La première étape a été de déterminer le mode d'extraction le plus adapté à l'ensemble de ces esters. Sept fibres SPME différentes et deux solvants d'extraction ont d'abord été testés. Bien que les esters appartiennent à la même famille chimique, certaines de leurs propriétés physiques et chimiques diffèrent (**Tableau 13**). Ainsi, les conditions optimales d'extraction varient de façon importante selon la classe d'esters considérée (**Figure 11**).



A: Esters totaux (1 à 41) B: Esters apolaires saturés les plus volatiles (1 à 15), C: Esters apolaires saturés les moins volatiles (16 à 27 et 30), D: esters apolaires aromatiques (28, 29, 31, 32), E: esters polaires (33 à 41)

Figure 11 : Aires relatives des pics de différents groupes d'esters (A, B, C, D, E) en fonction du mode d'extraction (nature de la fibre SPME et du solvant d'extraction), exprimées pour chaque groupe d'esters en pourcentage du rapport entre les aires absolues des pics et la plus grande aire absolue. Essais effectués dans un vin rouge commercial

Le premier constat est que les esters sont beaucoup mieux extraits par HS/SPME que par extraction liquide/liquide avec un rendement 15 à 30 fois supérieur. Seuls les esters polaires restent mieux extraits avec les méthodes traditionnelles liquide/liquide et notamment celle utilisant le dichlorométhane. Ce groupe d'esters ne sera donc pas concerné par le développement de cette méthode de dosage. Néanmoins, ils ont été dosés au cours de nos travaux par le biais d'une méthode permettant de quantifier certains composés polaires du vin par GC/MS et extraction liquide/liquide au dichlorométhane (chapitre II-III-B-2).

Les 32 esters apolaires sélectionnés (**Tableau 13**, n° 1 à 32) n'ont pas forcément tous la même affinité envers les fibres SPME testées, démontrant ainsi la variabilité de leurs propriétés physiques et chimiques (polarité, température d'ébullition) malgré leur appartenance à la même famille de composés.

Toutefois, un compromis a été trouvé avec l'utilisation de la fibre en PDMS (100 µm) qui est celle permettant de façon globale la meilleure extraction des esters apolaires.

Une comparaison a ensuite été faite entre l'extraction des esters apolaires d'un vin rouge par HS/SPME (PDMS) et SBSE. Les résultats montrent que la SBSE a un meilleur rendement, mais seulement d'un facteur 3 sur l'ensemble des esters testés. De plus, certains problèmes chromatographiques (dédoublage de pics) apparaissent en SBSE pour les esters apolaires les plus abondants (C6C2, C8C2, C10C2). Ainsi, le gain moyen de rendement étant limité en SBSE, il a été décidé de développer la méthode de dosage des 32 esters apolaires par HS/SPME-GC/MS en utilisant la fibre en PDMS (100 µm).

Les conditions optimales d'adsorption en HS/SPME (temps et température) ont ensuite été recherchées en fixant la température de désorption à 250 °C. Quatre températures et cinq temps différents d'adsorption ont été testés (**Figures 12X et 12Y**). Les profils des températures d'extraction des esters (**Figure 12X**) montrent une légère diminution du rendement d'extraction entre 30 °C et 40 °C, qui devient plus importante après 40 °C. Seul le groupe des esters aromatiques a un comportement différent avec une légère augmentation du rendement entre 30 °C et 40 °C, avant qu'il ne se stabilise après 40 °C. Le meilleur rendement pour la majorité des esters est atteint dès 30 °C. Cependant, la régulation de la température du four d'adsorption est plus difficile à 30 °C. Pour de longues séquences analytiques, les résultats sont plus robustes pour une température choisie de 40 °C, pour laquelle les rendements sont également meilleurs vis à vis des esters aromatiques.

En outre, le rendement optimal d'extraction à 40 °C est très vite atteint pour les esters les plus légers (10 min), mais cela met plus de temps pour les esters les moins volatiles (45 min), alors que pour les esters aromatiques il est atteint à partir de 60 min (**Figure 12Y**). Le principe de l'HS/SPME repose sur un équilibre entre la volatilité des composés et leur affinité pour la fibre, qui est en permanence déplacé et influencé par la température. Lorsque la capacité d'adsorption maximale de la fibre SPME est atteinte, une désorption peut s'amorcer sous l'influence de la température. Pour une température donnée, ce phénomène intervient au bout de délais qui diffèrent selon la volatilité des composés et le type d'interactions avec la fibre. Ainsi, le rendement d'extraction chute à partir de 45 min d'extraction à 40 °C pour la majorité des esters à l'exception des esters aromatiques. Un temps d'adsorption de 30 min semble ainsi plus adapté, car les résultats sont certainement plus robustes à 30 min qu'à 45 min.

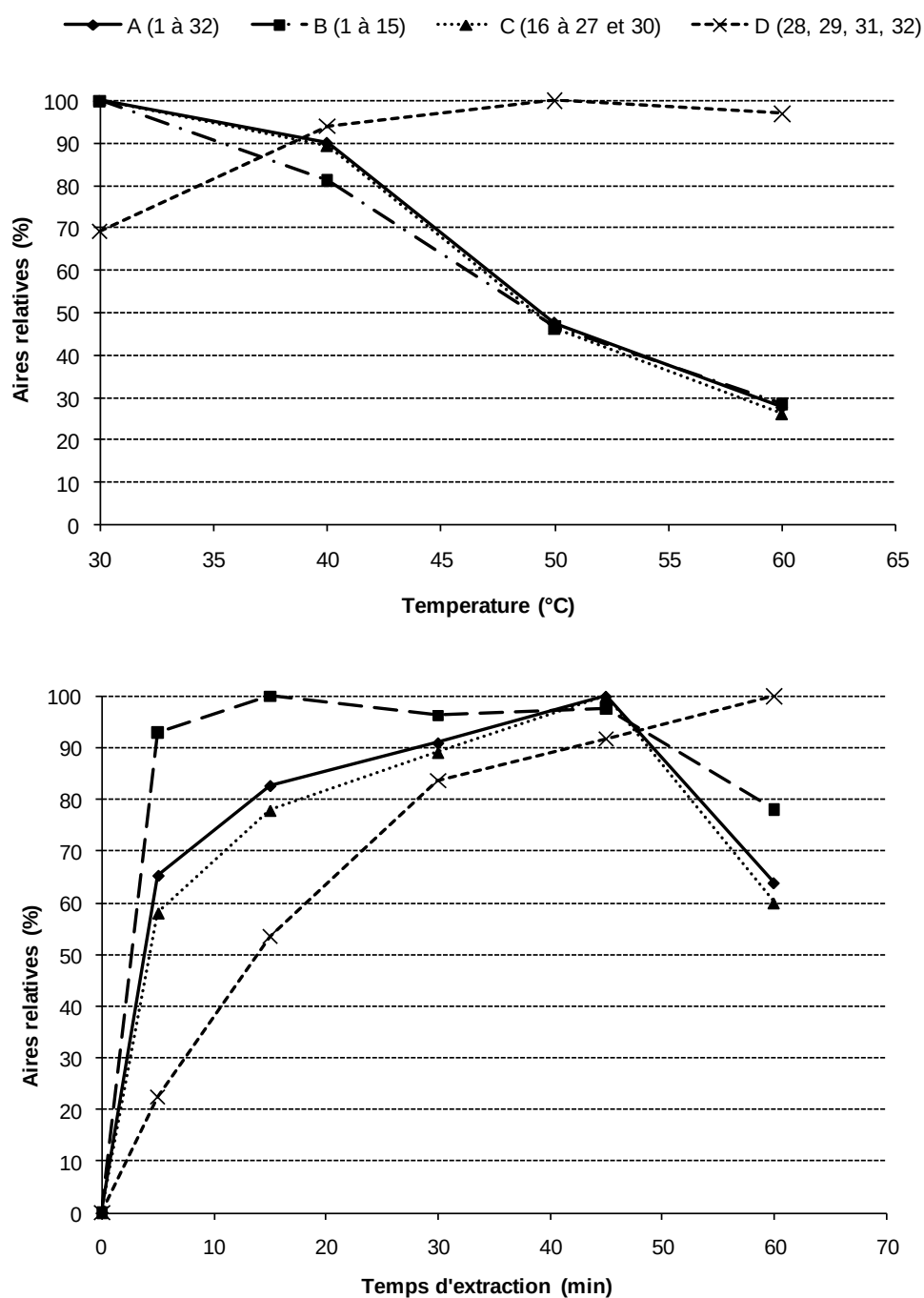
Les paramètres d'adsorption ont donc été optimisés pour une température de 40 °C et un temps de 30 min.

D'autres paramètres pouvant potentiellement influencer le rendement d'extraction ont été testés comme la dilution de l'échantillon et la force ionique du sel ajouté. La dilution du vin n'a ici aucun effet excepté pour un facteur ¼ où une diminution du rendement est alors constatée. De la même façon, le remplacement du chlorure de sodium par du sulfate d'ammonium à plus grande force ionique n'a eu aucun impact sur le rendement d'extraction, tout comme la vitesse d'agitation à l'adsorption. L'utilisation de chlorure de sodium sans dilution du vin avec une vitesse d'agitation de 500 rpm est donc maintenue.

Les paramètres de désorption ont également été évalués. Tout d'abord, il n'existe aucune différence entre une température de désorption de 250 °C et 270 °C mais afin de préserver le plus longtemps la fibre SPME, une température de 250 °C a été choisie.

L'injecteur du GC étant en mode splitless, le temps de désorption n'a aucune influence sur le rendement de récupération tant qu'il est supérieur au temps de splitless soit 45 secondes. En revanche, l'appareil utilisé n'étant pas équipé de four de nettoyage de fibre, celui-ci est opéré dans l'injecteur à chaud dès que les vannes de split sont ouvertes. L'optimisation du temps de désorption dans l'injecteur à chaud correspond finalement à la recherche du temps au bout duquel le nettoyage de la fibre est effectif. Une désorption de 15 min à 250 °C suffit à

nettoyer l'ensemble des esters dosés restant sur la fibre après injection dans la colonne du GC, évitant ainsi les effets mémoires.



A: Esters totaux (1 à 41) B: Esters apolaires saturés les plus volatiles (1 à 15), C: Esters apolaires saturés les moins volatiles (16 à 27 et 30), D: esters apolaires aromatiques (28, 29, 31, 32)

Figure 12 : Aires relatives des pics de différents groupes d'esters (A, B, C, D) en fonction de la température d'extraction (X) (réalisé avec un temps d'extraction de 40 min), et en fonction du temps d'adsorption (Y) (réalisé avec une température d'extraction de 40 °C). Essais effectués dans un vin rouge commercial.

Comme cela a été vu précédemment, il est très important que l'étalon interne soit bien adapté aux composés dosés. Ceci est encore plus vrai avec les techniques de microextraction comme la SPME qui est très sensible aux différences de propriétés physiques et chimiques entre les différentes classes de composés. Or, il a été vu précédemment qu'il existait certaines différences dans les profils d'adsorption entre les différentes familles d'esters. Ainsi, plusieurs étalons internes sont nécessaires pour couvrir toute la gamme des esters dosés par cette méthode.

Le vin contenant de nombreux esters différents, il est très difficile de trouver plusieurs esters qui ne soient pas présents dans les vins et dont les propriétés chimiques et physiques sont proches des composés dosés. Lors d'une étude préliminaire, l'octan-3-ol, très couramment utilisé pour l'analyse des composés volatils du vin s'est révélé être un médiocre étalon interne (linéarité et répétabilité correcte mais faible justesse d'analyse). Ce résultat semble logique au regard des conditions de sélection d'un étalon interne précédemment évoqué, mais pourtant il reste encore très utilisé même pour des méthodes par microextraction sur phase solide.

Certains auteurs ont déjà reporté l'utilisation d'esters deutérés pour l'analyse d'esters dans les vins (Siebert *et al.*, 2005). Ainsi, 5 esters deutérés ont été retenus pour représenter au mieux toute la gamme des esters dosés par la méthode. Il s'agit du butyrate d'éthyle-d₅, de l'hexanoate d'éthyle-d₅, de l'octanoate d'éthyle-d₅, du décanoate d'éthyle-d₅ et du cinnamate d'éthyle-d₅. N'étant pas commercialisés et pour des raisons économiques, il a été choisi de les synthétiser au laboratoire à partir du chlorure d'acyle correspondant et de l'éthanol-d₆. Ceci a permis de réduire le coût de la synthèse d'un facteur 25 par rapport à des synthèses effectuées par des laboratoires de chimie extérieurs.

Le protocole de la synthèse est décrit par Antalick *et al.* (2010) mais son principe repose sur les points suivants:

- Réaction entre les chlorures d'acyles correspondant et l'éthanol-d₆ dans du dichlorométhane en présence de tributylamine
- Lavage, séchage, purification sur silice (éluant dichlorométhane), reconcentration, test de pureté par GC/MS (scan)

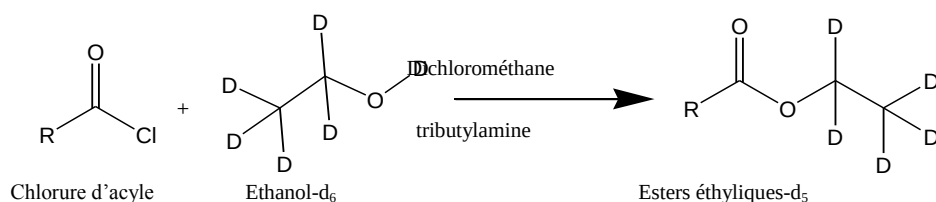


Figure 13 : schéma de synthèse des esters deutérés

Les esters ainsi synthétisés ont dû ensuite subir un test de stabilité dans les vins. En effet, la deutération étant faite sur la partie éthylique de l'ester et le vin étant une matrice hydroalcoolique et acide, il y a des risques d'hydrolyse et de transformation en esters éthyliques analogues non deutérés par transestérification avec l'éthanol du vin. Finalement, seul le décanoate d'éthyle-d₅ n'est pas compatible avec la méthode développée, car la cinétique d'hydrolyse est pour cet ester trop rapide par rapport au temps d'une séquence classique d'analyses. Une diminution significative de ce composé dans le vin est observée après 8 heures, c'est-à-dire à partir du cinquième échantillon d'une séquence automatique. En revanche, les quatre autres esters deutérés s'avèrent stables dans les vins sur une durée minimale de 30 heures, soit 15 échantillons, ce qui reste tout à fait satisfaisant. Ces constats peuvent s'expliquer par des effets inducteurs plus importants avec les longues chaînes carbonées favorisant l'hydrolyse des esters deutérés à plus longues chaînes carbonées. Au final, les étalons internes utilisés pour doser les esters du vin par HS/SPME-GC/MS sont les butyrate, hexanoate, octanoate et cinnamate d'éthyle-d₅.

Tous les paramètres de validation de la méthode et la correspondance entre les esters dosés et les étalons internes sont regroupés dans le **Tableau 14**.

La linéarité a été évaluée trois fois, dans le même vin rouge, sur une gamme représentative des concentrations d'esters généralement trouvés dans les vins. Les gammes sont linéaires pour l'ensemble des esters avec des coefficients de corrélation allant de 0,9924 à 0,9990. La répétabilité des gammes est également satisfaisante car le coefficient de variation est inférieur à 10 % pour l'ensemble des esters à l'exception de l'octanoate d'isoamyle (13,9 %).

Les limites de détection et de quantification ont été évaluées manuellement à partir des rapports des hauteurs des pics sur celle du bruit de fond proche des pics. Ces limites

analytiques varient selon l'ester considéré avec par exemple des LOQ qui s'étendent de 4,1 µg/l à 0,4 ng/l. Elles sont toutes inférieures aux seuils de perception des esters.

La répétabilité de la méthode a été calculée sur 10 échantillons identiques d'un vin rouge non dopé, excepté pour 4 esters dont les concentrations dans le vin utilisé sont inférieures aux LOQ (C4C1, C2C4, C5C2, C2C8) (chapitre II-III-C-2). Les coefficients de variation sont inférieurs à 10 % pour tous les esters, excepté pour l'acétate d'octyle (11,2 %). Deux tiers d'entre eux sont même inférieurs à 5 %.

La reproductibilité a été mesurée sur 5 échantillons d'un vin rouge commercial non dopé analysé à des jours différents sur une période de deux semaines. Les résultats du Tableau x montrent que les coefficients de variation sont tous inférieurs à 15 % et même 10 % pour 25 des 32 esters dosés.

Enfin, la justesse de la méthode a été évaluée en calculant les taux de recouvrement à partir d'une addition d'esters de niveaux connus. La spécificité de la méthode a également été testée en appliquant des essais de justesse à différents types de matrices (vin rouge, vin blanc sec, vin blanc liquoreux, solution hydroalcoolique). Les taux de recouvrement sont satisfaisants, car ils sont tous proches de 100 %.

La méthode de dosage de 32 esters apolaires par HS/SPME-GC/MS ainsi développée est donc sensible, précise, juste et applicable dans tous les types de vins. De plus elle s'avère également rapide, car elle a permis de réduire considérablement le temps de manipulation de 45 min à 5 min par échantillon par rapport à la méthode utilisée jusqu'à présent au laboratoire pour doser 8 de ces esters (Bertrand, 1981).

Tableau 14 : données de validation de la méthode de dosage de 32 esters apolaires : linéarité (n =3), limites analytiques, répétabilité (n = 10), reproductibilité (n = 5), justesse (n = 4).

Esters	Etalons internes	Gamme d'étalonnage (µg/l)	R ²	Linéarité CV (%)	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)	Répétabilité CV (%)	Reproductibilité CV (%)	Recouvrement	Recouvrement CV(%)
C3C2	C4C2d5	1.22-609	0.9949	2.7	1.2	4.1	3.9	3.3	101	8
iC4C2	C4C2d5	1.11-554	0.9966	5.6	0.25	0.82	3	1.5	103	6
C2C3	C4C2d5	1.08-541	0.9987	3.6	0.45	1.5	4.3	4.8	101	15
C4C1	C4C2d5	1.01-505	0.9988	4.9	0.16	0.54	5.8	6.1	98	5
C2iC4	C4C2d5	1.08-541	0.9979	3.1	0.33	1.1	2.5	4.2	95	7
C4C2	C4C2d5	8.14-4070	0.9985	9.1	0.035	0.115	3	3.6	102	6
2mC4C2	C4C2d5	0.61-307	0.9978	5.1	0.017	0.058	6.3	7.3	102	6
iC5C2	C4C2d5	0.58-291	0.9966	7.9	0.015	0.049	4.9	2.1	99	7
C2C4	C4C2d5	1.01-503	0.9959	6.7	0.31	1.0	5.8	15.0	99	5
C2iC5	C4C2d5	5.37-2685	0.9984	4.5	0.11	0.37	3.6	3.4	103	13
C5C2	C4C2d5	0.11-53.5	0.9996	2.8	0.035	0.12	4.4	10.0	93	8
C6C1	C6C2d5	0.11-55	0.9984	2.2	0.0064	0.021	3.4	3.9	94	9
C6C2	C6C2d5	5.58-2790	0.9970	6.8	0.0025	0.0083	4.7	6.1	99	13
C4iC5	C6C2d5	0.10-51.2	0.9988	2.8	0.0056	0.019	2.5	3.3	97	5
C2C6	C6C2d5	0.55-276	0.9989	1.4	0.012	0.038	3.2	5.2	97	6
C7C2	C6C2d5	0.12-58.3	0.9977	6.3	0.009	0.030	2.4	6.2	100	5
HexC2	C6C2d5	0.10-52.1	0.9975	4.2	0.014	0.046	4.1	3.3	90	9
C6iC5	C6C2d5	0.10-49.4	0.9980	5.7	0.0014	0.0048	7.8	8.0	100	14
C8C1	C6C2d5	0.11-55.8	0.9986	2.5	0.0005	0.0016	6.6	6.8	101	7
C8C2	C8C2d5	5.6-2800	0.9990	7.0	0.0009	0.0031	5	9.0	94	8
C6iC5	C8C2d5	0.11-54.4	0.9973	4.4	0.0011	0.0038	3.2	4.2	101	9
C2C8	C8C2d5	0.12-58.7	0.9953	8.7	0.0044	0.015	11.2	11.8	103	11
C9C2	C8C2d5	0.12-59.8	0.9963	4.0	0.0004	0.0013	3	6.2	105	5
C10C1	C8C2d5	0.12-60.4	0.9982	4.5	0.0001	0.0004	4.6	11.4	106	12
C10C2	C8C2d5	5.32-2660	0.9976	3.7	0.0002	0.0006	6.4	8.8	113	14
C8iC5	C8C2d5	0.56-278	0.9966	13.9	0.0021	0.0070	5.4	12.7	99	12
gerC1	C8C2d5	0.08-39.7	0.9953	8.3	0.0018	0.0061	5.4	12.6	99	3
PhC2C2	C8C2d5	5.27-527	0.9924	9.1	0.0001	0.0004	8.6	12.9	111	4
C2PhC2	cinC2d5	0.64-322	0.9951	1.6	0.0071	0.024	3.7	4.0	97	7
C12C2	cinC2d5	0.59-295	0.9985	4.4	0.0050	0.017	4.1	4.8	98	8
dhCinC2	cinC2d5	0.59-297	0.9987	6.6	0.0030	0.010	7.4	2.6	104	7
CinC2	cinC2d5	0.64-319	0.9990	1.5	0.014	0.045	2.1	4.0	102	5

C. Etablissement d'une base de données esters des vins

Le développement d'une telle méthode a permis d'établir une base de données en quantifiant les esters apolaires dans près de 200 vins français de tout type et de différentes origines. Les esters retrouvant une place importante dans les problématiques liées à la perception de la note fruitée des vins rouges, il était intéressant de mettre à jour un certain nombre de données sur ces composés. De plus, la quantification d'esters qui n'avaient jamais été étudiés jusqu'à présent, était également l'occasion d'établir de nouvelles données œnologiques.

Une centaine de vins rouges commerciaux français (104) ont été analysés, dont 64 vins de Bordeaux de différentes appellations (dont 30 % de Pomerol et 30 % de Saint-Julien), 7 de la vallée du Rhône, 5 de la Loire, 4 de Bourgogne, 4 du midi/Sud-Ouest et 20 Beaujolais dont 18 Beaujolais Nouveaux. De nombreux millésimes de ces 30 dernières années sont concernés : 13 millésimes de 1981 à 1999 et tous les millésimes de 2000 à 2009. L'analyse d'un nombre conséquent de vins blancs secs de différentes origines (dont plus de la moitié de Bordeaux) a également été réalisée (55). Cela concerne essentiellement les millésimes 2007, 2008 et 2009. Quelques vins blancs liquoreux (11) et rosés (18) sont venus compléter la base de données. Tous ces vins ont été analysés dans un délai de 2 mois à partir d'échantillons congelés afin de limiter les biais notamment dus à l'effet de vieillissement. L'absence d'impact de la congélation sur la teneur en esters des vins a préalablement été vérifiée.

Les principales données œnologiques mises en évidence par l'établissement de cette base de données esters des vins concernent toutes les familles d'esters. Les esters composant les différentes familles sont regroupés dans le **Tableau 1** au chapitre 1-II-A-1.

Esters éthyliques d'acides gras (EEAG) et acétates d'alcools supérieurs (AAS) :

Ces deux catégories d'esters apolaires sont généralement les plus présentes dans les vins. Comme cela est connu depuis une trentaine d'années (Bertrand, 1975), ces deux catégories d'esters sont présentes à des niveaux plus importants dans les vins blancs et rosés que dans les vins rouges traditionnels (**Tableau 15**).

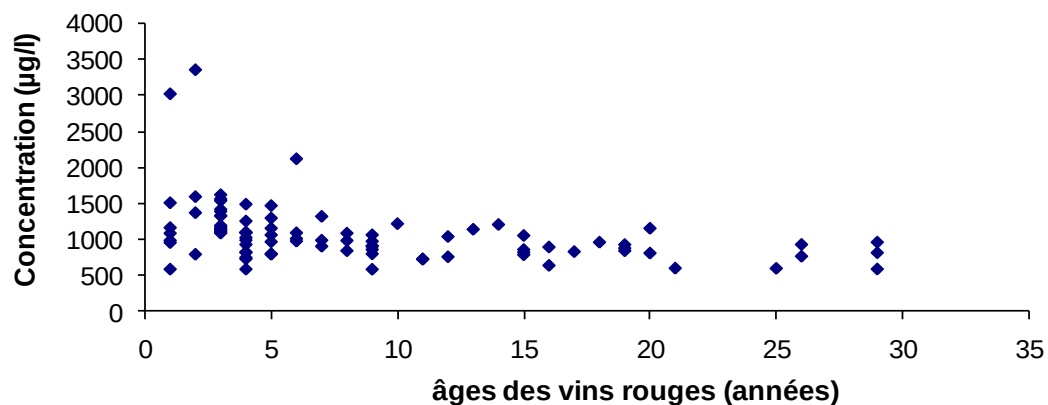
Tableau 15 : Teneurs moyennes en EEAG et AAS selon le type de vin, exprimées en $\mu\text{g/l}$.

Esters	Vins rouges traditionnels (n = 87)	Vins blancs secs (n = 55)	Vins blancs liquoreux (n = 11)	Vins rosés (n = 18)	Beaujolais Nouveaux (n = 17)
EEAG	1050	3313	3156	3273	2873
AAS	465	1540	1756	1482	3566

La production d'EEAG et d'AAS augmente lorsque les fermentations alcooliques sont lentes et réalisées dans des conditions stressantes pour les levures comme l'emploi de moûts clarifiés, des températures basses de FA ou encore un milieu riche en CO_2 (Bertrand, 1983; Dubois, 1993). La turbidité étant plus importante dans les moûts de vins rouges et la température de fermentation plus élevée, la production d'EEAG et d'AAS au cours de la FA sera donc moins importante. Au contraire, la macération carbonique employée pour l'élaboration des Beaujolais nouveaux favorise grandement la synthèse de ces esters, par fermentation des cellules végétales directement dans la baie de raisin, et tout particulièrement en acétate d'isoamyle qui marque ce type de vin par ces notes aromatiques typiques de banane et de bonbon anglais. De ce fait, la teneur en AAS est très élevée dans ce type de vin.

En outre, ces esters sont connus pour marquer particulièrement l'arôme des vins jeunes. Leurs teneurs diminuent en effet au cours du vieillissement du vin, à la suite d'une hydrolyse causée par un rééquilibrage naturelle par rapport aux concentrations en acides correspondants. Il n'existe pas de données dans la littérature traitant de la cinétique de ce phénomène en milieu naturel sur un nombre de millésimes conséquents. L'analyse de vins rouges de ces 30 dernières années a permis de visualiser dans le temps ce phénomène d'hydrolyse des EEAG et AAS (**Figure 14A et 14B**). Il s'avère que l'hydrolyse des EEAG et des AAS au cours du temps n'est que très peu marquée, plus particulièrement pour les EEAG. En effet, si les 2-3 cas de vins jeunes très riches en esters sont enlevés, la tendance à l'hydrolyse est beaucoup moins franche. L'hydrolyse reste toutefois un peu plus marquée pour la famille des AAS. Elle semble se stabiliser au bout de 5 ans d'évolution tandis que celle des EEAG est moins rapide en se stabilisant plutôt au bout de 10 ans. Cependant, la synthèse des esters étant très dépendante des paramètres de la FA, une analyse verticale de millésimes récents d'un même vin devrait permettre de mieux visualiser le phénomène d'hydrolyse.

A : EEAG



B : AAS

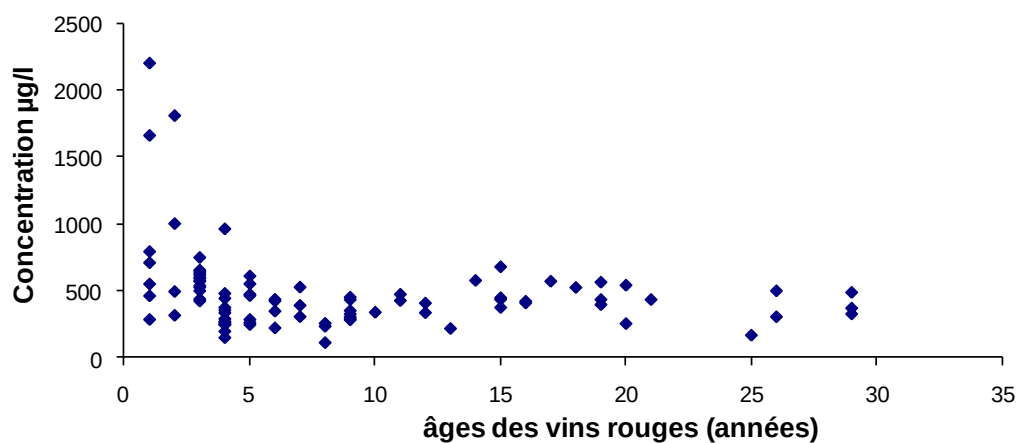


Figure 14 : Evolution des teneurs en EEAG (A) et AAS (B) dans des vins rouges en fonction de l'âge du vin. (n = 104)

En outre, la distribution dans les vins dosés des EEAG en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras correspondant est fidèle aux données de la littérature (Vianna et Ebeler, 2001) (**Figure 15**).

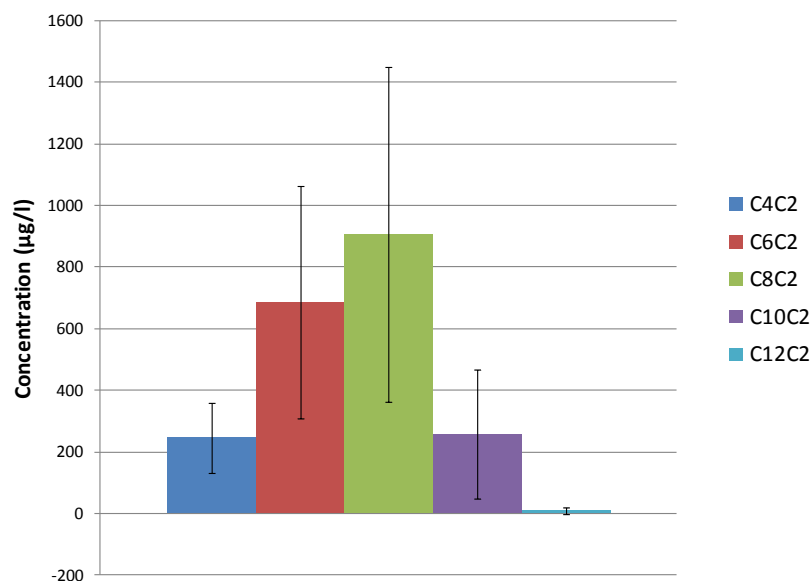


Figure 15 : concentrations moyennes des EEAG dans les vins en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide correspondant (n = 188).

La plus forte présence de C6C2 et de C8C2 s'explique par le fait que le transfert transmembranaire des EEAG est très lié à la longueur de leur chaîne carbonée. Ce transfert est d'autant plus faible que la longueur de la chaîne carbonée de l'acide correspondant est grande. Ainsi, 100 % du C6C2 synthétisé par la levure est transféré au milieu mais ce chiffre chute entre 54 et 68 % pour le C8C2, 8 et 17 % pour le C10C2 et seulement une infime partie pour le C12C2 (Nykanen, 1986). La plus forte présence de C8C2 s'explique par la plus grande disponibilité de l'acide octanoïque. Le C4C2 étant issu d'un métabolisme un peu différent des autres esters d'acide gras, il doit être considéré à part.

Le C3C2, ici non représenté, doit également être considéré de façon différente des autres EEAG. Il ne fait d'ailleurs pas partie de cette catégorie d'esters car l'acide propionique n'est pas un acide gras. Sa teneur varie dans les vins de façon différente des EEAG et AAS car elle est plutôt stable dans le temps, et les vins rouges en contiennent significativement un peu plus que les vins blancs (en moyenne 106 µg/l contre 82 µg/l, significatif au seuil de 0,1 %). Ce composé pourrait ainsi plus marquer la note fruitée des vins rouges que celle des vins blancs. Pineau *et al.* (2009) ont d'ailleurs montré que le C3C2 participait de façon synergique à la perception de la note fruitée des vins rouges et plus particulièrement à la nuance fruit noir/fruit confituré.

Esters éthyliques d'acides branchés (EEAB)

La formation des EEAB au cours du temps par estérification des acides branchés correspondant avec l'éthanol est ici confirmée. Leurs concentrations peuvent atteindre plus de 700 µg/l, il s'agit de marqueurs importants de la note fruitée des vins évolués. L'iC4C2 est l'ester le plus abondant de cette famille dans les vins, devant l'iC5C2, le 2-mC4C2 et enfin le PhC2C2. A notre connaissance, la cinétique de leur formation dans les vins n'a jamais été évaluée sur un nombre conséquent de millésimes. L'analyse de vins rouges sur de nombreux millésimes de ces 30 dernières années a permis de visualiser dans le temps ce phénomène d'estérification des EEAB (**Figure 16**).

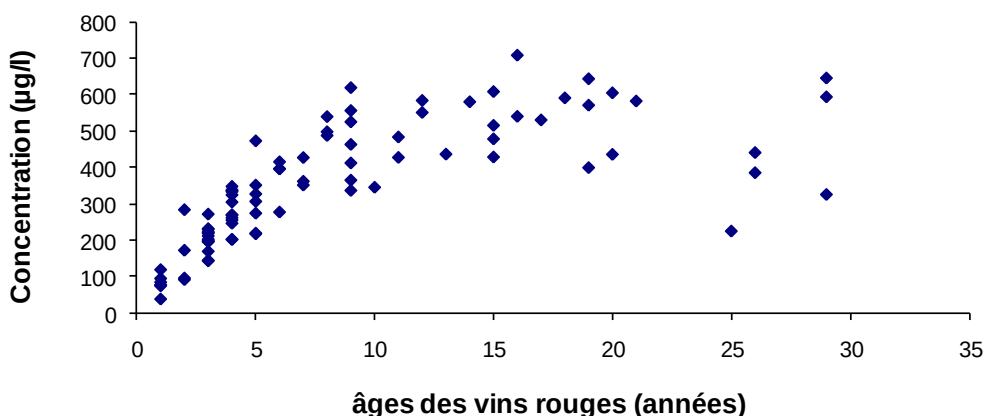
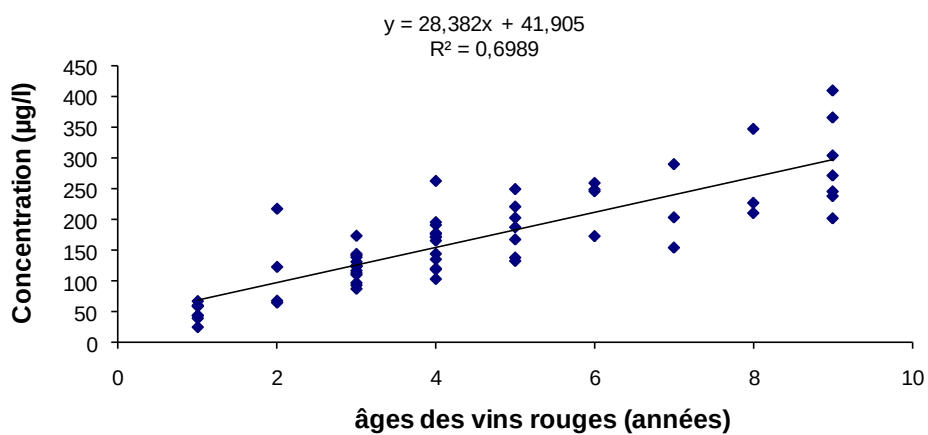


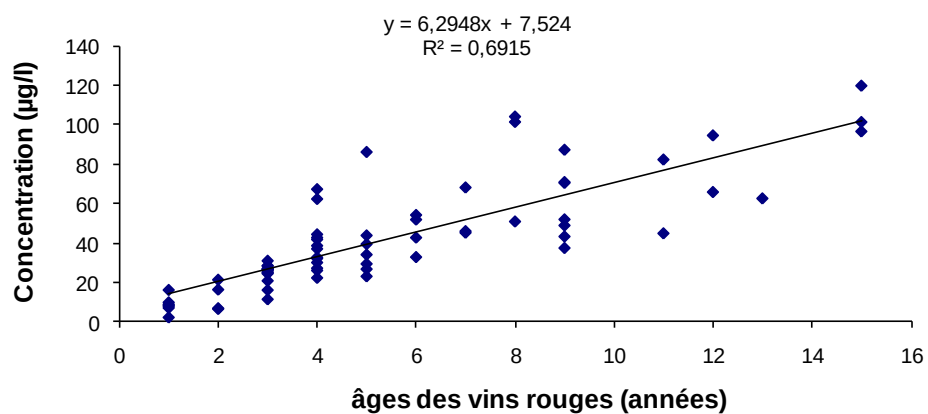
Figure 16 : Evolution des teneurs en EEAB dans des vins rouges en fonction de l'âge du vin. (n = 104)

La formation des EEAB au cours du temps est effective au cours des 10 premières années de vieillissement, mais elle a tendance à se stabiliser par la suite. Ce phénomène est constaté pour tous les esters branchés avec une phase de synthèse un peu plus longue pour le 2mC4C2 et l'iC5C2 (environ 15 ans). Sur ces 10-15 premières années, la cinétique de synthèse est relativement linéaire (**Figure 17**). Des vitesses de formation de ces esters au cours des 10-15 premières années de vieillissement peuvent donc être facilement estimées. C'est ainsi que l'iC4C2 est formé à une vitesse estimée de l'ordre de 28 µg/l par an, le 2mC4C2 avec une vitesse de 6 µg/l par an et cette valeur est de 10 µg/l par an pour l'iC5C2. Ces vitesses sont intéressantes d'un point de vue aromatique car des variations de 24 µg/l d'iC4C2 et de 3 µg/l de 2mC4C2 peuvent être perceptibles dans des vins désaromatisés (Pineau *et al.*, 2009). Ceci indique que ces esters peuvent marquer le bouquet du vin de manière relativement rapide.

A : iC4C2



B : 2mC4C2



C : iC5C2

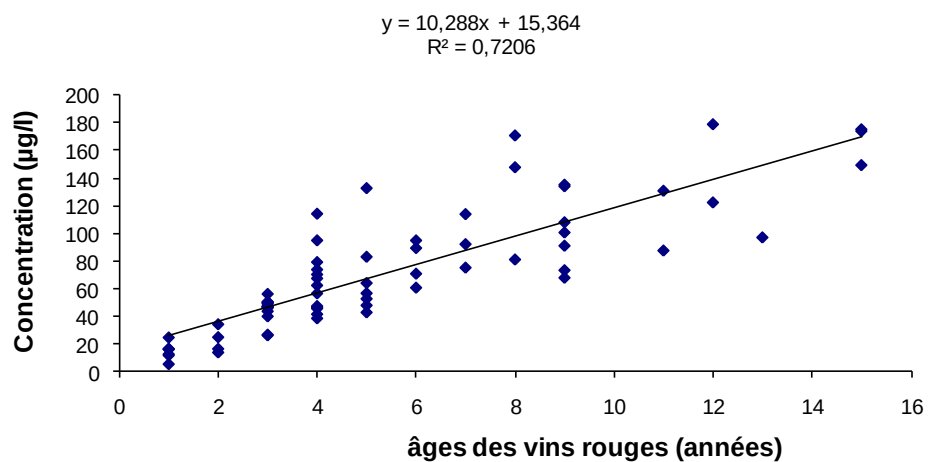


Figure 17 : Evolution des teneurs en iC4C2 (A), 2mC4C2 (B), iC5C2 (C) dans des vins rouges en fonction de l'âge du vin. (n = 79 pour l'iC4C2 et n = 87 pour le 2mC4C2 et l'iC5C2).

En outre, les EEAB sont significativement plus présents dans les vins rouges que dans les vins blancs. En effet, la comparaison de la teneur moyenne des vins rouges et vins blancs de 2007 à 2009 montre une concentration moyenne significativement plus forte dans les vins rouges (164 $\mu\text{g/l}$ contre 93 $\mu\text{g/l}$, significatif au seuil de 1 %).

Ces esters pourraient donc être des marqueurs de l'évolution de la note fruitée des vins rouges au cours du temps. De plus, à l'image du C3C2, leur participation à la note fruit noir/fruit confituré des vins rouges a été mise en évidence par Pineau *et al.* (2009).

Cinnamates et autres esters d'origine variétale

La formation des cinnamates se faisant au cours de la FA à partir de précurseurs variétaux, leur origine variétale ne fait aucun doute (Loscos *et al.*, 2007; Ugliano *et al.* 2008). Toutefois, ces composés ont finalement été peu étudiés mis à part quelques travaux dans les années 80, indiquant qu'ils seraient présents à des teneurs plus importantes dans les vins de macération carbonique (Versini *et al.*, 1984; Tesnières *et al.*, 1989), mais depuis, aucun travaux n'ont confirmé ces hypothèses.

Ainsi, leur dosage a permis de compléter les connaissances sur ces esters d'origine variétale (**Figure 18**).

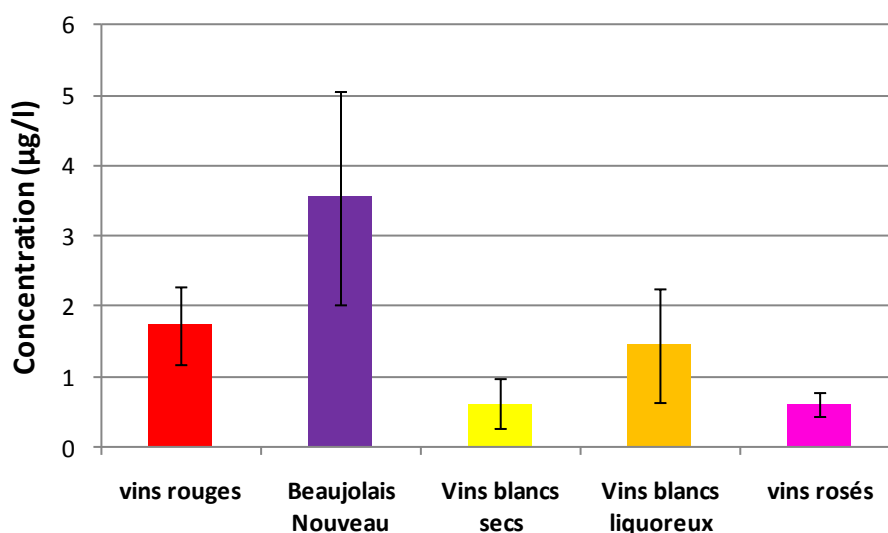


Figure 18 : Teneur moyenne en cinnamates en fonction du type de vin, exprimées en $\mu\text{g/l}$.

Les plus fortes teneurs en cinnamates rencontrées dans les vins de Beaujolais Nouveau sont ici confirmées. Cependant, nous ne sommes pas en mesure d'assurer que cela vienne de

la macération carbonique car deux autres vins de Gamay vinifiés de façon traditionnelle affichent des teneurs en cinnamates aussi élevées que les Beaujolais Nouveaux. Ainsi, ces phénomènes pourraient être plutôt d'origine variétale que fermentaire.

En outre, de façon générale les vins rouges sont significativement plus riches en cinnamates que les vins blancs secs et rosés (au seuil de 0,1%). Cela provient très certainement d'un temps de contact avec les pellicules beaucoup plus long au cours de la vinification en rouge, permettant ainsi une meilleure extraction des précurseurs variétaux. Enfin, les vins blancs liquoreux sont plus riches en cinnamates que les vins blancs secs. C'est la première fois qu'un tel constat est effectué. Toutefois, un enrichissement de la baie de raisin en précurseurs des cinnamates par l'action de *Botrytis cinerea*, voir une accessibilité améliorée mécaniquement, pourrait être envisagé.

Deux autres esters variétaux ont été mis en évidence : l'hexénoate d'éthyle et le géranoate de méthyle. Ils n'ont fait jusqu'à présent l'objet d'aucune étude. Cependant, leur absence constatée dans des milieux synthétiques dans lesquels ont été menées des FA par *Saccharomyces cerevisiae* indique que ces composés sont synthétisés uniquement à partir de précurseurs venant de la pellicule du raisin. Ces dosages ont été faits dans le cadre de l'établissement de la base de données esters des vins.

A la différence des cinnamates, ces deux esters semblent être plus présents dans les vins blancs secs même si leurs teneurs, notamment celle en géranoate de méthyle, restent toutefois très faibles.

Esters éthyliques à nombres impairs de carbone (EENI)

Ces esters mineurs des vins n'ont jamais fait l'objet d'étude particulière dans la littérature. Contrairement aux EEAG, les esters éthyliques à nombre impair de carbone sont plus présents dans les vins rouges que dans les vins blancs même si cette différence n'est pas significative (3,17 µg/l contre 2,8 µg/l). Cependant, l'analyse des milieux fermentés synthétiques indique que malgré la capacité des levures à produire ces esters dans ces milieux, la teneur en EENIC y est beaucoup plus faible que dans les vins. Ainsi, la présence de précurseurs issus de la pellicule du raisin serait nécessaire à leur formation, ce qui pourrait expliquer la plus forte teneur constatée dans les vins rouges.

Esters méthyliques (EM)

Présents en moyenne à des teneurs plus importantes dans les vins blancs (4,9 µg/l) que dans les vins rouges (3,4 µg/l), les EM sont comme leurs analogues éthyliques (EEAG) plutôt d'origine fermentaire. Cependant, leur synthèse est par rapport aux EEAG proportionnellement plus faible dans les vins blancs et rosés que dans les vins rouges. Les rapports EM/EEAG sont significativement plus élevés dans les vins rouges que dans les vins blancs (seuil de 0,1 %) (**Figure 19**).

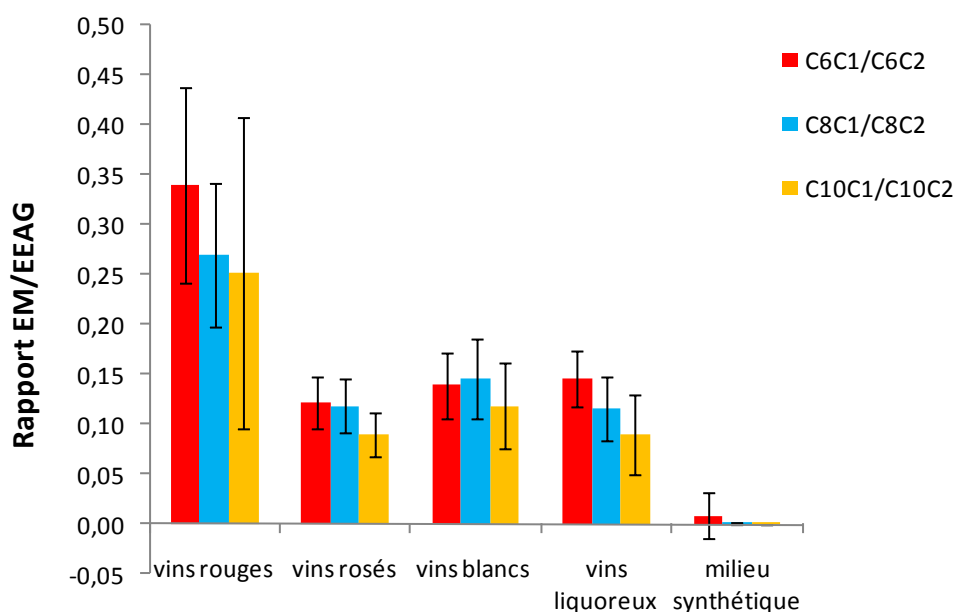


Figure 19 : Rapport EM/EEAG pour 3 couples d'esters (C6, C8, C10) dans différents types de vins et dans des milieux de fermentation synthétique

Ce phénomène est à mettre en relation avec le rapport méthanol/éthanol qui est plus important dans les vins rouges que dans les vins blancs (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Le méthanol est ainsi proportionnellement plus disponible dans les vins rouges qui sont donc proportionnellement plus riches en esters méthyliques. Ce phénomène provient une nouvelle fois du temps de contact avec les pellicules plus long lors des vinifications en rouge, car la dégradation de pectines issues des pellicules mène à la production de méthanol. L'analyse des milieux synthétiques confirme qu'en l'absence de pellicules de raisins la synthèse des ces esters est très faible.

En outre, la distribution des concentrations dans les vins en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide correspondant est similaire à celle des EEAG. Le C8C1 (1,60 µg/l) est ainsi présent à des teneurs moyennes légèrement supérieures au C6C1 (1,35 µg/l) et bien supérieures au C10C1 (0,37 µg/l).

Esters isoamyliques (EI)

Les EI marquent l'activité fermentaire de la même façon que les EM, les EEAG et les AAS car ils sont présents en plus fortes concentrations dans les vins blancs et rosés que les vins rouges.

Les variations constatées sur la teneur des vins en ces esters sont identiques à celles observées pour l'acétate d'isoamyle. Les vins de macération carbonique sont ainsi les plus riches en EI. D'un autre côté la distribution des teneurs dans les vins suivant la longueur de la chaîne carbonée de l'acide correspondant est la même que pour les EEAG. Le C8iC5 (1,91 µg/l) est ainsi présent à des teneurs moyennes légèrement supérieures au C6iC5 (1,36 µg/l) et bien supérieures au C4iC5 (0,41 µg/l).

Toutes ces données combinées à celles évoquées pour les EM indiquent que les disponibilités de l'alcool et de l'acide sont importantes pour la synthèse des esters dans les vins.

D. Discussion

Cette nouvelle méthode de dosage est un outil très intéressant pour l'étude de l'impact de la FML sur la composition en esters des vins rouges (Antalick *et al.*, 2010).

En effet, l'établissement d'une base de données esters des vins grâce à ce développement a permis de confirmer certaines données œnologiques et surtout d'en établir de nouvelles. Nous avons notamment pu caractériser différents types de vins par le dosage de tous ces esters. Les vins rouges sont plus riches que les vins blancs en C3C2, EEAB, EENIC, cinnamates et proportionnellement en EM par rapport à l'activité fermentaire. Les vins blancs secs sont en revanche plus riches en nombreux esters fermentaires (EEAG, AAS, EM, EI). Enfin, les vins de Beaujolais Nouveaux sont plus riches pour tous les esters isoamyliques et en cinnamates.

Le rôle des esters dans la perception de la note fruitée ainsi que dans la typicité aromatique des vins rouges est mis de plus en plus en évidence. Il pourrait être intéressant de regarder si une telle méthode de dosage ne pourrait pas permettre de déceler certaines différences dans la composition en esters des vins d'appellations différentes pouvant être potentiellement à l'origine de différences aromatiques.

La **Figure 20** montre la projection des individus d'une ACP menée sur les vins rouges d'appellation Saint-Julien (n =19) et Pomerol (n =19) en prenant l'ensemble des familles décrites précédemment comme variables. Le plan principal permet de mettre en évidence un groupe particulier de vins corrélé avec les variables esters méthyliques (EM), gérarate de méthyle (gerC2), esters éthyliques d'acides gras (EEAG), esters isoamyliques (EI) et à moindre niveau acétate d'alcool supérieur (AAS). Deux-tiers des vins de Pomerol, dont l'ensemble des vins du millésime 2007, font partie de ce groupe. L'effet millésime est certainement plus impliqué dans la séparation des deux groupes que l'effet appellation. Toutefois, des ANOVA pratiquées pour l'ensemble des familles d'esters entre les vins des deux appellations montrent de nombreuses différences significatives. Ainsi, par rapport aux 38 vins analysés, les vins de Saint Julien sont significativement plus riches en C3C2 (seuil de 5 %), EEAB (seuil de 1 %), cinnamates (seuil de 5 %) et en hexénoate d'éthyle (seuil de 0,1 %), alors que les vins de Pomerol sont significativement plus riches en EEAG (au seuil de 0,1 %), EM (seuil de 0,1 %), EI (seuil de 5 %) et gérarate de méthyle (seuil de 0,1 %). Seules les catégories des AAS et des EENIC ne différencient pas les deux appellations. Ainsi, les différences observées vont au-delà de l'effet millésime car les AAS ne sont pas affectés alors que ces esters présentent justement les teneurs les plus dépendantes du vieillissement. De plus, les AAS sont peu cités dans les études des phénomènes de synergie à la base de la perception de la note fruitée des vins rouges contrairement aux EEAG et autres EEAB (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2007, Pineau *et al.*, 2009). Ce constat renforce ainsi ces tendances car s'il existe des différences aromatiques entre les vins de différentes zones de la région de Bordeaux, cela ne provient certainement pas des teneurs respectives en AAS.

Dans tous les cas, cela montre le réel intérêt d'une telle méthode de dosage dans notre étude sur l'impact de la FML vis-à-vis de la note fruitée des vins rouges. De plus, le dosage d'une douzaine d'esters mineurs des vins, encore jamais étudiés dans la littérature, amènent de nouvelles informations qui pourraient se révéler être très intéressantes. En effet, des similitudes ont été trouvées entre ces nouveaux esters et d'autres plus connus comme les

EEAG. Or, les connaissances de ces esters sont importantes lorsqu'il s'agit du métabolisme des levures mais beaucoup moins en ce qui concerne les BL. Le dosage de tels composés pourra certainement permettre d'améliorer les connaissances sur le métabolisme des BL par rapport aux esters du vin.

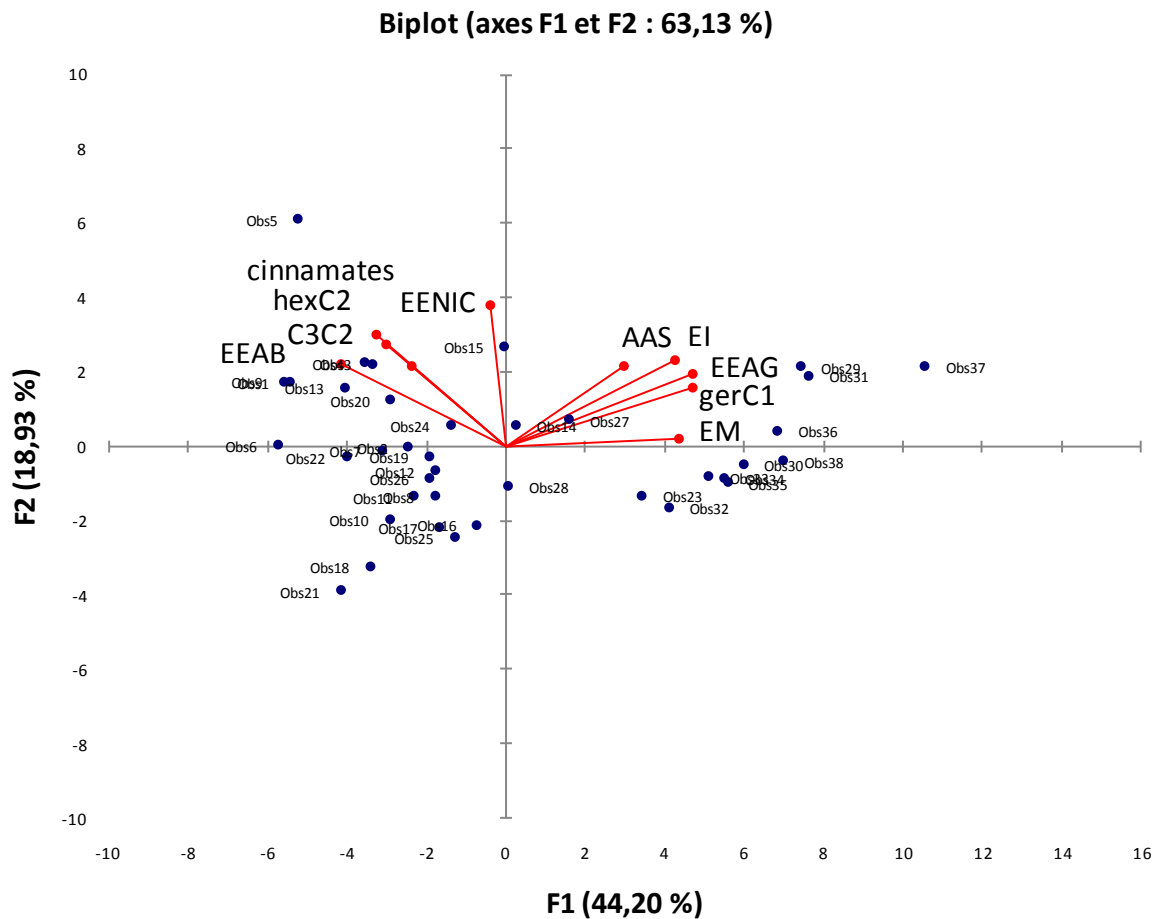


Figure 20 : projection sur le plan principal des individus des vins de Saint-Julien (n = 19) et Pomerol (n = 19) de l'ACP réalisée avec les familles d'esters comme variables (EEAG, AAS, EEAB, EM, EENIC, EI, Cinnamates, hexénoate d'éthyle, géranoate de méthyle). Les variables sont représentées en trait rouge.

**Partie 2: Etude de l'activité des BL sur la fraction aromatique
fruitée des vins rouges**

Partie 2: Etude de l'activité des BL sur la fraction aromatique fruitée des vins rouges

L'absence de consensus sur la question de l'impact de la FML sur l'arôme fruité des vins rouges est due à différents facteurs. La complexité des phénomènes impliqués dans la perception de l'arôme fruité des vins rouges en est certainement une des principales raisons. L'absence de données fondamentales claires sur les marqueurs de cette note aromatique participe grandement à ces divergences d'opinion. De plus, les composés impliqués sont nombreux et appartiennent à plusieurs familles chimiques (esters, lactones, norisoprénoides, composés soufrés, thiols, terpénols, furanones). L'étude de l'évolution de ces marqueurs aromatiques au cours de la FML nécessite des méthodes d'analyses permettant un dosage à la fois simple et fiable (sensible et spécifique). Les travaux effectués jusqu'à présent ont été limités à une partie de ces marqueurs, et aucune étude n'a suivi l'ensemble des molécules aromatiques connues pour participer à la note fruitée des vins rouges. Le manque de données sur le métabolisme des BL vis-à-vis de ces marqueurs aromatiques aggrave la méconnaissance de l'impact de la FML sur l'arôme fruité des vins.

Du point de vue œnologique, il existe très peu de données concernant l'impact de paramètres de vinification sur les modulations de la note fruitée des vins engendrée par l'activité des BL. Outre la souche de BL, existe-t-il d'autres facteurs œnologiques qui peuvent contribuer à ces variations? Quels métabolismes sont impliqués dans cette modulation de la note fruitée des vins rouges par les BL?

Pour aborder ce sujet et pour tenter de répondre aux questions qu'il soulève, des études analytiques et sensorielles ont été menées dans ce travail. De nombreux marqueurs de l'arôme des vins rouges, principalement de la note fruitée (esters, C13-norisoprénoides, DMS, thiols, lactones, linalol) et de la note lactique (composés dicarbonylés) ont été dosés, en particulier par les méthodes de microextraction sur phase solide. Une cinquantaine de vins rouges, principalement de la région bordelaise mais aussi Suisse, ont été suivis avant et après FML. Certains de ces essais ont préalablement fait l'objet d'évaluations sensorielles afin d'établir des liens entre les variations aromatiques et biochimiques observées. Toutes les données œnologiques relatives à la mise en œuvre des essais et des épreuves d'analyses sensorielles sont indiquées aux chapitres 2-I et 2-IV.

I. Modification de l'arôme des vins rouges par la FML

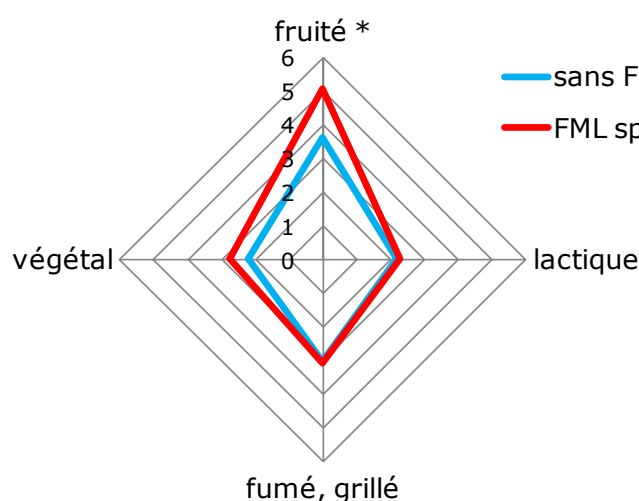
A. Modulation du profil aromatique

Des épreuves discriminantes, type tests triangulaires, ont été réalisées au cours d'essais préliminaires sur des vins rouges du millésime 2007 ayant réalisé la FML spontanément, et les même vins sans FML (inhibition par sulfitage) conservés en bouteille (Msg1807, Msg507, Mhm607). Des différences significatives entre ces vins ont été mises en évidence, démontrant ainsi l'impact de la FML sur l'arôme des vins rouges.

Au cours des deux millésimes suivants, des épreuves d'analyse descriptive ont été réalisées afin de pouvoir caractériser les variations aromatiques apportées par la FML et plus particulièrement sur la note fruitée des vins rouges. Sept profils sensoriels ont permis de comparer de façon orthonasale des vins ayant réalisé la FML avec les mêmes vins sans FML. Ces comparaisons ont été menées sur 4 vins rouges différents du même cépage (Merlot). Pour les lots concernés, les FML ont été majoritairement menées par inoculation du vin avec des levains malolactiques commerciaux, excepté un vin issu d'une FML spontanée (Ms08 si). Cependant, les contrôles d'implantation effectués ont montré que certains levains ne s'étaient pas implantés (voir chapitre II-I-B). Dans ces cas, la FML a vraisemblablement été effectuée par des BL présentes initialement dans le moût.

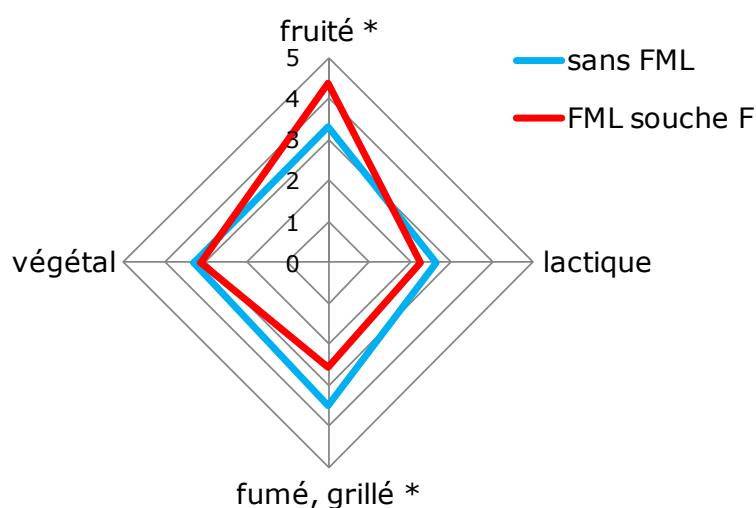
A l'image des données décrites dans la littérature, l'impact de la FML par rapport à la note fruitée des vins est très variable. Une intensification de la note fruitée est perçue au cours de la FML spontanée du vin Ms08 (**Figure 21, profil 1**) ainsi qu'au cours de la FML menée par la souche F sur le vin Mlaf09 (**profil 2**). Dans les deux cas les différences olfactives perçues sur la note fruitée sont significatives au seuil de 5 %. Dans le même temps, la note lactique n'est pas affectée par l'activité des BL. Seule la note fumé/grillé est plus marquée dans le vin Mlaf09 qui n'a pas réalisé la FML (significatif au seuil de 5 %), avec toutefois un désaccord entre les juges concernant l'évaluation de ce descripteur (effet juge).

Profil 1 (Ms08)



descripteur	p produit	p juge
fruité	0,0174	0,2331
lactique	0,839	0,0892
fumé/grillé	0,875	0,0832
végétal	0,1921	0,0996

Profil 2 (Mlaf09)



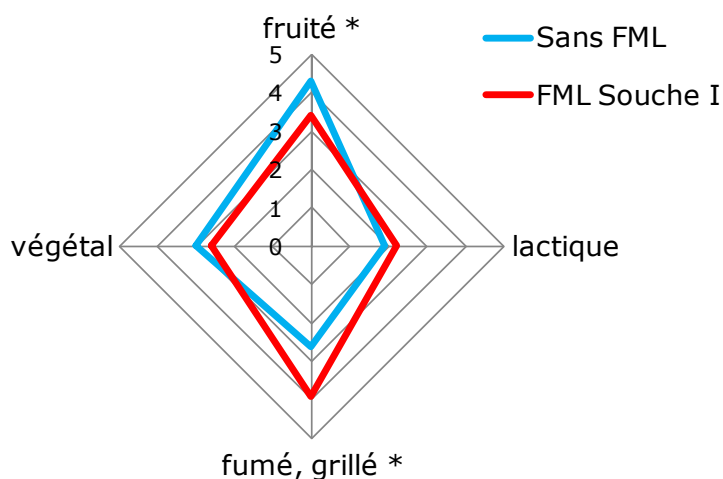
descripteur	p produit	p juge
fruité	0,0327	0,4335
lactique	0,4639	0,1567
fumé/grillé	0,0197	0,0169
végétal	0,6883	0,0865

Figure 21 : Profils comparés réalisés sur le vin Ms08 (Merlot, Suisse, 2008) dont la FML a été réalisée spontanément (profil 1), et sur le vin Mlaf09 (Merlot, Bordeaux, 2009) dont la FML a été menée par la souche F (profil 2). Le panel est constitué de 11 dégustateurs pour le profil 1 et 16 dégustateurs pour le profil 2.

En revanche, deux FML menées en microvinification sur le vin Mmv09 (Merlot, Bordeaux, 2009) ont abouti à des diminutions de l'arôme fruité (**Figure 22**). Dans le cas de la FML menée par la population indigène suite à une absence d'implantation d'un levain commerciale (souche I), la diminution de la note fruitée (significative à 5 %) est accompagnée d'une augmentation de la note fumé/grillé (significative à 5 %). Dans le cas de la FML menée par la souche J, la baisse d'intensité perçue sur la note fruitée est moins marquée (non significative) qu'avec la population indigène. Elle est accompagnée d'une légère augmentation de la note fumé/grillé (non significative), d'une augmentation plus importante de la note

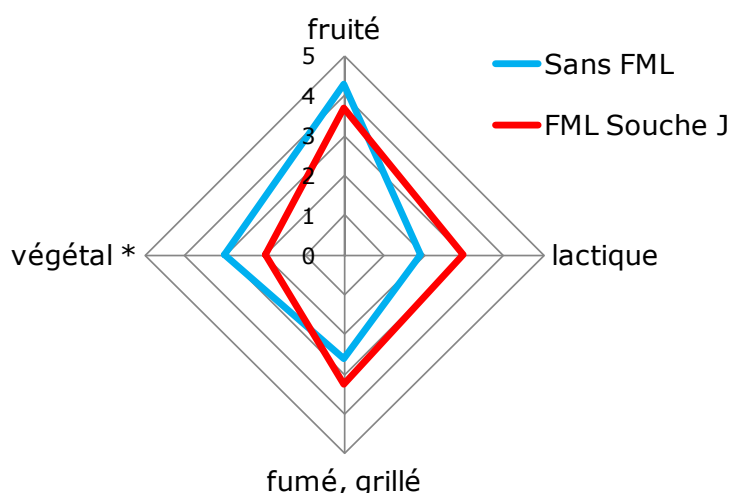
lactique (significatif à 10 %) et d'une diminution de la note végétale (significatif à 5 % avec effet juge).

Profil 3 (Mmv09I)



descripteur	p produit	p juge
fruité	0,0395	0,0142
lactique	0,5268	0,181
fumé/grillé	0,0223	0,0625
végétal	0,4972	0,0945

Profil 4 (Mmv09J)



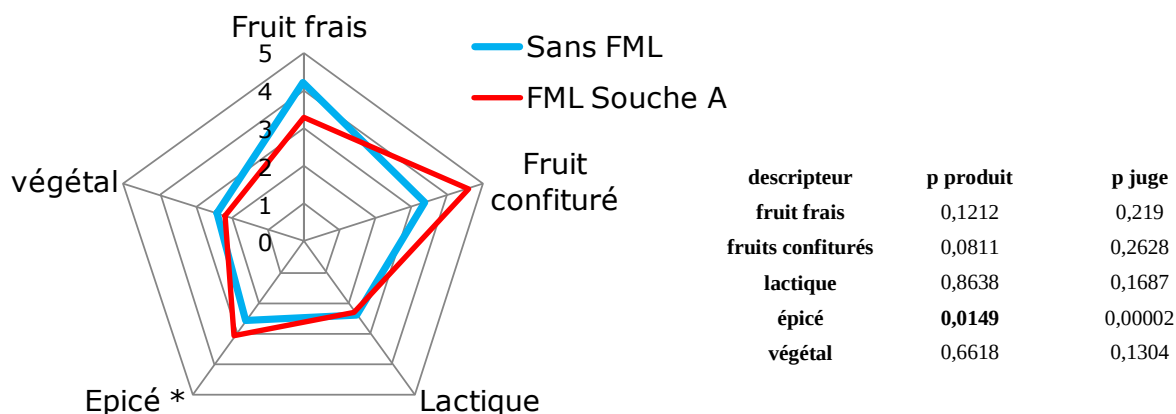
descripteur	p produit	p juge
fruité	0,3208	0,7638
lactique	0,0785	0,6189
fumé/grillé	0,1199	0,03
végétal	0,0207	0,0039

Figure 22 : Profils comparés réalisés sur le vin Mmv09 (Merlot, Bordeaux, microvinification 2009) dont la FML a été menée par la souche I (profil 3) et J (profil 4). Chaque souche a été testée en triplicats considérés olfactivement identiques (chapitre II-I-B). Pour chaque souche, l'échantillon évalué correspond à un assemblage des trois triplicats. Le panel est constitué de 13 dégustateurs. L'évaluation des 3 vins (sans FML, souche I, J) a été faite simultanément.

En outre, la FML peut également nuancer la note fruitée sans forcément la détruire ou l'intensifier. Ainsi, la FML menée en microvinification sur le vin de Merlot Mmv08 avec les souches A et C favorise l'apparition de notes de fruits confiturés (significatif à 10 %) au détriment des notes de fruit frais (non significative) (**Figure 23**). Une intensification de la note épicée par ces FML est également perçue (significative à 5 % pour A, non significative

pour C). Il est intéressant de souligner dans ce cas, l'homogénéité des modulations apportées par les 2 souches de BL testées.

Profil 5 (Mmv08A)



Profil 6 (Mmv08C)

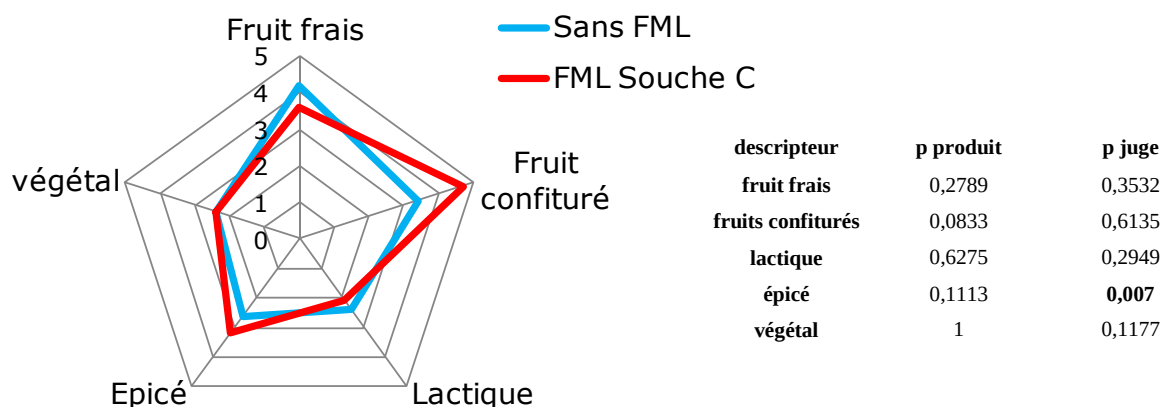


Figure 23 : Profils comparés réalisés sur le vin Mmv08 (Merlot, Bordeaux, microvinification 2008) dont la FML a été menée avec la souche A (profil 5) et C (profil 6). Chaque souche a été testée en triplicats considérés olfactivement identiques (chapitre II-I-B). Pour chaque souche, l'échantillon évalué correspond à un assemblage des trois triplicats. Le panel est constitué de 10 dégustateurs. L'évaluation des 3 vins (sans FML, souche A et C) a été faite simultanément.

Enfin, il peut arriver que l'activité des BL ne modifie pas la note fruitée des vins rouges, comme c'est le cas lors de la FML réalisée en microvinification par la souche L sur le vin Mmv09. Comme pour les souches I et J, une augmentation de la note fumé/grillé ainsi qu'une diminution de la note végétale sont perçues dans le vin Mmv09 ayant fait la FML avec

la souche L. Toutefois, ces variations sont, dans ce cas, beaucoup plus légères (non significatives) (**Figure 24**).

Profil 7 (Mmv09L)

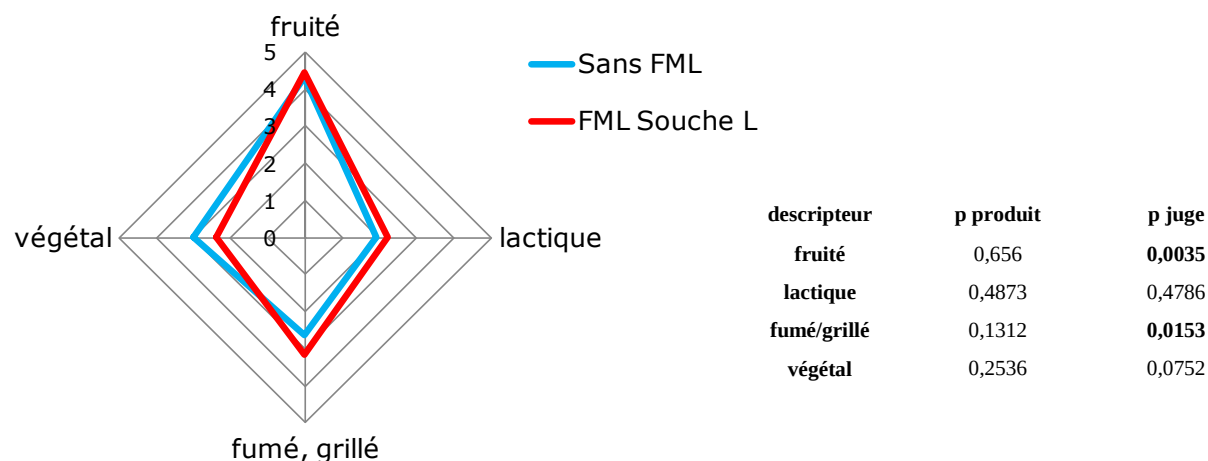


Figure 24 : Profil comparé réalisé sur le vin Mmv09 (Merlot, Bordeaux, microvinification 2009) dont la FML a été menée par la souche F (profil 7). Cette souche a été testée en triplicats considérés olfactivement identiques (chapitre II-I-B). L'échantillon évalué correspond à un assemblage des trois triplicats. Le panel est constitué de 13 dégustateurs. L'évaluation des 2 vins (sans FML, souche L) a été faite simultanément avec ceux dont la FML a été menée avec la souche I et J.

B. Impact de la souche de BL

Certaines différences peuvent être observées dans le profil aromatique du vin Mmv09 dont la FML a été menée avec les souches I (population indigène), J et L.

En effet, la souche L donne un vin plus fruité que les 2 autres souches, ce résultat étant significatif seulement pour la comparaison avec I (au seuil de 5 %) (**Figure 25**). Parallèlement à cela, I paraît conférer au vin une note fumé/grillé légèrement plus importante que lorsque la FML est faite avec les souches J et L (non significatif). Cependant, les juges ne s'accordent pas sur la notation de ce descripteur (effet juge). En outre, la souche J semble apporter un caractère lactique plus marqué que les souches I et L bien que cela ne soit pas significatif également. Enfin, de légères différences de notes végétales sont également trouvées ($I > L > J$) mais elles ne sont pas significatives et le panel semble avoir beaucoup de mal à juger ce descripteur (fort effet juge).

Profil 8 (Mmv09 : L, I, J)

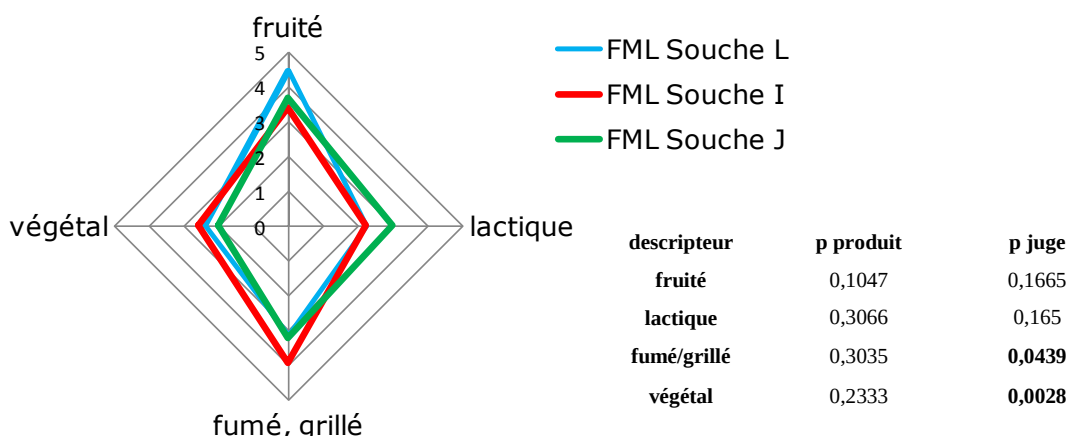


Figure 25 : Profil comparé réalisé sur le vin Mmv09 dont la FML a été réalisé avec 3 souches différentes (I, J, L) en microvinification. Chaque souche a été testée en triplicats considérés olfactivement identiques. Pour chaque souche, l'échantillon évalué correspond à un assemblage des trois triplicats. Le panel est constitué de 13 dégustateurs.

D'autres profils comparés ont été réalisés sur les vins Mmv08 et CSmv08 mais ils n'ont montré aucun impact de la souche de BL testée sur le profil aromatique des vins. De même, aucun test de classement évaluant l'intensité de la note fruitée sur les vins Mmv09, Mmv08 et CSmv08, selon la souche de BL impliquée, n'a donné de résultats pertinents. Ils ne feront donc pas l'objet de discussion.

C. Discussion

La FML modifie l'arôme des vins rouges et plus particulièrement la note fruitée, qui, de tous les descripteurs aromatiques étudiés, paraît être celui qui est le plus influencé par l'activité des BL. En effet, 6 profils sur 7 montrent des variations de la note fruitée, statistiquement significatives dans la moitié des cas. La grande variabilité des résultats dans la modification de l'arôme fruité par la FML est confirmée avec toutes les tendances retrouvées (augmentation, diminution, absence d'impact). L'effet souche de BL mis en évidence sur le vin Mmv09 pourrait être en partie à l'origine de cette variabilité. De nombreux auteurs ont auparavant évoqué l'effet souche pour expliquer la grande variabilité d'impact de la FML sur la note fruitée des vins (Davis *et al.*, 1985; Mc Daniel, 1987; Henick-Kling et Acree, 1994; Laurent *et al.*, 1994; Boido *et al.*, 2009). Cependant, peu d'épreuves d'analyse sensorielle

réalisées au cours de ces mêmes travaux ont permis de confirmer réellement l'impact de la souche de BL sur les modulations de la note fruitée.

Au-delà de ces grandes tendances, il est intéressant de constater que la FML peut moduler la note fruitée des vins sans forcément la détruire ou la renforcer. L'intensification de la note fruit confituré au détriment de la note fruit frais au cours des FML menées sur le vin Mmv08, pourrait être liée à l'augmentation dans le même temps de l'intensité de la note épicée. Le caractère épicé des vins rouges traduit en effet une certaine complexité. Or, la FML est connue pour apporter une complexité à l'arôme des vins, qui pourrait se traduire dans ce cas par une diminution de la note fruit frais plutôt fermentaire en faveur de notes plus complexes de fruit confituré. De plus, l'intensification par la FML de zones olfactives correspondant à des descripteurs de type fruits confiturés (Bonbon, doux, fraise) a déjà été constatée dans des aromagrammes de vins de Merlot (Keim *et al.*, 2002).

Par ailleurs, il semblerait que l'évolution de la note fruitée au cours de la FML puisse être en partie liée à celle de la note fumé/grillé. En effet, les 4 vins pour qui la note fumé/grillé est perçue plus intense sont également perçus moins fruités. La note fumé/grillé semble ainsi produire un effet de masque olfactif sur l'arôme fruité des vins rouges. De plus, ce masque olfactif semble plutôt caractériser les vins ayant réalisé la FML, car 3 des 4 vins concernés par ce phénomène ont effectivement réalisé la FML. Toutefois, ces 3 vins correspondant aux essais réalisés sur le vin Mmv09 ont tous été comparés au même témoin sans FML. De ce fait, l'implication de la FML dans l'origine de ce masque fumé/grillé reste à confirmer. Néanmoins, d'autres auteurs ont précédemment observé une intensification de cette note fumé/grillé au cours de la FML (Keim *et al.*, 2002).

Ces modulations de la note fruitée au cours de la FML ne dépendent pas des variations de la note végétale qui peut également être influencée par la FML. La note végétale est cependant moins affectée par la FML que la note fruitée et fumé/grillé (3 vins sur 7). L'activité des BL semble toutefois plutôt diminuer l'intensité de cette note aromatique (2 vins sur 3). Ce constat correspond aux données de la littérature (Henick-Kling et Acree, 1994; Laurent *et al.*, 1994; Keim *et al.*, 2002), mais une augmentation de ce caractère aromatique par l'activité des BL a déjà été observée dans des vins rouges (Sauvageot et Vivier, 1997).

Enfin, de tous les descripteurs évalués, la note lactique est la moins affectée par la FML. En effet, la FML intensifie la note lactique des vins rouges seulement dans 1 cas sur 7,

les autres ne conduisant à aucune variation notable. La souche commerciale de BL impliquée dans ce cas est d'ailleurs connue pour produire rapidement et de façon importante du diacétyl, principal marqueur de l'arôme lactique des vins. Dans ce cas, l'augmentation de la note lactique est associée à une diminution de l'intensité de la note fruitée. Un masque de l'arôme lactique sur l'arôme fruité est envisageable, bien que dans le même temps la note fumé/grillé augmente également. Cette fréquence faible d'apparition de la note lactique est surprenante car celle-ci caractérise généralement l'activité des BL du vin. De plus, empiriquement, la diminution de la note fruitée des vins au cours de la FML est souvent associée à un certain effet masque apporté par le caractère lactique développé par l'activité des BL. Or, ici cet effet de masque lactique sur la note fruitée des vins n'est pas démontré. L'étude des variations en marqueurs de l'arôme lactique des vins au cours de la FML devrait pouvoir apporter certains éléments de réponse.

II. Evolution des composés de la fraction lactique au cours de la FML

Le diacétyl est majoritairement responsable de la note lactique des vins. De ce fait, les variations de sa concentration au cours de la FML ont été étudiées durant 3 millésimes (2007, 2008, 2009) dans 45 vins rouges, en regardant notamment l'impact de la souche de BL et de la matrice "vin". La teneur en diacétyl étant susceptible d'être modulée par les activités réductases des BL (de Revel, 1992), les composés issus de sa réduction ont également été suivis (acétoïne, butane-2,3-diol) ainsi que d'autres composés plus ou moins marqueurs de la note lactique (méthylglyoxal, acétol, pentane-2,3-dione).

A. Bilan analytique des variations en composés α -dicarbonylés

1. Le diacétyl et les composés issus de sa réduction

La FML augmente de façon significative la teneur en diacétyl des vins rouges étudiés. En effet, sur les 45 vins dosés, la teneur en diacétyl est accentuée au cours de la FML pour 40 d'entre eux, en considérant comme négligeables toutes variations inférieures à 10 % de la concentration initiale (seuil de rejet) (**Figure 26**). La teneur moyenne en diacétyl des vins rouges étudiés avant FML est de 4,5 mg/l et augmente jusqu'à 10,2 mg/l après FML.

La moyenne des variations en diacétyle constatées au cours des FML étudiées est de + 164 %, ce qui équivaut à des concentrations augmentant en moyenne d'un facteur 2,6. Cette augmentation est significative au seuil de 0,1 % (**Figure 27**).

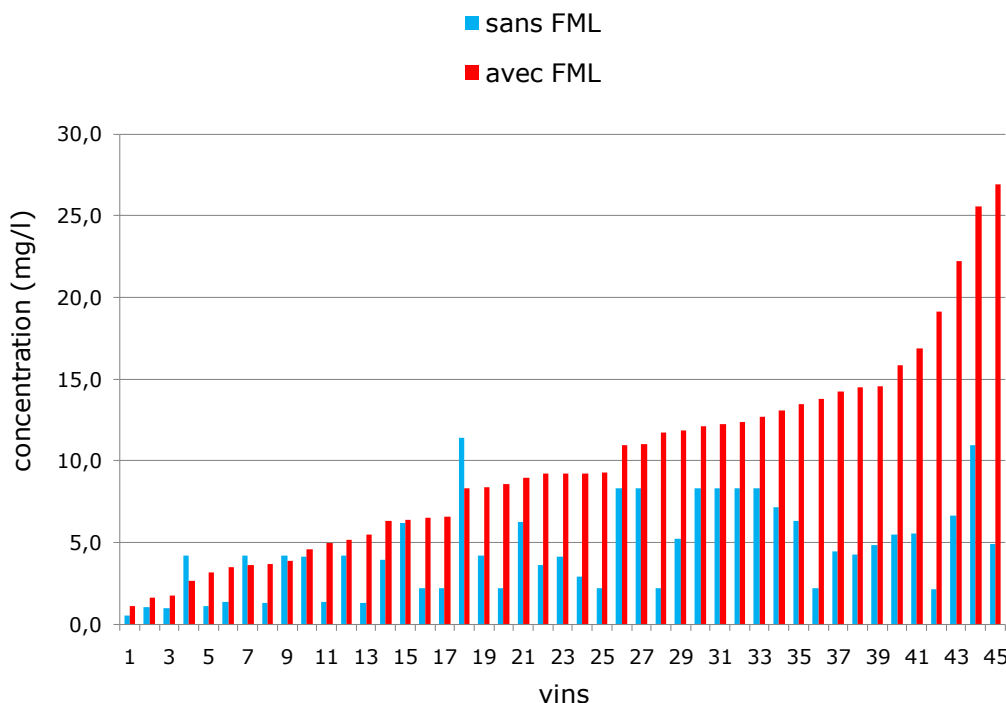


Figure 26 : Teneur en diacétyle de 45 vins rouges avant et après FML, exprimée en mg/l.

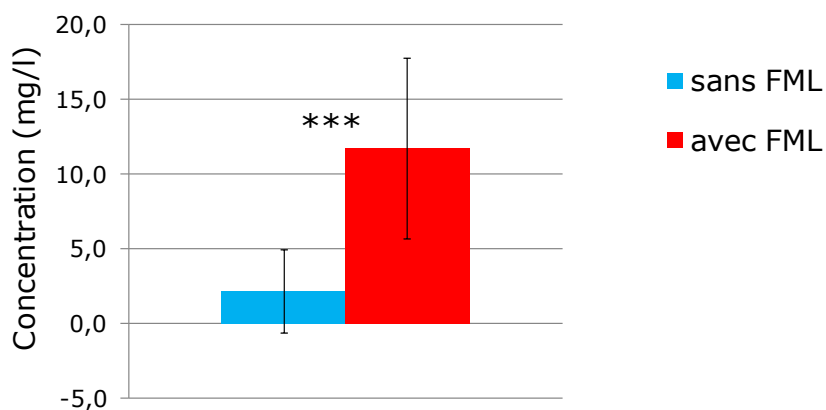


Figure 27 : Teneur moyenne en diacétyle de 45 vins rouges avant et après FML, exprimée en mg/l.

Dans le même temps, une augmentation de la teneur en composés issus de la réduction du diacétyle est également observée au cours de la FML. Ce constat est particulièrement vrai pour l'acétoïne qui augmente en moyenne de façon significative (au seuil de 0,1 %) pratiquement d'un facteur 3 (+ 195 %) (**Figure 28**). La concentration en acétoïne augmente

dans 42 vins sur 44 (seuil de rejet à 10 %) (annexe 6). La teneur moyenne des vins avant FML en acétoïne est de 12,5 mg/l et augmente pour atteindre un niveau de 25,5 mg/l après FML.

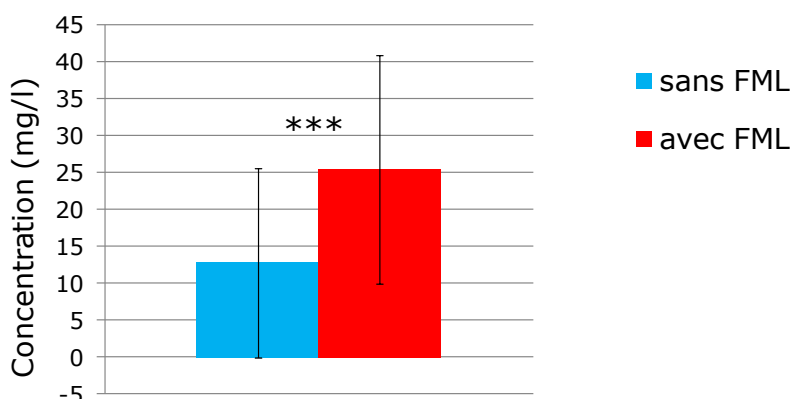


Figure 28 : Teneur moyenne en acétoïne de 44 vins rouges avant et après FML, exprimée en mg/l.

En revanche, ce constat est moins flagrant lorsqu'il s'agit des deux isomères du butane-2,3-diol. En effet, la différence entre la teneur moyenne en butane-2,3-diol (somme des 2 isomères) des vins avant et après FML est très faible, et n'est pas significative (respectivement 172 et 189 mg/l). Les vins avant FML ont des teneurs en butane-2,3-diol comprises entre 63 et 450 mg/l alors qu'après FML cela ne varie pas beaucoup (entre 75 et 460 mg/l). Dans la moitié des vins, aucune variation de la teneur en butane-2,3-diol n'est observée (seuil de rejet 10 %). D'un autre côté, il y a tout de même 44 % des FML étudiées qui conduisent à une augmentation du niveau en butane-2,3-diol (annexe 6). Au final, l'augmentation moyenne de la teneur en butane-2,3-diol au cours de la FML n'est seulement que de 15 %.

2. Autres composés α -dicarbonylés et l'acétol

D'autres composés α -dicarbonylés participant de façon plus ou moins évidente à la note lactique ont été suivis au cours de la FML. Cependant, le principal intérêt de les doser est de confirmer les phénomènes de réduction enzymatique observée par ailleurs sur le diacétyl. Il s'agit en effet de composés α -dicarbonylés tel que le méthyl-glyoxal et la pentan-2,3-dione susceptibles d'être réduits par le métabolisme bactérien. En plus de ces composés, l'acétol qui est principalement produit par la réduction du méthyl-glyoxal a également été dosé.

Si nous considérons la teneur moyenne des vins en méthylglyoxal, aucune variation particulière n'est mise en évidence avec une valeur de 0,69 mg/l avant FML et de 0,68 mg/l après FML. Cependant, en observant les variations pour chaque vin (voir annexe 6), ce constat n'est plus valable car 65 % des vins analysés ont des plus fortes teneurs en méthylglyoxal après FML alors que 30 % d'entre eux présentent au contraire des concentrations plus faibles après FML, la variation moyenne étant de + 46 %. Ce constat est le signe d'une production de méthylglyoxal par les BL, vraisemblablement couplée à une certaine réduction diminuant la teneur des vins en méthylglyoxal et ceci plus ou moins rapidement.

Cette hypothèse est confirmée par le dosage de l'acétol, issu de la réduction du méthylglyoxal. En effet, bien que la différence entre les teneurs moyennes des vins avant et après FML ne soit pas significative (respectivement 45,3 et 49,2 mg/l), 66 % des vins analysés montrent une augmentation de la teneur en acétol après FML (annexe 6). La moyenne des variations de la concentration en acétol au cours des FML étudiées est de + 38 %, ce qui confirme la réduction du méthylglyoxal par les BL du vin.

Enfin, la teneur des vins rouges en pentane-2,3-dione diminue significativement (au seuil de 5 %) au cours de la FML avec une concentration moyenne de 0,44 mg/l avant FML chutant à 0,33 mg/l après FML. Plus de 70 % des vins étudiés montrent une diminution de la teneur en ce composé au cours de la FML. La pentane-2,3-dione étant d'origine levurienne, ces tendances sont en partie le reflet des activités réductases des BL (**figure 29**).

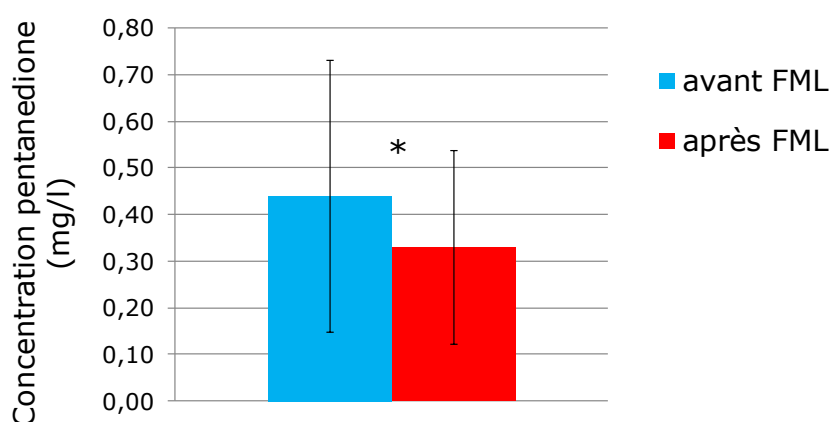


Figure 29 : Teneur moyenne en pentane-2,3-dione de 45 vins rouges avant et après FML, exprimée en mg/l.

B. Implication de certains paramètres œnologiques sur les teneurs en diacétyl

1. Effet souche

Certains essais ont permis d'étudier l'influence de la souche de BL sur la synthèse bactérienne de diacétyl en comparant les teneurs d'un même vin dont la FML a été effectuée avec différentes souches de BL.

Toutes les études menées s'accordent sur le fait que la souche bactérienne influence fortement la synthèse du diacétyl. En effet, les 4 vins testés ici présentent des différences inter-souches importantes. L'exemple des essais menés en microvinification sur le vin Mmv09 permettant de tester 6 souches de BL différentes illustre bien ce phénomène. La variabilité inter-souches dans la production de diacétyl est montrée **Figure 30**. La souche K, qui a terminé la FML beaucoup plus rapidement que les autres souches (11 jours), a produit le plus de diacétyl (11,6 mg/l). Cependant, les FML languissantes (H, I et L), dont 2 ont été effectuées avec des BL issues de la population indigène (H et I), présentent des niveaux de production de diacétyl assez variables qui restent supérieurs à la souche F (4,3 mg/l). La souche J a produit moins de diacétyl que K mais le niveau de production reste élevé (9,6 mg/l), pour ce levain par ailleurs connu pour produire des teneurs élevées en diacétyl et de façon plutôt précoce au cours de la FML.

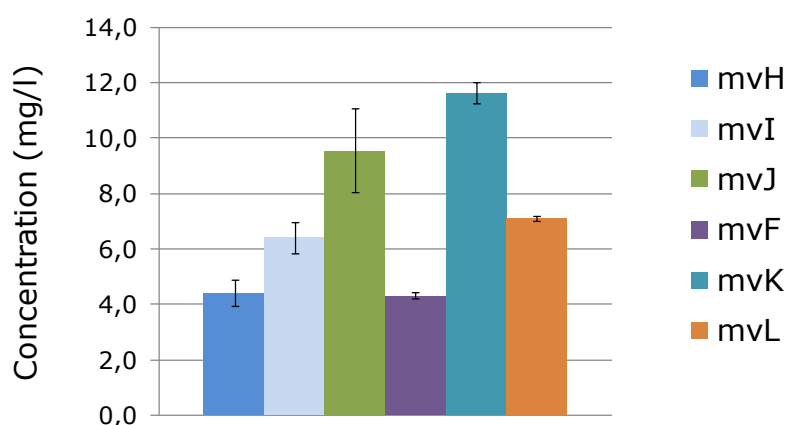


Figure 30 : Variation moyenne (sur 3 triplicats) de la teneur en diacétyl au cours de la FML de 6 souches de BL (H, I, J, F, K, L) sur le vin Mmv09 (essai de microvinification sur Merlot). Concentrations exprimées en mg/l.

L'essai réalisé sur le vin Ms08 compare l'impact d'une souche indigène (Sis) et d'une souche commerciale (souche F). La **Figure 31** montre que la population indigène ne produit pratiquement pas de diacétyle (0,4 mg/l) alors que la souche F en produit 13 fois plus (5,1 mg/l).

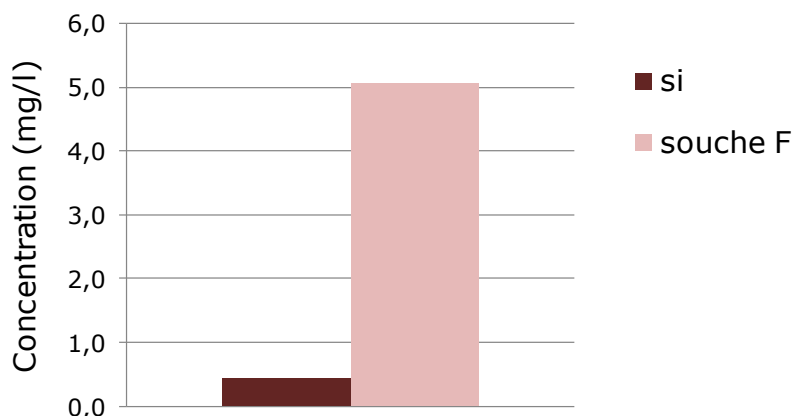


Figure 31 : Variation de la teneur en diacétyle au cours de la FML de 2 souches de BL (Sis, F) sur le vin Ms08. Concentrations exprimées en mg/l.

Cette différence peut être due à une activité réductrice plus importante de la population indigène car Sis produit plus d'acétoïne (annexe 6). Cependant, la différence majeure entre ces deux populations vient probablement de la capacité de dégradation de l'acide citrique. En effet, la souche F produit globalement plus de composés issus de la dégradation de l'acide citrique (diacétyle et ses produits de réduction) que la population indigène (**Figure 32**).

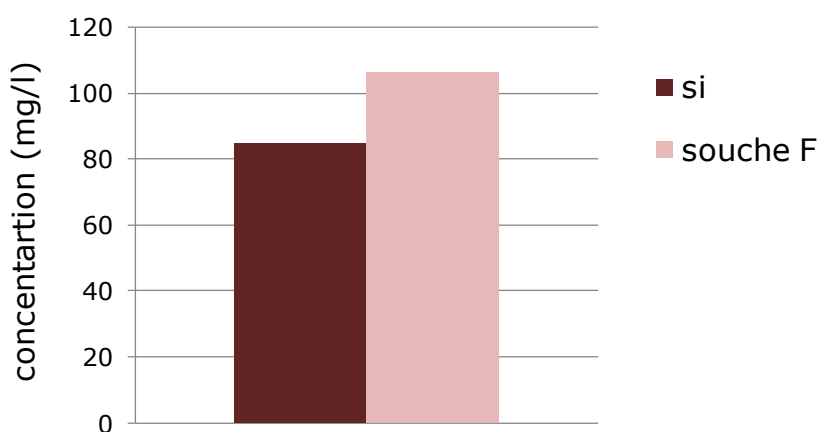


Figure 32 : Variation en composés issus de la dégradation de l'acide citrique au cours de la FML de 2 souches de BL (Sis, F) sur le vin Ms08. Concentrations exprimées en mg/l correspondant à la somme des concentrations en diacétyle, acétoïne et butane-2,3-diol.

2. Effet "matrice"

Parmi tous les essais réalisés au cours de ces travaux, certains ont permis de comparer l'impact d'une même souche de BL réalisant la FML dans des vins différents. Cela correspond à ce que nous avons appelé l'étude de l'effet "matrice" qui englobe la composition du vin mais aussi l'action d'une microflore indigène et de son métabolisme résiduel.

La souche F produit du diacétyle de façon relativement constante dans les 3 vins testés, le taux de variation de sa concentration étant de + 122 % pour Ms08, + 199 % pour Mmv09 et de + 185 % pour MLaf09. D'un autre côté, la souche B produit du diacétyle dans 3 vins sur 4 (Mmv08, Beaum09, Lev09), aucune production n'étant constatée au cours de la FML menée sur le vin CSmv08. L'impact de l'effet matrice sur la production en diacétyle par les BL est bien réel. Il est plus ou moins fort en fonction de la souche.

Cet effet se confirme lorsque nous comparons l'effet inter-souche entre cette souche B et la souche E sur les vins CSmv08 et Mmv08 (**Figure 33**). Ces 2 souches sont les seules à avoir complètement réussi leur implantation sur ces 2 essais de microvinification réalisés à la même température. La souche E produit de façon constante du diacétyle sur les 2 vins. En revanche, la souche B produit beaucoup plus de diacétyle dans le vin Mmv08 que CSmv08. Cette différence peut provenir d'une diminution de l'activité citrate lyase et/ou d'une augmentation de l'activité réductase de la souche B dans le vin CSmv08. Les deux possibilités peuvent être envisagées, seul un dosage de l'acide citrique pourrait permettre de mettre en évidence la voie principale responsable de cet effet matrice.

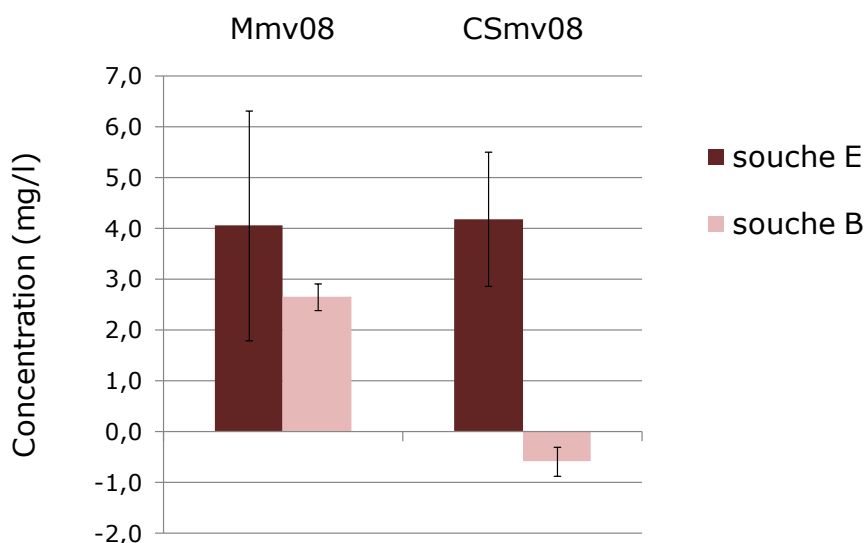


Figure 33 : Variation moyenne (sur 3 triplicats) en diacétyle au cours de la FML des souches E et B sur les vins Mmv08 et CSmv08. Concentrations exprimées en mg/l.

C. Discussion

Tous ces essais menés sur 3 millésimes (2007, 2008, 2009) confirment bien la capacité des BL à synthétiser le diacétyl ainsi que l'acétoïne et le butane-2,3-diol, issus de sa réduction. La formation de ces composés en quantité très diverses au cours de la FML indique la présence d'une d'activité citrate lyase. En outre, la synthèse de l'acétoïne et du butan-2,3-diol, ainsi que les variations observées au cours de la FML sur d'autres composés α -dicarbonylés (méthylglyoxal, pentanedione) montrent des activités réductases très variables chez *Oe. oeni*.

La production de diacétyl est dépendante de la souche et des différences intersouches peuvent être importantes et liées aux activités citrate lyase et réductases. Mais la matrice "vin" influence également les variations en diacétyl constatées au cours de la FML.

Cependant, cette grande variabilité de la modulation de la teneur en diacétyl au cours de la FML semble être dans un premier temps en contradiction avec les résultats d'analyses sensorielles précédemment décrits. En effet, seul 1 profil aromatique a donné lieu à des variations de la note lactique, alors que 6 des 7 vins évalués par analyse sensorielle présentent une augmentation de la teneur en diacétyl lors de la FML.

Une des raisons pouvant expliquer ces contradictions est le fait que l'arôme lactique est souvent difficile à percevoir dans des vins rouges très jeunes. Le diacétyl et les autres composés α -dicarbonylés y sont en grande majorité complexés par le SO₂ (de Revel, 1988; Martineau *et al.*, 1995). La forme combinée du diacétyl est beaucoup moins volatile que sa forme libre, ce qui entraîne une nette augmentation de son seuil de perception (Bartowsky et Henschke, 2004). Il faut souvent attendre plusieurs semaines, voir de nombreux mois pour mieux percevoir le caractère lactique des vins, le temps que le diacétyl se décombine car la réaction est réversible (de Revel, 1988). Ainsi, il serait plus intéressant de juger l'impact de la note lactique sur la note fruitée des vins rouges quelques mois après la fin de la FML. Un masque olfactif de l'arôme fruité des vins rouges dû au développement tardif de notes lactiques produites par la FML pourrait alors être envisageable. Cependant, à court terme, cet effet de masque lactique est remis en cause. Les mouvements de composés marquant la note fruitée pourraient alors être directement plus impliqués dans les variations de l'arôme fruité constatées à la dégustation.

III. Influence de la FML sur certains composés impliqués dans la perception de l'arôme fruité des vins rouges

La perception de l'arôme fruité des vins rouges met en jeu des phénomènes d'interaction perceptive très complexes. De ce fait, de nombreuses molécules de diverses origines y sont sans doute impliquées. Outre les esters, qui représentent la principale famille de marqueurs de la note fruitée des vins, d'autres composés comme les lactones, C13-norisoprénoides, terpénols, composés soufrés volatils ou furanones peuvent jouer un rôle. Toutes ces molécules prises individuellement n'ont souvent qu'un impact limité sur l'arôme des vins rouges malgré leur pouvoir odorant important. Cependant, il est maintenant reconnu que ces composés participent en mélange à des phénomènes de synergie, exhaustant notamment la note fruitée de certains esters. Pour cette raison, l'étude de l'impact des BL sur la composition des vins rouges en lactones, C13-norisoprénoides, linalol, thiols et DMS s'est avérée indispensable.

A. Evolution de la teneur en certains composés variétaux

1. Les lactones

Les lactones qui ont été suivies au cours de cette étude sont les γ -lactones (du C8 au C12) et la δ -décalactone (δ -C10).

Dans leur ensemble, les lactones ne sont que très peu affectées par la FML car pour 80 % des vins étudiés ($n = 39$) aucune variation particulière n'est constatée, en considérant tout mouvement inférieur à 10 %, négligeable. Pour le reste, 13 % des FML étudiées conduisent à une diminution de la concentration globale en lactones et seulement 7 % amènent à une augmentation.

Comme le montre le **Tableau 16**, ce constat peut être établi pour la majorité des lactones étudiées. C'est le cas pour la γ -C9 qui représente une grande partie de la teneur totale en lactones et dont la concentration ne varie pas dans 82 % des cas. Les autres lactones semblent être un peu plus sensibles à l'activité des BL, car la proportion de cas sans variation est un peu moins élevée, même si elle reste majoritaire (entre 49 % et 66 %). Par ailleurs, les

diminutions de concentration au cours de la FML semblent un peu plus fréquentes que les augmentations, notamment pour la δ -C10 dont la teneur diminue dans pratiquement la moitié des cas.

Tableau 16 : Bilan des variations de concentrations en lactones constatées sur 39 vins rouges au cours de la FML. Les critères pour considérer les variations négligeables dépendent de la concentration de la lactone dans le vin après FA : variations < 10 %.

Lactones	Moyenne des variations (%)	Proportion de FML aux variations négligeables (%)	Proportion de FML avec diminution de la concentration en lactones (%)	Proportion de FML avec augmentation de la concentration en lactones (%)
γ -C8	0	66	16	18
γ -C9	-0,7	82	10	8
γ -C10	-1,5	64	23	13
γ -C11	-1,2	51	31	18
γ -C12	+ 3,1	51	23	26
δ -C10	-5,1	49	44	7

2. C13-norisoprénoides et linalol

Les composés C13-norisoprénoides (C13NI) et le linalol ont non seulement comme point commun d'être des composés d'origine variétale, mais également d'être issus en partie de précurseurs glycosylés. Cela constitue d'ailleurs la principale raison de mesurer les variations du linalol. Car si d'un côté ce n'est pas un véritable marqueur de l'arôme fruité des vins rouges non muscatés, d'un autre côté, il représente un excellent modèle pour étudier les activités β -glycosidases responsables de la libération des aglycones dans le vin. En outre, il s'agit du seul terpénol ayant été cité comme pouvant être impliqué de manière synergique dans certaines modulations de l'arôme des vins rouges (Ferreira *et al.*, 2001; Guth et Sies, 2002).

Les C13NI sont connus pour être impliqués activement et de façon synergique dans la perception de la note fruitée des vins rouges. C'est particulièrement le cas de la β -

damascénone (β -d) qui est majoritaire dans les vins et de la β -ionone (β -i) en quantité plus restreinte. L' α -ionone (α -i), moins puissante au niveau aromatique, a également été suivie au cours de cette étude. En revanche, la β -damascone, beaucoup moins odorante que les 3 premiers composés ne se rencontre qu'à l'état d'ultratraces dans les vins (une dizaine de ng/l) (annexe 4), et ne fera pas l'objet de discussion.

Deux constats apparaissent après l'analyse des résultats du dosage des C13NI dans les vins, avant et après FML. Le premier est comme cela a été observé précédemment avec les lactones, la FML affecte peu la teneur en C13NI. Pour 73 % des vins étudiés, aucune variation particulière n'est mise en évidence (seuil de rejet = 10 % de la concentration initiale). D'un autre côté, il est intéressant de remarquer que dans les rares cas où des mouvements sont observés, il s'agit essentiellement d'une diminution de la teneur globale en C13NI. Sur les trois C13NI étudiés, nous constatons une tendance très similaire pour la β -d et pour la β -i, alors que la FML semble avoir plus d'impact sur l' α -ionone dont la teneur peut, soit augmenter (32 % des cas), soit diminuer (48 % des cas) (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Bilan des variations de concentrations en C13NI constatées sur 39 vins rouges au cours de la FML. Les critères pour considérer les variations négligeables dépendent de la concentration de l'ester dans le vin après FA : variations < 10 %.

C13NI	Moyenne des variations (%)	Proportion de FML aux variations négligeables (%)	Proportion de FML avec diminution de la concentration en C13NI (%)	Proportion de FML avec augmentation de la concentration en C13NI (%)
β -d	-5,2	70	25	5
β -i	-5,1	73	25	2
α -i	-3,1	20	48	32

En revanche, une augmentation globale de la teneur en linalol des vins après FML est parallèlement observée (**Figure 34**). Bien que limitée (variation moyenne = + 1,5 μ g/l), cette production par les BL s'avère toutefois significative au seuil de 5 %. Les BL libèrent en effet du linalol dans plus de la moitié des cas (51 % des cas, avec un seuil de rejet à 10 %), alors que des diminutions de teneur sont constatées dans 13 % des FML étudiées (annexe 4).

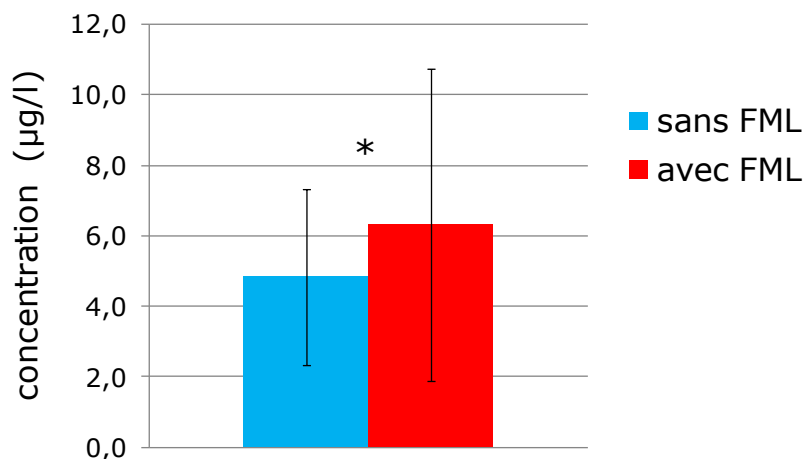


Figure 34 : Evolution moyenne de la teneur en linalol au cours de la FML dans 44 vins rouges, exprimée en µg/l.

3. Effet "souche" et effet "matrice"

Au regard des faibles variations de concentration observées entre les vins, avant et après FML pour les lactones et les C13NI, l'effet souche et l'effet matrice restent minimes. Quelques petites variations sont constatées aussi bien entre différentes souches sur un même vin, qu'entre différents vins pour une même souche de BL. Toutefois, 85 % des variations constatées sur les vins concernés sont négligeables.

En revanche, l'impact de la souche et de la composition même du vin sur les variations en linalol au cours de la FML sont plus visibles. D'un côté, comme le potentiel en précurseurs glycosylés dépend du vin et notamment du cépage, la matrice a forcément un impact sur la quantité de linalol libérée au cours de la FML. C'est par exemple le cas de la souche E qui libère 0,4 µg/l de linalol dans le vin de Cabernet-Sauvignon CSmv08 contre 1 µg/l dans le vin de Merlot Mmv08. Cependant, l'effet souche semble toutefois plus marqué que l'effet matrice dans la production de linalol au cours de la FML. En effet, les 3 souches testées pour étudier l'impact de la matrice "vin" ont le même comportement quelque soit l'essai considéré. D'un côté les souches B et E libèrent du linalol au cours de la FML dans tous les vins étudiés. D'un autre côté, la souche F ne libère pas de linalol dans les 3 vins étudiés, certainement à cause d'une activité β -glycosidase plus faible chez cette souche (Gagné *et al*, 2010.). Les petites diminutions de teneur en linalol observées pour cette souche sont probablement dues à des

réactions chimiques acide-catalysés comme par exemple des réarrangements en α -terpinéol (Gunata *et al.*, 1986).

Ces résultats et l'étude de l'effet souche sur le vin Mmv09 (**Figure 35**) confirment l'importance de la souche de BL dans la libération des terpénols issus de précurseurs glycosylés. Nous constatons en effet que 4 souches sur 6 testées sur le vin Mmv09 sont capables de libérer du linalol au cours de la FML. Les 2 dernières souches conduisent à des diminutions probablement dues aux mêmes raisons que celles évoquées précédemment. Bien que ces variations soient quantitativement faibles, elles ne sont pas pour autant négligeables car elles correspondent à une proportion de 15 % à 35 % de la teneur initiale en linalol.

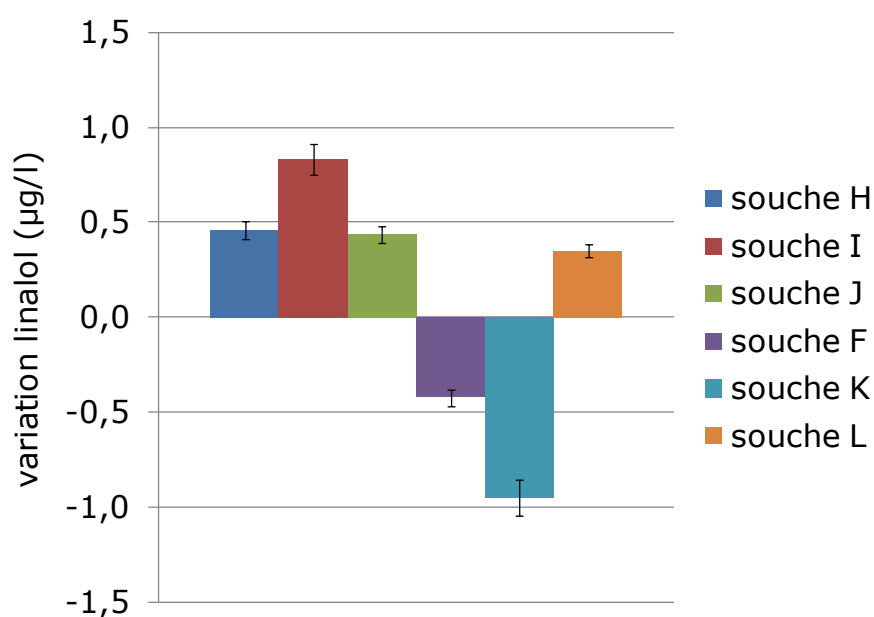


Figure 35 : Variation moyenne de linalol au cours de la FML de 6 souches de BL (H, I, J, F, K, L) sur le vin Mmv09. Niveaux de production exprimés en µg/l. L'écart-type associé est calculé sur les 3 triplicats réalisés pour chaque souche.

B. Evolution au cours de la FML de la teneur en composés soufrés participant à la note fruitée des vins rouges

1. Les thiols

L'impact de la FML sur les thiols impliqués dans la note fruitée des vins n'a jamais été étudié mis à part des travaux restreints sur le 3SH (Murat, 2000; de Revel, 2005). Les 3 thiols étudiés au cours de ces travaux sont le 3SH, le 2SPE et le 3SPE.

Dans l'ensemble, une diminution de la teneur en 3SH est observée au cours de la FML. Cependant cette tendance n'est pas systématique car en considérant une nouvelle fois les variations inférieures à 10 % de la teneur initiale comme négligeables, 53 % des FML étudiées mènent à une diminution de la concentration en 3SH, 21 % à une augmentation et 26 % des cas n'amènent aucune variation particulière (**Figure 36**). Le manque de temps et la difficulté du dosage ne nous ont pas permis d'avoir plus de données pour ce thiol.

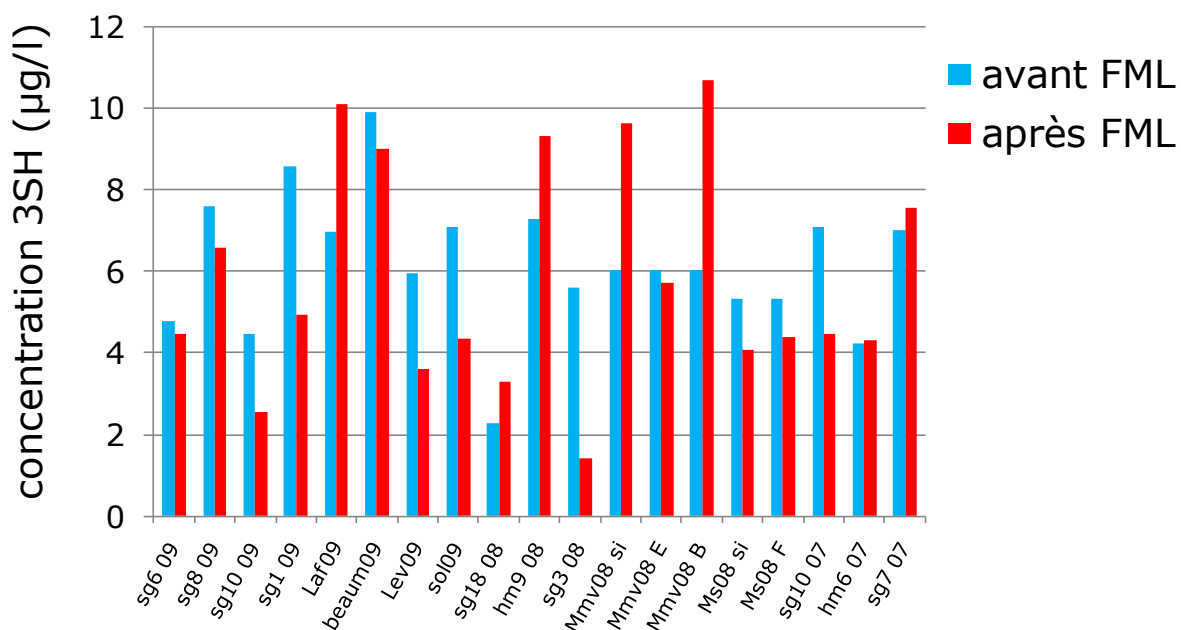


Figure 36 : Evolution de la teneur en 3SH de 19 vins rouges au cours de la FML exprimée en µg/l.

Aucune tendance particulière n'est observée pour la 2SPE et aucune conclusion ne peut être tirée pour ce composé qui devra être réévalué après optimisation de la méthode de dosage.

En revanche, contrairement à son isomère, une tendance est mise en évidence pour la 3SPE. En effet, 60 % des FML étudiées ont apporté un enrichissement du vin en 3SPE (seuil de rejet à 10 %). Le manque de résultats sur ce composé ne nous a pas permis d'étudier l'impact de la souche de BL et de la matrice sur cette production. L'optimisation de la méthode de dosage des thiols par SPE-SBSE-GC/MS devra confirmer ces tendances et permettre d'évaluer avec plus de précision les niveaux réels de production des BL afin de mieux estimer l'impact potentiel de ces variations sur l'arôme fruité des vins rouges.

2. Le DMS

Le DMS montre une tendance assez nette à être synthétisé par les BL au cours de la FML. Si d'un côté cette production n'est pas systématique, aucun cas de diminution de la concentration en DMS n'est observé. En effet, avec un seuil de rejet équivalent à 10 % de la teneur après FA, une synthèse de DMS est observée au cours de la FML dans 50 % des vins étudiés. Les variations moyennes dans ces cas restent faibles (+ 1,4 µg/l) rendant la production globale de DMS par les BL au cours des FML étudiées non significatives (**Tableau 18**). Les BL sont néanmoins capables de produire quelques microgrammes par litre de DMS comme dans le cas de la FML spontanée du vin Ms08 (+ 4,2 µg/l).

Tableau 18 : Variations moyennes des concentrations en DMS constatées sur 48 vins rouges au cours de la FML. Le test de significativité, réalisé par ANOVA (n = 48), différencie les vins avant et après FML. Le seuil de rejet est de 10 %.

Variation moyenne (µg/l)	+ 1,4
Moyenne des variations (%)	+ 35
Proportion de FML aux variations négligeables (%)	50
Proportion de FML avec diminution de la concentration (%)	0
Proportion de FML avec augmentation de la concentration (%)	50
Significativité des différences (valeur p)	0,29

Cette production de DMS au cours de la FML semble dépendre en partie de la souche de BL considérée. En effet, certaines variations inter-souches sont constatées. Les BL indigènes du vin Ms08 produisent plus de DMS que la souche F sur ce même vin (4,2 µg/l contre 2,2 µg/l). De même, sur le vin Mmv09, 4 souches de BL (H, I, K, F) produisent du DMS entre 0,8 µg/l et 2 µg/l pendant que les 2 autres souches (J, L) n'en produisent pas ou peu.

Enfin, la composition de la matrice modifie également la teneur en DMS au cours de la FML. Par exemple, la souche F produit 2,2 µg/l de DMS dans le vin Ms08, 1 µg/l dans le vin Mmv09 et n'en produit pas dans le vin Mlaf09, avec les 3 FML réalisés à 20 °C.

C. Discussion

Globalement, les lactones ne sont que peu affectées par la FML. La lactone dont la teneur est la plus influencée par l'activité des BL est la δ -décylactone dont la teneur diminue dans pratiquement la moitié des cas. Toutefois, les niveaux de variations de la concentration en δ -décylactone sont très faibles (moins d'1 $\mu\text{g/l}$) au regard de son seuil de perception (390 $\mu\text{g/l}$). Il est ainsi peu probable que des diminutions de la teneur en cette lactone participent à une baisse de l'intensité de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML. Comme l'ont montré Ugliano et Moio (2005), la γ -nonylactone, principale lactone pouvant avoir une influence sur la note fruitée des vins rouges, n'est pas affectée par la FML dans plus de 80 % des cas alors que les variations observées dans les autres cas sont minimales ($< 0,3 \mu\text{g/l}$). Ces mouvements sont faibles par rapport aux niveaux de variation constatés lors d'impact aromatique perçu en solution modèle (3,6 $\mu\text{g/l}$) (Loscos *et al.*, 2007). Nos données ne permettent pas de démontrer que les rares variations de la teneur en γ -nonylactone constatées au cours de la FML puissent avoir un impact sur la note fruitée des vins rouges. Cependant, à plus long terme, la FML pourrait être impliquée dans la formation des lactones par lactonisation chimique d'acides gras hydroxylés produits par les BL, soit par oxydation d'acides gras insaturés (Wanikawa *et al.*, 2000), soit par activité β -glycosidase (Segurel *et al.*, 2009). La FML pourrait ainsi contribuer à marquer l'arôme de vins vieillissants suite à un enrichissement préalable en précurseurs de lactones. Il est ici envisagé, encore une fois, un mécanisme différé de modification aromatique par la FML. Des études complémentaires devront être menées afin de doser les acides gras hydroxylés.

Comme les γ -lactones, les concentrations en C13NI sont très peu affectées par la FML. La libération de linalol constatée parallèlement prouve cependant que les activités β -glycosidases des BL sont actives. La capacité des BL d'hydrolyser les précurseurs glycosylés des C13NI ayant déjà été montrée par ailleurs (Boido *et al.*, 2002; Ugliano *et al.*, 2003), l'absence ici de variation pourrait provenir de phénomènes d'adsorption et d'occlusion des C13NI avec les macromolécules polysaccharidiques produites par les BL durant la FML (Boido *et al.*, 2002). Les C13NI étant des composés carbonylés, ils sont aussi potentiellement réductibles par les BL. Un équilibre entre libération et réduction des C13NI au cours de la FML peut donc également être envisagé, mais aucune étude ne démontre la présence de cette activité chez les BL ou les levures. Des interactions entre les C13NI et le SO_2 pourraient également être responsables de cette absence de variations et expliquer certaines diminutions

(Daniel *et al.*, 2004). En outre, le fait que la FML ait plus d'impact sur l' α -ionone que sur les deux premiers C13NI reste inexpliqué. Très peu de travaux ont étudié ce composé dans les vins. Une différence d'activité β -glycosidase pour cet aglycone comparé à la β -i et à la β -d pourrait être envisagée, comme l'ont montrée (Gagné *et al.*, 2010) pour d'autres aglycones. Cependant, les variations constatées sont faibles (quelques dizaines de ng/l) par rapport au seuil de perception de l' α -ionone (400 ng/l). L'implication des C13NI dans la variation à court terme, imputable aux BL, de l'arôme fruité des vins rouges, n'est pas démontrée. En revanche, une étude sur les complexes polysaccharides/C13NI et SO₂/C13NI pourrait permettre de savoir si ces interactions perdurent dans le temps, et si la FML ne pourrait pas avoir un impact à plus long terme sur la teneur en C13NI des vins rouges pouvant engendrer des modifications aromatiques tardives.

Le linalol, également issu de précurseurs glycosylés, est libéré significativement au cours de la FML. Ces variations dépendent plus des souches de BL que de la matrice. L'effet souche est bien connu pour l'activité β -glycosidase (Barbagallo *et al.*, 2004; Grimaldi *et al.*, 2005; Bloem *et al.*, 2008) et cette dernière est particulièrement liée à la nature du substrat (Gagné *et al.*, 2010). Cependant, bien qu'elles soient significatives, les variations de la teneur en linalol restent quantitativement faibles (en moyenne + 1,5 μ g/l). Aucun lien n'a été mis en évidence entre la variation de la teneur en linalol au cours de la FML et celle de la note fruitée des vins. Cependant, des variations plus importantes (+ 10 μ g/l) ont été observées dans quelques vins n'ayant pas été soumis à l'analyse sensorielle. Dans ces derniers, un impact aromatique notamment par un effet synergique de ce terpénol, ne peut être exclu. En outre, il peut être envisagé pour des cépages plus riches en précurseurs du linalol que la FML puisse favoriser le développement de certaines notes fruitées. De telles variations ont été observées récemment en milieu modèle (Hernandez-Orte *et al.*, 2010).

Malgré la difficulté de dosage, certaines tendances dans les variations des teneurs en 3SPE et 3SH au cours de la FML ont pu être mises en évidence. La production de 3SPE par les BL du vin observée au cours de nos travaux n'a jamais été évoquée dans la littérature mais concorde avec les résultats trouvés par Sourabié *et al.* (2008) dans le fromage. Le 3SPE pourrait alors provenir du catabolisme de l'homocystéine, acide aminé présent dans les vins (Benkova *et al.*, 2009). Des études supplémentaires menées avec une méthode d'analyse optimisée devront néanmoins confirmer ces tendances, et vérifier le potentiel d'implication du 3SPE dans les modifications aromatiques apportées par la FML. Les teneurs en 3SH subissent

plutôt la tendance inverse, la FML diminuant la concentration dans plus de la moitié des cas. Les données bibliographiques disponibles sur l'impact de la FML sur le 3SH confortent cette observation (Murat, 2000; de Revel, 2005). En revanche, la cause de cette tendance globale à la diminution du 3SH au cours de la FML reste encore inconnue. Aucune étude n'a encore montré la capacité des BL à dégrader de tels composés soufrés. Au contraire, les BL ont plutôt tendance à produire des composés soufrés à partir d'acides aminés comme la méthionine. Le catabolisme du 3SH par les BL n'étant pas connu, d'autres hypothèses doivent être envisagées. La capacité des lies de levures à retenir le 3SH a été montrée par Blanchard (2000). Une telle capacité peut également être envisagée pour les BL, et pourrait expliquer les diminutions de teneur en 3SH constatées après FML. Ainsi, par rapport aux connaissances actuelles sur le métabolisme des BL, l'hypothèse de la rétention du 3SH par les lies des microorganismes du vin est privilégiée pour expliquer les diminutions de concentration observées.

En outre, des augmentations de la teneur en 3SH au cours de la FML sont montrées pour la première fois. D'un point de vue métabolique, ce constat pourrait tout à fait être envisageable. Bien que cela ne soit pas encore totalement démontré, des activités cystathionine β -lyase et cystathionine γ -lyase semblent être notamment responsables de la conversion directe de la méthionine en méthanethiol chez *Oe. oeni* (Vallet, 2007). Ainsi, malgré la spécificité de ces enzymes envers la cystathionine, d'autres substrats peuvent néanmoins être catabolisés par ces enzymes. Une libération du 3SH au cours de la FML grâce à des activités lyases des BL pourrait alors être envisageable. De plus, le fait que l'augmentation de la teneur en 3SH ne soit observée que dans 20 % des cas, pourrait être le reflet du manque de spécificité des activités lyases des BL envers les précurseurs du 3SH. Ainsi, l'activité cystathionine β -lyase mise en évidence chez *Oe. oeni* (Vallet, 2007) pourrait de manière non spécifique être impliquée dans la libération de 3SH au cours de certaines FML. Cette libération de 3SH pourrait dans certains cas participer à l'intensification de la note fruitée des vins rouges. C'est particulièrement le cas pour le vin Mlaf09 dont la FML augmente de 45 % la teneur en 3SH en même temps qu'elle intensifie l'arôme fruité. L'activité lyase des BL pourrait ainsi être à l'origine de certaines modulations de la note fruitée des vins rouges. L'implication des thiols dans les variations de la note fruitée apportées par la FML pourrait être importante. Une optimisation de la méthode de dosage des thiols développée au cours de ces travaux devra être effectuée, afin de permettre la confirmation de ces résultats originaux.

Pour la première fois, la capacité des BL à produire du DMS est évoquée. Elles en synthétisent des petites quantités mais de façon régulière. La souche de BL ainsi que la matrice semble influencer cette production. Ce composé est principalement formé au cours du vieillissement du vin par dégradation chimique de la S-méthylméthionine (Segurel *et al.*, 2005). Cependant, une quantité non négligeable de DMS est formée également par les levures au cours de la FA par dégradation d'acides aminés mais sans doute aussi par réduction du DMSO (de Mora *et al.*, 1986, Anocibar-Beloqui, 1998). De telles capacités pourraient également être envisagées chez les BL. L'activité de réduction des BL a été précédemment confirmée sur les composés α -dicarbonylés. En outre, des molécules carbonylées plus légères comme l'éthanal sont également affectées par cette réduction. En effet, une tendance nette à la diminution de la teneur en éthanal est observée au cours des FML étudiées (significatif au seuil de 8 %), corroborant ainsi avec les données de la littérature (Osborne *et al.*, 2000). Un impact similaire des BL peut également être envisagé sur des molécules légères sulfonylées comme le DMSO, présent dans les vins à des teneurs allant du microgramme au milligramme par litre (Segurel *et al.*, 2005). L'origine du DMS produit par les BL pourrait également provenir de la dégradation d'acides aminés, à l'identique de nombreux composés soufrés légers.

Le DMS peut potentiellement être à l'origine d'intensification de la note fruitée. Les augmentations constatées sont cependant d'un faible niveau (+ 1,3 $\mu\text{g/l}$). Dans certains cas, cette production peut atteindre plusieurs microgrammes par litre, comme c'est le cas pour la FML spontanée dans le vin Ms08 (+ 4,2 $\mu\text{g/l}$). Dans ce cas, une intensification de la note fruitée accompagne la production de DMS. L'implication du DMS peut alors être envisagée car il a été montré qu'un ajout de DMS, pratiquement du même niveau (10 $\mu\text{g/l}$) dans un vin désaromatisé, pouvait participer de façon synergique à relever la note fruitée (Escudero *et al.*, 2007). La production de DMS par les BL du vin peut ainsi dans certains cas certainement participer à l'intensification de la note fruitée au cours de la FML. Il serait intéressant de pouvoir évaluer l'impact des BL sur la S-méthylméthionine, dont les mouvements pourraient engendrer des variations dans la note fruitée des vins rouges à plus long terme, en modifiant le potentiel DMS.

Finalement, comme le montre le **Tableau 19**, il existe un décalage entre la grande variabilité et la fréquence des modifications de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML et l'implication globale limitée des composés étudiés dans ces modifications

aromatiques. Si certains composés, impliqués de façon synergique dans la perception de la note fruitée des vins rouges, peuvent potentiellement participer aux variations à court terme de cette note aromatique au cours de la FML, il reste toutefois un certain nombre de modifications aromatiques inexpliquées. D'autres composés aromatiques sont ainsi certainement impliqués dans ces phénomènes.

Tableau 19 : Bilan des variations de concentrations en composés marqueurs de l'arôme fruité et en diacétyl constatées sur n vins rouges au cours de la FML (seuil de rejet : 10 %), et bilan des possibilités d'impact aromatique à court et long terme par rapport à la fréquence de cas où les niveaux de variations peuvent engendrer des modifications aromatiques (- : pas d'impact, + : impact occasionnel, ++ : impact régulier, n.c : non connu)

Composés	n	Proportion de FML aux variations négligeables (%)	Proportion de FML avec diminution de la concentration (%)	Proportion de FML avec augmentation de la concentration (%)	Potentiel sur l'arôme fruité à court terme		Potentiel sur l'arôme fruité à long terme	
					Diminution d'intensité	Augmentation d'intensité	Diminution d'intensité	Augmentation d'intensité
diacétyl	45	6	4	90	+	-	++	-
γ -lactones	36	81	6	13	-	-	-	+
δ -décalactone	36	49	44	7	-	-	-	-
C13-NI	36	73	22	5	-	-	-	-
Linalol	44	26	13	51	-	-	-	-
DMS	48	50	0	50	-	+	n.c	n.c
3SH	19	26	53	21	++	+	-	-
3SPE	20	14	26	60	n.c	n.c	n.c	n.c

IV. Modification de la composition en esters par l'activité des BL du vin

Les esters jouent un rôle central dans l'expression de la note fruitée des vins rouges (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2009). Or, l'impact des BL sur la teneur en esters dans les vins a été montré au cours de nombreux travaux (Sumbly *et al.*, 2010). L'étude de l'impact de la FML sur la composition des vins rouges en esters s'avère donc indispensable. De plus, les résultats issus de la base de données esters des vins (chapitre III-1-III-C) montrent que l'étude des différentes familles d'esters apporte des informations sur leur voie de formation dans les vins. Dans la mesure, où les données sur le métabolisme des esters chez les BL du vin ne sont pas nombreuses, il est donc important de suivre non seulement les variations globales mais aussi les mouvements de chaque catégorie d'esters.

A. Influence globale de la FML sur la composition en esters des vins rouges

1. Evolution de la teneur globale en esters

Pour une meilleure visibilité dans les résultats, il est indispensable de considérer séparément les esters à fortes teneurs dans les vins (acétate d'éthyle, lactate d'éthyle, succinate de diéthyle et succinate de monoéthyle) de l'ensemble des autres esters présents en quantités beaucoup plus faibles (liste dans le **Tableau 13**).

L'acétate d'éthyle (C2C2) diffère des autres esters car c'est le seul qui mène systématiquement à un défaut organoleptique des vins. Il peut notamment à grande concentration altérer la note fruitée des vins en conférant des notes aromatiques de solvant (acescence). La moitié des FML étudiées conduisent à des variations en C2C2 qui peut soit légèrement diminuer (moins de 10 mg/l), soit augmenter de façon plus franche (jusqu'à 20 mg/l) (annexe 3). Toutefois, dans les cas où la FML enrichie le vin en C2C2, les niveaux après FML restent limités à 30 mg/l. Un impact des variations en C2C2 engendrées par la FML des vins sains est ainsi peu probable.

Par contre, les FML étudiées mènent à une augmentation significative de la teneur en lactate d'éthyle avec une production moyenne de 27,1 mg/l soit une variation de + 266 % (**Figure 37**). La plus forte production constatée au cours de ces essais est de 46 mg/l alors que le seuil de perception du LE est de 150 mg/l. Il s'agit de la teneur en lactate d'éthyle total, les deux isomères n'étant pas séparés par la méthode d'analyse. Ces résultats confirment tous les travaux antérieurs. Les teneurs en fin de FML sont cependant relativement faibles, la majorité de la concentration finale en cet ester apparaît plus tardivement, bien après le processus fermentaire. Ainsi, en évaluant olfactivement les vins rouges en fin de FML, l'impact du LE sur les variations de leur note fruitée ne peut pas être mis en évidence.

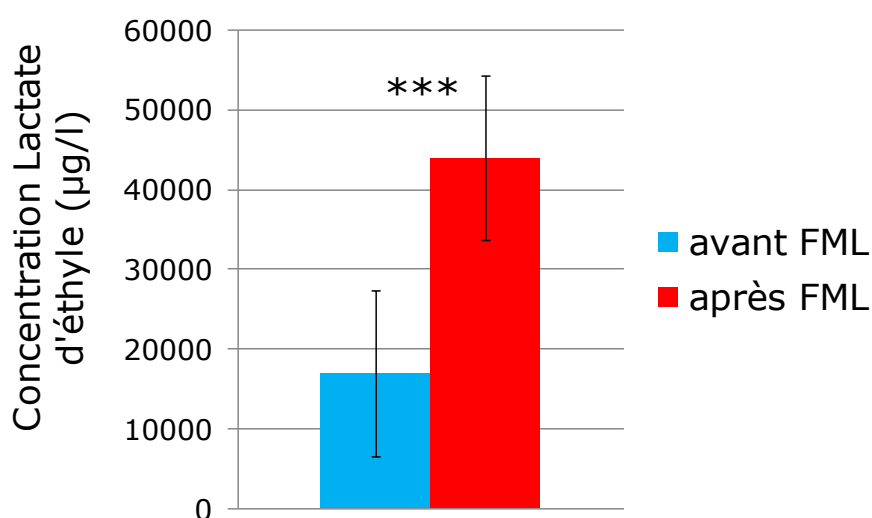


Figure 37 : Teneurs moyennes en lactate d'éthyle total de 48 vins rouges avant et après FML, exprimée en µg/l.

L'enrichissement du vin en esters de l'acide succinique (SDE et SME) par les BL est un peu moins systématique mais reste toutefois très fréquent. Dans 80 % des cas, les teneurs en ces composés sont plus fortes dans les vins ayant subi la FML. Comme chez la levure, la mono-estérification de l'acide succinique reste prépondérante chez les BL, formant en moyenne plus de 80 mg/l de succinate de monoéthyle (**Figure 38**). D'un autre côté, les BL ont été capables de synthétiser jusqu'à plus de 3 mg/l de succinate de diéthyle avec une production moyenne de 0,9 mg/l. Dans 20 % des cas, les BL n'ont pas conduit à une augmentation de ces deux esters. Ces deux esters sont donc marqués par l'activité des BL. Cependant, avec des seuils de perception respectifs de 1 g/l pour le SME et 200 mg/l pour le SDE, les variations constatées semblent toutefois bien faibles pour pouvoir participer aux modulations de la note fruitée.

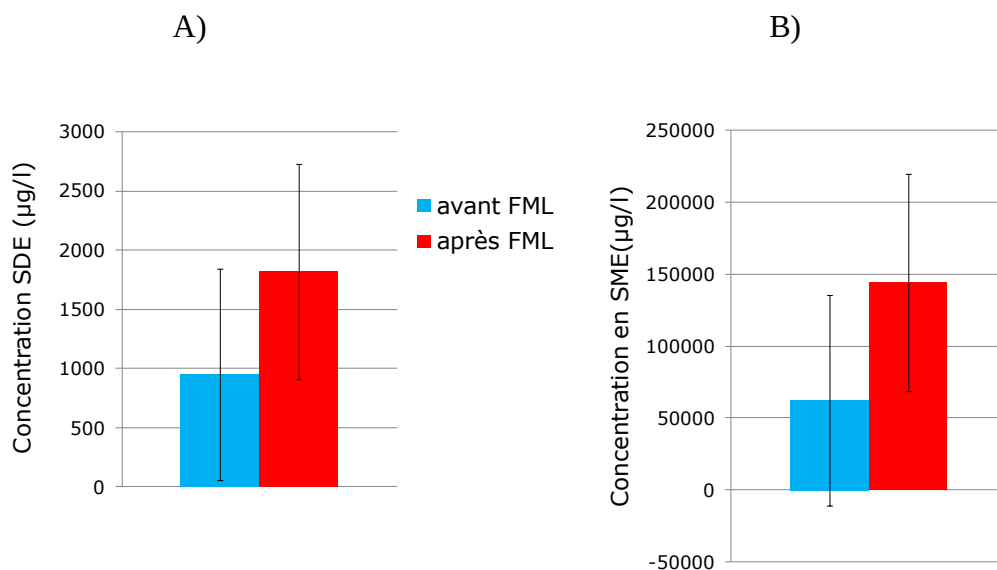


Figure 38 : Teneurs moyennes en succinate de diéthyle (A) et succinate de monoéthyle (B) de 48 vins rouges avant et après FML, exprimées en µg/l.

D'autre part, les analyses confirment l'existence d'une grande variabilité dans l'impact de la FML sur l'ensemble des autres esters, plus impliqués dans la perception de l'arôme fruité des vins. En effet, contrairement aux trois premiers esters, aucune tendance n'a pu être mise en évidence dans les variations de la teneur en esters odorants totaux au cours de la FML (esters apolaires et polaires) (**Tableau 20**). Il existe une grande variabilité d'impact de la FML qui peut tout aussi bien diminuer, augmenter ou ne pas modifier la teneur globale d'esters (**Figure 39**). La fréquence des cas où les BL synthétisent les esters est plus élevée que celle où les BL les hydrolysent. Les BL sont capables d'hydrolyser ces esters à des niveaux équivalents à 20 % de la concentration après FA (- 900 µg/l). D'un autre côté, elles peuvent synthétiser des esters jusqu'à des niveaux équivalents à plus de 40 % de la teneur après FA (+ 800 µg/l). Si la majorité de ces esters restent des composés en grande partie d'origine levurienne, les BL peuvent modifier leur teneur à des niveaux pouvant potentiellement avoir un impact sensoriel. En effet, les esters odorants étant au centre de phénomènes de synergie importants, des variations de quelques centaines à quelques dizaines de µg/l de mélanges d'esters peuvent être significativement perçues (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2007; Pineau *et al.*, 2009).

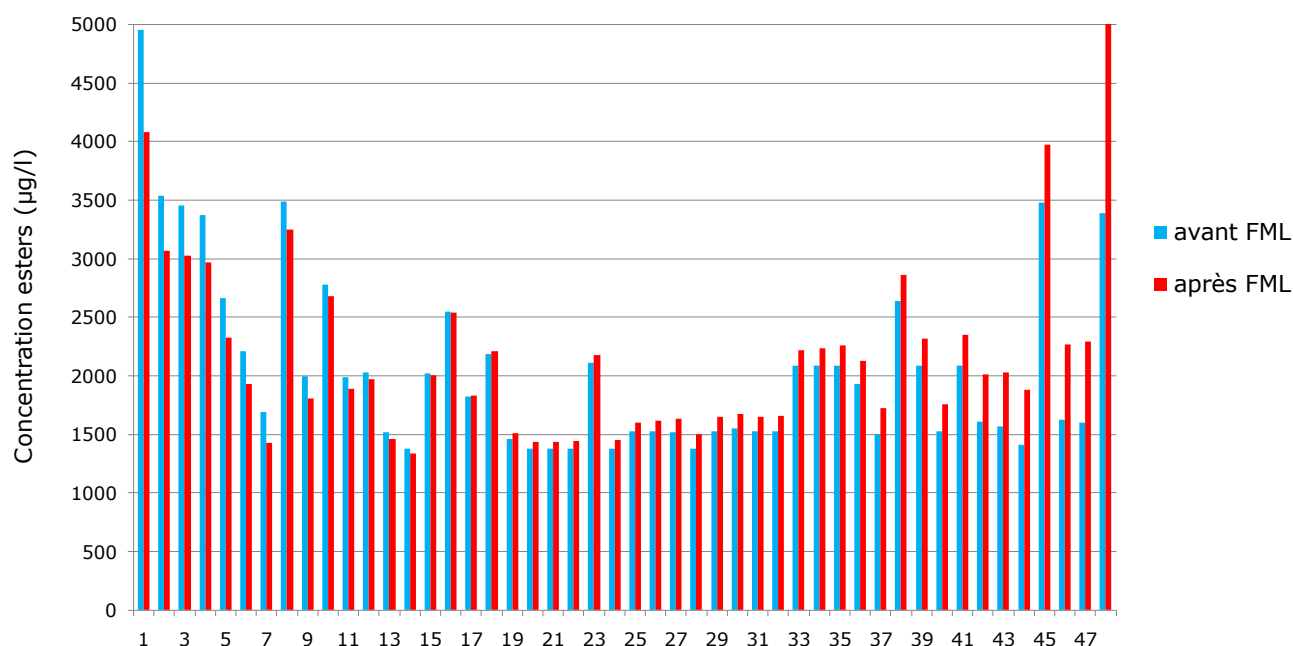


Figure 39 : Evolution de la teneur en esters odorants totaux de 47 vins rouges au cours de la FML exprimée en µg/l.

Tableau 20 : Variations moyennes des concentrations en esters odorants constatées sur 48 vins rouges au cours de la FML. Le test de significativité, réalisé par ANOVA ($n = 48$), différencie les vins avant et après FML. Le critère pour considérer les variations négligeables est : variations < 100 µg/l.

Variation moyenne (µg/l)	+ 55
Moyenne des variations (%)	+ 6,1
Proportion de FML aux variations négligeables (%)	30
Proportion de FML avec diminution de la concentration (%)	25
Proportion de FML avec augmentation de la concentration (%)	45
Significativité des différences (valeur p)	0,29

2. Evolution des différentes classes d'esters odorants au cours de la FML

Une absence de variation de la teneur globale en esters odorants durant la FML ne se traduit pas forcément par une absence totale de mouvement des concentrations en différents esters. C'est par exemple le cas pour le vin Msg1807 pour qui l'absence de variation de la teneur globale en esters ($- 0,8 \%$) au cours de la FML n'empêche pas certaines modifications

selon la classe d'esters considérés (**Figure 40**). Dans ce cas, les BL hydrolysent les acétates, synthétisent certains EEAG et esters branchés et n'ont pas d'impact sur les esters polaires.

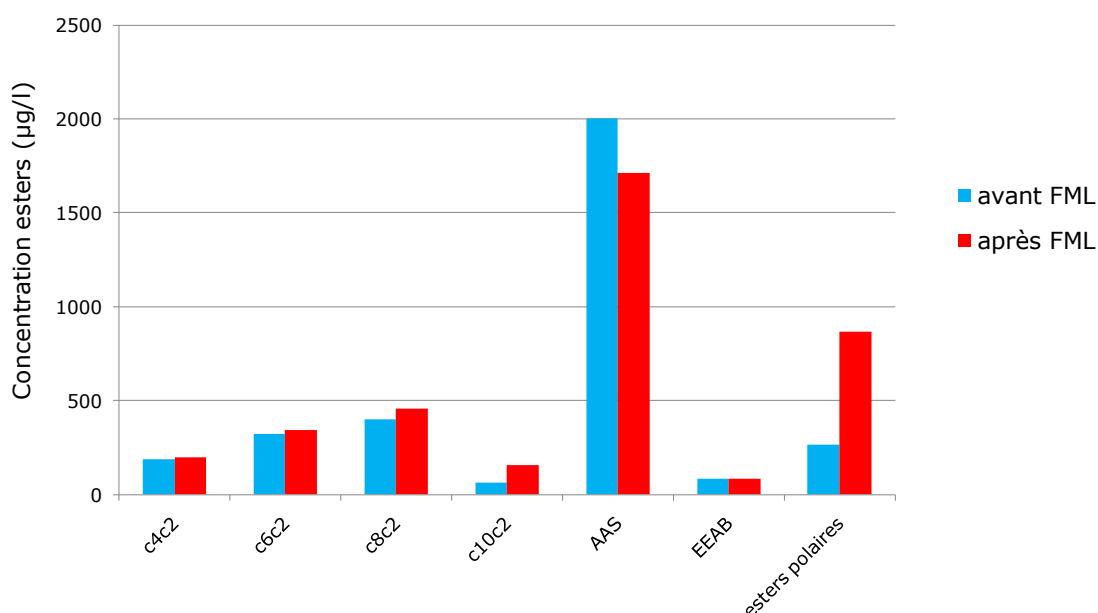


Figure 40 : Teneur (µg/l) en certains EEAG (C4C2, C6C2, C8C2, C10C2), en acétates, en esters branchés et en esters polaires dans le vin SG1807 (Merlot) avant et après FML.

En outre, au sein d'un même groupe d'esters, il peut y avoir une certaine variabilité dans l'impact de la FML. Ce constat est fait régulièrement (annexe 2) comme dans le cas du vin Mbeaum09 où selon l'EEAG considéré, des différences de variations sont observées. Pendant que les teneurs en C4C2 et C6C2 diminuent, celles en C8C2 et C10C2 augmentent au cours de la FML (**Figure 41**).

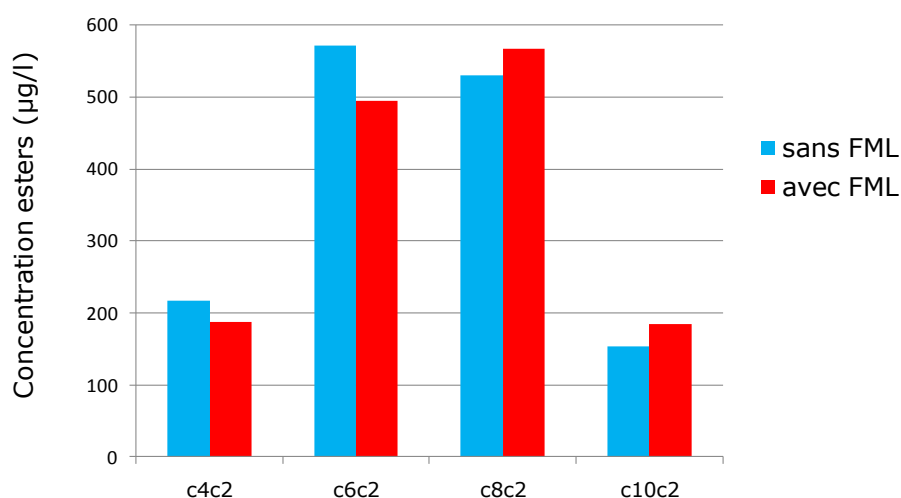


Figure 41 : Teneurs en certains EEAG (C4C2, C6C2, C8C2, C10C2) dans le vin Mbeaum09 (Merlot) avant et après FML, exprimée en µg/l.

Impact de la FML sur les Esters éthyliques d'acides gras (EEAG)

En moyenne, la FML a plutôt tendance à augmenter le niveau de concentration en EEAG des vins. Si les variations sont considérées comme négligeables pour des niveaux inférieurs à 80 µg/l, il existe alors une augmentation de la teneur en EEAG dans 46 % des cas et une diminution seulement dans 13 % des FML étudiées. Le reste des mouvements constatés est négligeable (soit 41 % des cas). Les BL sont capables de synthétiser jusqu'à plus de 500 µg/l d'EEAG, correspondant à plus de 40 % de la concentration après FA, et de diminuer leur teneur de plus de 300 µg/l, soit 30 % de la concentration après FA.

Toutefois, ces variations dans l'impact de la FML sur la teneur en EEAG dépendent de l'ester considéré. Le **Tableau 21** résume les différentes variations constatées pour cette famille d'esters.

Tableau 21 : Variations moyennes des concentrations en principaux EEAG constatées sur 48 vins rouges au cours de la FML. Le test de significativité, réalisé par ANOVA (n = 48), différencie les vins avant et après FML. Les critères choisis pour considérer les variations négligeables dépendent de la concentration de l'ester dans le vin après FA : variations < 10 % (i), < 10 µg/l (ii), < 15 µg/l (iii).

Esters	Variation moyenne (µg/l)	Moyenne des variations (%)	Proportion de FML aux variations négligeables (%)	Proportion de FML avec diminution de la concentration en EEAG (%)	Proportion de FML avec augmentation de la concentration en EEAG (%)	Significativité des différences (valeur p)
C3C2	-0,1	+ 6,6	40 ⁱ	23	37	0,99
C4C2	- 0,2	+ 1,6	48 ⁱⁱ	27	25	0,98
C6C2	+ 2,6	+ 1,5	38 ⁱⁱⁱ	24	38	0,87
C8C2	+ 33,3	+ 8,4	21 ⁱⁱⁱ	19	60	0,12
C10C2	+ 17,9	+ 12,6	23 ⁱⁱ	23	54	0,10
C12C2	+ 0,5	+ 10,7	25 ⁱ	27	48	0,53

Deux groupes peuvent être distingués selon la longueur de la chaîne carbonée de l'acide correspondant. Tout d'abord, les BL ont une tendance assez nette à synthétiser les EEAG à chaîne plus longue (C8 au C12). Le C8C2 et le C10C2 se démarquent particulièrement des 4 autres composés car les différences de concentrations constatées entre les vins avant et après FML sont significatives aux seuils respectifs de 12 % et 10 %. Le C12C2 est également plutôt synthétisé par les BL (dans la moitié des cas), mais cette tendance est toutefois moins significative ($p = 0,53$). A notre connaissance, c'est la première fois qu'il est montré que les BL du vin ont une tendance nette à synthétiser les EEAG à chaîne carbonée de longueur moyenne, sans pour autant exclure le fait qu'elles soient aussi capables de les hydrolyser. D'un autre côté, les EEAG à chaîne plus courte (C3 au C6) sont moins influencés par l'activité des BL car une plus forte proportion de FML n'apporte aucune variation notable de concentration. L'EEAG le moins affecté par les BL semble être le butyrate d'éthyle pour qui les variations sont négligeables pour près de 50 % des FML étudiées. Enfin, il est intéressant de constater que les BL hydrolysent autant les esters à courtes chaînes que les esters à plus longues chaînes carbonées.

Ces tendances se retrouvent également sur les esters méthyliques, isoamyliques et éthyliques à nombre impair de carbone (**Tableau 22**). Il existe une tendance à la synthèse au cours de la FML pour les esters méthyliques et isoamyliques de l'acide octanoïque et décanoïque, alors qu'aucun mouvement général n'est mis en évidence dans le cas des esters de l'acide butyrique et hexanoïque. De même, la synthèse est plus importante pour les esters à nombre impair de carbone, lorsque le nombre de carbone est plus grand.

Tableau 22 : Variations des concentrations en certains esters d'acides gras constatées sur 48 vins rouges au cours de la FML.

Esters	C6C1	C8C1	C10C1	C4iC5	C6iC5	C8iC5	C7C2	C9C2
Moyenne des variations (%)	-3	+ 15	+ 12,5	+ 2	+ 5	+ 17	+ 8,5	+ 23,5

Il semblerait donc que la capacité des BL à synthétiser les EEAG soit liée à la longueur de la chaîne carbonée de l'acide correspondant. Ce constat est confirmé lorsqu'une ACP est réalisée sur les variations de concentrations dues à la FML des esters éthyliques et méthyliques pour les 48 vins étudiés (**Figure 42**).

L'axe F1 semble être caractéristique des variations des esters d'acides gras linéaires au cours de la FML. Bien qu'il n'explique seulement que 12 % de la variance, l'axe F2 permet toutefois de séparer les esters suivant le nombre de carbone de l'acide correspondant. Ceci se traduit également par le fait que les rapports EM/EEAG ne varient pas au cours de la FML. Le comportement des BL par rapport aux EEAG dépend ainsi très certainement de la longueur de la chaîne carbonée. L'acide correspondant semble donc avoir un rôle plus important que l'alcool concerné dans l'impact des BL sur les esters du vin.

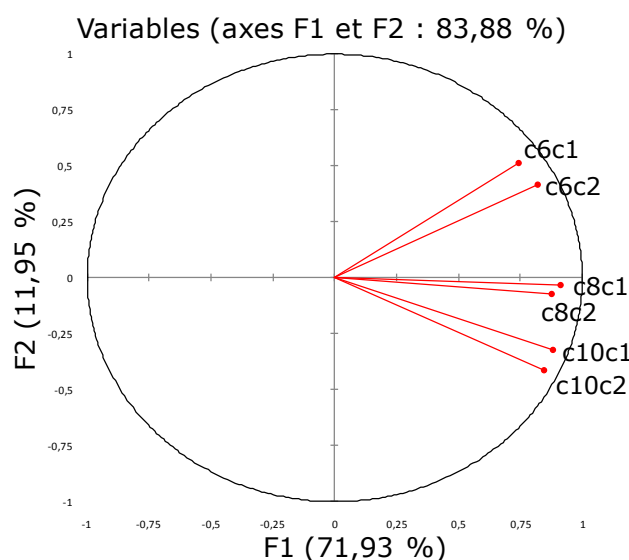


Figure 42 : Projection des variables sur le plan principal à partir d'une ACP type Pearson, réalisée avec les variables "variations de concentrations dues à la FML en certains esters éthyliques et méthyliques" et les individus "vins" ($n = 48$).

Une autre ACP réalisée pour 45 vins, sur les variations de concentrations dues à la FML de certains esters dont l'acide possède 6 carbones, indique qu'au-delà de la longueur de la chaîne, c'est bien la nature de l'acide impliqué qui semble avoir le plus d'importance dans les mécanismes de synthèse et d'hydrolyse au cours de la FML (**Figure 43**). En effet, la projection sur le plan (1 x 3), montrant 62,6 % de la variance totale, sépare les esters de l'acide hexanoïque des esters éthyliques hydroxylés dont l'acide est en C6. La voie de synthèse chez les BL du vin de ces esters hydroxylés, est ainsi probablement différente de celle des esters de l'acide hexanoïque.

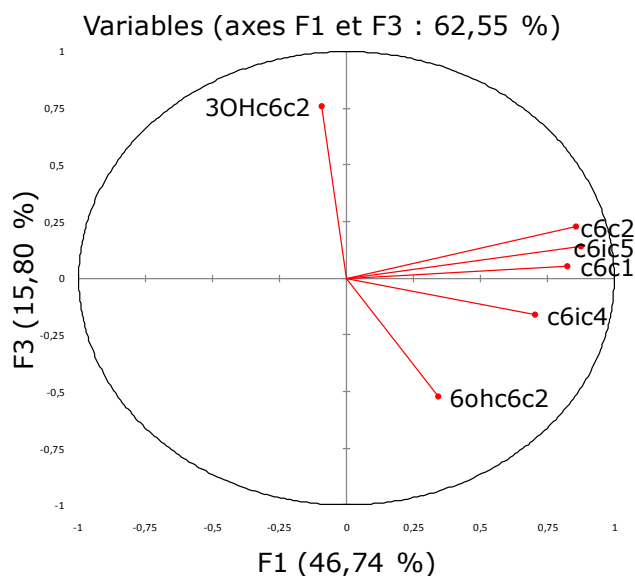


Figure 43 : Projection des variables sur le plan principal à partir d'une ACP type Pearson réalisée avec les variables "variations de concentrations dues à la FML en certains esters éthyliques en C6" et les individus "vins" (n = 45).

Impact de la FML sur les acétates d'alcools supérieurs

L'utilisation d'une nouvelle ACP, réalisée sur les variations des différents EEAG et AAS pour les 48 vins étudiés, permet de visualiser l'existence d'une différence globale dans les mouvements constatés sur les concentrations des 2 catégories d'esters au cours de la FML (**Figure 44**).

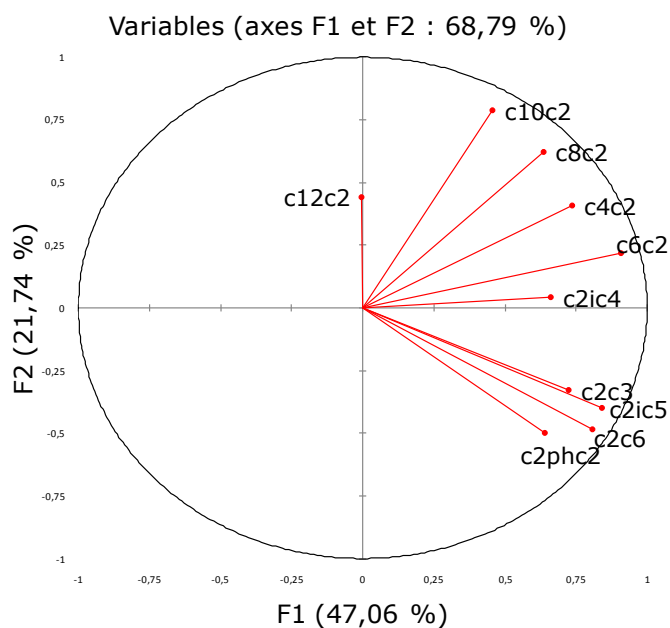


Figure 44 : Projection des variables sur le plan principal à partir d'une ACP type Pearson réalisée avec les variables " variations de concentrations dues à la FML en EEAG et en AAS" et les individus "vins" (n = 48).

Les variables sont dans l'ensemble bien représentées sur la projection du plan principal. A l'exception du C2iC4 et du C12C2, elles sont toutes proches du cercle des corrélations. L'axe F2 permet de séparer le groupe des EEAG de celui des AAS. Seul, le C2iC4 se démarque des autres acétates se situant dans la partie positive suivant l'axe F2. Cette représentation indique très certainement l'existence d'une différence dans le métabolisme bactérien de ces 2 catégories d'esters, le C2iC4 étant un cas particulier.

Comme les EEAG, les AAS ont plutôt tendance à être synthétisés au cours de la FML. Des augmentations de concentration sont en effet constatées dans 50 % des vins étudiés, une diminution dans 27 % des cas et aucune variation (< 5 %) dans le reste des FML étudiées (23 %). La moyenne des variations observées est de + 4,3 %, alors que la variation moyenne de la teneur en AAS est de - 44 µg/l. Ce décalage s'explique par le fait que certaines FML ont abouti à une hydrolyse marquée des AAS. Ainsi, les BL sont capables d'hydrolyser les AAS jusqu'à des teneurs proches de 700 µg/l (soit 30 % de la teneur après FA). D'un autre côté, elles ont synthétisé jusqu'à 170 µg/l d'AAS, correspondant à une augmentation de 40 % de la concentration après FA.

Les AAS sont dans l'ensemble beaucoup plus regroupés que les EEAG sur la projection principale de l'ACP de la **Figure 44**. L'importance évoquée précédemment, de la nature de l'acide impliqué dans le métabolisme bactérien des esters du vin, pourrait en partie expliquer ce constat.

Cela se vérifie avec les variations de concentrations observées pour chaque AAS, exceptés pour le C2C4 et le C2C8 dont les teneurs dans les vins étudiés sont au-dessous de la LOQ de la méthode d'analyse (**Tableau 23**). En effet, il semble exister moins de variabilité dans l'impact de la FML sur la teneur en AAS que pour les EEAG. La proportion des vins dont la FML augmente la teneur en esters est sensiblement la même (autour de 40 %) pour 4 AAS sur 5. Seul le C2PhC2 se démarque des autres, en étant peu affecté par l'activité des BL avec 65 % des FML n'amenant aucune variation particulière : 8 % des cas ont abouti à une augmentation de la concentration en C2PhC2. En revanche, le C2iC4 est peu hydrolysé par les BL du vin car seul 13 % des FML étudiées aboutissent à une diminution de sa teneur. Pour le reste, aucune tendance particulière n'est mise en évidence.

Tableau 23 : Variations moyennes des concentrations en principaux AAS constatées sur 48 vins rouges au cours de la FML. Le test de significativité, réalisé par ANOVA (n = 48), différencie les vins avant et après FML. Les critères pour considérer les variations négligeables dépendent de la concentration de l'ester dans le vin après FA : variations < 10 % (i), < 5 % (ii).

Esters	Variation moyenne (µg/l)	Moyenne des variations (%)	Proportion de FML aux variations négligeables (%)	Proportion de FML avec diminution de la concentration en AAS (%)	Proportion de FML avec augmentation de la concentration en AAS (%)	Significativité des différences (valeur p)
C2C3	+ 0,3	+ 13	38 ⁱ	21	41	0,72
C2iC4	+ 0,5	+ 9,5	46 ⁱ	13	41	0,92
C2iC5	-50,1	+ 4,4	23 ⁱⁱ	31	46	0,64
C2C6	-0,4	+ 14	27 ⁱ	35	38	0,61
C2PhC2	-5,4	-3,9	65 ⁱ	27	8	0,53

Impact de la FML sur les esters éthyliques d'acides branchés et sur leur précurseur

Une ACP réalisée sur les variations de concentrations en EEAG, AAS et EEAB pour les 48 vins étudiés montre que les EEAB se comportent différemment au cours de la FML (**Figure 45**). La projection du plan principal permet en effet de visualiser globalement les 2 groupes séparés suivant l'axe 2, le PhC2C2 étant lui, beaucoup mieux corrélé avec l'axe 4.

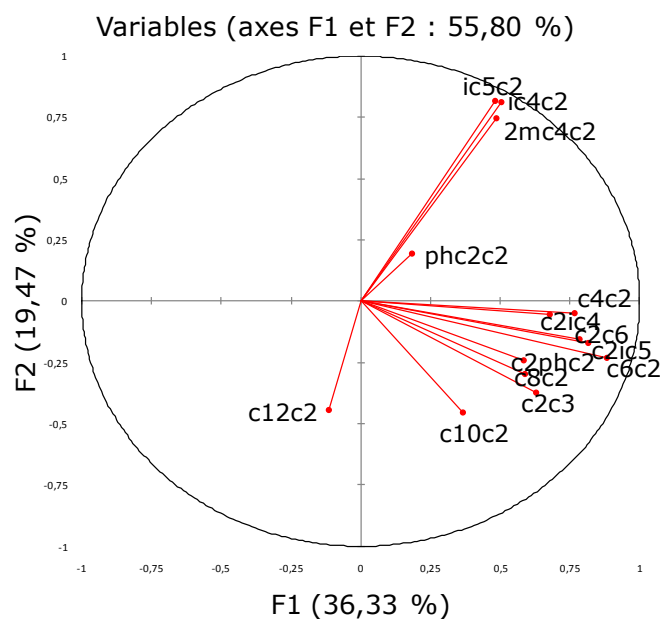


Figure 45 : Projection des variables sur le plan principal à partir d'une ACP type Pearson réalisée avec les variables " variations de concentrations dues à la FML en EEAB, EEAG et en AAS" et les individus "vins" (n = 48).

Le comportement général différent du PhC2C2 au cours de la FML par rapport aux autres EEAB est confirmé par les variations de concentrations observées au cours de la FML pour ces 4 esters (**Tableau 24**). En effet, le PhC2C2 a une tendance nette à être hydrolysé par les BL du vin alors que les 3 autres esters sont dans l'ensemble plutôt synthétisés. Plus de 70 % des cas étudiés ont abouti à des diminutions de la teneur en PhC2C2, menant à une moyenne des variations constatés d'environ - 30 % de la teneur avant FML. Seul 4 % des cas n'ont pas aboutis à des mouvements notables de la teneur en cet ester. L'impact général de la FML sur la teneur des vins rouges en PhC2C2 est significatif au seuil de 0,1 %.

En revanche, les autres EEAB ont plutôt tendance à être synthétisé au cours de la FML. Bien que cela ne soit pas significatif, les BL sont aussi capables d'hydrolyser l'iC4C2, le 2mC4C2 et l'iC5C2. Cependant, une plus forte proportion de vin (entre 38 et 48 %) s'enrichissent en ces EEAB au cours de la FML. De plus, les augmentations de concentration sont généralement bien plus importantes que les diminutions observées (annexe 2). De ce fait, la tendance générale d'impact des BL sur ces esters au cours de la FML est à la production. Cette tendance est notamment bien marquée pour l'iC5C2 dont la variation de concentration au cours des FML étudiées est significative au seuil de 15 %. Les BL sont capables de doubler la teneur en EEAB des vins au cours de la FML, mais également d'entraîner une diminution de 20 %. Quelque soit la tendance, les variations maximales observées restent à des niveaux assez faibles (40 µg/l) qui peuvent toutefois potentiellement être perceptibles (Pineau *et al.*, 2009).

Bien que les EEAB puissent être formés au cours des fermentations, leur principale origine dans les vins est l'estérification chimique des acides branchés correspondants, avec l'éthanol, au cours des premières années de vieillissement du vin (chapitre III-1-III-C). C'est pourquoi, il est aussi intéressant d'étudier en parallèle les variations de ces acides au cours de la FML, car l'évolution des rapports esters/acides au cours de la FML peut potentiellement affecter la note fruitée des vins.

Tableau 24 : Variations moyennes des concentrations en principaux EEAB constatées sur 48 vins rouges au cours de la FML. Le test de significativité, réalisé par ANOVA (n = 48), différencie les vins avant et après FML. Le critère pour considérer les variations négligeables est : variations < 10 %.

Esters	Variation moyenne (µg/l)	Moyenne des variations (%)	Proportion de FML aux variations négligeables (%)	Proportion de FML avec diminution de la concentration en EEAB (%)	Proportion de FML avec augmentation de la concentration en EEAB (%)	Significativité des différences (valeur p)
iC4C2	+ 3,1	+ 12	35	27	38	0,33
2mC4C2	+ 0,5	+ 10,6	23	29	48	0,31
iC5C2	+ 1,1	+ 12,6	39	17	44	0,15
PhC2C2	-1,5	-30	4	71	25	10⁻⁵

Les trois acides branchés (AB) étudiés ont plutôt tendance à être synthétisés au cours de la FML (**Tableau 25**). Cette production globale est même significative au seuil de 5 % dans le cas du 2mC4 avec une moyenne de + 43 % de la teneur après FA. Ainsi, au vu de la faible proportion de vins où la FML permet de diminuer sa teneur (8 %), les BL du vin ont une tendance très nette à synthétiser le 2mC4. Pour les deux autres acides les résultats sont plus contrastés et, même si la tendance est à l'augmentation, les BL sont aussi capables d'en diminuer la teneur. Toutefois, dans 70 % des vins montrant une diminution de la teneur en iC4 et iC5 au cours de la FML, il est parallèlement constaté une augmentation de la concentration en ester correspondant. Ces phénomènes ne sont pas forcément proportionnels mais leur existence pourrait correspondre à la capacité des BL de synthétiser les EEAB à partir des acides branchés issus de leur métabolisme.

Tableau 25 : Variations moyennes des concentrations pour les principaux acides branchés constatées sur 48 vins rouges au cours de la FML. Le test de significativité, réalisé par ANOVA (n = 48), différencie les vins avant et après FML. Le critère pour considérer les variations négligeables est : variations < 10 %.

Acides	Variation moyenne (µg/l)	Moyenne des variations (%)	Proportion de FML aux variations négligeables (%)	Proportion de FML avec diminution de la concentration en AB (%)	Proportion de FML avec augmentation de la concentration en AB (%)	Significativité des différences (valeur p)
iC4	+ 34,8	+ 7,6	29	25	46	0,63
2mC4	+ 81,3	+ 43	25	8	67	0,014
iC5	+ 29	+ 5,1	31	19	50	0,43

Finalement, des diminutions du rapport EEAB/AB sont constatées dans plus de 40 % des FML pour l'iC4 et l'iC5. En revanche, cette proportion passe à 70 % lorsqu'il s'agit du 2mC4 dont la teneur augmente très souvent après FML. La diminution du rapport EEAB/AB après FML entraîne un déséquilibre des concentrations entre l'acide et l'ester encore plus important qu'après FA. Les phénomènes d'estérification peuvent alors être plus rapide et conduire au bout de quelques années de vieillissement à des teneurs finales en EEAB plus importantes.

Impact de la FML sur certains esters éthyliques polaires (EEP) et les esters d'origine variétale

Parmi les 4 EEP suivis au cours de cette étude, le 3OHC4C2 est majoritaire dans les vins avec des teneurs plus de 100 fois supérieures à celles en LevC2, 3OHC6C2 et 6OHC6C2. Leurs voies de formation dans les vins sont peu ou pas connues et vraisemblablement différentes selon l'EEP considéré. Il est intéressant de regarder l'impact bactérien sur ces esters, ce qui n'a jamais été fait auparavant excepté pour le 3OHC4C2.

Le **Tableau 26** montre que la tendance générale est à la synthèse de ces esters au cours de la FML. Ce constat est particulièrement vrai pour le 3OHC6C2 et le 6OHC6C2 dont l'impact de la FML sur leur teneur est significatif au seuil de 5 % pour le premier et de 1 %

pour le second. Les fortes variations constatées pour ces 2 esters indiquent qu'il s'agit de composés qui peuvent marquer l'activité bactérienne. Ceci est surtout vrai pour le 3OHC6C2 dont la production par les BL du vin est plus systématique que pour le 6OHC6C2. De plus, la FML diminue très rarement la concentration en 3OHC6C2 (6 % des cas) alors que ce phénomène est plus fréquent pour le 6OHC6C2 (19 % des cas). Cependant, ces composés étant largement minoritaires dans les vins, les niveaux de production au cours de la FML sont faibles (1 µg/l).

Les BL sont aussi capables de produire du 3OHC4C2 au cours de la FML (36 % des cas) mais dans plus de la moitié des vins étudiés, aucune variation particulière n'a été mise en évidence. Les variations relatives constatées pour le 3OHC4C2 sont beaucoup moins importantes que pour les 2 premiers EEP, mais d'un autre côté, il est rare que la FML diminue sa teneur (10 % des cas). De ce fait, l'impact de la FML sur ce composé a un niveau de significativité avec un seuil de confiance de 16 %. Etant présent en quantité non négligeable dans les vins, les variations constatées sont souvent de l'ordre de plusieurs dizaines de microgrammes par litre, voir même plusieurs centaines dans certains cas (annexe 2).

Enfin, le LevC2 est l'EEP dont la tendance des variations au cours de la FML est la moins franche. D'un côté ce composé est souvent affecté par les BL avec seulement 9 % des cas sans variations, d'un autre côté sa teneur peut soit augmenter (53 % des cas), soit diminuer (38 % des cas). En outre, les variations sont très faibles en terme de concentration (inférieure à 1 µg/l) car le LevC2 est peu présent dans les vins.

Par ailleurs, les esters d'origine variétale comme le cinnamate d'éthyle, le dihydrocinnamate d'éthyle, l'hexénoate d'éthyle et le géranoate de méthyle semblent être peu affectés par la FML (annexe 2). Une étude sur des cépages plus riches en ces esters, comme le Gamay pour les cinnamates (chapitre III-1-III-C), pourrait peut-être apporter plus d'information sur l'impact des BL vis-à-vis de leurs teneurs.

Tableau 26 : Variations moyennes des concentrations en principaux EEP constatées sur la majorité des vins rouges étudiés au cours de la FML. Le test de significativité, réalisé par ANOVA (n = 48 (a), n = 47 (b), n = 38 (c)), différencie les vins avant et après FML. Le critère pour considérer les variations négligeables est : variations < 10 %.

Esters	Variation moyenne (µg/l)	variations (%)	Proportion de FML aux variations négligeables (%)	Proportion de FML avec diminution de la concentration en EEP (%)	Proportion de FML avec augmentation de la concentration en EEP (%)	Significativité des différences (valeur p)
3OHC4C2	+ 37,7	+ 17,6	54	10	36	0,16 ^b
LevC2	+ 0,03	+ 26	9	38	53	0,87 ^a
3OHC6C2	+ 1,4	+ 160	19	6	75	0,03^a
6OHC6C2	+ 1,04	+ 180	26	19	55	0,002^c

B. Impact de certains paramètres œnologiques sur les variations de teneurs en esters au cours de la FML

Des essais réalisés sur 4 vins rouges différents ont permis d'étudier l'effet souche des BL et l'effet "matrice" sur les teneurs en esters. Les composés étant nombreux, les résultats sont présentés ici pour les principaux esters, le reste étant détaillé en annexe 2.

1. Effet souche

La production des esters majeurs (LE, SDE, SME) au cours de la FML est en partie dépendante de la souche de BL. En effet, dans certains vins le niveau de production en LE peut varier d'un facteur 2 entre deux souches de BL (Mmv08 : 8,4 mg/l pour Si et 16,5 mg/l pour A). De plus, les variations restent quantitativement faibles au regard du seuil de perception du LE (150 mg/l), les niveaux de production des BL ne dépassant jamais les 50 mg/l. Certaines différences inter-souches pourraient en partie venir de la cinétique de la FML. En effet, dans le cas du vin Mmv09, les productions de LE sont plus importantes pour les

FML languissantes, car 2 de ces 3 FML (H et I) produisent en moyenne une dizaine de milligrammes par litre de plus que les autres souches (40 mg/l contre 30 mg/l).

Cette particularité des FML languissantes est encore plus marquée pour les esters de l'acide succinique, car dans le cas du vin Mmv09 (H, I et L), ce sont les seules à produire de façon intense du SDE et du SME (**Figure 46**). De façon générale, les variations inter-souches de la teneur en ces esters sont plus importantes que pour le LE, car elles peuvent aller jusqu'à 3 mg/l pour le SDE et de 100 mg/l pour le SME (annexe 3). Toutefois, ces variations restent minimales par rapport aux seuils de perception (Moreno *et al.*, 2005).

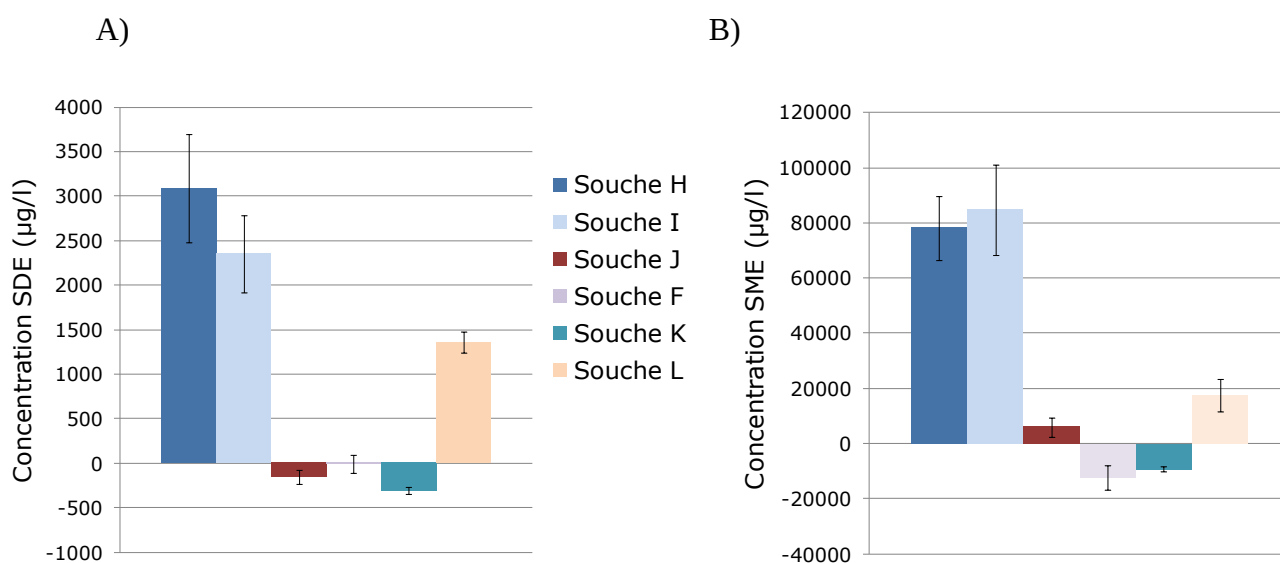


Figure 46 : Variation moyenne de SDE (A) et SME (B) au cours de la FML de 6 souches de BL (H, I, J, F, K, L) sur le vin Mmv09, exprimées en µg/l. L'écart-type associé est calculé sur les 3 triplicats réalisés pour chaque souche.

Bien que les esters odorants soient synthétisés en grande partie par les levures, les BL sont capables de moduler leur teneur au cours de la FML. D'un point de vue quantitatif, les niveaux de variation observés lors de l'étude de l'effet souche restent globalement bien inférieurs à ceux constatés pour le diacétyl et les esters à faible impact aromatique. Au cours des 4 études sur l'effet souche, seules la moitié d'entre elles ont montré des variations pertinentes (CSmv08 et Ms08). L'effet souche sur ces composés peut être important et avoir potentiellement un impact aromatique (Ms08).

Les FML réalisées sur le vin CSmv08 engendrent ainsi certaines variations de la teneur globale en esters odorants (**Figure 47**). Toutes les souches provoquent une augmentation en esters supérieure à 100 µg/l. La souche O synthétise 2 fois plus d'esters que

la souche B, augmentant la concentration en ester de 13 % (262 $\mu\text{g/l}$) contre 6 % (130 $\mu\text{g/l}$) pour la souche B. Ces variations concernent essentiellement les EEAG et les AAS (annexe 2). Cependant il est intéressant de constater que pendant que certaines souches produisent plus d'EEAG, d'autres synthétisent plus d'AAS (comparaison A avec C et B avec E) (annexe 2). Ceci indique que l'effet souche peut être différent selon la famille d'esters considérée.

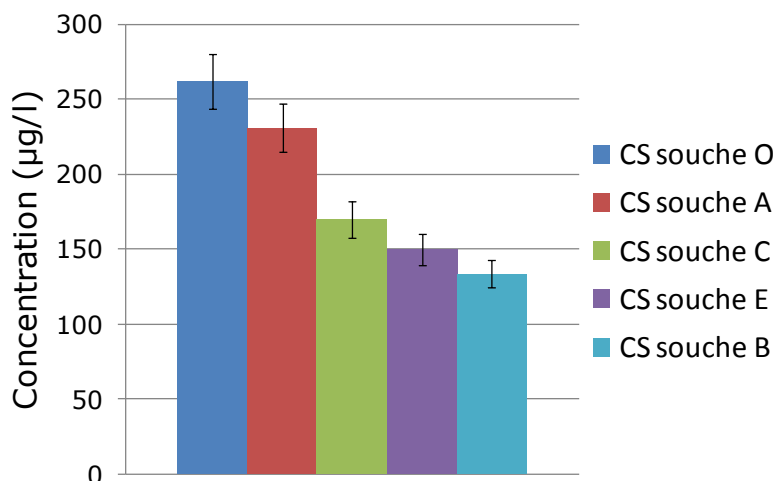


Figure 47 : Variations moyennes d'esters odorants au cours de la FML de 5 souches de BL (A, B, C, E, O) sur le vin CSmv08 (Cabernet-Sauvignon), exprimées en $\mu\text{g/l}$. L'écart-type associé est calculé sur les 3 triplicats réalisés pour chaque souche.

L'effet souche est beaucoup plus marqué sur l'essai Ms08 où il existe une différence importante entre la population indigène (Si) et la souche F, non seulement sur la teneur globale en esters odorants mais également selon la famille d'esters considérée (**Figure 48**). La population indigène diminue de 100 $\mu\text{g/l}$ la teneur en esters odorants, alors que la souche F hydrolyse 550 $\mu\text{g/l}$ des esters présents à la fin de la FA. Ces différences sont potentiellement perceptibles. Cet essai montre bien que l'impact de la FML sur la teneur en esters peut varier de façon importante pour un même vin, selon la souche de BL impliquée et que ces variations peuvent même être inversées selon la classe d'esters, comme c'est le cas avec les EEAG.

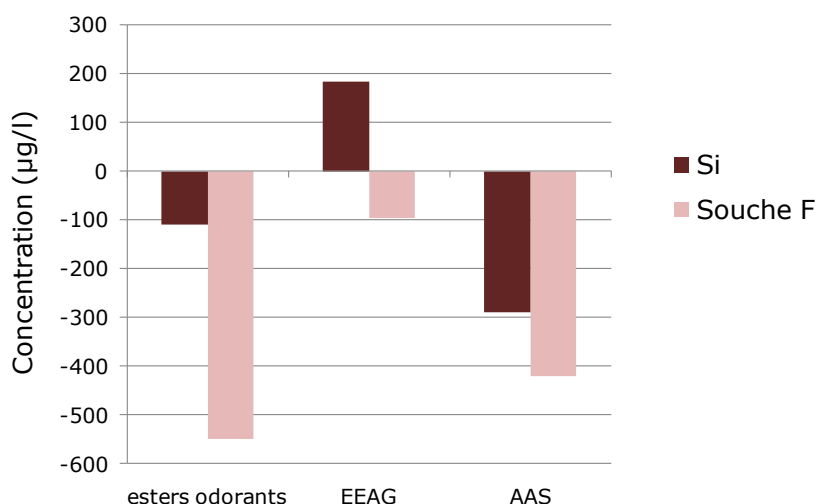


Figure 48 : Variations des teneurs (µg/l) en esters odorants, EEAG, AAS au cours de la FML de 2 souches de BL (Sis, F) sur le vin Ms08.

2. Effet matrice

Bien que les variations n'aient probablement pas d'impact sur la note fruitée des vins rouges, il est intéressant de constater la présence d'effet matrice important pour les esters majeurs.

Le lactate d'éthyle provient de l'activité malolactique des BL qui dépend forcément de la composition du milieu et de la teneur en acide malique Or, la proportion de LE formé par rapport à l'acide malique dégradé peut varier d'un vin à l'autre pour une même souche. Par exemple dans le cas de la souche F, ces rapports varient de 0,7 % à 2,4 % selon le vin considéré.

L'effet matrice est également constaté pour les 2 esters éthyliques de l'acide succinique. C'est ainsi le cas de la souche F qui synthétise en grande quantité du MSE dans le vin MLaf09, alors qu'elle n'a pas d'impact dans le vin Ms08 et qu'elle diminue même la teneur en MSE dans le cas du vin Mmv09, le paramètre température n'étant pas impliqué dans ces variations (FML à 20 °C).

L'effet matrice est aussi important dans le métabolisme des esters odorants par les BL du vin. Des différences de plusieurs centaines de µg/l, potentiellement perceptibles, sont constatées entre les vins étudiés pour les 3 souches testées. La souche F hydrolyse ainsi fortement les esters du vin Ms (- 550 µg/l) alors que de légères synthèses sont constatées dans les vins Mlaf09 (+ 104 µg/l) et Mmv09 (+ 64 µg/l) (**Figure 49**). De plus, des différences de

variation sont constatées selon la famille d'esters considérée comme c'est le cas entre les EEAG et les AAS. Les tendances d'impact de la souche F sont en effet les mêmes pour les 2 familles d'esters dans le vin Ms08 (hydrolyse d'EEAG et d'AAS) mais différent dans le vin Mlaf09 et Mmv09 (synthèse d'EEAG, pas de variation d'AAS). Une même souche peut donc hydrolyser ou synthétiser des esters selon le vin dans lequel elle se développe, et les tendances dépendent encore une fois de la famille d'esters. Ce cas particulier confirme le constat établi précédemment, comme quoi les variations sont dépendantes de la nature des esters.

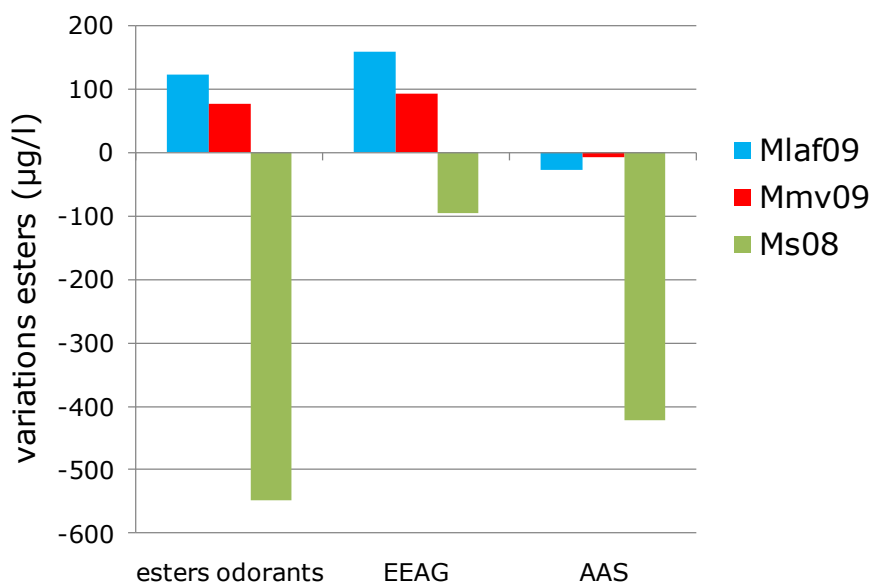


Figure 49 : Evolution des teneurs (μg/l) en esters odorants, EEAG et AAS au cours de la FML menée avec la souche F sur 3 vins différents.

De plus, 2 souches différentes ne répondent pas forcément de la même façon dans des vins différents (même température de FML, 25 °C), comme c'est le cas entre les souches B et E sur les vins Mmv08 et CSmv08 (**Figure 50**). Ainsi, non seulement l'effet matrice est important mais il dépend aussi de la souche de BL.

Cet effet "matrice" est visible pour toutes les familles d'esters odorants mais également pour les acides branchés précurseurs des EEAB. Les résultats sont disponibles en annexe 2 et 5.

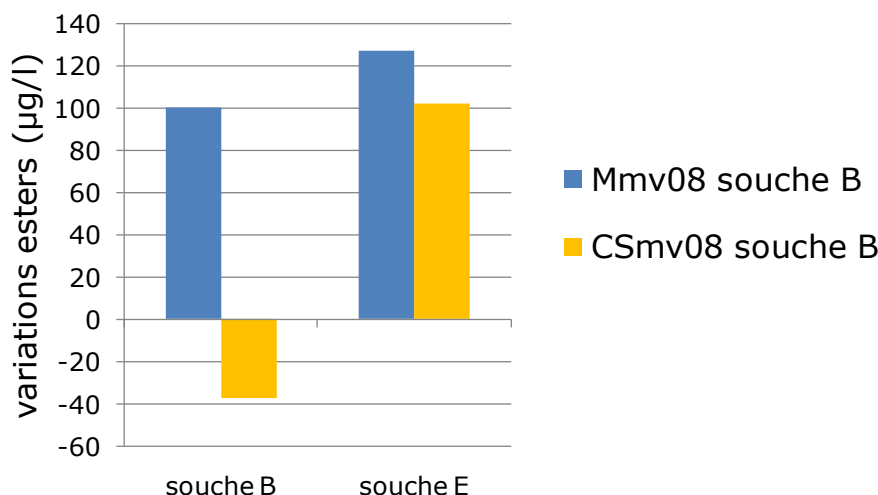


Figure 50 : Evolution de la teneur (µg/l) en esters odorants au cours de la FML menée avec 2 souches de BL (B, E) sur différents vins.

C. Discussion

Au vu des variations constatées pour le LE, SDE et le SME, ces esters ne semblent pas impliqués dans les modulations de la note fruitée apportée à court terme par la FML. Cependant, ces composés sont formés majoritairement au cours des premiers mois d'élevage par estérification de l'acide fixe correspondant avec l'éthanol. La teneur en SDE et MSE des vins finis est à la fois très supérieure à celle des vins venant de terminer la FML et bien au-dessous de leur seuil de perception (Escudero *et al.*, 2007, Boido *et al.*, 2009). Un impact aromatique à long terme des modifications engendrées par la FML sur ces esters est peu probable. En revanche, le LE des vins provient en grande majorité de l'estérification de l'acide lactique produit par les BL. Or, le taux de formation du LE peut atteindre 10 % de la teneur initiale en acide malique (de Revel, 1992), soit une teneur souvent proche de son seuil de perception (150 mg/l). Dans tous les vins étudiés ici, il existe encore un fort potentiel d'acide lactique pouvant être estérifié, le LE formé correspondant entre 0,5 % et 3 % de l'acide malique consommé. Le LE, produit indirectement par la FML, peut donc avoir un impact aromatique à plus long terme. Cependant, son niveau d'implication dans la note fruitée n'est pas encore bien déterminé.

Les esters odorants correspondent aux composés qui sont potentiellement les plus impliqués dans les modulations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML. Les niveaux globaux de ces variations peuvent en effet atteindre plusieurs centaines de µg/l, et

avoir un impact aromatique (Escudero *et al.*, 2007; Pineau *et al.* 2007, 2009). De plus, la grande variabilité observée dans les mouvements des esters correspond bien à l'absence de tendance des variations de la note fruitée des vins rouges apportées par la FML. Les BL peuvent certainement aussi bien, détruire l'arôme fruité en hydrolysant ces esters, qu'intensifier cette note fruitée en les synthétisant. En outre, même quand le niveau global de ces esters n'est pas affecté par la FML, les BL peuvent moduler la composition en esters avec des variations différentes selon la famille des esters considérée.

Les variations en esters polaires tel que le lévulinate d'éthyle, le 3OHC6C2 et le 6OHC6C2 sont certainement trop faibles pour être impliquées dans la modulation de la note fruitée (de quelques centaines de ng/l à quelques µg/l). Leur implication dans des phénomènes de synergie n'a jamais été mentionnée malgré la considération de ces composés dans les études sur les interactions perceptives (Pineau, 2007). En revanche, dans certains cas, les variations observées au cours de la FML sur la teneur en 3OHC4C2 (jusqu'à plusieurs centaines de µg/l) peuvent potentiellement être impliquées dans la note fruitée des vins rouges. En effet, Pineau *et al.* (2009) ont montré que des variations de quelques centaines de µg/l de 3OHC4C2 pouvaient être significativement perçues lorsqu'il est présent en mélange avec d'autres esters. Les voies de formation de ce composé dans les vins n'ont jamais été étudiées. Les BL ont plutôt tendance à le synthétiser; les hydrolyses constatées dans 10 % des cas n'excèdent jamais quelques dizaines de µg/l. Toutefois, le 3OHC4C2 est dans l'ensemble moins affecté par la FML (dans plus de la moitié des cas) que de nombreux autres esters. Il se pourrait que ce composé marque occasionnellement les variations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML, mais il ne s'agit certainement pas du marqueur le plus impliqué.

Les EEAB semblent être impliqués de façon plus importante dans les variations de la note fruitée des vins rouges engendrées par l'activité des BL. Des mouvements de quelques dizaines de µg/l suffisent à moduler l'arôme des vins rouges malgré le fait que ces variations soient largement au-dessous des seuils de perception de ces esters (Pineau *et al.*, 2009). De tels niveaux de variations sont dans certains cas observés au cours des FML étudiées, particulièrement sur l'iC4C2 et le 2mC4C2 qui participent à la note fruit noir/fruit confituré des vins rouges (Pineau *et al.* 2009).

Ces esters sont issus d'un métabolisme différent des principaux esters odorants (EEAG et AAS) car ils dérivent du catabolisme de certains acides aminés. Ces voies de synthèse ont déjà été étudiées chez les BL alimentaires mais finalement peu chez les BL du vin.

Cependant, l'étude récente du catabolisme de la méthionine par les BL du vin (Pripis-Nicolau, 2004; Vallet, 2007) peut servir d'exemple pour la valine, la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine, acides aminés précurseurs des EEAB. Globalement, les phénomènes de synthèse sont plus importants et plus fréquents que les hydrolyses pour les EEAB, à l'exception du PhC2C2 dont la teneur diminue significativement au cours de la FML. Cependant, pour les mêmes raisons que les esters polaires mineurs précédemment évoqués, ce composé n'est certainement pas impliqué dans la perception de la note fruitée des vins rouges.

Les EEAB sont en majorités formés au cours du vieillissement à partir des acides branchés correspondants. Les tendances observées pour les acides branchés au cours des FML étudiées sont assez contrastées même si les phénomènes de synthèse semblent être un peu plus importants. Parmi les 3 acides branchés étudiés, le 2mC4 se démarque car sa teneur augmente de façon significative au cours de la FML. Ce constat prouve une nouvelle fois l'existence de différences dans le catabolisme par les BL des différents acides aminés, comme ici la leucine. La synthèse quasi-systématique du 2mC4 n'engendre pas une augmentation aussi régulière de la teneur en 2mC4C2. Ce constat pourrait indiquer que l'estérification est l'étape limitante dans la synthèse des EEAB par les BL du vin. Toutefois, ce phénomène est particulièrement intéressant car le 2mC4C2 semble impliqué de façon importante dans les interactions perceptives précédemment évoquées. D'après Pineau (2007), une addition de ce composé à des faibles niveaux (3 µg/l soit une teneur passant de 2 à 5 µg/l) dans un vin rouge modèle reconstitué, est perceptible. Les variations observées au cours de la FML peuvent atteindre ces niveaux même si en moyenne elles sont plus proches de 1 µg/l. En outre, le fait que les BL synthétisent le 2mC4 va engendrer une diminution du rapport 2mC4C2/2mC4, qui chute globalement de 20 %, et mener ainsi à une synthèse plus rapide et plus importante du 2mC4C2 au cours du temps. Or, nous avons montré que la vitesse d'estérification de cet ester au cours des 15 premières années de vieillissement était d'environ 6 µg/l par an. Au regard de ces valeurs, la FML peut donc favoriser assez rapidement le développement de notes fruitées particulières des vins rouges après quelques années de vieillissement. Ainsi, comme pour le lactate d'éthyle, il serait intéressant de faire l'étude après quelques années de vieillissement. De part leur forte implication dans l'arôme fruité des vins rouges, les EEAB font certainement partie des composés les plus impliqués dans les variations de cette note aromatique au cours de la FML.

Les EEAG et les AAS sont également très liés à toutes ces interactions perceptives, et au regard des variations de leurs teneurs au cours de la FML (jusqu'à plusieurs centaines de $\mu\text{g/l}$), leur implication dans des modifications de la note fruitée des vins rouges est très probable. Comme le montrent ces travaux, les BL sont capables à la fois de synthétiser et d'hydrolyser ces esters qui sont ainsi certainement responsables aussi bien de diminutions que d'augmentations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML.

Toutefois, l'analyse sensorielle permet d'établir un ordre dans l'implication de ces deux familles d'esters dans les variations de l'arôme fruité des vins rouges par les BL. En effet, dans le cas des FML qui intensifie l'arôme fruité (Ms08 et Mlaf09), ces intensifications aromatiques sont très probablement dues aux variations en EEAG, les AAS n'étant pas impliqués car hydrolysés par les BL. Dans ces cas, les variations en EEAG semblent toutefois assez faibles (200 $\mu\text{g/l}$ et 150 $\mu\text{g/l}$) pour induire seules des modulations de la note fruitée, au regard des études sur les interactions perceptives (Pineau *et al.*, 2008). L'implication d'autres marqueurs, comme le DMS (Ms08) et le 3SH (Mlaf09), est alors probable. Il est intéressant de constater que les EEAG semblent d'après la littérature bien plus impliqués dans les phénomènes de synergie avec d'autres marqueurs (DMS, C13NI,...) que les AAS (Pineau *et al.*, 2007, Pineau *et al.*, 2009). Ces auteurs ont montré pour des vins de Merlot et de Cabernet-Sauvignon que les EEAG étaient plutôt responsables de la note fruit rouge. Or, des intensifications de la note fruit rouge de vins de Merlot par l'activité des BL ont déjà été constatées (Keim *et al.*, 2002). A l'inverse, Gambaro *et al.* (2001) ont relié des diminutions de la note fruit rouge de vins rouges à une diminution de la teneur en certains EEAG. Toutes ces données vont donc dans le sens d'un rôle central des EEAG dans les modulations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML.

Tout ceci souligne l'importance des activités estérases des BL dans la modulation de l'arôme fruité des vins rouges. Bien que ces activités soient encore peu étudiées chez les BL du vin, les nombreux travaux menés sur les BL de l'industrie alimentaire permettent de connaître certaines données. Quatre gènes codant pour des activités estérases intracellulaires chez des BL fromagères (Est A retrouvé chez *Lc. lactis* et Est B, Est C et une acyltransférase proche d'Est C retrouvé chez *Lb. casei*) ont en effet été identifiés chez la première souche de BL du vin dont le génome entier est connu (PSU1, *Oe. oeni*) (Sumby *et al.*, 2010). De plus, Matthews *et al.* (2006) ont mis en évidence le fait que de nombreuses souches de BL du vin et

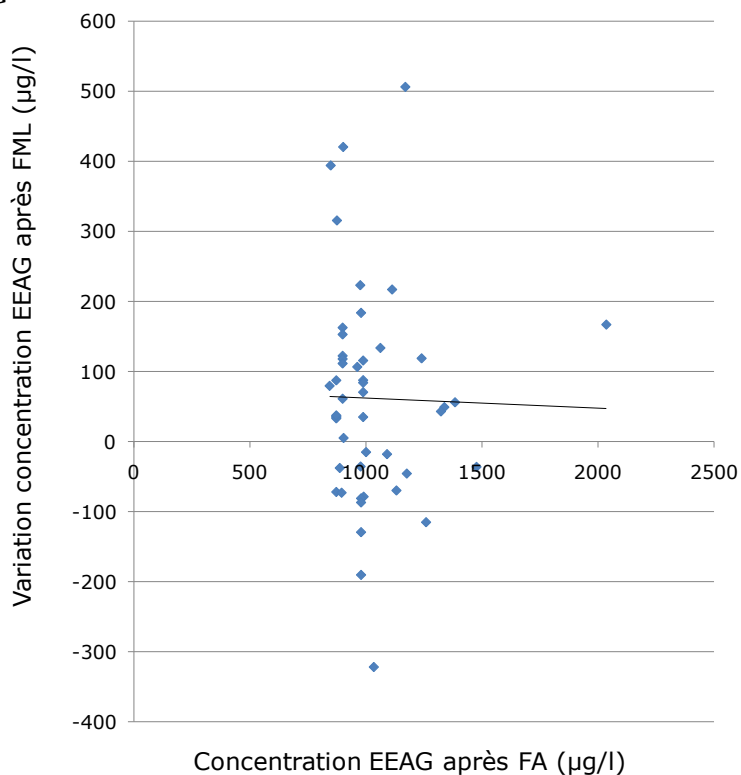
tout particulièrement celles de l'espèce *Oe. oeni*, pouvaient hydrolyser des substrats artificiels type esters liés au groupe p-nitrophényle.

Dans leur ensemble, les esters éthyliques d'acides gras peuvent suivre toutes les tendances. Mais de façon plus détaillée, il existe certaines différences au niveau du métabolisme en fonction de l'ester considéré. La longueur de chaîne carbonée de l'acide gras impliqué semble avoir un rôle important. Des similitudes ont été trouvées dans la variation des esters dérivant du même acide gras. La fonction acide semble ainsi avoir un rôle prépondérant dans le métabolisme des EEAG chez les BL du vin. Comme chez la levure, l'ester qui semble être le plus synthétisé au cours de la FML est le C8C2. En revanche, contrairement à la levure, le C10C2 est plus affecté par la FML que le C6C2, et les BL montrent clairement une tendance à le synthétiser. L'impact de la FML sur les EEAG à chaîne carbonée plus courte (C6C2, C4C2, C3C2) est à la fois moins marqué et plus contrasté que pour le C8C2, C10C2 et C12C2. Par ailleurs, le C4C2 semble être l'EEAG le moins affecté par la FML.

Ces résultats sont en contradiction avec les données de la littérature. En effet, Matthews *et al.* (2007) ont montré comme chez de nombreuses BL, que l'activité hydrolytique d'estérase de souches appartenant à différentes espèces de BL du vin (*Oe. oeni*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*) avait une plus grande spécificité pour les substrats à courtes chaînes (C2, C4). Ces auteurs ont notamment trouvé que l'activité estérase des souches d'*Oe. oeni* était la plus forte sur les substrats en C4. Or, nous montrons au contraire que le C4C2 est l'EEAG le moins affecté par la FML.

Ces décalages pourraient venir de la disponibilité des substrats qui jouent un rôle important dans les activités enzymatiques. L'étude de l'évolution de la teneur en EEAG en fonction de la concentration en esters après FA montre, que cette dernière, n'influence pas les activités enzymatiques des BL (**Figure 51**). Il n'existe aucune corrélation entre le niveau de concentration en EEAG avant FML et les variations constatées au cours de celle-ci. Il est toutefois intéressant de constater que plus la longueur de la chaîne carbonée est courte, plus il semble exister une certaine tendance à l'hydrolyse, lorsque la teneur après FA en ester augmente (**Tableau 27**). Ce phénomène est notamment visible pour le C4C2 et à un degré moindre le C6C2 dont la droite de régression présente une pente négative plus marquée. En revanche, le C8C2 et le C10C2 ne sont pas concernés par ce phénomène.

A) EEAG



B) AAS

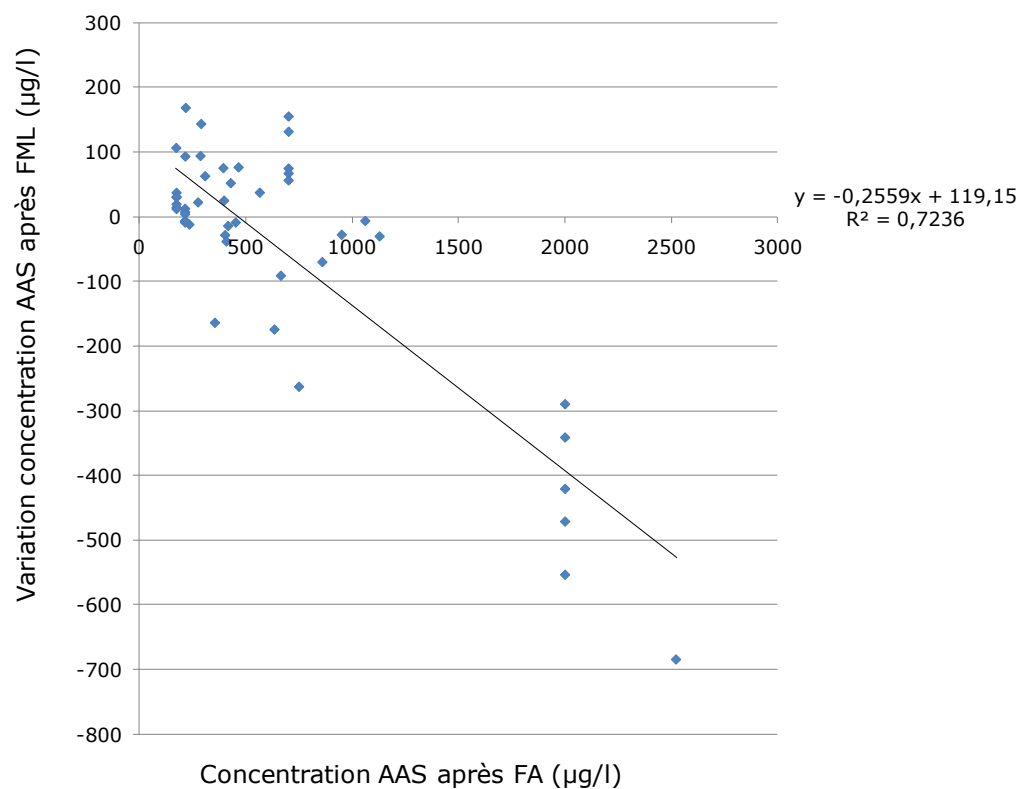


Figure 51 : Evolution de la teneur (en µg/l) en EEAG (A) et AAS (B) en fonction de leurs concentrations après FA (µg/l) sur 48 vins rouges.

Tableau 27 : Paramètres de la droite de régression linéaire calculée à partir de l'évolution de la teneur en EEAG et AAS ($\mu\text{g/l}$) en fonction de leurs concentrations initiales après FA ($\mu\text{g/l}$) sur 47 vins rouges.

Composés	Pente	R ²
C2C3	-0,2362	0,4596
C2iC4	-0,3211	0,5068
C2iC5	-0,2715	0,7233
C2C6	-0,2813	0,7759
C2PhC2	-0,3572	0,9057
C4C2	-0,2699	0,2606
C6C2	-0,1244	0,0526
C8C2	0,0201	0,0008
C10C2	0,0947	0,0126

Cette tendance se confirme avec la même étude réalisée sur les AAS (**Figure 51**). En effet, non seulement les pentes des droites sont négatives mais une corrélation est également mise en évidence. Au-delà d'un certain niveau de concentration initiale en AAS ($> 2000 \mu\text{g/l}$), les BL semblent hydrolyser ces esters. Toutes les FML menées sur le vin Ms08 (souches indigènes et souche F) ont ainsi entraîné une hydrolyse des AAS. Le seul autre vin avec une concentration initiale en AAS supérieure à $2000 \mu\text{g/l}$ (Mbeaum09), a également subi le même phénomène au cours de la FML menée par une autre souche commerciale (souche B). En revanche, si la concentration en AAS avant FML est plus faible, l'impact est beaucoup plus aléatoire avec toutefois une tendance à la synthèse et à l'absence de variation. Ce constat peut être fait à l'ensemble des AAS (**Tableau 27**) avec toutefois une plus grande corrélation pour les esters au nombre de carbone plus élevé (C2iC5, C2C6, C2PhC2) que pour les AAS les plus légers (C2C3, C2iC4). Pour chacun de ces essais, les témoins sans FML ont été gardés dans les mêmes conditions que les vins sur lesquels ont été pratiquées les FML. Ainsi, les phénomènes d'hydrolyse des AAS dus à la loi d'action de masse évoqués dans le chapitre III-1-III-C ne sont pas responsables des variations observées dans ces cas. La FML menée sur les vins blancs, beaucoup plus riches en acétates que les vins rouges (chapitre III-1-III-C), pourrait alors conduire à de nettes diminutions de leur teneur en acétates, et de leur arôme fruité. Ce phénomène pourrait correspondre aux diminutions de la note fruitée de vins de Chardonnay après FML décrites par (Laurent *et al.*, 1994) et (Sauvageot et Vivier, 1997).

De nombreuses études ont montré la capacité des BL à hydrolyser les esters avec une plus forte activité pour les substrats "légers". D'après Matthews *et al.* (2007), cette spécificité se retrouve chez les BL du vin et même si les expériences ont été jusqu'à présent réalisées en milieu modèle, il y a une forte probabilité pour que cette spécificité se retrouve également chez les BL impliquées dans cette étude. De plus, d'après la littérature, il semblerait que cela soit les mêmes enzymes qui puissent à la fois hydrolyser et synthétiser ces composés (Holland *et al.*, 2005). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe un équilibre permanent entre l'activité de lyse et de synthèse des esters par les BL du vin. Ce type d'équilibre se retrouve chez la levure qui régule la production d'esters au cours de la FA soit en les hydrolysant, soit en les synthétisant grâce à des activités estérases et transférases (Vianna et Ebeler, 2001). De plus, comme chez les BL, les activités enzymatiques d'hydrolyse et de synthèse des EEAG chez les levures sont gérées par les mêmes enzymes (EHT1, EEB1), et leur facteur limitant est la disponibilité des substrats (Saerens *et al.*, 2006). Ainsi, ce même système de régulation peut être envisagé pour les BL. Si les substrats indispensables à la synthèse des esters sont moins disponibles que les esters dans les vins après FA, il y a un fort risque que la voie estérolitique l'emporte. Inversement, si les acides gras sont plus disponibles que les esters, l'activité de synthèse sera favorisée.

Cette hypothèse induit que les principaux substrats impliqués dans la synthèse des esters par les BL ne soient pas des acides gras simples. En effet, leurs teneurs dans les vins après FA sont plus importantes que celles de leurs esters correspondants. De plus, les vins sont plus riches en acide butyrique et hexanoïque qu'en acide décanoïque. Or, la synthèse de C10C2 est plus fréquente que celle de C4C2 et C6C2. Si les acides gras simples étaient les principaux substrats impliqués dans la synthèse des esters par les BL du vin, ceci entraînerait alors une activité globale de synthèse d'esters plus fréquente, particulièrement pour les esters à courtes chaînes. Il est alors très probable que comme chez les autres BL alimentaires, la synthèse d'esters par les BL du vin se fasse majoritairement sans co-facteur par alcoololyse à partir de glycérides (Inoue *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003). Ceci est d'autant plus probable que la grande disponibilité de l'éthanol dans les vins renforce l'activité transférase (Holland *et al.*, 2005). D'après ces auteurs, il semblerait que les estérases des BL soient plus spécifiques envers les mono- et di-glycérides. Cependant, la synthèse d'esters par les BL du vin à partir d'acides gras simples ne peut être complètement exclue. Quelque soit les substrats, la disponibilité en acide gras (glycérides ou acides gras simples) est très probablement le facteur limitant à la synthèse d'esters par les BL du vin.

Ainsi, la disponibilité des substrats semblent être un facteur prépondérant dans la modulation de la composition en esters des vins par les BL, plus encore que la nature de la souche. En effet, les variations constatées entre des vins différents dont la FML a été menée avec une même souche s'avèrent plus importantes que celles observées entre des souches de BL différentes utilisées dans le même vin (**Tableau 28**).

Tableau 28 : Comparaison de la variabilité constatée sur les concentrations totales en esters odorants au cours de la FML, entre les vins utilisés pour l'étude de l'effet souche et ceux utilisés pour l'effet matrice. Les résultats correspondent aux valeurs absolues des coefficients de variation calculés pour chaque essai, avec n le nombre d'échantillons concernés.

Essai	n	Variabilité (%)
Effet souches		
Mmv08	6	98
CSmv08	5	29
Mmv09	6	48
MS	2	96
Effet matrices		
Souche F	3	286
Souche B	4	211
Souche E	2	249

Cette plus grande variabilité constatée dans l'étude de l'effet matrice est observée pour tous les esters. Il est évident que les conditions de vinification (température de FML, décuvage avant ou après FML,...) qui diffèrent d'un essai à l'autre, participent probablement à cet effet matrice. Cependant, des essais réalisés dans des conditions contrôlées en microvinification sur 2 vins différents montrent des variations imputables à cet effet matrice. Dans ce cas, les facteurs qui peuvent avoir un impact sur les activités estérases sont essentiellement le pH et la composition en substrats.

Matthews *et al.* (2007) ont indiqué que le pH avait un impact sur l'activité estérase. Cependant, dans notre cas, les variations de pH entre les vins étudiés sont certainement trop faibles pour influencer les activités enzymatiques liées aux esters. Aucun lien n'a en effet été établi entre la valeur du pH et les variations de la teneur en EEAG et AAS.

Partie 3 : Influence des interactions levures-BL sur les modulations de la note fruitée des vins rouges apportées par la FML

Partie 3 : Influence des interactions levures-BL sur les modulations de la note fruitée des vins rouges apportées par la FML

Les interactions entre les levures et les BL du vin sont étudiées à travers des comparaisons analytiques et sensorielles de vins réalisées en co-inoculation levures/BL ou de façon traditionnelle en inoculant les BL après FA (inoculation séquentielle). En effet, il existe en co-inoculation des possibilités d'interactions biochimiques ou chimiques entre les métabolites d'origine levurienne et bactérienne, autres que celles possibles en inoculation séquentielle.

Sept essais réalisés dans des vins différents et avec des couples levures/BL différents, permettent de comparer la composition en marqueurs des notes fruitées et lactiques d'un même vin ayant réalisé la FML en co-inoculation et en inoculation séquentielle. En co-inoculation, certaines FML se sont déroulées simultanément à la FA (MLaf09, Mbeaum09, Mlev09) et d'autres après FA (Ms08 F, Ms08 FM, PN08, Msol09). Quatre autres essais permettent de comparer l'influence de souches de BL implantées en co-inoculation sur la composition en certains marqueurs aromatiques d'un même vin (FML simultanées à la FA).

Une comparaison des profils aromatiques de vins de co-inoculation et d'inoculation séquentielle réalisée sur 4 essais complète l'étude.

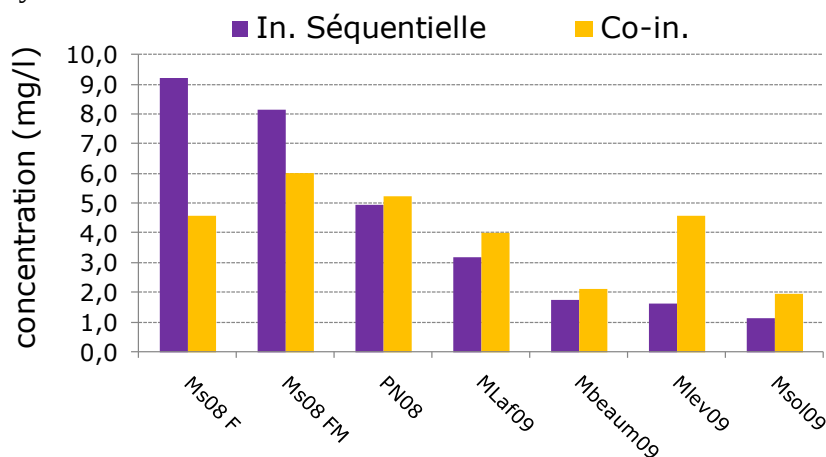
I. Impact de la co-inoculation sur la composition des vins en marqueurs aromatiques impliqués dans les variations de la note fruitée des vins au cours de la FML

Parmi l'ensemble des marqueurs aromatiques, deux catégories de composés sont particulièrement intéressantes à suivre. Il s'agit du diacétyl, majoritairement d'origine bactérienne (BL), marqueur potentiel d'un masque aromatique de la note fruitée des vins, et des esters, principalement d'origine levurienne, qui constituent les marqueurs les plus impliqués dans les variations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML.

A. Modulation de la teneur en diacétyl

Les niveaux en diacétyl peuvent varier de façon importante selon le moment où le levain malolactique est inoculé (**Figure 52**). La co-inoculation peut aussi bien diminuer (2 cas sur 7) qu'augmenter la teneur en diacétyl (4 cas sur 7). De plus, l'étude de l'évolution des composés acétoïniques montre que si des phénomènes de réduction peuvent expliquer certaines variations (Ms08 F, Ms08 FM), dans d'autres cas il n'existe pas de lien particulier entre la teneur en diacétyl et les composés issus de sa réduction (PN08, MLaf09, Mbeaum09, Msol09).

A : Diacétyl



B: Composés issus de la réduction du diacétyl (Acétoïne + butan-2,3-diol)

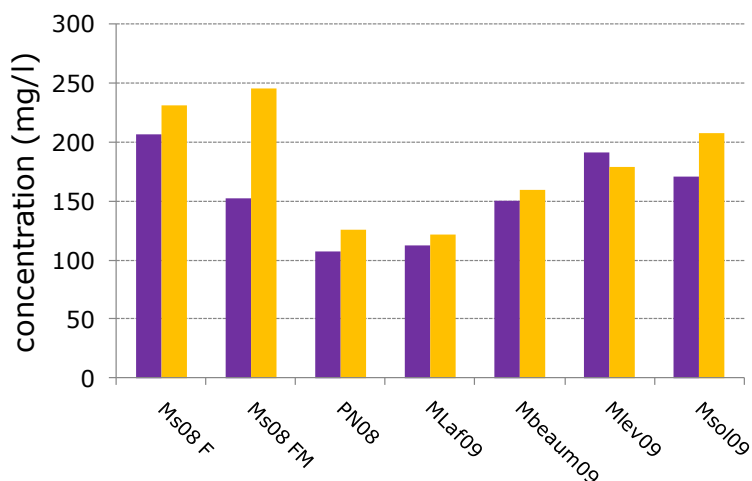


Figure 52 : Comparaison des concentrations (mg/l) en diacétyl (A) et en composés issus de sa réduction (B) dans différents vins après co-inoculation levures/BL ou réalisé en inoculation séquentielle. Les couples levures/BL sont répertoriés au chapitre II-I-C

En outre, des essais de co-inoculation réalisés sur un vin rouge (gar07) avec l'utilisation d'une seule levure et de 3 BL différentes inoculées seules et en mélange, indiquent que l'effet souche de BL peut être important en co-inoculation (**Figure 53**). Ces variations ne sont pas particulièrement dues à des phénomènes de réduction car aucun lien ne peut être établi entre les mouvements de concentration en diacétyle et ceux en composés issus de sa réduction. Dans ces 4 essais, les FML se sont déroulées simultanément à la FA. L'impact des BL sur la teneur en diacétyle s'avère donc aussi important lors de FML simultanée à la FA que lors de FML séquentielles décrites précédemment. Ceci est le signe qu'en co-inoculation, la production de diacétyle reste majoritairement d'origine bactérienne. Les variations constatées avec l'inoculation séquentielle indiquent qu'en co-inoculation, l'activité des levures affecte la production du diacétyle quelque soit son origine.

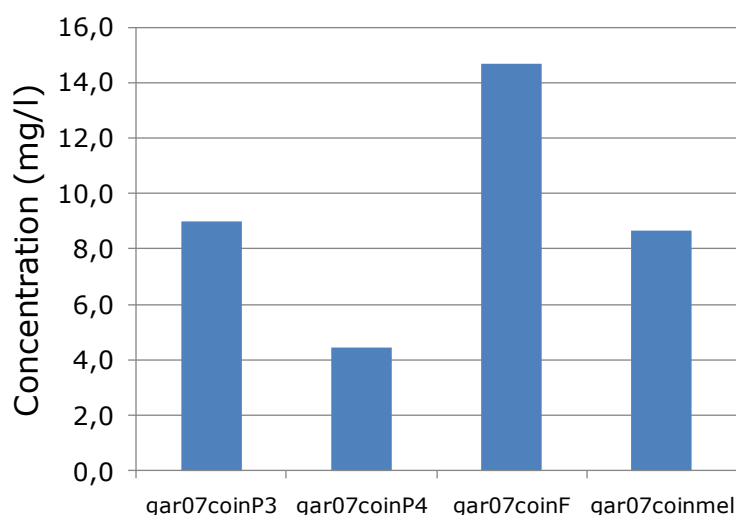


Figure 53 : Comparaison des concentrations en diacétyle (mg/l) du vin gar07 dont la FML a été menée en co-inoculation avec une même levure (W) et 3 souches de BL différentes (P3, P4, F) ainsi qu'un mélange de ces 3 souches (mel).

B. Modification de la composition en esters et en lactones

Des esters majeurs, seul le lactate d'éthyle paraît pouvoir potentiellement avoir un impact aromatique sur le vin, mais après plusieurs mois d'élevage et l'estérification plus complète de l'acide lactique. Or, les BL produisent autant d'acide lactique en co-inoculation levures/BL qu'en inoculation séquentielle, l'incidence de la méthode d'inoculation paraît faible. Les esters odorants sont certainement avec le diacétyle, les composés les plus affectés par le moment d'inoculation des BL. Cependant, comme le montre la **Figure 54**, il n'existe aucune tendance particulière d'impact de la co-inoculation levures/BL sur la teneur globale en

esters odorants. Dans trois essais, la co-inoculation augmente la teneur en esters (Ms08 F, PN08, Mlev09), dans 2 autres essais, elle la diminue (Mlaf09, Msol09) et dans les deux autres essais, les variations sont faibles (< 5 %) (Ms08 FM, Mbeaum09). Ces résultats montrent l'importance des interactions entre les micro-organismes du vin sur les variations de la teneur en esters et donc de la note fruitée. L'exemple des FML réalisées sur le vin Ms08 (F et FM) en est la parfaite illustration. Les FML ont été menées par la souche F, à la différence que dans l'essai Ms08 FM, d'autres souches de BL (P1 et P2) ont été introduites en même temps que la souche F mais sans réussir à s'implanter (chapitre II-I-C). Dans les deux cas (Ms08 F et FM), les FML issues de la co-inoculation ont été réalisées après la FA par la souche F. Or, des différences sont observées entre les essais Ms08 F et Ms08 FM, avec des teneurs en esters plus importantes en co-inoculation sur Ms08 F (+ 430 µg/l) alors que les variations sont très faibles (90 µg/l) dans le cas Ms08 FM. Ceci indique que le fait d'inoculer en masse une population de BL au cours de la FA, peut avoir une influence sur les variations de la teneur en esters, même si cette population ne s'est pas implantée. Les essais n'ont pas pu être répétés pour vérifier si ces variations viennent bien de la présence d'autres BL (P1 et P2) au moment de l'inoculation. Cependant, les résultats observés sur les essais réalisés parallèlement en microvinification par inoculation séquentielle (Mmv08, CSmv08, Mmv09), montrent que lorsque la FML est réalisée dans les mêmes conditions (vin, température, même couple levures/BL), les modifications des teneurs en métabolites sont répétables. Il est donc très probable que les différences entre les concentrations en esters des vins Ms08 F et Ms08 FM soient imputables à la présence de P1 et P2 lors de l'inoculation en début de FA.

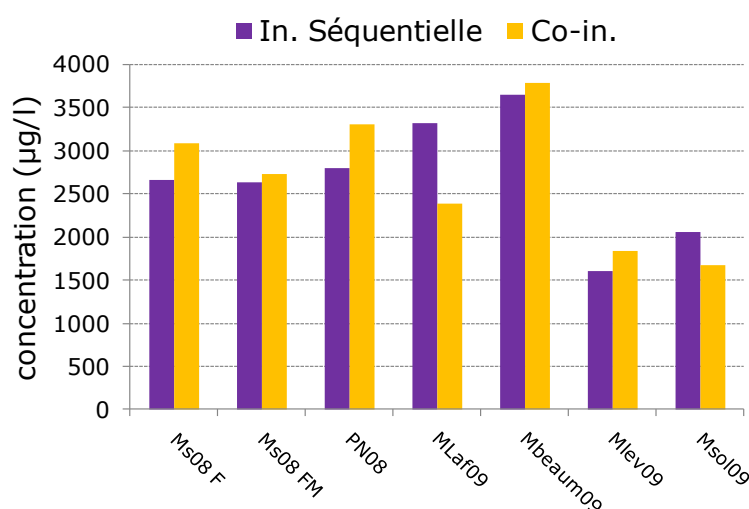


Figure 54 : Comparaison des concentrations (µg/l) en esters odorants dans différents vins après co-inoculation levures/BL ou réalisé en inoculation séquentielle. Les couples levures/BL sont répertoriés au chapitre II-I-C.

Comme pour le diacétyl, un effet souche de BL est constaté pour les esters lors de la co-inoculation avec FML simultanée à la FA (**Figure 55**). Des différences de teneurs en esters potentiellement perceptibles sont constatées entre les souches de BL (jusqu'à 290 µg/l). Les niveaux de variations sont proches de ceux rencontrés en inoculation séquentielle. A l'image du diacétyl qui reste majoritairement produit par les BL, les esters restent donc principalement d'origine levurienne en co-inoculation. Les variations constatées dans les teneurs en esters avec les vins d'inoculation séquentielle indiquent qu'en co-inoculation, l'activité des BL affecte la production levurienne d'esters.

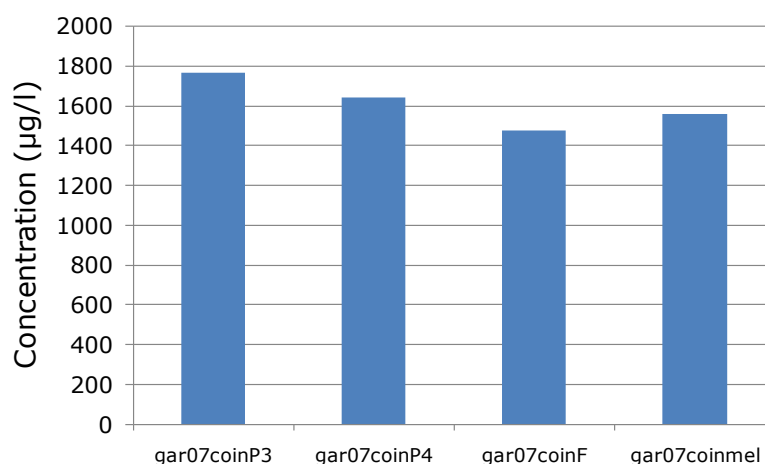


Figure 55 : Comparaison des concentrations (µg/l) en esters odorants du vin gar07 dont la FML a été menée en co-inoculation avec une même levure (W) et 3 souches de BL différentes (P3, P4, F) ainsi qu'un mélange de ces 3 souches (mel).

Les variations dues au moment d'inoculation touchent toutes les familles d'esters. C'est notamment le cas pour le 3OHC4C2 (**Figure 56**), pour qui les variations allant jusqu'à 320 µg/l (Mlaf09), sont potentiellement perceptibles (Pineau *et al.*, 2009). Les mouvements de concentration en 3OHC4C2 suivent toutes les tendances. La co-inoculation peut aussi bien augmenter (3 cas sur 7) que diminuer (3 cas sur 7) la teneur en cet ester.

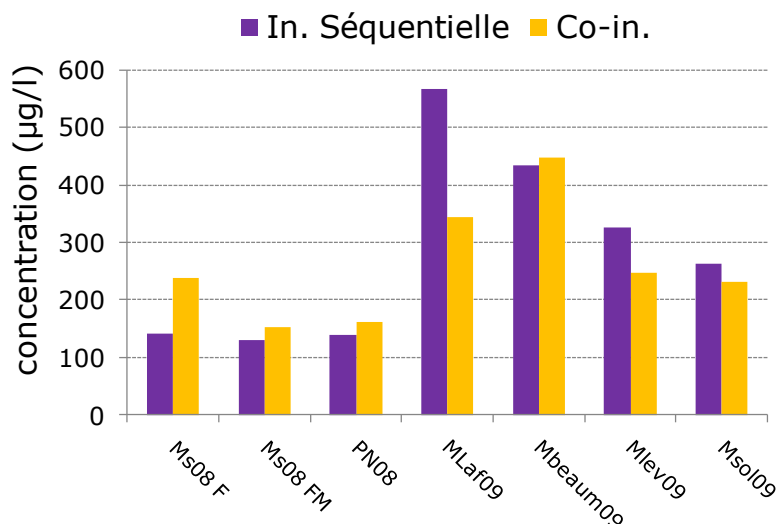


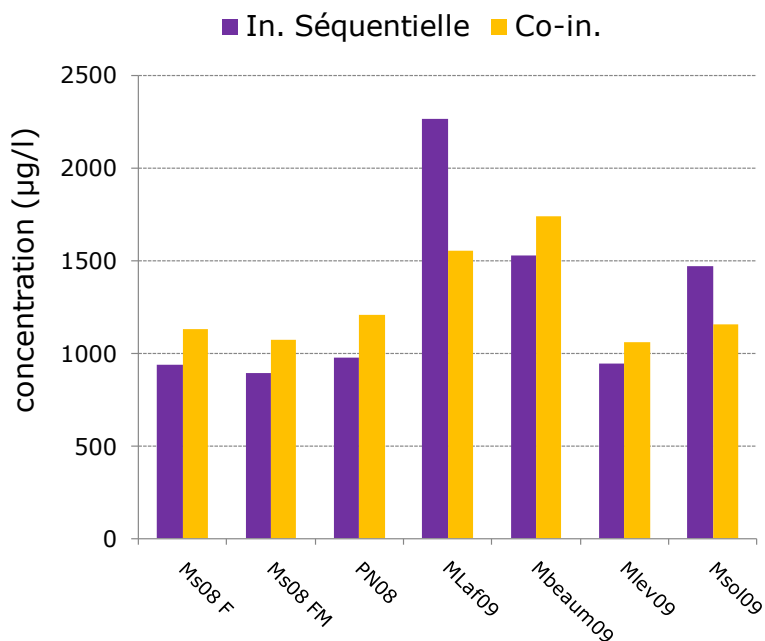
Figure 56 : Comparaison des concentrations (µg/l) en 3OHC4C2 dans différents vins après co-inoculation levures/BL ou réalisé en inoculation séquentielle. Les couples levures/BL sont répertoriés au chapitre II-I-C.

Les EEAG (**Figure 57A**) et les AAS (**Figure 57B**) sont également affectés par la co-inoculation. Même quand la teneur globale en esters ne varie pas, les EEAG et les AAS présentent des variations selon le mode d'inoculation des BL, comme c'est le cas pour l'essai Mbeaum09 et Ms08FM. Il existe une tendance à ce que la co-inoculation procure des teneurs en EEAG plus importantes qu'en inoculation séquentielle (5 cas sur 7). Parfois (Mlaf09 et Msol09), la co-inoculation entraîne de fortes diminutions de la teneur en EEAG par rapport à l'inoculation séquentielle (jusqu'à – 700 µg/l). Au regard de l'impact aromatique des variations en EEAG observées précédemment au cours de la FML, les mouvements d'EEAG liés au moment d'inoculation peuvent certainement influencer la note fruitée des vins rouges. Ces résultats montrent à quel point les interactions entre les levures et les BL peuvent potentiellement affecter cette note aromatique des vins.

L'impact de la co-inoculation sur la teneur en AAS est plus contrasté, comme le montre la **Figure 57B** (3 augmentations, 3 diminutions et un cas sans variation notable). En outre, les différences de variations des teneurs en AAS observées entre les essais Mbeaum09 et Mlev09 indiquent que la composition initiale du moût a également son importance. En effet, ces deux essais ont été menés sur deux vins différents avec le même couple levures/BL (Z/B). Dans les deux cas, la FML en inoculation séquentielle amène une diminution de la teneur en AAS comparée à celle du vin après FA (annexe 2). La co-inoculation a pour effet d'augmenter légèrement cette hydrolyse dans le vin Mbeaum09 tandis que ce phénomène est

bien limité lorsqu'il s'agit du vin Mlev09. Ces résultats montrent que l'impact des interactions levures/BL peut varier d'un vin à l'autre.

A : EEAG



B : AAS

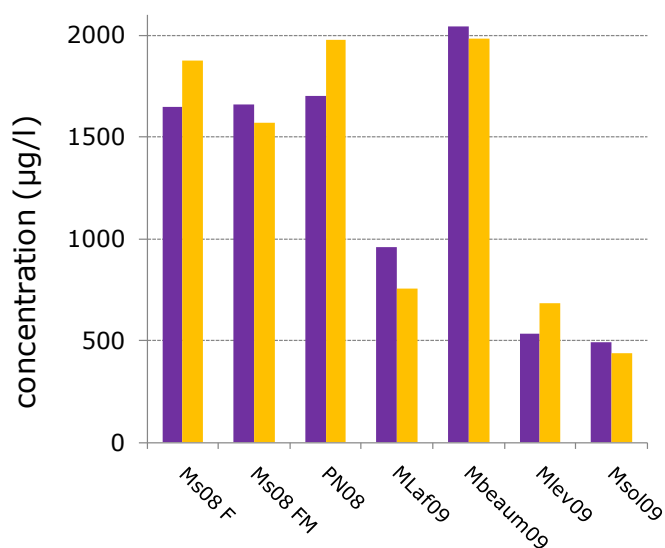


Figure 57 : Comparaison des concentrations en EEAG (A) et AAS (B) dans différents vins après co-inoculation levures/BL ou réalisé en inoculation séquentielle. Les couples levures/BL sont répertoriés au chapitre II-I-D.

Les EEAB sont les esters les moins affectés par le moment d'inoculation, les variations constatées étant 5 fois sur 7 inférieures à 10 µg/l. A court terme, la co-inoculation n'augmente jamais la teneur en EEAB alors que l'inoculation séquentielle présente des teneurs supérieures

à la co-inoculation dans 4 cas sur 7. Dans certains cas, comme le vin Mlev09, ces variations peuvent potentiellement avoir un impact sur l'arôme fruité du vin. Il est en effet constaté pour ce vin une différence de 30 µg/l d'EEAB en faveur de l'inoculation séquentielle, avec une augmentation du 2-mC4C2 de 6 µg/l, qui est potentiellement perceptible (Pineau *et al.*, 2009).

Les acides branchés, précurseurs des EEAB, peuvent également être influencés par le moment d'inoculation. La co-inoculation a notamment une forte tendance à augmenter la teneur en acides branchés par rapport à l'inoculation séquentielle (5 cas sur 7). Dans 5 cas sur 7, les rapports de concentration EEAB/acides branchés diminuent en co-inoculation (jusqu'à – 35 %), alors que dans les deux autres cas les variations sont faibles (2 %) (**Figure 58**). Ainsi, contrairement à ce qui se passe à court terme, la co-inoculation favorise la formation des EEAB au cours du temps et donc, le développement potentiel de notes fruitées particulières au cours du vieillissement du vin rouge.

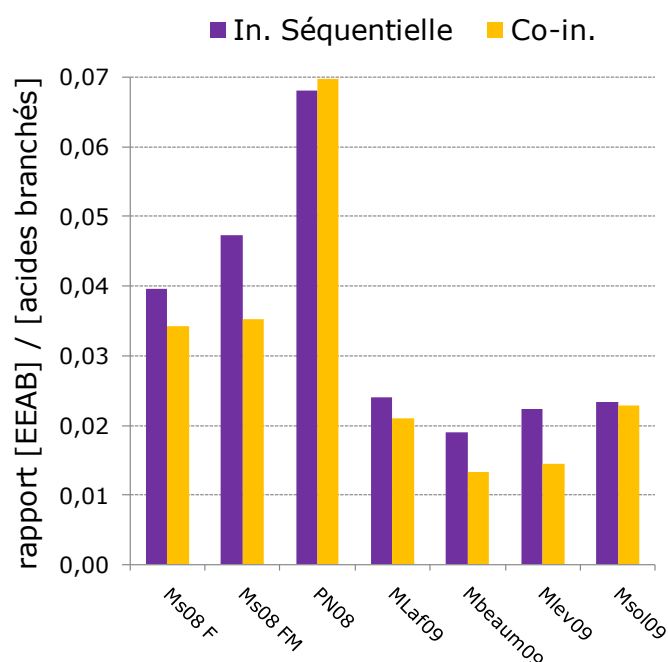


Figure 58 : Comparaison des rapports de concentrations EEAB/acides branchés dans différents vins après co-inoculation levures/BL ou réalisé en inoculation séquentielle. Les couples levures/BL sont répertoriés au chapitre II-I-C.

Les autres marqueurs de la note fruitée sont affectés de façon moins intense par la co-inoculation, les variations étant plus faibles et beaucoup moins systématiques. Toutefois, dans le cas des lactones, même si ces mouvements n'ont certainement pas d'impact aromatique (< 3 µg/l), il est intéressant de constater que la co-inoculation augmente de façon générale leur teneur par rapport à l'inoculation séquentielle (**Figure 59**). Les variations sont ici du même niveau que celles observées généralement au cours de la FML. Bien que l'impact soit

globalement très faible, la FML a plutôt tendance à diminuer la teneur en lactone. En revanche, en co-inoculation, les variations sont certes toujours aussi faibles, mais les tendances sont clairement inversées. Ainsi, l'augmentation légère mais régulière de la teneur en lactones en co-inoculation peut être liée à la voie de formation de ces composés dans le vin. La présence simultanée de levures et de BL actives peut probablement faciliter la lactonisation par les levures des acides gras hydroxylés formés par les BL, menant alors à des teneurs un peu plus importantes en lactones que dans les vins réalisés en inoculation séquentielle.

Comme pour les EEAB et les acides branchés, les variations des teneurs en lactones suivent une tendance particulière selon le mode d'inoculation, qui prouve définitivement que les interactions entre les microorganismes du vin modifient sa composition en métabolites, et donc potentiellement son profil aromatique.

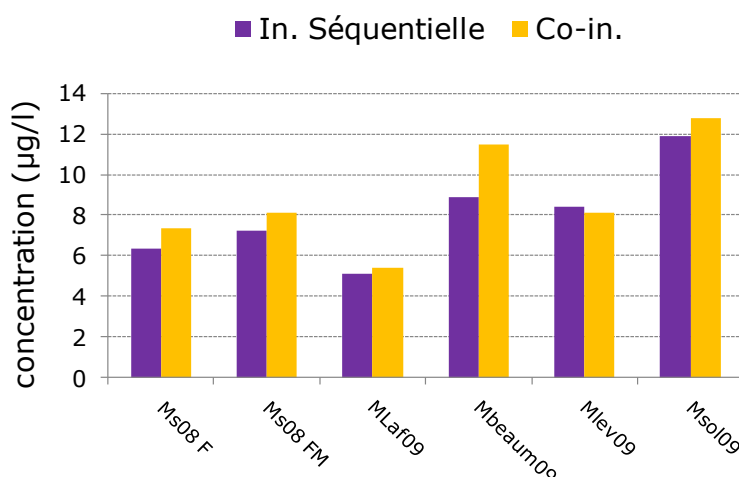


Figure 59 : Comparaison des concentrations en lactones dans différents vins entre un essai réalisé après co-inoculation levures/BL et le même essai réalisé en inoculation séquentielle. Les couples levures/BL sont répertoriés au chapitre II-I-C.

C. Discussion

Il existe un impact réel de la co-inoculation sur les marqueurs aromatiques des vins. Le diacétyle et les esters sont les composés les plus affectés par la co-inoculation qui peut aussi bien provoquer une augmentation de leurs teneurs que les diminuer. Pour certains métabolites (lactones, EEAB, acides branchés), il existe des tendances qui peuvent plus ou moins modifier la note fruitée des vins rouges. Les variations de la teneur des vins en

métabolites engendrées par la co-inoculation peuvent affecter l'arôme fruité du vin à court terme (EEAG, AAS, EEAB) mais également à plus long terme (acides branchés).

Les interactions mises en jeu entre les levures et les BL au cours de la co-inoculation peuvent donc modifier le profil biochimique du vin. L'essai MLaf09 marque tout particulièrement ces phénomènes (inoculation aux 2/3 de la FA). La co-inoculation diminue non seulement fortement la teneur en esters de toutes classes mais également celle d'autres composés comme les alcools supérieurs (- 63 mg/l, soit - 20 %). Ces composés ne sont que très peu affectés par la FML en général et aucune variation n'est constatée pour 80 % des FML étudiées (seuil de rejet de 10 %). Dans les rares cas où des mouvements sont observés, il s'agit plus d'augmentation des teneurs en alcool supérieur (8 vins sur 10) (annexe 7). Ce sont des composés en grande majorité d'origine levurienne. De telles modifications de leur teneur ne peuvent venir que du métabolisme des levures. Ainsi, l'introduction dans ce vin de BL aux deux tiers de la FA perturbe certainement le métabolisme des levures. Les BL introduites en masse concurrencent sans doute les levures vis-à-vis des substrats présents. Certaines synthèses de composés issus de métabolismes levuriens sont probablement limitées. C'est ainsi le cas pour les EEAG et AAS car la composition nutritive du milieu est un facteur important pour leur synthèse au cours de la FA (Sumby *et al.*, 2010). Or, la production de ces esters par les levures, et plus particulièrement celle en AAS, atteint son maximum en deuxième partie de FA (Vianna et Ebeler, 2001). Ainsi, l'introduction de BL en masse, au moment où la production d'esters est la plus forte, va certainement diminuer fortement la disponibilité des éléments nutritifs pour les levures. L'inoculation de BL au deux tiers de la FA entraîne alors probablement une forte diminution de la synthèse d'esters par les levures comme c'est le cas avec le vin Mlaf09.

La réversibilité des interactions levures/BL est vraisemblablement possible. L'action de levures ou de ses lies sur les modulations en composés aromatiques au cours de la FML est notamment vérifiée dans le cas de la production de diacétyl en co-inoculation. Ce composé dont l'origine dans les vins est due majoritairement à l'action des BL est en effet affecté de façon importante par le moment d'inoculation des BL. Certains auteurs suggèrent que l'activité réductrice des levures et/ou de ses lies, entraînent en co-inoculation une diminution de la teneur en diacétyl (Krieger et Arnink, 2003; Bartowsky et Henschke, 2004). Si ces phénomènes de réduction sont probablement impliqués dans certaines variations, d'un autre côté il est montré pour la première fois que la co-inoculation peut aussi augmenter la teneur

en diacétyle. Le métabolisme bactérien de dégradation de l'acide citrique est alors certainement modifié par l'activité des levures.

La composition initiale du moût peut aussi avoir un impact sur les modulations en composés aromatiques engendrées par la co-inoculation levures/BL. Un même couple levures/BL peut ainsi interagir de façon différente selon le vin dans lequel les microorganismes sont inoculés, comme le montre la comparaison des variations constatées sur les AAS entre les essais Mbeaum09 et Mlev09 en co-inoculation. La disponibilité des substrats pour les levures et les BL étant différente d'un vin à l'autre, il est normal de mettre en évidence des différences entre les vins. Toutefois, ces variations d'esters semblent un peu moins marqué que celles dues exclusivement aux interactions entre microorganismes (Ms08 F et FM). Les interactions entre les microorganismes du vin restent ainsi au centre des phénomènes responsables de la modification de la composition en esters, principaux métabolites impliqués dans les variations de l'arôme fruité des vins rouges au cours de la FML.

II. Impact des interactions levures/BL sur le profil aromatique des vins

Les mouvements en marqueurs aromatiques dus aux interactions levures/BL constatés précédemment, ont-il un impact réel sur le profil aromatique des vins?

En effet, les niveaux de variations en métabolites, apportés par la co-inoculation, sont dans l'ensemble plus importants que ceux engendrés uniquement par la FML. Or, il a été montré que la FML modifiait de façon importante le profil aromatique des vins rouges et que la note fruitée était particulièrement concernée par ces mouvements.

Quatre essais comparant le profil aromatique d'un vin élaboré en co-inoculation et en inoculation séquentielle ont été faits sur les vins Ms08 (F et FM), PN08 et MLaf09 (**Figure 60**). L'évaluation sensorielle réalisée olfactivement sur le descripteur fruité, lactique, fumé/grillé et végétal, montre des modifications importantes des profils aromatiques des vins testés par rapport à une inoculation séquentielle classique. Tous les descripteurs évalués sont influencés mais le plus affecté est encore une fois le caractère fruité. La co-inoculation n'augmente pas forcément le caractère fruité des vins rouges qui peut aussi bien augmenter

que diminuer lors de ce mode d'inoculation. De même, la co-inoculation ne diminue pas systématiquement la note lactique qui peut être plus intense y compris dans le cas de FML simultanée (Mlaf09). Ces données sont en relation avec les constats précédemment évoqués pour les esters et le diacétyl. En revanche, elle semble contrarier les idées véhiculées chez les viticulteurs comme quoi la co-inoculation préserve l'arôme fruité par diminution de la note lactique. Si ces phénomènes sont possibles, nous montrons que l'inverse l'est également.

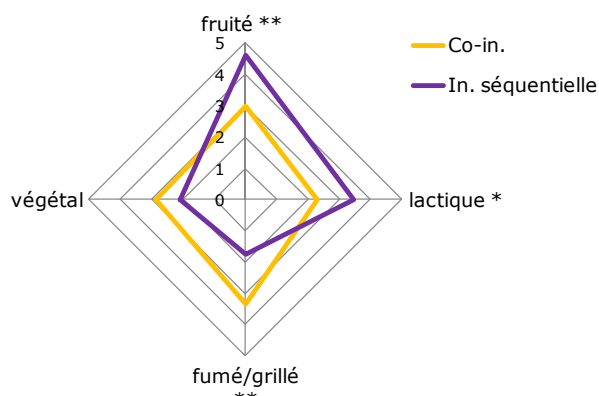
Des effets de masque de l'arôme fruité, autre que celle de la note lactique, sont clairement mis en évidence. En effet, parfois (Ms08 F et FM) la co-inoculation favorise le développement d'une note végétale (FM) ou fumé/grillé (F). La note végétale est souvent en opposition avec la note fruitée. L'IBMP, principale responsable de la note végétale des vins, n'a pas ici été dosée. Cependant, les notes végétales ressenties ne se rapprochent pas de celles de poivron, caractéristiques de ce composé. Dans le cas du vin Mlaf09, l'effet de masque du caractère fumé/grillé participe à la perte importante de la note fruitée constatées avec cette inoculation des BL au 2/3 de la FA (significatif à 1 % et consensus des 16 juges), mais les fortes diminutions des teneurs en esters sont certainement en grande partie responsables de ce phénomène. En revanche, l'effet de masque de la note fumé/grillé perçu en co-inoculation sur le vin Ms08 F (augmentation en esters opposée à la note fruitée), a été évoqué précédemment dans le cas des vins Mm09 (I, J, L). Il semblerait donc que cette note fumé/grillé soit le vrai masque de l'arôme fruité apporté à court terme par la FML. Les composés soufrés volatils impliqués le plus souvent dans les notes de réduction, ont été dosés et ne sont pas ici responsables de cette note particulière. De même, il est peu probable que ces notes fumé/grillé correspondent à l'apparition de composés marquant le bouquet du vin comme les thiazoles car ces réactions sont généralement lentes et certainement pas possibles dans un délai aussi court (Marchand *et al.*, 2000; Marchand *et al.*, 2002). En outre, lors des épreuves d'analyse descriptive orientée, le panel n'a pas eu le choix dans le vocabulaire pour s'exprimer et le nombre de descripteur était limité. Ainsi, les juges ont pu évaluer une note aromatique qui ne soit pas forcément caractéristique de la note fumé/grillé mais qui s'en approche le plus, comme certaines notes de réduction. Le fort effet juge souvent constaté dans l'évaluation de la note fumé/grillé, indique que le panel a effectivement eu des difficultés à juger cette note aromatique. Une évaluation des vins à plus long terme pourrait permettre de voir si ce caractère aromatique persiste ou si au contraire il s'estompe, ce qui serait probablement le signe de phénomènes de réduction.

D'un autre côté, l'impact aromatique à court terme de la co-inoculation n'est pas forcément négatif par rapport à l'arôme fruité. En effet, la co-inoculation peut également apporter une intensification de la note fruitée suite à l'augmentation de la teneur en esters, comme c'est le cas dans le vin PN08. Le vin issu de la co-inoculation est également perçu moins lactique et moins riche pour la note fumé/grillé. Toutes ces variations favorisent dans ce cas l'expression de la note fruitée lors de la co-inoculation.

La grande variabilité d'impact de la FML sur l'arôme fruité des vins rouges ainsi que sur les marqueurs impliqués dans sa perception, est en partie le reflet des interactions entre les microorganismes et le vin lui-même.

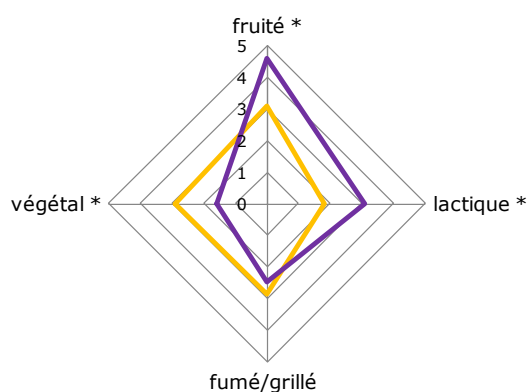
La composition du vin après FA est un élément essentiel pour expliquer les modulations aromatiques engendrées par la FML. Or celle-ci est intimement liée aux métabolites produits par les levures au cours de la FA mais aussi plus tard lors de leur autolyse. S'il est connu depuis longtemps que les levures influencent grandement la viabilité des BL, elles interfèrent aussi sur les modifications apportées à la note fruitée des vins rouges par la FML. Les essais réalisés en co-inoculation montrent que ces interactions entre les microorganismes sont à l'origine de la perte de l'arôme fruité aussi bien par masquage aromatique que par dégradation directe des marqueurs fruités. D'un autre côté, elles induisent également des intensifications de la note fruitée, en étant responsable de la production plus importante de ces mêmes marqueurs, aussi bien à court terme qu'au bout de quelques années de vieillissement. Les esters sont au cœur de toutes ces interactions et, de part leur rôle central dans la perception de la note fruitée des vins rouges, ils constituent les marqueurs les plus fidèles de la modification de l'arôme fruité des vins rouges apportée par la FML.

A: Ms08, couple W/F, panel 13 personnes



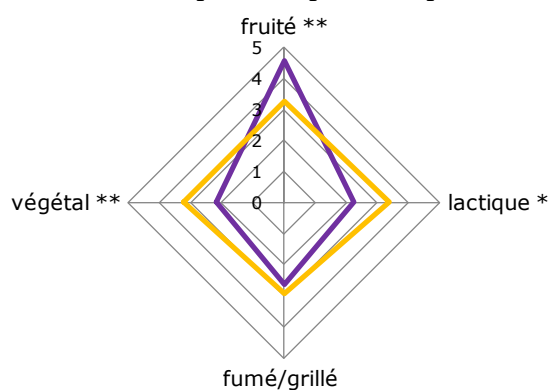
descripteur	p produit	p juge
fruité	0,0046	0,0613
lactique	0,0288	0,0329
fumé/grillé	0,0112	0,0369
végétal	0,0902	0,5294

B: Ms08, W/F+P1+P2, panel 10 personnes



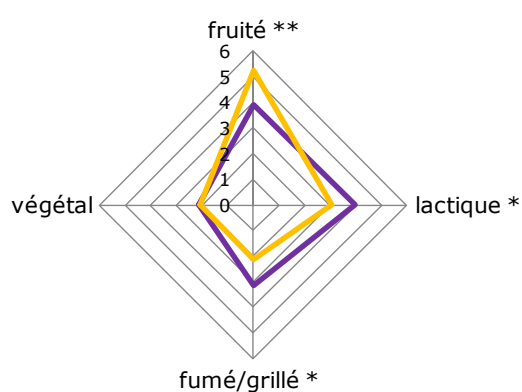
fruité	0,0119	0,1493
lactique	0,0332	0,1285
fumé/grillé	0,4057	0,0159
végétal	0,0039	0,2615

C: Mlaf09, couple Y/F, panel 16 personnes



fruité	0,0099	0,9863
lactique	0,0411	0,1234
fumé/grillé	0,4929	0,0859
végétal	0,0045	0,0050

D: PN08, couple X/G, panel 14 personnes



fruité	0,0063	0,1021
lactique	0,0339	0,0089
fumé/grillé	0,0500	0,1317
végétal	0,8060	0,0149

Figure 60 : Profil comparé réalisé sur le vin Ms08 (A et B), Mlaf09 (C) et PN08 (D) entre des vins réalisés en co-inoculation levures/BL et les mêmes avec une FML séquentielle.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La question initiale était de savoir si les variations de l'arôme fruité des vins rouges au cours de la FML étaient dues à un masque aromatique provoqué par l'apparition des notes lactiques, ou bien si d'autres voies métaboliques que celle de la dégradation de l'acide citrique par les BL pouvaient être impliquées dans ces nuances aromatiques.

Cette étude a pu en partie y répondre grâce au dosage spécifique de plus de 70 molécules dans plus d'une centaine de vins. Le développement préalable des techniques d'analyses rapides et de haute performance s'est révélé être un outil précieux à la réalisation de ce projet. Ces travaux ont ainsi abouti à l'identification des composés majoritairement impliqués dans les variations de la note fruitée des vins rouges engendrées par la FML. Ils ont également permis de mettre en place les outils analytiques indispensables à l'étude approfondie des phénomènes biochimiques responsables de la grande variabilité de ces modifications aromatiques.

Dans un premier temps, il a été montré que le caractère fruité est la note aromatique qui varie le plus au cours de la FML. Contrairement aux idées reçues, l'activité des BL ne diminue pas systématiquement l'arôme fruité des vins rouges. Il existe une grande variabilité dans l'impact des BL sur ce caractère aromatique. L'intensité de la note fruitée peut être soit diminuée, soit augmentée et même, ne pas être affectée par la FML. De plus, ces modifications aromatiques sont non seulement perçues rapidement en fin de fermentation, mais les effets de la FML sur l'arôme fruité des vins pourraient être révélés plus tardivement après quelques années de vieillissement. Cette réalité contraire aux discours généralistes, caractérise l'absence de consensus trouvée dans la littérature.

L'impact d'un masque lactique n'a pas été démontré et de façon surprenante cette note aromatique connue pour caractériser la FML, n'a finalement été que très peu affectée par l'activité des BL. La production de diacétyle par les BL n'est pas remise en cause, car les variations constatées pour ce composé sont confirmées. En revanche, très peu de liens ont pu être établis dans nos conditions entre la synthèse bactérienne du diacétyle et l'apparition de la note lactique. La principale cause de cette absence de corrélation a été attribuée à la difficulté de percevoir précocement le diacétyle dans les vins rouges très jeunes. Ce composé est alors en grande majorité complexé par le SO₂ (de Revel, 1988). Une évaluation plus tardive

pourrait permettre de mieux établir l'impact d'un éventuel masque lactique sur l'arôme fruité des vins rouges. Cette note lactique n'est finalement que très peu impliquée dans les modulations de l'arôme fruité des vins rouges très jeunes. En revanche, un autre effet de masque a été mis en évidence. Quand elle est présente après FML, la note fumé/grillé masque clairement la note fruitée des vins rouges. Des vins, dont la teneur en marqueurs fruités augmente au cours de la FML, sont perçus significativement moins fruités suite au développement de cette note aromatique particulière. L'apparition de notes fumé/grillé au cours de la FML a déjà été observée, notamment dans les vins de Merlot (Keim *et al.*, 2002). Cependant, c'est la première fois qu'un tel effet de masque est aussi clairement évoqué. Les composés qui caractérisent cette note aromatique sont peu connus. Des travaux antérieurs ont toutefois étudié la genèse de composés marquant le bouquet du vin d'un certain caractère grillé (Marchand *et al.*, 2000). Mais il est peu probable que la cinétique de formation de ces composés tertiaires soit compatible avec la perception de cette note dans les vins nouveaux. Malgré la difficulté de consensus sur cette note aromatique, un effet de réduction apporté par la FML et confirmé par les études récentes, pourrait en être la cause (Pripis-Nicolau, 2002 ; Vallet, 2007). Mais les composés soufrés volatils recherchés n'ont pas permis d'identifier les marqueurs moléculaires. Des études complémentaires pourraient préciser la réalité de cette note qualifiée dans ce travail de fumé/grillé.

Les effets de masque sont loin d'expliquer toutes les variations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML. L'implication de la dégradation ou de la synthèse de marqueurs de l'arôme fruité par les BL a ainsi été mise en évidence. Parmi les métabolismes bactériens potentiellement responsables de ces modulations aromatiques, les activités β -glycosidase, bien que peu impliquées dans les variations des C13-norisoprénoïdes, sont mises en évidence avec la libération du linalol. Dans les cépages non muscatés, les concentrations libérées sont extrêmement faibles. L'action synergique de ce terpénol pourrait cependant présenter un réel intérêt. Par ailleurs, la FML affecte peu les teneurs en lactones, mais les BL pourraient produire les acides gras hydroxylés précurseurs de ces composés par oxydation enzymatique des acides gras insaturés correspondants (Wanikawa *et al.*, 2000). La libération par une activité β -glycosidase pourrait être également envisagée (Ségurel *et al.*, 2009). L'enrichissement éventuel d'acides hydroxylés pourrait constituer une réserve potentielle de composés aromatiques formés au cours du temps, contribuant à l'évolution plus tardive de la note fruitée des vins rouges.

Pour la première fois, la capacité des BL à produire du DMS est mise en lumière. Cette production semble autant dépendre de la souche de BL que du milieu. Ce composé participe de façon synergique à l'arôme fruité des vins rouges lorsque les teneurs sont de plusieurs $\mu\text{g/l}$ (Segurel *et al.*, 2004; Escudero *et al.*, 2007). Dans certains cas, la production des BL peut être proche de ces niveaux. Des voies de formation par réduction du DMSO et par le catabolisme d'acides aminés ont été suggérées. Un autre composé soufré produit par les BL à partir d'acides aminés soufrés est potentiellement impliqué. Il s'agit du 3SPE dérivant de l'homocystéine. Toutefois, les niveaux d'implications dans la modulation de la note fruitée des vins rouges restent à évaluer. En ce qui concerne le 3SH, l'activité des BL a plutôt tendance à diminuer sa teneur. Le catabolisme de ce thiol par les BL n'étant pas connu, l'hypothèse de la rétention du 3SH par les lies des microorganismes du vin est envisagée. Cette diminution de la teneur en 3SH au cours de la FML serait suffisante pour expliquer des baisses d'intensité de la note fruitée des vins rouges observées dans certains cas. A contrario, pour la première fois, il est évoqué la libération par les BL du 3SH. Des augmentations de la teneur en 3SH, participant certainement à l'augmentation de l'intensité de la note fruitée, ont en effet été observées. Si ce constat reste à confirmer, cette libération de 3SH au cours de la FML pourrait provenir de l'expression des activités β -lyase des BL. L'étude plus approfondie de l'impact de la FML sur la composition des vins rouges en thiols pourrait certainement améliorer la compréhension des phénomènes responsables de la variation de la note fruitée des vins au cours de la FML. Pour ce faire, des améliorations devront être encore apportées dans la robustesse de la quantification de ces thiols.

Finalement, l'activité enzymatique la plus impliquée dans les modulations de la note fruitée des vins rouges est l'activité estérase des BL. La grande variabilité dans la composition des vins en esters lors de la FML, est en accord sensoriellement avec celle constatée pour la note fruitée des vins. De plus, le rôle central des esters dans les phénomènes de synergie renforce cette hypothèse. Toutes les familles d'esters n'ont pas le même niveau d'implication dans la note fruitée des vins rouges. Trois catégories d'esters ont ainsi été mises en évidence selon leur niveau de variation. Les esters éthyliques d'acides branchés (EEAB) présentent des variations potentiellement perceptibles lors de certaines FML. En outre, les BL sont capables de synthétiser les acides branchés précurseurs, et plus particulièrement l'acide 2-méthylbutyrique (2mC4) dont l'ester éthylique correspondant (2mC4C2) est très impliqué dans la note fruitée des vins rouges. Cette synthèse de l'acide favorise la formation du 2mC4C2 au cours du temps et participe très certainement au développement de notes fruitées

particulières après quelques années de vieillissement (3-4 ans), comme établi grâce à la base de données esters des vins. La synthèse rapide de ces esters par les BL est issue du catabolisme d'acides aminés mais l'étape limitante semble être l'activité estérase des BL. De plus, les acétates d'alcools supérieurs peuvent varier de façon importante au cours de la FML et participer dans certains cas à ces modulations aromatiques. Mais c'est dans les vins blancs que cette famille d'esters est probablement la plus impliquée dans les modifications aromatiques apportées par la FML. Dans les vins rouges, les composés les plus importants sont les esters éthyliques d'acides gras (EEAG). Ces esters sont au centre des phénomènes de synergie avec les EEAB. De plus, les EEAG correspondent aux composés dont les variations de concentration sont corrélées avec celles de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML. Ces composés peuvent être aussi bien hydrolysés que synthétisés au cours de la FML, conduisant ainsi soit à une destruction de l'arôme fruité, soit à son intensification. L'activité estérase des BL du vin a été peu étudiée mais des gènes codant pour de telles activités enzymatiques ont déjà été identifiés chez *Oe. oeni*. Nous mettons en évidence le fait que l'activité estérolitique et celle de synthèse, gérées par les mêmes enzymes (Holland *et al.*, 2005), sont très dépendantes de la longueur de la chaîne carbonée et de la nature de l'acide correspondant. Les BL ont ainsi une tendance à synthétiser les EEAG à longueur de chaîne moyenne (C8C2 et C10C2) alors que les esters plus légers (C4C2 et C6C2) sont moins affectés par les BL. En outre, les variations de la teneur en esters au cours de la FML résultent d'un équilibre entre les activités hydrolytiques des esters, et celles d'estérifications des acides gras, vraisemblablement plus par alcoololyse de glycérides que par estérifications des acides gras simples correspondants. Le facteur limitant de l'activité estérase chez les BL du vin pourrait être la disponibilité des substrats. Si la souche de BL est un facteur à prendre en compte, la composition du vin en substrats est certainement encore plus importante. L'étude de l'influence des interactions entre les levures et les BL sur les modulations de la note fruitée montre à quel point les processus microbiologiques fermentaires sont complexes. Effectivement, la souche de BL et le moment d'inoculation influencent grandement le profil aromatique et biochimique des vins. Mais, ces variations sont propres à chaque couple levures/BL pour un milieu donné. Ainsi, les phénomènes à la base de la grande variabilité d'impact de la FML sur la note fruitée des vins rouges sont plus complexes qu'un simple effet souche. Ces variations sont le reflet d'un triptyque bactéries-levures-vin dont chaque composante a son importance. L'utilisation d'une souche de BL ne peut assurer l'expression de la note fruitée des vins rouges. En revanche, l'étude des interactions levures-BL sur la production d'esters pourrait permettre de mettre en valeur certains couples potentiellement

plus intéressants que les seules souches de bactéries. Le développement des méthodes multicritères d'analyse par microextraction sur phase solide telle que la détermination des esters, est fondamental pour comprendre et interpréter ces facteurs complexes. En outre, ces méthodes utilisant des volumes restreints et à haut débit, sont adaptées aux études plus fondamentales. Des outils mis en place dernièrement pour l'étude des interactions levuriennes (Renault, 2010), devraient pouvoir affiner les mécanismes impliqués et nous aider à décrire les métabolismes croisés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Abeijón Mukdsi, M. C., Medina, R.B., Alvarez, M.F., González, S.N. (2009). "Ester synthesis by lactic acid bacteria isolated from goat's and ewe's milk and cheeses." *Food Chemistry* 117(2), 241-247.
- Acree, T. E., Barnard, J., Cunningham, D.G. (1984). "A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents." *Food Chemistry* 14(4), 273-286.
- Acree, T. E., Butts, R.M., Nelson, R.R, Lee, C.Y. (1976). "Sniffer to determine the odor of gas chromatographic effluents." *Analytical Chemistry* 48(12), 1821-1822.
- Alewijn, M., B. A. Smit, Sliwinski, E.L., Wouters J.T.M. (2007). "The formation mechanism of lactones in Gouda cheese." *International Dairy Journal* 17(1), 59-66.
- Alexandre, H., D. Heintz, Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Charpentier, C., Feuillat, M. (2001). "Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26(4), 235-240.
- Alves, R. F., Nascimento, A. M. D, Nogueira, J.M.F. (2005). "Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques." *Analytica Chimica Acta* 546(1), 11-21.
- Anocibar-Beloqui, A. (1995). "Study on sulfur compounds in wine: preliminary results." *Italian Journal of Food Science* 3, 279-289.
- Anocibar Beloqui, A., Y. Kotseridis, Bertrand,A. (1996). "Détermination de la teneur en sulfure de diméthyle dans quelques vins rouges." *Journal international des sciences de la vigne et du vin* 30, 167-170.
- Antalick, G., M. C. Perello, de Revel, G. (2010). "Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry." *Food Chemistry* 121(4), 1236-1245.
- Aronson, J. et Ebeler , S.E. (2004). "Effect of Polyphenol Compounds on the Headspace Volatility of Flavors." *Am. J. Enol. Vitic.* 55(1), 13-21.
- Avedovech, R.M., Mcdaniel, M.R, Watson, B.T., Sandine, W.E. (1992). "An Evaluation of Combinations of Wine Yeast and *Leuconostoc oenos* Strains in Malolactic Fermentation of Chardonnay Wine." *Am. J. Enol. Vitic.* 43(3), 253-260.
- Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J., Ferreira, V. (2003). "Prediction of Aged Red Wine Aroma Properties from Aroma Chemical Composition. Partial Least Squares Regression Models." *J. Agric. Food Chem.* 51(9), 2700-2707.

Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J., Ferreira, V. (2001). "Identification and Quantification of Impact Odorants of Aged Red Wines from Rioja. GC-Olfactometry, Quantitative GC-MS, and Odor Evaluation of HPLC Fractions." *J. Agric. Food Chem.* 49(6), 2924-2929.

B

Barbagallo, R.N, Spagna, G., Palmeri, R., Torriani, S. (2004). "Assessment of β -glycosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation." *Enz. Microb. Technol.* 34, 292-296.

Bartowsky, E. J. et Henschke, P.A. (2004). "The [']buttery' attribute of wine--diacetyl--desirability, spoilage and beyond." *International Journal of Food Microbiology* 96(3), 235-252.

Bely, M, Sablayrolles, J.M, Barre, P. (1990a). "Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance." *Am J Enol Vitic* 41, 319–324.

Bely, M., Sabblayroles, J.M., Barre, P. (1990b). "Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions." *J Ferment Bioeng* 70, 246–252

Benkova, B., Lozanov, V., Ivanov, I.P., Kalenderova, S., Stoev, G., Yordanova, N., Milchova, M., Mitev, V. (2009). "Quantitation of the homocysteine content in wine." *European Food Research and Technology* 230 (2), 361-365.

Berger, C., Khan, J.A., Molimard, P., Martin, N., Spinnler, H.E. (1999). "Production of Sulfur Flavors by Ten Strains of *Geotrichum candidum*." *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12), 5510-5514.

Bertrand, A. (1983). "Volatiles from grape must fermentation. Flavour of distilled beverages. Origin and development." E. Horwood. Chichester, Pigott, J.R, 93-109.

Bertrand, A., C. Zmirou-Bonnamour, et Lonvaud-Funel, A. (1984). "Aroma compounds formed in malolactic fermentation Flavour research of alcoholic beverages." *Alko Symposium, Helsinki.*

Bertrand A. (1981). "Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique; incidence sur la qualité du vin." *Colloque de la Société Française de Microbiologie, Reims*, 251-267.

Blanchard, L. (2000). "Recherche sur la contribution de certains thiols volatils à l'arôme des vins rouges. Etude de leur genèse et de leur stabilité." *Université Bordeaux 2.thèse*

Bloem, A. (2005). "Activité glycosidases chez *Oenococcus oeni*: importance dans la libération de la vanilline à partir du bois de chêne." *Université Bordeaux 2. thèse*

Bloem, A., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G. (2008). "Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*." *Food Microbiology* 25(1), 99-104.

Bloem, A., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A., de Revel, G. (2006). "Ability of *oenococcus oeni* to influence vanillin levels." *Developments in Food Science*, 43, 137-140.

- Boido, E., F. Carrau, et al. (1999). Modificaciones producidas por la fertacion malolactica en la composicion aromatica de las fracciones libre y ligada para la variedad Tannat. VII Congreso Latino-americano de Viticultura y Enologia, Mendoza, Argentina.
- Boido, E., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E. (2002). "Effect of B-Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni* on the Glycosylated Flavor Precursors of Tannat Wine during Malolactic Fermentation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(8), 2344-2349.
- Boido, E., Medina, K., Farina, L., Carrau, F., Versini, G., Dellacassa, E. (2009). "The Effect of Bacterial Strain and Aging on the Secondary Volatile Metabolites Produced during Malolactic Fermentation of Tannat Red Wine." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (14), 6271-6278.
- Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M., Spinnler, H.E. (2001). "L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms." *Journal of Dairy Research* 68 (04), 663-674.
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruège, V., Duburdieu, D. (1998). "Identification of Volatile and Powerful Odorous Thiols in Bordeaux Red Wine Varieties." *J. Agric. Food Chem.* 46 (8), 3095-3099.
- Buttery, R. G., Ling, L.C., Stern, D.J. (1997). "Studies on Popcorn Aroma and Flavor Volatiles." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(3), 837-843.

C

- Cavin, J. F. (1988). Etude de la flore lactique des vins et de fermentation malolactique. Dijon, France, Université de Bourgogne. thèse.
- Cavin, J. F., Andioc, V., Etievant, P.X., Divies, C. (1993). "Ability of Wine Lactic Acid Bacteria to Metabolize Phenol Carboxylic Acids." *Am. J. Enol. Vitic.* 44 (1), 76-80.
- Charpentier, C., Feuillat, M. (1993). Yeast autolysis. *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet. Chur, Switzerland, Hardwood Publishers.
- Chatonnet, P., D. Dubourdie, Boidron, J.N., Pons, M. (1992). "The origin of ethylphenols in wines." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60 (2), 165-178.
- Collins, Y.F, Mc Sweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003). "Lipolyses and free fatty acid catabolism in cheese : a review of current knowledge". *International Dairy Journal* 13 (11), 841-866.
- Cullere, L., A. Escudero, Cacho, J., Ferreira, V. (2004). "Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines." *J. Agric. Food Chem.* 52 (6), 1653-1660.

D

- Davis, C. R., Wibowo, D., Eshenbruch, R., Lee, T.H., Fleet, G.H. (1985). "Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review." *Am. J. Enol. Vitic.* 36 (4), 290-301.
- de Mora, S. J., Eschenbruch, R., Knowles, S.J., Spedding, D.J. (1986). "The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast." *Food Microbiology* 3 (1), 27-32.
- de Mora, S. J., Knowles, S.J., Eschenbruch, R., Torrey, W.J. (1987). "Dimethyl sulphide in some Australian red wines." *Vitis* 26, 79-84.
- de Revel, G. (1988). Synthèse, réduction et dégradation du diacétyl, Université Bordeaux 2. DEA oenologie-Ampélogie.
- de Revel, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. (1989). Synthèse des substances acétoïniques par *Leuconostoc oenos*. *Connaissance Vigne et Vin* 23, 39-45.
- de Revel, G. (1992). "Le diacétyl, les composés dicarbonylés et leurs produits de réactions dans les vins." Thèse de doctorat n° 190, Université Victor Segalen Bordeaux 2: Bordeaux, France.
- de Revel, G. (2002). "Fermentation malolactique." *Vigne et Vin Publications internationales*, 7-16.
- de Revel, G., Bertrand, A. (1993). "A method for the detection of carbonyl compounds in wine: Glyoxal and methylglyoxal." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61(2), 267-272.
- de Revel, G., Bertrand, A. (1994). Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes. *Trends in Flavour Research*, Amsterdam, Elsevier Science.
- de Revel, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. (1989). "Synthèse des substances acétoïniques par *Leuconostoc oenos*." *Connaissance Vigne et Vin* 23 (1), 39-45.
- de Revel, G., Bloem, A., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A. (2005). "Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds." *Food Microbiology* 22 (6), 569-575.
- de Revel, G. (2005). "Les composés aromatiques produits par les bactéries lactiques: impact sur l'arôme des vins". Journées techniques du CIVB. 29 Mars, Saint-Germain-de-la rivière, France.
- de Revel, G., Martin, M., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A. (1999). "Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (10), 4003-4008.
- de Revel, G., Pripis-Nicolau, L., Barbe, J.C, Bertrand, A. (2000). "The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives" *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (1), 102-108.
- Denayrolles, M., Aigle, M., Lonvaud-Funel, A. (1994). "Cloning and sequence analysis of the gene encoding *Lactococcus lactis* malolactic enzyme: Relationships with malic enzymes." *FEMS Microbiology Letters* 116 (1), 79-86.
- Diaz-Maroto, M. C., Schneider, R., Baumes, R. (2005). "Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (9), 3503-3509.

- Dick, K. J., Molan, P.C., Eshenbruch, R. (1992). "The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria." *Vitis* 31, 105-116.
- D'Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spettoli, P., Henschke, P. (2004). "Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Chem.* 21, 257-265.
- Du Plessis, H., Steger., C., L., du Toit, M., Lambrechts, M. (2002). "The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality." *J. Appl. Microbiol.* 92, 1005-1013.
- Dubois, P. (1993). "Les arômes des vins et leurs défauts." *Revue française d'oenologie* 144, 63-76.
- Dufour, C., Bayonove, C.L. (1999a). "Influence of Wine Structurally Different Polysaccharides on the Volatility of Aroma Substances in a Model System." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2), 671-677.
- Dufour, C., Bayonove, C.L. (1999b). "Interactions between Wine Polyphenols and Aroma Substances. An Insight at the Molecular Level." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2), 678-684.
- Dufour, C., Sauvaitre, I (2000). "Interactions between Anthocyanins and Aroma Substances in a Model System. Effect on the Flavor of Grape-Derived Beverages." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (5), 1784-1788.

E

- Edwards, C. G., Reynolds, A.G., Rodriguez, A.V., Semon, M.J., Mills, M.J. (1999). "Implication of Acetic Acid in the Induction of Slow/Stuck Grape Juice Fermentations and Inhibition of Yeast by *Lactobacillus* sp." *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (2), 204-210.
- Eschenbruch, R., Peterson, C.A., Fisher, B.M. (1984). Towards controlling the malolactic fermentation? 7th Int. Oenol. Symp.
- Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., Ferreira, V. (2007). "Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines." *J. Agric. Food Chem.* 55 (11), 4501-4510.
- Etievant, P. X. (1991). *Wine. Volatile Compounds in Foods and Beverage.* H. Maarse. New York, Dekker, 483-586.
- Etievant, P. X., Bayonove, C.L. (1983). "Aroma components of pomaces and wine from the variety muscat de frontignan." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34(4), 393-403.

F

- Falcao, L.D., de Revel, G., Perello, M.C., Riquier, L., Rosier, J.P., Uberti, A., Bordignon-Luiz, M.T. (2008). "Volatile profile characterization of young cabernet-sauvignon wines from a new grape growing reggion brazil." *Journal international des sciences de la vigne et du vin* 42 (3), 133-145.
- Fedrizzi, B., Versini, G., Lavagnini, I., Nicolini, G., Magno, F. (2008). "Hyphenated gas chromatography-mass spectrometry analysis of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: Comparison with results of other sampling procedures via a robust regression." *Analytica Chimica Acta* 621 (1), 38-43.
- Fedrizzi, B., Versini, G., Lavagnini, I., Badocco, D., Nicolini, G., Magno, F. (2007). "Gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: A comparison of headspace solid phase microextraction and solid phase extraction methods." *Analytica Chimica Acta* 596 (2), 291-297.
- Ferreira, V., Lopez, R., Cacho, J. (2000). "Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (11), 1659-1667.
- Ferreira, V., Aznar, M., Lopez, M., Cacho, J.. (2001). "Quantitative Gas Chromatography-Olfactometry Carried out at Different Dilutions of an Extract. Key Differences in the Odor Profiles of Four High-Quality Spanish Aged Red Wines." *J. Agric. Food Chem.* 49 (10), 4818-4824.
- Ferreira, V., Jarauta, I., Lopez, R., Cacho, J. (2003). "Quantitative determination of sotolon, maltol and free furaneol in wine by solid-phase extraction and gas chromatography-ion-trap mass spectrometry." *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 1010 (1), 95-103.
- Ferreira, V., Jarauta, I., Ortega, L., Cacho, J. (2004). "Simple strategy for the optimization of solid-phase extraction procedures through the use of solid-liquid distribution coefficients: Application to the determination of aliphatic lactones in wine." *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 1025 (2), 147-156.
- Ferreira, V., López, R., Escudero, A., Cacho, J. (1998). "Quantitative determination of trace and ultratrace flavour active compounds in red wines through gas chromatographic-ion trap mass spectrometric analysis of microextracts." *Journal of Chromatography A* 806 (2), 349-354.
- Ferreira, V., Ortin, N., Escudero, A., Lopez, R., Cacho, J. (2002). "Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Roset#233; Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies." *J. Agric. Food Chem.* 50(14), 4048-4054.
- Ferreira, V., A. Rapp, Cacho, J., Hastrich, H., Yavas, I (1993). "Fast and quantitative determination of wine flavor compounds using microextraction with Freon 113." *J. Agric. Food Chem.* 41 (9), 1413-1420.
- Feuillat, M., P. Bidan, Rosier, Y. (1977). "Croissance des bactérieies lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin." *Annales de Technologie Agricole* 19, 141-154.

- Fornachon, J. C. M. (1968). "Influence of different yeasts on the growth of lactic acid bacteria in wine." *Journal of the science of food* 19, 374-378.
- Fornachon, J. C. M., Lloyd, B. (1965). "Bacterial production of diacetyl and actoin in wine." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 16 (12), 710-716.
- Franc, C., David, F., de Revel, G. (2009). "Multi-residue off-flavour profiling in wine using stir bar sorptive extraction thermal desorption-gas chromatography-mass-spectrometry". *J. Chrom. A.* 1216 (15), 3318-3327.

G

- Gagné, S., Lucas, P., Perello, M.C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G. "Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates." *Journal of Applied Microbiology*, 2010.
- Gambaro, A., Boido, E.; Zlotejablko, A.; Medina, K.; Lloret, A.; Dellacassa, E.; Carrau, F. (2001). "Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wines." *Aust. J. Grape. Wine. Res.* 7, 27-32.
- Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C. (2007). "Effect of SO₂ on the formation and evolution of volatile compounds in wines." *Food Control* 18 (12), 1501-1506.
- Gindreau, E., Joyeux, A., de Revel, G., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. (1997). "Evaluation de l'établissement des levains malolactiques au sein de la microflore bactérienne indigène." *Journal international des sciences de la vigne et du vin* 31 (4), 197-202.
- Gobbetti, M., Fox, P.F., Stepaniak, L. (1997). "Isolation and Characterization of a Tributyrin Esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739." *Journal of dairy science* 80 (12), 3099-3106.
- Grimaldi, A., Mc Lean, H., Jiranek, V. (2000). "Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51 (4), 362-369.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V. (2005). "A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*." *Int. J. Food Microbiol.*
- Guilloux-Benatier, M., Feuillat, M. (1991). "Utilisation d'adjuvants d'origine levurienne pour améliorer l'ensemencement des vins en bactéries sélectionnées." *Revue française d'oenologie* 132, 51-55.
- Guilloux-Benatier, M., M. Feuillat, Gerbaux, V.. (1985). "Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries isolées du vin: effet stimulant des autolysats de levures." *Vitis* 24, 59-74.
- Guilloux-Benatier, M., Guerreau, J., Feuillat, M. (1995). "Influence of Initial Colloid Content on Yeast Macromolecule Production and on the Metabolism of Wine Microorganisms." *Am. J. Enol. Vitic.* 46(4), 486-492.

- Guilloux-Benatier, M., Son, H.S., Bouhier, S., Feuillat, M. (1993). "Activités enzymatiques: glycosidases et peptidases chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures." *Vitis* 32, 51-57.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C. et al. (1985). "The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components." *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 331, 83-90.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C., Baumes, R., Cordonnier, R. (1986). "Stability of Free and Bound Fractions of Some Aroma Components of Grapes cv. Muscat During the Wine Processing: Preliminary Results." *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (2), 112-114.
- Guth, H. (1997a). "Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(8), 3022-3026.
- Guth, H. (1997b). "Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(8), 3027-3032.
- Guth, H. (1999). Comparison of different white wine varieties in odor profiles by instrumental analysis and sensory studies, Waterhouse, A. L., Ebeler, S. E.,. *The Chemistry of Wine FlaVor*. A. S. S. A. C. Society:. Washington, DC39-54.
- Guth, H., Sies, A. (2002). Winetitles. *Eleventh Australian Wine Industry Technical Conference*.

H

- Henick-Kling, T., Acree, T.E., Krieger S., Laurent, A., Edinger W.D. (1994). Modification of wine flavor by malolactic fermentation. *Wine east.* 4, 8-15 et 29-30.
- Hernandez-Orte, P., M. Cersosimo, Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V. (2009). "Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria." *Food Research International* In Press, Corrected Proof.
- Holland, R., Liu, S.Q., Crow, V.L., Delabre, M.L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. (2005). "Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification." *International Dairy Journal* 15 (6-9), 711-718.

I

- Inoue, Y., Trevanichi, S., Fukuda, K., Izawa, S., Wakai, Y., Kimura, A. (1997). "Roles of Esterase and Alcohol Acetyltransferase on Production of Isoamyl Acetate in *Hansenula mrakii*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3), 644-649.
- Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E., Gomez-Alonso, S., Palop Herreros, M.L.L. (2008). "Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation." *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (8), 724-730.

J

- Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I.L., Waters, E.J. (2008). "The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine." *Food Quality and Preference* 19 (6), 596-607.
- Jussier, D., Dube Morneau, A., Mira de Orduna, R. (2006). "Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay." *Applied and environmental microbiology* 72, 221-227.

K

- Keim, H., de Revel, G., Bertrand, A. (2002). Instrumental and sensory evaluation of malolactic fermentation wine. 10th Weurman, Beaune, France.
- Knapp, D. R. (1979). *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. New York.
- Kolor, M. G. (1983). "Identification of an important new flavor compound in Concord grape: ethyl-3-mercaptopropionate." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31(5), 1125-1127.
- Kotseridis, Y. (1999). "Etude de l'arôme des vins de Merlot et Cabernet-Sauvignon de la région bordelaise." Thèse de doctorat n° 652, Université Victor Segalen Bordeaux 2: Bordeaux, France.
- Kotseridis, Y., Baumes, R. (2000). "Identification of Impact Odorants in Bordeaux Red Grape Juice, in the Commercial Yeast Used for Its Fermentation, and in the Produced Wine." *J. Agric. Food Chem.* 48 (2), 400-406.
- Kotseridis, Y., Baumes, R., Skouroumounis, G. (1998). "Synthesis of labelled [2H4][beta]-damascenone, [2H2]2-methoxy-3- isobutylpyrazine, [2H3][alpha]-ionone, and [2H3][beta]-ionone, for quantification in grapes, juices and wines." *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 824(1), 71-78.
- Krieger, S., Arnink, K. (2003). Malolactic fermentation- A review of recent research on timing of inoculation and possible yeast-bacteria combinations. 32th annual New York wine industry workshop. New York.
- Kunkee, R. E. (1974). Malo-lactic fermentation in winemaking. *Chemistry of winemaking*. A. D. Webb, 151-170.

L

- Lafon-Lafourcade, S., Carre, S., Ribéreau-Gayon, P. (1983). "Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification." *Applied and environmental microbiology* 46, 874-880.
- Lambropoulos, I., Roussis, I.G. (2007). "Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid." *Food Research International* 40 (1), 176-181.

- Laurent, A., Hening-Kling, T., Acree, T.E (1994). "Changes in the aroma and odour of chardonnay wine due to malolactic fermentation." *Viticulture and enology sciences* 49, 3-10.
- Liu, S.-Q, Pilone, G.J. (2000). "An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications." *International Journal of Food Science et Technology* 35 (1), 49-61.
- Liu, S. Q. (2002). "Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification." *Journal of Applied Microbiology* 92 (4), 589-601.
- Liu, S. Q., Holland, R., Crow, V.L. et al. (2004). "Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review." *International Dairy Journal* 14(11), 923-945.
- Llaubères, R.-M., Dubourdieu, D., Villetaz, J.C. (1987). "Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in Wine." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 41 (3), 277-286.
- Lloret A., Boido, E., Lorenzo, D., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E., Versini, G. (2002). "Aroma variation in tannat wines: effect of malolactic fermentation on ethyl lactate level and its enantiomeric distribution." *Italian Journal of Food Science* 14 (2), 175-180.
- Lonvaud-Funel, A. (1991). *Evolution des populations bactériennes. Les acquisitions récentes en microbiologie du vin.* L. T. e. DOC. Paris.
- Lonvaud-Funel, A. (1998). "Les applications de la biologie moléculaire à la connaissance des bactéries lactiques du vin. Intérêts oenologiques." *Bulletin de l'OIV*, 807-808, 398-405.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). "Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine." *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 317-331.
- Lonvaud-Funel, A., Strasser de Saad, A.M. (1982). "Purification and Properties of a Malolactic Enzyme from a Strain of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Grapes." *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (2), 357-361.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. (1994). "Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*." *Journal of Applied Microbiology* 77 (4), 401-407.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. et al. (1988a). "Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 44, 183-191.
- Lonvaud-Funel, A., Masclef, J.P., Joyeux, A., Paraskevopoulos, Y. (1988b). "Etude des interactions entre levures et bactéries lactiques dans le moût de raisin." *Connaissance de la Vigne et du Vin* 22, 11-24.
- Lonvaud-Funel, A., Zmirou, A., Larue, F. (1984). "Le métabolisme de l'acide citrique par les bactéries lactiques de la fermentation malolactique des vins." *Science des aliments* 4, 81-85.
- López, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V. (2002). "Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection." *Journal of Chromatography A* 966 (1-2), 167-177.

- López, R., Ferreira, V., Hernandez, P., Cacho, J. (1999). "Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (11), 1461-1467.
- López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J., Ferreira, V. (2004). "Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry." *Food chemistry* 88(1), 95-103.
- Loscos, N., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V. (2007). "Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (16), 6674-6684.
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V. (2010). "Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing." *Food Chemistry* 120 (1), 205-216.
- Loscos, N., Ségurel, M., Dagan, L., Sommerer, N., Marlin, T., Baumes, R. (2008). "Identification of S-methylmethionine in Petit Manseng grapes as dimethyl sulphide precursor in wine." *Analytica Chimica Acta* 621 (1), 24-29.

M

- Mansfield, A.K., Zoecklein, B.W., Whiton, R.S. (2002). "Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oen.* *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 303-307.
- Marchand, S., de Revel, G. (2010). "A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine." *Analytica Chimica Acta* 660(1-2), 158-163.
- Marchand, S., de Revel, G., Bertrand, A. (2000). "Approaches to Wine Aroma: Release of Aroma Compounds from Reactions between Cysteine and Carbonyl Compounds in Wine." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(10), 4890-4895.
- Marchand, S., de Revel, G., Vercauteren, J. (2002). "Possible Mechanism for Involvement of Cysteine in Aroma Production in Wine." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21), 6160-6164.
- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Pons, M., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2006. Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. *FEMS Yeast Research* 6, 268-279.
- Martin, N., Berger, C., Le Du, C., Spinnler, H.E. et al. (2001). "Aroma Compound Production in Cheese Curd by Coculturing with Selected Yeast and Bacteria." *Journal of dairy science* 84 (10), 2125-2135.
- Martineau, B., Acree, T.E., Henick-Kling, T. (1995). "Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl." *Food Research International* 28 (2), 139-143.

- Mason, A. B., Dufour, J.P. (2000). "Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast." *Yeast* 16 (14), 1287-1298.
- Massera, M., Soria, A., Catiana, C., Krieger, S., Combina, M. (2009). "Simultaneous inoculation of Malbec (*Vitis vinifera*) musts with yeast and bacteria: Effects on fermentation performance, sensory and sanitary attributes of wines." *Food Technology and Biotechnology* 47(2), 192-201.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., Ferreira, V. (2007). "Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography-negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives." *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 1146(2), 242-250.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., Ferreira, V. (2008). "Improved solid-phase extraction procedure for the isolation and in-sorbent pentafluorobenzyl alkylation of polyfunctional mercaptans: Optimized procedure and analytical applications." *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 1185(1), 9-18.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., Ferreira, V.. "Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptohexyl acetate at ng L-1 level by headspace solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometric determination." *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 1121(1), 1-9.
- Matthews, A., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2007). "Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(2), 329-337.
- Matthews, A., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2006). "A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12 (3), 235-244.
- Matthews, A., A. Grimaldi, Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2004). "Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification." *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (10), 5715-5731.
- Mc Daniel, M., Henderson, L. A., Watson, B.T, Heatherbell, D. (1987). "Sensory panel training and screening for descriptive analysis of the aroma of pinot noir wine fermented by several strains of malolactic bacteria." *Journal of sensory studies* 2, 149-167.
- Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., Makarova, K. (2005). "Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking." *FEMS Microbiology Reviews* 29 (3), 465-475.
- Moio, L., Etievant, P.X. (1995). "Ethyl Anthranilate, Ethyl Cinnamate, 2,3-Dihydrocinnamate, and Methyl Anthranilate: Four Important Odorants Identified in Pinot noir Wines of Burgundy." *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (3), 392-398.
- Moreno, J. A., Zea, L., Moyano, L., Medina, M.. (2005). "Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing." *Food Control* 16 (4), 333-338.
- Müller-Thurgau, H. (1891). *Über die ergebnisse, neuer untersughungen auf den gebite der meinbersitung. XII. Dtsch. Weinbaukong.*
- Murat, M. L. (2001). *Recherches sur la vinification des vins Rosés et Clairets de Bordeaux*, Université Bordeaux 2.

N

- Naouri, P., Chagnaud, A., Arnaud, A., Galzy, P. (1990). "Purification and properties of a malolactic enzyme from *Leuconostoc oenos* ATCC 23278." *Journal of Basic Microbiology* 30 (8), 577-585.
- Nelson, R. R., Acree, T.E., Lee, C.Y., Butts, R.M. (1977). "Methyl anthranilate as an aroma constituent of american wine." *Journal of Food Science* 42 (1), 57-59.
- Nielsen, J. C., Prahl, C., Lonvaud-Funel, A. (1996). "Malolactic Fermentation in Wine by Direct Inoculation with Freeze-Dried *Leuconostoc oenos* Cultures." *Am. J. Enol. Vitic.* 47 (1), 42-48.
- Nielsen, J. C., Richelieu, M. (1999). "Control of Flavor Development in Wine during and after Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni*." *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2), 740-745.
- Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre, P.L., Darriet, P. "Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide." *Analytica Chimica Acta* 660 (1-2), 102-109.
- Nykanen, L. (1986). "Formation and Occurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages." *Am. J. Enol. Vitic.* 37(1), 84-96.

O

- Ortega, C., López, R., Cacho, J., Ferreira, V. (2001). "Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts." *Journal of Chromatography A* 923(1-2), 205-214.
- Osborne, J. P., Mira de Orduña, R., Pilone, G.J., Liu, S.Q. (2000). "Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria." *FEMS Microbiology Letters* 191 (1), 51-55.

P

- Papadopoulou, D., Roussis, I.G. (2008). "Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine." *International Journal of Food Science et Technology* 43 (6), 1053-1057.
- Peynaud, E. (1980). *Les arômes secondaires ou arômes de fermentation. Le goût du vin.* Dunod. Paris.
- Peyrot des Gachons, C., T. Tominaga, Dubourdieu, D. (2002). "Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form; Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (14), 4076-4079.

- Pilone, G. J., Kunkee, R.E., Webb, A.D. (1966). "Chemical characterization of wine fermented with various malolactic bacteria." *Applied microbiology* 14(4), 608-615.
- Pineau, B. (2007). "Contribution à l'étude de l'arôme fruité spécifique des vins rouges de vitis vinifera L. cv. merlot noir et cabernet-sauvignon." Thèse de doctorat n° 1484, Université Victor Segalen Bordeaux 2: Bordeaux, France.
- Pineau, B., Barbe, J.C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. (2009). "Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific "Red-and-Black-berry" Aromas in Red Wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (9), 3702-3708.
- P Pineau, B., Barbe, J.C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. (2007). "Which Impact for Beta-Damascenone on Red Wines Aroma?" *J. Agric. Food Chem.* 55(10), 4103-4108.
- Piombino, P., Nicklaus, S., Le Fur, Y., Moio, L., Le Quéré, J.L. (2003). "Berry" aroma of wine: sensory and olfactory analysis. 10th Weurman Flavour Research Symposium, Paris, France.
- Postel, W., Meier, B. (1983). "Verhalten von 2-Acetolactat, 2-Acetohydroxybutyrate, Diacetyl, 2-3-Pentandion und Acetoin während der Traubenmostgärung." *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 176, 113-115.
- Pozo-Bayon, M. A., Alegria, E.G., Polo, M.C., Tenorio, C., Martin-Alvarez, P.J., Calvo de la Banda, M.T., Ruiz-Larrea, F., Moreno-Arribas, M.V. (2005). "Wine Volatile and Amino Acid Composition after Malolactic Fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* Starter Cultures." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (22), 8729-8735.
- Pripis-Nicolau, L. (2002). Composés soufrés volatils du vin et métabolismes des bactéries lactiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2, thèse.
- Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. (2004). "Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*." *Journal of Applied Microbiology* 96 (5), 1176-1184.
- Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A., Maujean, A. (2000). "Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (9), 3761-3766.
- Pueyo, E., Martinez-Rodriguez, A., Polo, M.C., Santa-Maria, G., Bartolomé, B. (1999). "Release of Lipids during Yeast Autolysis in a Model Wine System." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (1), 116-122.

R

- Rankine, B. C. (1972). "Influence of Yeast Strain and Malo-Lactic Fermentation on Composition and Quality of Table Wines." *Am. J. Enol. Vitic.* 23 (4), 152-158.
- Rankine, B. C., Fornachon, J.C.M., Bridson, D.A. (1969). "Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality." *Vitis* 8, 129-134.
- Rasmussen, J. E., Schultz, E., Snyder, R.E, Jones, R.S., C.R., Smith (1995). "Acetic Acid as a Causative Agent in Producing Stuck Fermentations." *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (2), 278-280.

- Renault, P.E. (2010). "Caractérisation phénotypique de l'espèce *Torulaspora delbruckeii* en condition œnologique. Application à la co-inoculation avec l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse
- Ribéreau-Gayon, J, Peynaud, E. (1961). Traité d'oenologie II. L. p. Béranger. Allemagne, 497.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y. Maujean, A., Dubourdieu, D. (2000). Handbook of Enology. The chemistry of wine: Stabilisation and Treatments Chichester, Wiley. 2.
- Rocha, S., Ramalheira, V., Barros, A., Delgadillo, I., Coimbra, M.A. (2001). "Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model." J. Agric. Food Chem. 49 (11), 5142-5151.
- Rocha, S. M., Coutinho, P., Barros, A., Delgadillo, I., Coimbra, M.A. (2006). "Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature." Journal of Chromatography A 1114 (2), 188-197.
- Rodrigues, F., M. Caldeira, et al. (2008). "Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC-qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages." Analytica Chimica Acta 609(1), 82-104.
- Rodríguez-Bencomo, J.J., Conde, J.E., Garcia-Montelongo, F., Pérez-Trujillo, J.P. (2002). "Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography." Journal of chromatography A 963(1-2), 213-223.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Schneider, R., Lepoutre, J.P., Rigou, P. (2009). "Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization." ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies 1216 (30), 5640-5646.
- Romano, A., Perello, M.C., Lonvaud-Funel, A., Sicard, G., de Revel, G. (2009). "Sensory and analytical re-evaluation of "Brett character". Food Chemistry 114 (1), 15-19.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., Papadopoulou, D. (2005). "Inhibition of the decline of volatile esters and terpenols during oxidative storage of Muscat-white and Xinomavro-red wine by caffeic acid and N-acetyl-cysteine." Food Chemistry 93 (3), 485-492.

S

- Sabon, I., G. de Revel, Kotseridis, Y, Bertrand, A. (2002). "Determination of Volatile Compounds in Grenache Wines in Relation with Different Terroirs in the Rhone Valley." Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (22), 6341-6345.
- Saenz-Navajas, M.P., Campo, E., Culleré, L., Fernandez-Zurbano, P., Valentin, D., Ferreira, V. (2010). "Effects of the Nonvolatile Matrix on the Aroma Perception of Wine." Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 (9), 5574-5585.
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Vestrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. (2008). "Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation." Appl. Environ. Microbiol. 74 (2), 454-461.

- Saerens, S. M. G., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Voet, A.R.D., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, M. (2006). "The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel Enzymes with Medium-chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity." *Journal of Biological Chemistry* 281 (7), 4446-4456.
- Sarrazin, E., Dubourdieu, D., Darriet, P. (2007). "Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization." *Food Chemistry* 103 (2), 536-545.
- Sauvageot, F., Vivier, P (1997). "Effects of Malolactic Fermentation on Sensory Properties of Four Burgundy Wines." *Am. J. Enol. Vitic.* 48(2), 187-192.
- Schneider, R., Charrier, A., Razungles, A., Baumes, R. (2006). "Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines." *Analytica Chimica Acta* 563 (1-2), 58-64.
- Schneider, R., Razungles, A., Augier, C., Baumes, R. (2001). "Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines." *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 936 (1-2), 145-157.
- Schneider, R., Kotseridis, Y., Ray, J.L., Augier, C., Baumes, R. (2003). "Quantitative Determination of Sulfur-Containing Wine Odorants at Sub Parts per Billion Levels. 2. Development and Application of a Stable Isotope Dilution Assay." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (11), 3243-3248.
- Segurel, M. A., Baumes, R., Langlois, D., Riou, C., Razungles, A. (2009). "Role of glycosidic aroma precursors on the odorant profiles of Grenache noir and Syrah wines from the Rhone valley. Part 2: characterisation of derived compounds." *Journal international des sciences de la vigne et du vin* 43 (4), 213.
- Segurel, M. A., A. J. Razungles, et al. (2004). "Contribution of Dimethyl Sulfide to the Aroma of Syrah and Grenache Noir Wines and Estimation of Its Potential in Grapes of These Varieties." *J. Agric. Food Chem.* 52(23), 7084-7093.
- Segurel, M. A., A. Razungles, Riou, C., Salles, M., Baumes, R. (2005). "Ability of Possible DMS Precursors To Release DMS during Wine Aging and in the Conditions of Heat-Alkaline Treatment." *J. Agric. Food Chem.* 53(7), 2637-2645.
- Maicas, S., Gil, J.V., Pardo, I., Ferrer, S. (1999). "Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria." *Food Research International* 32 (7), 491-496.
- Shimazu, Y., Uehara, M., Watnabe, M. (1985). "Transformation of Citric Acid to Acetic Acid, Acetoin and Diacetyl by Wine Making Lactic Acid Bacteria." *Agricultural and biological chemistry* 49 (7), 2147-2157.
- Siebert, T. E., Smyth, H.E., Capone, D.L., Neuwöhner, C., Pardon, K.H., Skouroumounis, G.K., Herderich, M.J., Sefton, M.A., Pollnitz, A.P. (2005). "Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS." *Analytical and Bioanalytical chemistry* 381, 937-947.
- Sourabié, A. M., Spinnler, H.E., Bonnarne, P., Saint-Eve, A., Landaud, S. (2008). "Identification of a Powerful Aroma Compound in Munster and Camembert Cheeses: Ethyl 3-Mercaptopropionate." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (12), 4674-4680.

- Spano, G., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L., Beneduce, L., Massa, S. (2005). "A β -glycosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* regulated by abiotic stresses. J. Appl. Microbiol. 98, 855-861.
- Spedding, D., J., Raut, P. (1982). "The influence of dimethyl sulphide and carbon disulphide in the bouquet of wines." Vitis 21, 240-246.
- Spettoli, P., Nuti, M.P., Zamorani, A. (1984). "Properties of Malolactic Activity Purified from *Leuconostoc oenos* ML34 by Affinity Chromatography." Appl. Environ. Microbiol. 48 (4), 900-901.
- Strauss, C.R., Wilson, B., Anderson, R., Williams, P.J. (1987). "Development of precursors of C13 norisoprénoid flavorants in Riesling grapes. American journal of Enology and Viticulture 38, 23-27.
- Sumby, K. M., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2010). "Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects." Food Chemistry 121 (1), 1-16.

T

- Teranishi, R., Corse, J.W., McFadden, W.H., Black, D. (1963). "Volatiles from Strawberries. I. Mass Spectral Identification of the More Volatile Components." Journal of Food Science 28(4), 478-483.
- Tesnières, C., NICOL, M.Z., Romien, C., Flanzky, C. (1991). "Effect of increasing exogenous ethanol on the anaerobic metabolism of grape berries." Science des Aliments 11, 111-124.
- Thibon, C., Shinkaruk, S., Tominaga, T., Bennetau, B., Dubourdieu, D. (2008). "Analysis of the diastereoisomers of the cysteinylated aroma precursor of 3-sulfanyhexanol in *Vitis vinifera* grape must by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry." ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies 1183 (1-2), 150-157.
- Tominaga, T., Guimbertau, G., Dubourdieu, D. (2003). "Role of Certain Volatile Thiols in the Bouquet of Aged Champagne Wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (4), 1016-1020.
- Tominaga, T., Murat, M.L., Dubourdieu, D. (1998a). "Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc." J. Agric. Food Chem. 46 (3), 1044-1048.
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., Dubourdieu, D. (1998). "Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines." Flavour and Fragrance Journal 13 (3), 159-162.
- Tominaga, T., Niclass, Y., Frérot, E., Dubourdieu, D. (2006). "Stereoisomeric Distribution of 3-Mercaptohexan-1-ol and 3-Mercaptohexyl Acetate in Dry and Sweet White Wines Made from *Vitis vinifera* (Var. Sauvignon Blanc and Semillon)." J. Agric. Food Chem. 54 (19), 7251-7255.

Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D. (1998b). "A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates." *J. Agric. Food Chem.* 46 (12), 5215-5219.

U

Ugliano, M., Genovese, A., Moio, L. (2003). "Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*." *J. Agric. Food Chem.* 51(17), 5073-5078.

Ugliano, M., Moio, L. (2005). "Changes in the Concentration of Yeast-Derived Volatile Compounds of Red Wine during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*." *J. Agric. Food Chem.* 53 (26), 10134-10139.

Ugliano, M., Moio, L. (2008). "Free and hydrolytically released volatile compounds of *Vitis vinifera* L. cv. Fiano grapes as odour-active constituents of Fiano wine." *Analytica Chimica Acta* 621 (1), 79-85.

V

Vallet, A. (2007). Etude de la synthèse des composés soufrés volatils issus du catabolisme de la méthionine par *Oenococcus oeni*, Université Bordeaux 2.

Vallet, A., Lucas, P., Lonvaud-Funel, de Revel, G. (2008). "Pathways that produce volatile sulphur compounds from methionine in *Oenococcus oeni*." *Journal of Applied Microbiology* 104 (6), 1833-1840.

Versini, G., Dalla Serra, A., Pelligrini R. (1984). "Aspects of wine aroma attributable to carbonic maceration." *Food Science and Technology Abstracts* 20 (10), 871-878.

Vianna, E., Ebeler, S.E. (2001). "Monitoring Ester Formation in Grape Juice Fermentations Using Solid Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *J. Agric. Food Chem.* 49 (2), 589-595.

Vivas, N., Bellemere, L., Lonvaud-Funel, A., Glories, Y., Augustin, M. (1995). "Etudes de la fermentation malolactique des vins rouges en barriques et en cuves." *Revue française d'oenologie* 149, 37-42.

W

Wanikawa, A., Hosoi, K., Kato, T. (2000). "Conversion of unsaturated fatty acids to precursors of gamma-lactones by lactic acid bacteria during the production of malt whisky." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58, 51-56.

Williams, P. J., Strauss, C.R., Wilson, B. (1980). "New linalool derivatives in muscat of alexandria grapes and wines." *Phytochemistry* 19 (6), 1137-1139.

Williams, P.J, Sefton, M.A., Wilson, B. (1989). "Non volatile conjugates of secondary metabolites as precursors of varietal grape flavour components. " *In: Teranishi R, Buttery R.G, Shanidi R. (Eds), Flavor chemistry, Trends and developments, ACS Symposium Series, American chemical society, Washington, DC.* 338, 35-48

Y, Z

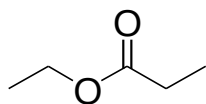
Yahya, A. R. M., Anderson, W.A., Moo-Young, M. (1998). "Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions." *Enzyme and Microbial Technology* 23 (7-8), 438-450.

Zeeman, W., Snyman, J.P., van Wyck, C.J. (1980). The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet substances and on quality of table wines. *Grape and Wine Centennial Symposium, Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis.*

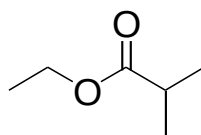
ANNEXES

Sommaire des annexes

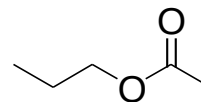
ANNEXE 1 : LES ESTERS ETUDIES	207
ANNEXE 2 : BILAN ANALYTIQUE DE LA FML SUR LES ESTERS ODORANTS	210
ANNEXE 3 : BILAN ANALYTIQUE DE LA FML SUR LES ESTERS MAJEURS	228
ANNEXE 4 : BILAN ANALYTIQUE DE LA FML SUR LES C13NI, LACTONES ET LINALOL	230
ANNEXE 5 : BILAN ANALYTIQUE DE LA FML SUR LES ACIDES BRANCHES.....	236
ANNEXE 6 : BILAN ANALYTIQUE DE LA FML SUR LES COMPOSES DE LA FRACTION LACTIQUE	238
ANNEXE 7 : BILAN ANALYTIQUE DE LA FML SUR LES COMPOSES SOUFRES LEGERES, L'ETHANAL ET LES ALCOOLS SUPERIEURS.....	241

Annexe 1 : Les esters étudiés

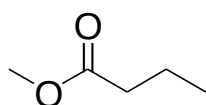
Propanoate d'éthyle



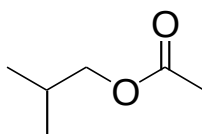
Isobutyrate d'éthyle



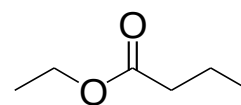
Acétate de propyle



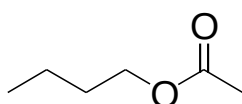
Butyrate de méthyle



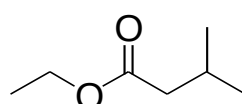
Acétate d'isobutyle



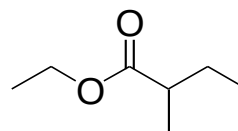
Butyrate d'éthyle



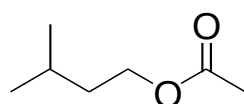
Acétate de butyle



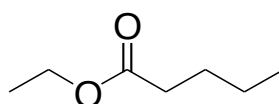
Isovalérate d'éthyle



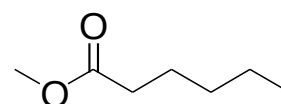
2-méthylbutyrate d'éthyle



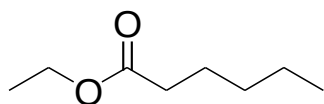
Acétate d'isoamyle



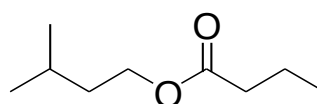
Valérate d'éthyle



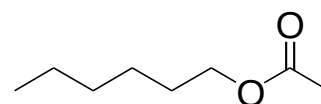
Hexanoate de méthyle



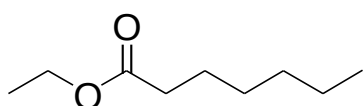
Hexanoate d'éthyle



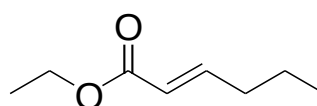
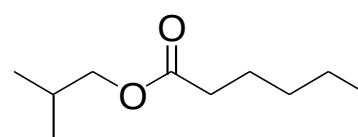
Butyrate d'isoamyle



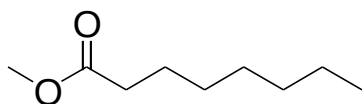
Acétate d'hexyle



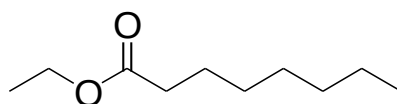
Heptanoate d'éthyle

*t*-2-hexénoate d'éthyle

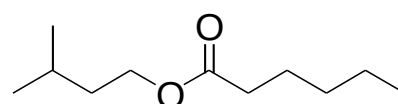
Hexanoate d'isobutyle



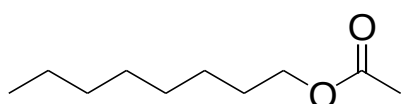
Octanoate d'éthyle



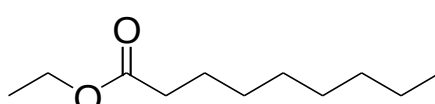
Octanoate d'éthyle



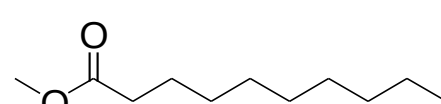
Hexanoate d'isoamyle



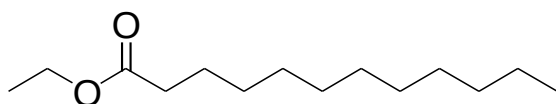
Acétate d'octyle



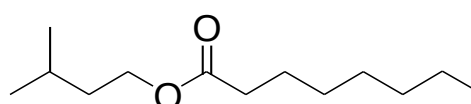
Nonanoate d'éthyle



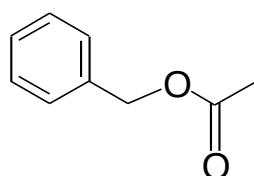
Décanoate de méthyle



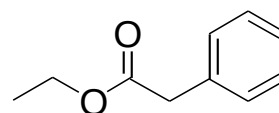
Dodécanoate d'éthyle



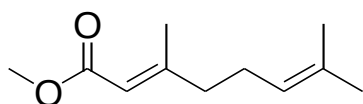
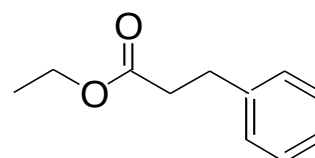
Octanoate d'isoamyle



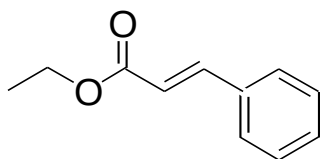
Acétate de 2-phényléthyle



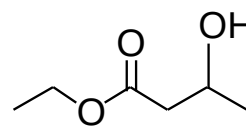
Phénylacétate d'éthyle

*t*-geranoate de méthyle

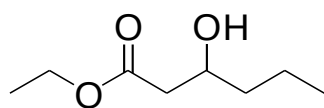
Hydrocinnamate d'éthyle



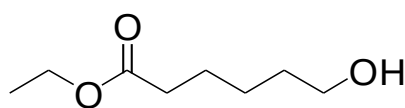
Cinnamate d'éthyle



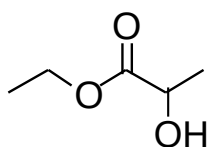
3-hydroxybutyrate d'éthyle



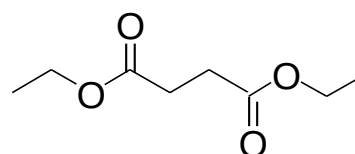
3-hydroxyhexanoate d'éthyle



6-hydroxyhexanoate d'éthyle



Lactate d'éthyle



Succinate de diéthyle

Annexe 2 : Bilan analytique de la FML sur les esters odorants

Esters totaux en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	2290	2522
Msg307	1819	1849
Msg707	1260	1671
Msg807	1438	2082
Mhm607	1298	1868
Mhm1207	1104	1573
Mhm1307	1473	1487
CSsg507	2322	2315
Msg1007	1392	1789
Msg1807	1679	1652
CShm 908	1773	1594
Mhm 1008	1330	1281
CSsg 1808	2532	2376
Msg 408	1866	1860
Msg 308	1680	1595
Msg 208	1601	1778
Mmv08D	1168	1219
Mmv08A	1168	1214
Mmv08C	1168	1224
Mmv08E	1168	1131
Mmv08B	1168	1269
Mmv08 Si	1168	1237
CSmv08O	1834	2108
CS mv08A	1834	2048
CSmv08C	1834	2002
CSmv08E	1834	1937
CSmv08B	1834	1962
Mmv09H	1380	1508
Mmv09I	1380	1479
Mmv09J	1380	1505
Mmv09F	1380	1457
Mmv09K	1380	1518
Mmv09L	1380	1407
Msg109	1439	1652
Msg609	1464	1586
Msg 1009	1605	1354
Msg1609	1431	1541
Msg1409	1421	1643
Msg809	1450	1405
Ms08si	3211	3103
Ms08F	3211	2663
Ms08P1	3211	2462
Ms08P2	3211	2447
Ms08FM	3211	2634
Mlaf09	3190	3311
Mbeaum09	4488	3650
Mlev09	1910	1605
Msol09	2196	2061

C3C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	43,1	45,8
Msg307	28,5	30,3
Msg707	21,4	29,3
Msg807	15,6	30,7
Mhm607	62,3	60,7
Mhm1207	26,2	50,6
Mhm1307	59,5	61,0
CSsg507	28,6	29,5
Msg1007	38,8	39,9
Msg1807	36,7	41,1
CShm 908	41,2	37,1
Mhm 1008	54,9	51,5
CSsg 1808	26,9	23,8
Msg 408	33,5	36,8
Msg 308	40,8	40,8
Msg 208	44,0	52,4
Mmv08D	51,7	49,0
Mmv08A	51,7	57,0
Mmv08C	51,7	58,4
Mmv08E	51,7	53,9
Mmv08B	51,7	55,3
Mmv08 Si	51,7	56,7
CSmv08O	28,6	33,9
CS mv08A	28,6	36,1
CSmv08C	28,6	34,5
CSmv08E	28,6	30,9
CSmv08B	28,6	27,8
Mmv09H	145,9	134,6
Mmv09I	145,9	122,6
Mmv09J	145,9	127,2
Mmv09F	145,9	127,7
Mmv09K	145,9	142,1
Mmv09L	145,9	121,3
Msg109	38,9	49,1
Msg609	37,7	59,2
Msg 1009	63,0	51,2
Msg1609	53,1	56,6
Msg1409	51,2	60,8
Msg809	43,5	48,0
Ms08si	56,8	57,1
Ms08F	56,8	41,7
Ms08P1	56,8	43,2
Ms08P2	56,8	45,0
Ms08FM	56,8	43,7
Mlaf09	68,5	59,8
Mbeaum09	87,3	87,4
Mlev09	97,5	119,0
Msol09	106,6	105,1

Annexe 2

C4C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	131	143
Msg307	137	151
Msg707	103	115
Msg807	92	145
Mhm607	112	142
Mhm1207	84	131
Mhm1307	141	140
CSsg507	170	166
Msg1007	149	158
Msg1807	162	174
CShm 908	147	130
Mhm 1008	148	136
CSsg 1808	192	173
Msg 408	182	175
Msg 308	166	150
Msg 208	155	165
Mmv08D	142	125
Mmv08A	142	130
Mmv08C	142	132
Mmv08E	142	134
Mmv08B	142	131
Mmv08 Si	142	145
CSmv08O	138	145
CS mv08A	138	150
CSmv08C	138	145
CSmv08E	138	142
CSmv08B	138	129
Mmv09H	91	95
Mmv09I	91	96
Mmv09J	91	85
Mmv09F	91	90
Mmv09K	91	90
Mmv09L	91	92
Msg109	124	151
Msg609	129	141
Msg 1009	156	103
Msg1609	150	149
Msg1409	139	143
Msg809	122	127
Ms08si	186	196
Ms08F	186	180
Ms08P1	186	157
Ms08P2	186	170
Ms08FM	186	186
Mlaf09	373	370
Mbeaum09	217	187
Mlev09	143	128
Msol09	227	221

C6C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	269	276
Msg307	375	384
Msg707	263	310
Msg807	327	421
Mhm607	315	431
Mhm1207	284	377
Mhm1307	316	328
CSsg507	413	407
Msg1007	346	346
Msg1807	386	406
CShm 908	377	320
Mhm 1008	363	351
CSsg 1808	425	342
Msg 408	362	368
Msg 308	350	320
Msg 208	341	366
Mmv08D	269	280
Mmv08A	269	270
Mmv08C	269	291
Mmv08E	269	262
Mmv08B	269	302
Mmv08 Si	269	301
CSmv08O	291	341
CS mv08A	291	315
CSmv08C	291	306
CSmv08E	291	285
CSmv08B	291	313
Mmv09H	281	297
Mmv09I	281	283
Mmv09J	281	281
Mmv09F	281	276
Mmv09K	281	286
Mmv09L	281	259
Msg109	250	282
Msg609	248	255
Msg 1009	272	197
Msg1609	276	283
Msg1409	256	289
Msg809	244	229
Ms08si	324	344
Ms08F	324	277
Ms08P1	324	248
Ms08P2	324	249
Ms08FM	324	262
Mlaf09	663	688
Mbeaum09	572	495
Mlev09	257	243
Msol09	420	422

Annexe 2

C8C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	490	601
Msg307	604	613
Msg707	410	511
Msg807	536	761
Mhm607	354	574
Mhm1207	370	498
Mhm1307	434	431
CSsg507	612	620
Msg1007	518	523
Msg1807	524	554
CShm 908	333	330
Mhm 1008	330	324
CSsg 1808	501	484
Msg 408	478	418
Msg 308	476	434
Msg 208	426	497
Mmv08D	327	366
Mmv08A	327	372
Mmv08C	327	345
Mmv08E	327	289
Mmv08B	327	372
Mmv08 Si	327	332
CSmv08O	435	464
CS mv08A	435	447
CSmv08C	435	462
CSmv08E	435	459
CSmv08B	435	468
Mmv09H	343	415
Mmv09I	343	426
Mmv09J	343	452
Mmv09F	343	419
Mmv09K	343	445
Mmv09L	343	420
Msg109	303	334
Msg609	328	326
Msg 1009	379	267
Msg1609	356	357
Msg1409	355	427
Msg809	310	337
Ms08si	402	460
Ms08F	402	387
Ms08P1	402	396
Ms08P2	402	338
Ms08FM	402	350
Mlaf09	735	820
Mbeaum09	530	567
Mlev09	354	327
Msol09	500	537

C10C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	215	297
Msg307	215	231
Msg707	191	251
Msg807	204	338
Mhm607	106	169
Mhm1207	126	173
Mhm1307	183	159
CSsg507	179	235
Msg1007	177	204
Msg1807	158	211
CShm 908	123	124
Mhm 1008	127	119
CSsg 1808	135	139
Msg 408	146	162
Msg 308	133	150
Msg 208	134	159
Mmv08D	124	128
Mmv08A	124	125
Mmv08C	124	122
Mmv08E	124	104
Mmv08B	124	140
Mmv08 Si	124	122
CSmv08O	116	145
CS mv08A	116	135
CSmv08C	116	152
CSmv08E	116	125
CSmv08B	116	151
Mmv09H	168	198
Mmv09I	168	196
Mmv09J	168	221
Mmv09F	168	206
Mmv09K	168	212
Mmv09L	168	173
Msg109	156	146
Msg609	186	174
Msg 1009	214	134
Msg1609	202	185
Msg1409	195	197
Msg809	199	146
Ms08si	64	156
Ms08F	64	51
Ms08P1	64	86
Ms08P2	64	28
Ms08FM	64	47
Mlaf09	253	314
Mbeaum09	153	185
Mlev09	136	117
Msol09	169	178

Annexe 2

C12C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	7,18	10,35
Msg307	6,83	7,47
Msg707	7,59	11,60
Msg807	9,88	10,43
Mhm607	13,18	5,97
Mhm1207	9,89	10,20
Mhm1307	15,86	14,33
CSsg507	10,17	11,38
Msg1007	10,15	10,95
Msg1807	8,94	13,15
CShm 908	9,22	6,60
Mhm 1008	8,47	9,69
CSsg 1808	6,10	5,11
Msg 408	6,20	7,08
Msg 308	5,64	7,29
Msg 208	6,06	8,41
Mmv08D	10,43	8,14
Mmv08A	10,43	9,53
Mmv08C	10,43	14,34
Mmv08E	10,43	9,86
Mmv08B	10,43	13,46
Mmv08 Si	10,43	8,65
CSmv08O	7,90	8,07
CS mv08A	7,90	9,99
CSmv08C	7,90	9,76
CSmv08E	7,90	10,85
CSmv08B	7,90	9,16
Mmv09H	15,25	16,58
Mmv09I	15,25	15,79
Mmv09J	15,25	21,53
Mmv09F	15,25	19,64
Mmv09K	15,25	18,08
Mmv09L	15,25	14,57
Msg109	9,52	9,46
Msg609	11,05	10,67
Msg 1009	12,06	8,79
Msg1609	15,07	10,68
Msg1409	17,52	12,57
Msg809	11,32	9,02
Ms08si	2,54	5,41
Ms08F	2,54	2,28
Ms08P1	2,54	4,03
Ms08P2	2,54	1,76
Ms08FM	2,54	3,24
Mlaf09	11,58	10,44
Mbeaum09	4,82	5,82
Mlev09	4,51	6,13
Msol09	5,93	7,74

C2C3 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	7,7	5,1
Msg307	4,2	3,7
Msg707	3,1	3,5
Msg807	2,2	4,0
Mhm607	5,0	5,9
Mhm1207	2,2	4,0
Mhm1307	4,3	4,6
CSsg507	5,6	5,2
Msg1007	4,5	4,3
Msg1807	3,4	3,7
CShm 908	8,1	8,2
Mhm 1008	7,2	7,5
CSsg 1808	7,1	8,2
Msg 408	6,2	6,4
Msg 308	5,5	5,7
Msg 208	5,0	6,2
Mmv08D	4,9	7,3
Mmv08A	4,9	7,5
Mmv08C	4,9	6,7
Mmv08E	4,9	7,4
Mmv08B	4,9	6,3
Mmv08 Si	4,9	7,6
CSmv08O	3,6	6,1
CS mv08A	3,6	5,3
CSmv08C	3,6	5,6
CSmv08E	3,6	5,1
CSmv08B	3,6	5,3
Mmv09H	7,1	7,4
Mmv09I	7,1	8,0
Mmv09J	7,1	6,8
Mmv09F	7,1	6,0
Mmv09K	7,1	6,5
Mmv09L	7,1	6,4
Msg109	3,4	3,7
Msg609	3,6	3,4
Msg 1009	4,3	2,9
Msg1609	4,2	3,4
Msg1409	2,8	4,2
Msg809	2,8	2,6
Ms08si	16,7	15,8
Ms08F	16,7	15,3
Ms08P1	16,7	13,5
Ms08P2	16,7	14,6
Ms08FM	16,7	14,7
Mlaf09	10,0	10,0
Mbeaum09	15,5	13,1
Mlev09	7,2	6,7
Msol09	8,4	9,2

Annexe 2

C2iC4 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	46,1	34,5
Msg307	38,2	39,8
Msg707	33,9	38,5
Msg807	23,6	38,4
Mhm607	26,8	31,2
Mhm1207	15,0	26,8
Mhm1307	25,8	26,0
CSsg507	64,1	61,1
Msg1007	43,2	44,7
Msg1807	34,4	38,1
CShm 908	38,7	37,3
Mhm 1008	26,1	24,7
CSsg 1808	60,9	60,6
Msg 408	41,7	46,9
Msg 308	37,6	34,4
Msg 208	43,3	46,7
Mmv08D	20,9	22,5
Mmv08A	20,9	21,9
Mmv08C	20,9	22,3
Mmv08E	20,9	27,0
Mmv08B	20,9	21,7
Mmv08 Si	20,9	25,0
CSmv08O	40,8	56,3
CS mv08A	40,8	52,4
CSmv08C	40,8	53,3
CSmv08E	40,8	47,7
CSmv08B	40,8	48,2
Mmv09H	23,7	25,9
Mmv09I	23,7	23,8
Mmv09J	23,7	24,3
Mmv09F	23,7	22,9
Mmv09K	23,7	24,0
Mmv09L	23,7	26,4
Msg109	38,3	55,4
Msg609	42,7	54,3
Msg 1009	57,0	36,6
Msg1609	47,1	49,6
Msg1409	52,6	47,0
Msg809	51,8	49,9
Ms08si	120,2	110,4
Ms08F	120,2	89,6
Ms08P1	120,2	83,1
Ms08P2	120,2	87,4
Ms08FM	120,2	91,4
Mlaf09	61,6	63,3
Mbeaum09	73,4	80,8
Mlev09	26,6	36,8
Msol09	36,1	73,8

C2iC5 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	904	923
Msg307	340	310
Msg707	159	322
Msg807	174	249
Mhm607	243	379
Mhm1207	143	236
Mhm1307	235	256
CSsg507	758	694
Msg1007	385	374
Msg1807	302	133
CShm 908	613	524
Mhm 1008	199	187
CSsg 1808	1050	1019
Msg 408	514	545
Msg 308	371	359
Msg 208	347	367
Mmv08D	146	171
Mmv08A	146	154
Mmv08C	146	160
Mmv08E	146	174
Mmv08B	146	158
Mmv08 Si	146	169
CSmv08O	652	787
CS mv08A	652	769
CSmv08C	652	713
CSmv08E	652	710
CSmv08B	652	698
Mmv09H	181	191
Mmv09I	181	187
Mmv09J	181	174
Mmv09F	181	175
Mmv09K	181	185
Mmv09L	181	169
Msg109	423	481
Msg609	381	421
Msg 1009	332	428
Msg1609	234	326
Msg1409	252	318
Msg809	353	316
Ms08si	1854	1575
Ms08F	1854	1467
Ms08P1	1854	1277
Ms08P2	1854	1365
Ms08FM	1854	1477
Mlaf09	876	846
Mbeaum09	2412	1728
Mlev09	714	436
Msol09	584	370

Annexe 2

C2C6 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	4,24	3,58
Msg307	0,63	0,67
Msg707	0,95	1,02
Msg807	0,35	0,44
Mhm607	0,97	1,43
Mhm1207	0,56	0,60
Mhm1307	0,54	0,71
CSsg507	4,21	3,95
Msg1007	0,94	0,92
Msg1807	0,63	0,65
CShm 908	3,15	2,35
Mhm 1008	0,88	0,83
CSsg 1808	9,59	9,09
Msg 408	1,97	2,17
Msg 308	1,10	0,94
Msg 208	0,77	0,89
Mmv08D	0,44	0,74
Mmv08A	0,44	0,58
Mmv08C	0,44	1,57
Mmv08E	0,44	0,70
Mmv08B	0,44	0,61
Mmv08 Si	0,44	0,72
CSmv08O	3,78	4,71
CS mv08A	3,78	4,06
CSmv08C	3,78	2,48
CSmv08E	3,78	3,72
CSmv08B	3,78	4,20
Mmv09H	0,74	0,63
Mmv09I	0,74	0,64
Mmv09J	0,74	0,54
Mmv09F	0,74	0,54
Mmv09K	0,74	0,67
Mmv09L	0,74	0,63
Msg109	0,45	0,60
Msg609	0,60	0,82
Msg 1009	0,22	0,70
Msg1609	0,12	0,24
Msg1409	0,00	0,89
Msg809	0,32	0,32
Ms08si	9,43	8,43
Ms08F	9,43	6,89
Ms08P1	9,43	6,22
Ms08P2	9,43	5,62
Ms08FM	9,43	6,83
Mlaf09	1,79	1,82
Mbeaum09	20,90	14,86
Mlev09	1,05	0,58
Msol09	0,93	0,85

C2PhC2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	98,2	87,7
Msg307	18,2	17,7
Msg707	18,3	19,4
Msg807	13,6	15,3
Mhm607	12,7	13,9
Mhm1207	10,5	10,2
Mhm1307	7,8	8,0
CSsg507	25,8	24,1
Msg1007	17,3	18,1
Msg1807	12,7	13,3
CShm 908	24,7	23,2
Mhm 1008	9,4	11,9
CSsg 1808	59,4	55,8
Msg 408	23,5	23,2
Msg 308	20,8	19,8
Msg 208	17,6	18,7
Mmv08D	9,4	8,4
Mmv08A	9,4	8,5
Mmv08C	9,4	9,6
Mmv08E	9,4	8,7
Mmv08B	9,4	9,3
Mmv08 Si	9,4	8,5
CSmv08O	43,0	43,6
CS mv08A	43,0	45,4
CSmv08C	43,0	44,8
CSmv08E	43,0	44,8
CSmv08B	43,0	40,9
Mmv09H	27,3	27,1
Mmv09I	27,3	23,7
Mmv09J	27,3	25,7
Mmv09F	27,3	25,5
Mmv09K	27,3	26,5
Mmv09L	27,3	25,3
Msg109	15,2	16,4
Msg609	14,0	13,6
Msg 1009	13,3	14,9
Msg1609	12,0	13,1
Msg1409	9,5	12,1
Msg809	11,0	10,6
Ms08si	82,6	70,8
Ms08F	82,6	65,6
Ms08P1	82,6	66,1
Ms08P2	82,6	56,1
Ms08FM	82,6	68,8
Mlaf09	40,1	38,1
Mbeaum09	324,3	202,2
Mlev09	70,5	47,0
Msol09	47,2	35,2

Annexe 2

iC4C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	36,8	45,0
Msg307	22,6	26,8
Msg707	17,4	27,7
Msg807	13,6	30,3
Mhm607	22,2	21,4
Mhm1207	10,4	24,1
Mhm1307	22,8	28,8
CSsg507	22,5	27,1
Msg1007	25,1	32,5
Msg1807	21,8	29,4
CShm 908	26,4	25,2
Mhm 1008	28,5	27,8
CSsg 1808	28,1	27,2
Msg 408	36,3	36,1
Msg 308	39,5	38,9
Msg 208	49,1	57,2
Mmv08D	36,0	25,9
Mmv08A	36,0	30,2
Mmv08C	36,0	29,9
Mmv08E	36,0	32,6
Mmv08B	36,0	31,3
Mmv08 Si	36,0	32,6
CSmv08O	48,0	43,5
CS mv08A	48,0	47,5
CSmv08C	48,0	44,4
CSmv08E	48,0	44,9
CSmv08B	48,0	38,8
Mmv09H	47,8	49,2
Mmv09I	47,8	46,8
Mmv09J	47,8	39,4
Mmv09F	47,8	43,0
Mmv09K	47,8	38,0
Mmv09L	47,8	48,7
Msg109	46,2	80,0
Msg609	48,8	81,5
Msg 1009	61,8	68,0
Msg1609	46,7	66,3
Msg1409	54,8	85,4
Msg809	65,8	85,2
Ms08si	59,4	65,3
Ms08F	59,4	50,8
Ms08P1	59,4	51,9
Ms08P2	59,4	56,1
Ms08FM	59,4	53,1
Mlaf09	50,0	43,6
Mbeaum09	29,3	31,1
Mlev09	49,9	72,7
Msol09	40,9	43,8

2mC4C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	6,72	9,58
Msg307	3,18	3,95
Msg707	3,16	4,00
Msg807	2,12	3,55
Mhm607	4,03	5,02
Mhm1207	2,58	5,38
Mhm1307	3,59	5,02
CSsg507	3,28	3,69
Msg1007	3,79	4,68
Msg1807	3,64	4,75
CShm 908	4,99	4,46
Mhm 1008	4,79	4,22
CSsg 1808	3,34	3,15
Msg 408	4,25	4,54
Msg 308	6,00	5,98
Msg 208	6,22	6,47
Mmv08D	5,80	4,03
Mmv08A	5,80	5,06
Mmv08C	5,80	4,75
Mmv08E	5,80	4,42
Mmv08B	5,80	4,66
Mmv08 Si	5,80	4,39
CSmv08O	5,85	5,31
CS mv08A	5,85	5,92
CSmv08C	5,85	5,36
CSmv08E	5,85	5,09
CSmv08B	5,85	4,72
Mmv09H	9,08	11,42
Mmv09I	9,08	11,04
Mmv09J	9,08	8,50
Mmv09F	9,08	9,74
Mmv09K	9,08	8,23
Mmv09L	9,08	11,16
Msg109	5,89	9,77
Msg609	5,95	9,82
Msg 1009	8,24	11,72
Msg1609	6,76	9,37
Msg1409	7,66	11,68
Msg809	8,73	11,19
Ms08si	7,87	8,43
Ms08F	7,87	5,69
Ms08P1	7,87	6,18
Ms08P2	7,87	6,50
Ms08FM	7,87	5,90
Mlaf09	7,19	6,52
Mbeaum09	7,12	7,81
Mlev09	12,52	15,11
Msol09	8,58	9,49

Annexe 2

iC5C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	13,25	16,38
Msg307	6,60	8,32
Msg707	6,36	8,63
Msg807	4,17	7,60
Mhm607	6,84	8,56
Mhm1207	5,15	10,03
Mhm1307	5,19	6,91
CSsg507	5,81	7,27
Msg1007	6,84	8,29
Msg1807	7,49	9,95
CShm 908	7,09	6,56
Mhm 1008	8,27	7,79
CSsg 1808	6,93	7,13
Msg 408	9,82	9,88
Msg 308	10,28	11,42
Msg 208	10,97	11,55
Mmv08D	8,59	7,69
Mmv08A	8,59	9,04
Mmv08C	8,59	8,28
Mmv08E	8,59	8,64
Mmv08B	8,59	8,03
Mmv08 Si	8,59	7,30
CSmv08O	8,86	9,48
CS mv08A	8,86	9,78
CSmv08C	8,86	8,84
CSmv08E	8,86	8,23
CSmv08B	8,86	7,97
Mmv09H	14,59	15,13
Mmv09I	14,59	14,70
Mmv09J	14,59	13,20
Mmv09F	14,59	12,36
Mmv09K	14,59	12,72
Mmv09L	14,59	14,51
Msg109	12,21	18,48
Msg609	11,70	18,92
Msg 1009	15,97	17,82
Msg1609	11,08	16,53
Msg1409	14,22	18,86
Msg809	12,66	18,10
Ms08si	12,72	13,09
Ms08F	12,72	10,99
Ms08P1	12,72	11,68
Ms08P2	12,72	11,95
Ms08FM	12,72	11,02
Mlaf09	14,34	14,49
Mbeaum09	12,34	14,12
Mlev09	18,26	24,50
Msol09	14,85	16,79

PhC2C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	4,46	5,41
Msg307	2,22	2,57
Msg707	2,12	2,40
Msg807	2,17	2,48
Mhm607	1,49	1,74
Mhm1207	1,80	1,91
Mhm1307	1,06	1,18
CSsg507	1,77	1,98
Msg1007	1,73	2,11
Msg1807	1,49	1,76
CShm 908	3,72	1,87
Mhm 1008	3,77	1,98
CSsg 1808	2,80	4,22
Msg 408	3,15	3,71
Msg 308	4,03	1,92
Msg 208	3,41	1,90
Mmv08D	2,78	1,84
Mmv08A	2,78	1,65
Mmv08C	2,78	1,85
Mmv08E	2,78	1,80
Mmv08B	2,78	1,76
Mmv08 Si	2,78	1,90
CSmv08O	2,34	2,08
CS mv08A	2,34	2,10
CSmv08C	2,34	1,98
CSmv08E	2,34	2,23
CSmv08B	2,34	2,00
Mmv09H	8,00	1,20
Mmv09I	8,00	1,25
Mmv09J	8,00	1,09
Mmv09F	8,00	1,16
Mmv09K	8,00	1,07
Mmv09L	8,00	1,06
Msg109	2,48	1,72
Msg609	3,00	1,72
Msg 1009	2,68	1,35
Msg1609	1,94	2,38
Msg1409	2,30	1,62
Msg809	2,11	1,54
Ms08si	2,18	0,78
Ms08F	2,18	0,59
Ms08P1	2,18	1,67
Ms08P2	2,18	1,45
Ms08FM	2,18	1,61
Mlaf09	2,56	2,31
Mbeaum09	5,62	2,23
Mlev09	4,81	0,73
Msol09	4,21	1,75

Annexe 2

C6C1 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	1,13	1,10
Msg307	1,69	1,76
Msg707	1,21	1,32
Msg807	1,39	1,96
Mhm607	1,43	1,89
Mhm1207	1,19	1,51
Mhm1307	1,43	1,53
CSsg507	1,67	1,67
Msg1007	1,71	1,78
Msg1807	1,55	1,65
CShm 908	1,03	0,92
Mhm 1008	1,15	1,04
CSsg 1808	1,47	1,27
Msg 408	1,53	1,44
Msg 308	1,13	1,13
Msg 208	1,17	1,18
Mmv08D	1,12	1,01
Mmv08A	1,12	0,91
Mmv08C	1,12	1,00
Mmv08E	1,12	0,49
Mmv08B	1,12	0,98
Mmv08 Si	1,12	1,02
CSmv08O	0,98	1,00
CS mv08A	0,98	0,98
CSmv08C	0,98	0,98
CSmv08E	0,98	0,99
CSmv08B	0,98	0,90
Mmv09H	0,95	0,88
Mmv09I	0,95	0,90
Mmv09J	0,95	0,85
Mmv09F	0,95	0,88
Mmv09K	0,95	0,85
Mmv09L	0,95	0,85
Msg109	0,97	1,05
Msg609	0,87	0,94
Msg 1009	0,90	0,77
Msg1609	0,89	1,03
Msg1409	0,96	0,97
Msg809	0,91	0,84
Ms08si	0,83	0,89
Ms08F	0,83	0,80
Ms08P1	0,83	0,71
Ms08P2	0,83	0,75
Ms08FM	0,83	0,72
Mlaf09	3,19	3,16
Mbeaum09	1,52	1,14
Mlev09	1,04	0,97
Msol09	1,32	1,29

C8C1 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	2,35	2,89
Msg307	2,89	3,54
Msg707	1,88	2,69
Msg807	3,11	4,44
Mhm607	1,40	2,71
Mhm1207	1,62	2,04
Mhm1307	1,93	1,93
CSsg507	2,35	2,59
Msg1007	2,49	2,82
Msg1807	2,13	2,66
CShm 908	1,15	1,07
Mhm 1008	1,22	1,26
CSsg 1808	1,75	1,60
Msg 408	1,92	2,03
Msg 308	1,54	1,54
Msg 208	1,54	1,38
Mmv08D	0,92	1,24
Mmv08A	0,92	1,17
Mmv08C	0,92	1,17
Mmv08E	0,92	1,17
Mmv08B	0,92	1,16
Mmv08 Si	0,92	1,28
CSmv08O	1,04	1,38
CS mv08A	1,04	1,19
CSmv08C	1,04	1,29
CSmv08E	1,04	1,12
CSmv08B	1,04	1,27
Mmv09H	0,74	0,91
Mmv09I	0,74	0,87
Mmv09J	0,74	0,93
Mmv09F	0,74	0,92
Mmv09K	0,74	0,94
Mmv09L	0,74	0,83
Msg109	1,28	1,47
Msg609	1,19	1,10
Msg 1009	1,30	0,92
Msg1609	1,26	1,16
Msg1409	1,09	1,52
Msg809	1,25	1,16
Ms08si	0,84	1,05
Ms08F	0,84	0,86
Ms08P1	0,84	0,79
Ms08P2	0,84	0,75
Ms08FM	0,84	0,76
Mlaf09	3,24	3,67
Mbeaum09	1,16	1,15
Mlev09	0,98	0,93
Msol09	1,32	1,44

Annexe 2

C10C1 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	0,77	1,32
Msg307	0,75	0,90
Msg707	0,63	1,01
Msg807	0,74	1,47
Mhm607	0,40	0,69
Mhm1207	0,43	0,65
Mhm1307	0,71	0,64
CSsg507	0,61	0,75
Msg1007	0,68	0,83
Msg1807	0,61	0,78
CShm 908	0,29	0,26
Mhm 1008	0,27	0,29
CSsg 1808	0,31	0,30
Msg 408	0,34	0,40
Msg 308	0,31	0,33
Msg 208	0,29	0,34
Mmv08D	0,28	0,30
Mmv08A	0,28	0,28
Mmv08C	0,28	0,29
Mmv08E	0,28	0,27
Mmv08B	0,28	0,31
Mmv08 Si	0,28	0,31
CSmv08O	0,28	0,31
CS mv08A	0,28	0,30
CSmv08C	0,28	0,31
CSmv08E	0,28	0,29
CSmv08B	0,28	0,30
Mmv09H	0,23	0,27
Mmv09I	0,23	0,26
Mmv09J	0,23	0,29
Mmv09F	0,23	0,28
Mmv09K	0,23	0,27
Mmv09L	0,23	0,24
Msg109	0,40	0,33
Msg609	0,41	0,38
Msg 1009	0,47	0,31
Msg1609	0,47	0,39
Msg1409	0,40	0,45
Msg809	0,49	0,36
Ms08si	0,09	0,19
Ms08F	0,09	0,07
Ms08P1	0,09	0,11
Ms08P2	0,09	0,04
Ms08FM	0,09	0,06
Mlaf09	0,69	0,89
Mbeaum09	0,21	0,26
Mlev09	0,28	0,25
Msol09	0,31	0,35

C5C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	0,18	0,31
Msg307	0,35	0,60
Msg707	0,06	0,28
Msg807	0,26	0,34
Mhm607	0,37	0,79
Mhm1207	0,28	0,35
Mhm1307	0,86	0,86
CSsg507	0,58	0,59
Msg1007	0,64	0,60
Msg1807	0,33	0,29
CShm 908	0,69	0,60
Mhm 1008	1,02	0,94
CSsg 1808	0,50	0,49
Msg 408	0,63	0,70
Msg 308	0,50	0,43
Msg 208	0,49	0,48
Mmv08D	nq	nq
Mmv08A	nq	nq
Mmv08C	nq	nq
Mmv08E	nq	nq
Mmv08B	nq	nq
Mmv08 Si	nq	nq
CSmv08O	nq	nq
CS mv08A	nq	nq
CSmv08C	nq	nq
CSmv08E	nq	nq
CSmv08B	nq	nq
Mmv09H	1,56	1,44
Mmv09I	1,56	1,34
Mmv09J	1,56	1,29
Mmv09F	1,56	1,37
Mmv09K	1,56	1,18
Mmv09L	1,56	1,30
Msg109	0,23	0,42
Msg609	0,00	0,60
Msg 1009	1,16	0,30
Msg1609	0,76	0,67
Msg1409	0,46	0,51
Msg809	0,32	0,85
Ms08si	0,50	0,43
Ms08F	0,50	0,32
Ms08P1	nq	nq
Ms08P2	nq	nq
Ms08FM	nq	nq
Mlaf09	0,50	0,45
Mbeaum09	1,66	1,53
Mlev09	0,88	0,76
Msol09	0,37	0,91

Annexe 2

C7C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	0,51	0,55
Msg307	0,68	0,65
Msg707	0,55	0,65
Msg807	0,64	0,73
Mhm607	0,52	1,00
Mhm1207	0,57	0,59
Mhm1307	0,90	0,97
CSsg507	0,92	0,95
Msg1007	0,72	0,84
Msg1807	0,53	0,63
CShm 908	1,20	1,05
Mhm 1008	1,19	1,17
CSsg 1808	1,03	0,86
Msg 408	1,05	1,03
Msg 308	0,96	0,89
Msg 208	0,86	0,82
Mmv08D	1,09	1,17
Mmv08A	1,09	1,05
Mmv08C	1,09	1,14
Mmv08E	1,09	1,23
Mmv08B	1,09	1,13
Mmv08 Si	1,09	1,16
CSmv08O	0,60	0,68
CS mv08A	0,60	0,65
CSmv08C	0,60	0,67
CSmv08E	0,60	0,63
CSmv08B	0,60	0,68
Mmv09H	2,05	2,24
Mmv09I	2,05	2,19
Mmv09J	2,05	2,19
Mmv09F	2,05	2,24
Mmv09K	2,05	2,23
Mmv09L	2,05	2,13
Msg109	0,65	0,92
Msg609	0,81	0,73
Msg 1009	0,70	0,42
Msg1609	0,59	0,52
Msg1409	0,60	0,76
Msg809	0,62	0,61
Ms08si	0,40	0,55
Ms08F	0,40	0,50
Ms08P1	0,40	0,44
Ms08P2	0,40	0,48
Ms08FM	0,40	0,51
Mlaf09	0,65	0,64
Mbeaum09	0,56	0,55
Mlev09	0,46	0,52
Msol09	0,68	0,81

C9C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	0,86	1,30
Msg307	1,50	0,86
Msg707	0,72	0,87
Msg807	1,84	1,10
Mhm607	0,43	0,83
Mhm1207	1,14	0,59
Mhm1307	0,87	0,82
CSsg507	0,59	0,67
Msg1007	0,60	0,73
Msg1807	0,63	0,69
CShm 908	0,68	0,77
Mhm 1008	0,66	0,71
CSsg 1808	0,53	0,54
Msg 408	0,70	0,76
Msg 308	0,71	0,80
Msg 208	0,50	0,63
Mmv08D	0,93	1,06
Mmv08A	0,93	0,73
Mmv08C	0,93	2,74
Mmv08E	0,93	0,91
Mmv08B	0,93	0,95
Mmv08 Si	0,93	1,44
CSmv08O	0,45	0,57
CS mv08A	0,45	0,48
CSmv08C	0,45	0,57
CSmv08E	0,45	0,51
CSmv08B	0,45	0,56
Mmv09H	1,59	2,06
Mmv09I	1,59	2,04
Mmv09J	1,59	2,39
Mmv09F	1,59	2,13
Mmv09K	1,59	2,13
Mmv09L	1,59	1,89
Msg109	0,80	0,58
Msg609	1,04	0,83
Msg 1009	1,11	0,48
Msg1609	0,84	0,67
Msg1409	0,81	0,91
Msg809	0,75	0,64
Ms08si	0,36	0,80
Ms08F	0,36	0,73
Ms08P1	0,36	0,62
Ms08P2	0,36	0,54
Ms08FM	0,36	1,06
Mlaf09	0,58	0,53
Mbeaum09	0,38	0,80
Mlev09	0,67	0,53
Msol09	0,80	0,69

Annexe 2

C4iC5 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	0,37	0,43
Msg307	0,37	0,45
Msg707	0,31	0,36
Msg807	0,41	0,52
Mhm607	0,31	0,42
Mhm1207	0,34	0,37
Mhm1307	0,33	0,39
CSsg507	0,58	0,66
Msg1007	0,50	0,53
Msg1807	0,40	0,49
CShm 908	0,43	0,37
Mhm 1008	0,35	0,36
CSsg 1808	0,51	0,46
Msg 408	0,51	0,48
Msg 308	0,31	0,34
Msg 208	0,37	0,35
Mmv08D	0,30	0,36
Mmv08A	0,30	0,32
Mmv08C	0,30	0,32
Mmv08E	0,30	0,34
Mmv08B	0,30	0,29
Mmv08 Si	0,30	0,34
CSmv08O	0,36	0,40
CS mv08A	0,36	0,34
CSmv08C	0,36	0,36
CSmv08E	0,36	0,33
CSmv08B	0,36	0,35
Mmv09H	0,20	0,23
Mmv09I	0,20	0,19
Mmv09J	0,20	0,24
Mmv09F	0,20	0,19
Mmv09K	0,20	0,17
Mmv09L	0,20	0,18
Msg109	0,27	0,33
Msg609	0,37	0,41
Msg 1009	0,43	0,25
Msg1609	0,42	0,17
Msg1409	0,35	0,26
Msg809	0,31	0,25
Ms08si	0,42	0,57
Ms08F	0,42	0,45
Ms08P1	0,42	0,39
Ms08P2	0,42	0,38
Ms08FM	0,42	0,42
Mlaf09	0,94	0,90
Mbeaum09	0,61	0,55
Mlev09	0,34	0,32
Msol09	0,52	0,57

C6iC5 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	1,02	1,27
Msg307	1,72	1,87
Msg707	1,00	1,41
Msg807	1,94	2,87
Mhm607	0,80	1,57
Mhm1207	1,07	1,34
Mhm1307	1,36	1,31
CSsg507	2,04	2,26
Msg1007	1,49	1,61
Msg1807	1,37	1,66
CShm 908	0,83	0,74
Mhm 1008	0,72	0,72
CSsg 1808	1,31	1,16
Msg 408	1,14	1,08
Msg 308	0,96	0,87
Msg 208	0,90	0,97
Mmv08D	0,65	0,70
Mmv08A	0,65	0,66
Mmv08C	0,65	0,69
Mmv08E	0,65	0,65
Mmv08B	0,65	0,76
Mmv08 Si	0,65	0,75
CSmv08O	0,98	1,13
CS mv08A	0,98	1,12
CSmv08C	0,98	1,12
CSmv08E	0,98	0,99
CSmv08B	0,98	1,19
Mmv09H	0,49	0,49
Mmv09I	0,49	0,47
Mmv09J	0,49	0,53
Mmv09F	0,49	0,51
Mmv09K	0,49	0,52
Mmv09L	0,49	0,44
Msg109	0,80	0,73
Msg609	0,87	0,61
Msg 1009	0,99	0,43
Msg1609	1,09	0,73
Msg1409	0,98	0,99
Msg809	0,92	0,80
Ms08si	1,02	1,21
Ms08F	1,02	1,03
Ms08P1	1,02	0,92
Ms08P2	1,02	1,00
Ms08FM	1,02	1,00
Mlaf09	2,02	2,08
Mbeaum09	1,98	1,78
Mlev09	0,67	0,65
Msol09	1,11	1,16

Annexe 2

C8iC5 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	1,92	4,25
Msg307	2,55	3,02
Msg707	2,13	3,58
Msg807	2,58	6,62
Mhm607	1,18	2,36
Mhm1207	1,70	2,27
Mhm1307	3,63	3,14
CSsg507	0,07	0,07
Msg1007	2,66	3,13
Msg1807	2,16	3,28
CShm 908	1,06	1,09
Mhm 1008	0,87	0,88
CSsg 1808	1,69	1,61
Msg 408	1,43	1,60
Msg 308	1,28	1,64
Msg 208	1,50	1,71
Mmv08D	1,23	0,90
Mmv08A	1,23	1,08
Mmv08C	1,23	1,21
Mmv08E	1,23	0,91
Mmv08B	1,23	1,27
Mmv08 Si	1,23	0,90
CSmv08O	1,83	1,97
CS mv08A	1,83	2,15
CSmv08C	1,83	2,07
CSmv08E	1,83	2,13
CSmv08B	1,83	1,97
Mmv09H	1,00	1,37
Mmv09I	1,00	1,35
Mmv09J	1,00	1,45
Mmv09F	1,00	1,42
Mmv09K	1,00	1,37
Mmv09L	1,00	1,35
Msg109	1,88	1,89
Msg609	2,59	2,63
Msg 1009	3,15	2,14
Msg1609	3,24	2,93
Msg1409	3,31	2,94
Msg809	3,20	2,68
Ms08si	1,54	2,64
Ms08F	1,54	1,66
Ms08P1	1,54	1,78
Ms08P2	1,54	1,54
Ms08FM	1,54	1,77
Mlaf09	3,02	3,37
Mbeaum09	2,30	2,59
Mlev09	0,89	1,19
Msol09	1,67	1,80

C6iC4 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	0,11	0,13
Msg307	0,31	0,32
Msg707	0,21	0,26
Msg807	0,36	0,44
Mhm607	0,12	0,19
Mhm1207	1,07	1,34
Mhm1307	1,36	1,31
CSsg507	2,04	2,26
Msg1007	1,49	1,61
Msg1807	1,37	1,66
CShm 908	0,17	0,15
Mhm 1008	0,14	0,14
CSsg 1808	0,32	0,27
Msg 408	0,29	0,26
Msg 308	0,16	0,15
Msg 208	0,22	0,20
Mmv08D	0,12	0,14
Mmv08A	0,12	0,13
Mmv08C	0,12	0,14
Mmv08E	0,12	0,13
Mmv08B	0,12	0,12
Mmv08 Si	0,12	0,15
CSmv08O	0,22	0,26
CS mv08A	0,22	0,25
CSmv08C	0,22	0,25
CSmv08E	0,22	0,20
CSmv08B	0,22	0,25
Mmv09H	0,07	0,09
Mmv09I	0,07	0,08
Mmv09J	0,07	0,08
Mmv09F	0,07	0,08
Mmv09K	0,07	0,07
Mmv09L	0,07	0,07
Msg109	0,15	0,14
Msg609	0,17	0,13
Msg 1009	0,17	0,09
Msg1609	0,19	0,17
Msg1409	0,16	0,20
Msg809	0,19	0,21
Ms08si	0,18	0,21
Ms08F	0,18	0,20
Ms08P1	0,18	0,14
Ms08P2	0,18	0,19
Ms08FM	0,18	0,17
Mlaf09	0,37	0,34
Mbeaum09	0,14	0,12
Mlev09	0,06	0,06
Msol09	0,12	0,13

Annexe 2

dhCinC2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	0,37	0,45
Msg307	0,26	0,28
Msg707	0,28	0,27
Msg807	0,34	0,34
Mhm607	0,39	0,36
Mhm1207	0,27	0,27
Mhm1307	0,31	0,23
CSsg507	0,43	0,44
Msg1007	0,24	0,28
Msg1807	0,46	0,49
CShm 908	0,35	0,30
Mhm 1008	0,24	0,32
CSsg 1808	0,45	0,42
Msg 408	0,25	0,26
Msg 308	0,33	0,29
Msg 208	0,28	0,33
Mmv08D	nq	nq
Mmv08A	nq	nq
Mmv08C	nq	nq
Mmv08E	nq	nq
Mmv08B	nq	nq
Mmv08 Si	nq	nq
CSmv08O	nq	nq
CS mv08A	nq	nq
CSmv08C	nq	nq
CSmv08E	nq	nq
CSmv08B	nq	nq
Mmv09H	0,61	0,63
Mmv09I	0,61	0,57
Mmv09J	0,61	0,70
Mmv09F	0,61	0,56
Mmv09K	0,61	0,62
Mmv09L	0,61	0,59
Msg109	nq	nq
Msg609	nq	nq
Msg 1009	nq	nq
Msg1609	nq	nq
Msg1409	nq	nq
Msg809	nq	nq
Ms08si	1,27	1,49
Ms08F	1,27	1,08
Ms08P1	1,27	1,20
Ms08P2	1,27	1,08
Ms08FM	1,27	1,16
Mlaf09	0,45	0,47
Mbeaum09	1,36	1,02
Mlev09	1,34	1,38
Msol09	0,75	0,85

CinC2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Mmc07	1,41	1,34
Msg307	1,45	1,50
Msg707	1,62	1,43
Msg807	1,60	1,48
Mhm607	0,73	1,27
Mhm1207	1,43	1,35
Mhm1307	1,45	1,35
CSsg507	1,73	1,63
Msg1007	1,11	1,24
Msg1807	1,49	1,41
CShm 908	1,68	1,59
Mhm 1008	1,16	1,56
CSsg 1808	1,56	1,60
Msg 408	1,11	1,14
Msg 308	1,43	1,48
Msg 208	1,31	1,36
Mmv08D	1,24	1,17
Mmv08A	1,24	1,09
Mmv08C	1,24	1,28
Mmv08E	1,24	1,15
Mmv08B	1,24	1,14
Mmv08 Si	1,24	1,11
CSmv08O	1,55	1,68
CS mv08A	1,55	1,69
CSmv08C	1,55	1,82
CSmv08E	1,55	1,71
CSmv08B	1,55	1,93
Mmv09H	1,81	1,75
Mmv09I	1,81	1,80
Mmv09J	1,81	1,92
Mmv09F	1,81	1,63
Mmv09K	1,81	1,76
Mmv09L	1,81	1,96
Msg109	1,27	1,50
Msg609	1,39	1,30
Msg 1009	1,17	1,22
Msg1609	1,64	1,50
Msg1409	1,12	1,33
Msg809	1,27	1,45
Ms08si	1,40	1,15
Ms08F	1,40	1,07
Ms08P1	1,40	1,29
Ms08P2	1,40	1,06
Ms08FM	1,40	1,21
Mlaf09	0,52	0,57
Mbeaum09	0,84	1,00
Mlev09	0,73	1,09
Msol09	1,52	0,87

Annexe 2

hexC2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	0,75	0,78
Msg307	1,14	1,32
Msg707	1,59	1,78
Msg807	0,93	1,08
Mhm607	1,78	1,95
Mhm1207	1,84	1,94
Mhm1307	1,69	1,91
CSsg507	4,28	4,28
Msg1007	2,09	2,14
Msg1807	1,92	2,07
CShm 908	1,96	1,87
Mhm 1008	1,98	1,98
CSsg 1808	4,73	4,22
Msg 408	3,42	3,71
Msg 308	1,97	1,92
Msg 208	1,86	1,90
Mmv08D	2,03	1,84
Mmv08A	2,03	1,65
Mmv08C	2,03	1,85
Mmv08E	2,03	1,80
Mmv08B	2,03	1,76
Mmv08 Si	2,03	1,90
CSmv08O	2,11	2,08
CS mv08A	2,11	2,10
CSmv08C	2,11	1,98
CSmv08E	2,11	2,23
CSmv08B	2,11	2,00
Mmv09H	1,25	1,20
Mmv09I	1,25	1,25
Mmv09J	1,25	1,09
Mmv09F	1,25	1,16
Mmv09K	1,25	1,07
Mmv09L	1,25	1,06
Msg109	1,40	1,72
Msg609	1,47	1,72
Msg 1009	1,31	1,35
Msg1609	2,06	2,38
Msg1409	1,45	1,62
Msg809	1,58	1,54
Ms08si	0,64	0,78
Ms08F	0,64	0,59
Ms08P1	0,64	0,54
Ms08P2	0,64	0,49
Ms08FM	0,64	0,58
Mlaf09	2,37	2,31
Mbeaum09	1,75	2,23
Mlev09	0,72	0,73
Msol09	1,74	1,75

gerC1 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	0,41	0,41
Msg307	0,41	0,39
Msg707	0,32	0,36
Msg807	0,42	0,45
Mhm607	0,38	0,38
Mhm1207	0,37	0,38
Mhm1307	0,36	0,37
CSsg507	0,12	0,13
Msg1007	0,42	0,43
Msg1807	0,46	0,45
CShm 908	0,05	0,05
Mhm 1008	0,04	0,05
CSsg 1808	0,10	0,08
Msg 408	0,13	0,16
Msg 308	0,06	0,07
Msg 208	0,04	0,03
Mmv08D	nq	nq
Mmv08A	nq	nq
Mmv08C	nq	nq
Mmv08E	nq	nq
Mmv08B	nq	nq
Mmv08 Si	nq	nq
CSmv08O	nq	nq
CS mv08A	nq	nq
CSmv08C	nq	nq
CSmv08E	nq	nq
CSmv08B	nq	nq
Mmv09H	0,13	0,13
Mmv09I	0,13	0,13
Mmv09J	0,13	0,15
Mmv09F	0,13	0,15
Mmv09K	0,13	0,15
Mmv09L	0,13	0,13
Msg109	nq	nq
Msg609	nq	nq
Msg 1009	nq	nq
Msg1609	nq	nq
Msg1409	nq	nq
Msg809	nq	nq
Ms08si	0,08	0,15
Ms08F	0,08	0,07
Ms08P1	0,08	0,09
Ms08P2	0,08	0,05
Ms08FM	0,08	0,06
Mlaf09	0,20	0,21
Mbeaum09	0,16	0,14
Mlev09	0,27	0,20
Msol09	0,34	0,33

Annexe 2

hexC2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
MmcO7	0,75	0,78
Msg307	1,14	1,32
Msg707	1,59	1,78
Msg807	0,93	1,08
Mhm607	1,78	1,95
Mhm1207	1,84	1,94
Mhm1307	1,69	1,91
CSsg507	4,28	4,28
Msg1007	2,09	2,14
Msg1807	1,92	2,07
CShm 908	1,96	1,87
Mhm 1008	1,98	1,98
CSsg 1808	4,73	4,22
Msg 408	3,42	3,71
Msg 308	1,97	1,92
Msg 208	1,86	1,90
Mmv08D	2,03	1,84
Mmv08A	2,03	1,65
Mmv08C	2,03	1,85
Mmv08E	2,03	1,80
Mmv08B	2,03	1,76
Mmv08 Si	2,03	1,90
CSmv08O	2,11	2,08
CS mv08A	2,11	2,10
CSmv08C	2,11	1,98
CSmv08E	2,11	2,23
CSmv08B	2,11	2,00
Mmv09H	1,25	1,20
Mmv09I	1,25	1,25
Mmv09J	1,25	1,09
Mmv09F	1,25	1,16
Mmv09K	1,25	1,07
Mmv09L	1,25	1,06
Msg109	1,40	1,72
Msg609	1,47	1,72
Msg 1009	1,31	1,35
Msg1609	2,06	2,38
Msg1409	1,45	1,62
Msg809	1,58	1,54
Ms08si	0,64	0,78
Ms08F	0,64	0,59
Ms08P1	0,64	0,54
Ms08P2	0,64	0,49
Ms08FM	0,64	0,58
Mlaf09	2,37	2,31

gerC1 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	0,41	0,41
Mhm1207	0,41	0,39
CSsg507	0,32	0,36
MmcO7	0,42	0,45
Msg1007	0,38	0,38
Msg707	0,37	0,38
Msg807	0,36	0,37
Mhm1307	0,12	0,13
Mhm607	0,42	0,43
Msg307	0,46	0,45
CShm 908	0,05	0,05
Mhm 1008	0,04	0,05
CSsg 1808	0,10	0,08
Msg 408	0,13	0,16
Msg 308	0,06	0,07
Msg 208	0,04	0,03
Mmv08D	nq	nq
Mmv08A	nq	nq
Mmv08C	nq	nq
Mmv08E	nq	nq
Mmv08B	nq	nq
Mmv08 Si	nq	nq
CSmv08O	nq	nq
CS mv08A	nq	nq
CSmv08C	nq	nq
CSmv08E	nq	nq
CSmv08B	nq	nq
Ms08si	0,13	0,13
Ms08F	0,13	0,13
Mmv09H	0,13	0,15
Mmv09I	0,13	0,15
Mmv09J	0,13	0,15
Mmv09F	0,13	0,13
Mmv09K	nq	nq
Mmv09L	nq	nq
Mlaf09	nq	nq
Msg109	nq	nq
Msg609	nq	nq
Msg 1009	nq	nq
Msg1609	0,08	0,15
Msg1409	0,08	0,07
Msg809	0,08	0,09
Mbeaum09	0,08	0,05
Mlev09	0,08	0,06
Msol09	0,20	0,21

Annexe 2

3OHC4C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	349	339
Mhm1207	289	326
CSsg507	351	338
MmcO7	163	205
Msg1007	329	392
Msg707	307	307
Msg807	350	343
Mhm1307	224	218
Mhm607	173	230
Msg307	341	348
CShm 908	217	207
Mhm 1008	177	172
CSsg 1808	243	297
Msg 408	311	339
Msg 308	303	290
Msg 208	327	340
Mmv08D	201	212
Mmv08A	201	214
Mmv08C	201	202
Mmv08E	201	199
Mmv08B	201	225
Mmv08 Si	201	208
CSmv08O	247	235
CS mv08A	247	265
CSmv08C	247	250
CSmv08E	247	294
CSmv08B	247	254
Ms08si	142	143
Ms08F	142	141
Ms08P1	142	144
Ms08P2	142	141
Ms08FM	142	131
Mmv09H	72	77
Mmv09I	72	81
Mmv09J	72	76
Mmv09F	72	62
Mmv09K	72	81
Mmv09L	72	65
Mlaf09	580	561
Msg109	264	862
Msg609	272	580
Msg 1009	160	502
Msg1609	245	577
Msg1409	323	425
Msg809	195	1703
Mbeaum09	471	428
Mlev09	300	316
Msol09	466	256

LevC2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	0,32	0,47
Mhm1207	0,31	0,41
CSsg507	0,65	0,82
MmcO7	0,52	0,69
Msg1007	0,64	0,86
Msg707	0,26	0,67
Msg807	0,48	0,66
Mhm1307	0,48	0,83
Mhm607	0,20	0,24
Msg307	0,72	0,87
CShm 908	3,77	2,99
Mhm 1008	2,30	2,70
CSsg 1808	1,04	1,38
Msg 408	1,58	1,85
Msg 308	1,82	2,19
Msg 208	1,85	1,64
Mmv08D	3,61	3,47
Mmv08A	3,61	3,14
Mmv08C	3,61	2,00
Mmv08E	3,61	2,40
Mmv08B	3,61	3,18
Mmv08 Si	3,61	3,22
CSmv08O	0,96	0,98
CS mv08A	0,96	1,01
CSmv08C	0,96	1,07
CSmv08E	0,96	1,17
CSmv08B	0,96	0,69
Ms08si	0,31	0,28
Ms08F	0,31	0,00
Ms08P1	0,31	0,24
Ms08P2	0,31	0,00
Ms08FM	0,31	0,00
Mmv09H	1,23	1,35
Mmv09I	1,23	1,01
Mmv09J	1,23	1,09
Mmv09F	1,23	1,21
Mmv09K	1,23	1,00
Mmv09L	1,23	0,89
Mlaf09	0,66	0,54
Msg109	0,28	0,56
Msg609	1,23	0,87
Msg 1009	0,32	0,78
Msg1609	0,88	1,38
Msg1409	0,96	1,14
Msg809	0,69	1,39
Mbeaum09	0,53	1,45
Mlev09	0,34	1,87
Msol09	0,50	1,59

Annexe 2

3OHC6C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	0,29	1,35
Mhm1207	0,46	1,39
CSsg507	0,32	0,92
MmcO7	0,61	2,27
Msg1007	0,34	1,22
Msg707	0,31	0,71
Msg807	0,43	1,01
Mhm1307	0,34	1,37
Mhm607	0,29	2,71
Msg307	0,46	0,92
CShm 908	2,18	2,08
Mhm 1008	2,98	2,78
CSsg 1808	0,88	2,01
Msg 408	1,18	2,12
Msg 308	1,22	1,77
Msg 208	1,00	2,04
Mmv08D	2,97	3,09
Mmv08A	2,97	3,03
Mmv08C	2,97	3,12
Mmv08E	2,97	3,06
Mmv08B	2,97	2,99
Mmv08 Si	2,97	2,86
CSmv08O	1,64	1,80
CS mv08A	1,64	2,16
CSmv08C	1,64	1,98
CSmv08E	1,64	2,07
CSmv08B	1,64	2,30
Ms08si	0,60	1,24
Ms08F	0,60	0,71
Ms08P1	0,60	0,84
Ms08P2	0,60	0,71
Ms08FM	0,60	0,55
Mmv09H	6,08	20,52
Mmv09I	6,08	17,21
Mmv09J	6,08	5,28
Mmv09F	6,08	5,17
Mmv09K	6,08	4,56
Mmv09L	6,08	11,00
Mlaf09	0,68	1,11
Msg109	0,62	2,66
Msg609	0,52	2,36
Msg 1009	0,33	2,41
Msg1609	0,47	1,78
Msg1409	0,46	1,80
Msg809	0,51	2,14
Mbeaum09	0,60	3,05
Mlev09	0,57	4,03
Msol09	0,64	2,02

6OHC6C2 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	0,43	2,89
Mhm1207	0,43	2,95
CSsg507	nq	1,67
MmcO7	0,32	2,97
Msg1007	1,06	3,04
Msg707	0,37	2,39
Msg807	0,66	2,17
Mhm1307	0,23	2,60
Mhm607	nq	8,18
Msg307	nq	1,86
CShm 908	3,31	2,94
Mhm 1008	4,53	4,91
CSsg 1808	0,99	3,39
Msg 408	1,96	3,31
Msg 308	2,21	3,75
Msg 208	1,94	3,33
Mmv08D	4,75	4,42
Mmv08A	4,75	4,54
Mmv08C	4,75	4,51
Mmv08E	4,75	4,26
Mmv08B	4,75	5,12
Mmv08 Si	4,75	3,74
CSmv08O	3,21	2,62
CS mv08A	3,21	3,08
CSmv08C	3,21	2,76
CSmv08E	3,21	3,59
CSmv08B	3,21	2,75
Ms08si	nq	nq
Ms08F	nq	nq
Ms08P1	nq	nq
Ms08P2	nq	nq
Ms08FM	nq	nq
Mmv09H	4,84	4,52
Mmv09I	4,84	4,86
Mmv09J	4,84	5,28
Mmv09F	4,84	2,78
Mmv09K	4,84	5,09
Mmv09L	4,84	4,32
Mlaf09	1,31	1,97
Msg109	0,90	4,20
Msg609	0,72	5,68
Msg 1009	0,52	3,55
Msg1609	1,29	3,65
Msg1409	0,79	4,89
Msg809	1,59	4,16
Mbeaum09	0,00	1,52
Mlev09	2,14	3,87
Msol09	nq	2,20

Annexe 3 : Bilan analytique de la FML sur les esters majeurs

LE en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	8840	28297
Mhm1207	4150	24966
CSsg507	11588	47383
MmcO7	4194	28341
Msg1007	11700	38171
Msg707	9564	34840
Msg807	20524	41233
Mhm1307	5038	23810
Mhm607	4318	31243
Msg307	14147	38953
CShm 908	19911	32081
Mhm 1008	28697	35726
CSsg 1808	16969	63513
Msg 408	20064	53951
Msg 308	20336	51833
Msg 208	15501	53807
Mmv08D	31302	42177
Mmv08A	31302	47785
Mmv08C	31302	42189
Mmv08E	31302	40757
Mmv08B	31302	44802
Mmv08 Si	31302	39675
CSmv08O	33699	62392
CS mv08A	33699	67012
CSmv08C	33699	55333
CSmv08E	33699	62577
CSmv08B	33699	63155
Ms08si	21277	49805
Ms08F	21277	53684
Ms08P1	21277	50425
Ms08P2	21277	53684
Ms08FM	21277	47514
Mmv09H	6948	47351
Mmv09I	6948	46876
Mmv09J	6948	39584
Mmv09F	6948	35524
Mmv09K	6948	38022
Mmv09L	6948	39967
Mlaf09	6108	33430
Msg109	10152	43416
Msg609	11452	39644
Msg 1009	10375	41176
Msg1609	7060	40048
Msg1409	7411	43649
Msg809	6580	37028
Mbeaum09	5433	48352
Mlev09	7783	54181
Msol09	21100	33701

SDE en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	155	1170
Mhm1207	263	1427
CSsg507	123	689
MmcO7	324	2158
Msg1007	153	1071
Msg707	132	577
Msg807	211	708
Mhm1307	199	1469
Mhm607	168	3096
Msg307	225	704
CShm 908	2382	2120
Mhm 1008	2809	2382
CSsg 1808	743	1799
Msg 408	930	1822
Msg 308	1067	2030
Msg 208	776	1715
Mmv08D	2748	2995
Mmv08A	2748	2869
Mmv08C	2748	2783
Mmv08E	2748	2818
Mmv08B	2748	2953
Mmv08 Si	2748	2463
CSmv08O	1513	1835
CS mv08A	1513	1949
CSmv08C	1513	1913
CSmv08E	1513	2097
CSmv08B	1513	2242
Ms08si	376	985
Ms08F	376	585
Ms08P1	376	757
Ms08P2	376	585
Ms08FM	376	457
Mmv09H	868	3960
Mmv09I	868	3222
Mmv09J	868	710
Mmv09F	868	858
Mmv09K	868	558
Mmv09L	868	2225
Mlaf09	416	782
Msg109	506	2290
Msg609	390	2003
Msg 1009	292	1719
Msg1609	378	1859
Msg1409	407	1896
Msg809	337	1668
Mbeaum09	303	2918
Mlev09	403	3794
Msol09	306	1603

Annexe 3

MSE en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	14724	209855
Mhm1207	16139	214065
CSsg507	8462	118605
MmcO7	19527	219160
Msg1007	12800	209771
Msg707	13522	133634
Msg807	12442	88781
Mhm1307	14269	189703
Mhm607	16018	204781
Msg307	11956	78645
CShm 908	239347	201614
Mhm 1008	166116	156166
CSsg 1808	17782	191059
Msg 408	25548	189543
Msg 308	33538	194527
Msg 208	26943	214180
Mmv08D	163652	199416
Mmv08A	163652	202708
Mmv08C	163652	205435
Mmv08E	163652	202520
Mmv08B	163652	203554
Mmv08 Si	163652	181806
CSmv08O	187389	179985
CS mv08A	187389	188489
CSmv08C	187389	182107
CSmv08E	187389	178234
CSmv08B	187389	191040
Ms08si	9202	11796
Ms08F	9202	9175
Ms08P1	9202	11606
Ms08P2	9202	9175
Ms08FM	9202	7048
Mmv09H	35555	113707
Mmv09I	35555	120366
Mmv09J	35555	41510
Mmv09F	35555	23261
Mmv09K	35555	26263
Mmv09L	35555	53191
Mlaf09	28714	93165
Msg109	10005	146698
Msg609	11024	121056
Msg 1009	10954	122990
Msg1609	10559	120853
Msg1409	11362	127371
Msg809	11473	124882
Mbeaum09	17533	286063
Mlev09	34304	309263
Msol09	17195	112225

C2C2 en mg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	37,1	41,5
Mhm1207	44,3	44,2
CSsg507	30,7	32,4
MmcO7	28,7	31,7
Msg1007	36,6	37,4
Msg707	36,0	40,3
Msg807	35,1	38,2
Mhm1307	45,3	47,3
Mhm607	53,1	53,5
Msg307	37,8	36,5
CShm 908	35,9	37,3
Mhm 1008	40,6	43,3
CSsg 1808	34,8	40,0
Msg 408	47,4	41,9
Msg 308	44,9	48,3
Msg 208	59,5	50,2
Mmv08D	50,0	47,8
Mmv08A	50,0	44,2
Mmv08C	50,0	46,7
Mmv08E	50,0	44,9
Mmv08B	50,0	40,1
Mmv08 Si	50,0	44,4
CSmv08O	45,8	41,0
CS mv08A	45,8	42,4
CSmv08C	45,8	37,7
CSmv08E	45,8	38,7
CSmv08B	45,8	41,7
Ms08si	27,7	20,4
Ms08F	27,7	37,4
Ms08P1	27,7	nq
Ms08P2	27,7	nq
Ms08FM	27,7	nq
Mmv09H	7,0	12,5
Mmv09I	7,0	16,8
Mmv09J	7,0	26,3
Mmv09F	7,0	18,5
Mmv09K	7,0	20,6
Mmv09L	7,0	21,8
Mlaf09	20,6	20,2
Msg109	51,7	63,7
Msg609	62,1	68,7
Msg 1009	51,3	58,8
Msg1609	77,1	68,4
Msg1409	75,4	72,1
Msg809	71,0	73,2
Mbeaum09	8,0	29,9
Mlev09	4,7	8,2
Msol09	53,0	47,8

Annexe 4 : Bilan analytique de la FML sur les C13NI, lactones et linalol β -d en $\mu\text{g/l}$ β -i en $\mu\text{g/l}$

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	1,705	1,540
Msg1007	1,514	1,578
Msg807	1,626	1,497
CShm908	2,69	2,32
Mhm 1008	1,42	1,42
CSsg 1808	2,40	2,55
Msg 408	1,37	1,45
Msg 308	1,41	1,23
Msg 208	1,31	1,34
Mmv08D	1,558	1,523
Mmv08A	1,558	1,524
Mmv08C	1,558	1,465
Mmv08E	1,558	1,478
Mmv08B	1,558	1,488
Mmv08 Si	1,558	1,662
CSmv08O	2,863	2,800
CS mv08A	2,863	2,474
CSmv08C	2,863	2,795
CSmv08E	2,863	2,791
CSmv08B	2,863	2,716
Mmv09H	1,717	1,667
Mmv09I	1,717	1,396
Mmv09J	1,717	1,606
Mmv09F	1,717	2,001
Mmv09K	1,717	1,737
Mmv09L	1,717	1,579
Msg609	1,557	1,436
Msg 1009	1,418	1,446
Msg1609	1,332	1,339
Msg1409	1,069	1,260
Msg809	1,844	1,349
Ms08F	2,557	2,357
Ms08si	2,557	2,540
Mlaf09	2,596	2,473
Mbeaum09	4,387	4,059
Mlev09	2,353	1,737
Msol09	2,418	1,662

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	0,076	0,073
Msg1007	0,076	0,081
Msg807	0,083	0,084
CShm908	0,12	0,11
Mhm 1008	0,09	0,09
CSsg 1808	0,12	0,12
Msg 408	0,09	0,09
Msg 308	0,10	0,09
Msg 208	0,10	0,11
Mmv08D	0,099	0,106
Mmv08A	0,101	0,099
Mmv08C	0,101	0,094
Mmv08E	0,101	0,094
Mmv08B	0,101	0,097
Mmv08 Si	0,101	0,098
CSmv08O	0,101	0,101
CS mv08A	0,113	0,108
CSmv08C	0,113	0,092
CSmv08E	0,113	0,110
CSmv08B	0,113	0,110
Mmv09H	0,113	0,106
Mmv09I	0,158	0,152
Mmv09J	0,158	0,140
Mmv09F	0,158	0,144
Mmv09K	0,158	0,166
Mmv09L	0,158	0,152
Msg609	0,158	0,141
Msg 1009	0,122	0,124
Msg1609	0,113	0,120
Msg1409	0,164	0,158
Msg809	0,139	0,136
Ms08F	0,140	0,130
Ms08si	0,070	0,063
Mlaf09	0,070	0,081
Mbeaum09	0,083	0,081
Mlev09	0,136	0,114
Msol09	0,101	0,071

Annexe 4

 α -i en $\mu\text{g/l}$ β -dam en $\mu\text{g/l}$

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	0,070	0,088
Msg1007	0,064	0,047
Msg807	0,060	0,075
CShm908	0,06	0,07
Mhm 1008	0,07	0,07
CSsg 1808	0,06	0,07
Msg 408	0,06	0,07
Msg 308	0,08	0,06
Msg 208	0,06	0,05
Mmv08D	0,061	0,082
Mmv08A	0,061	0,096
Mmv08C	0,061	0,073
Mmv08E	0,061	0,075
Mmv08B	0,061	0,074
Mmv08 Si	0,061	0,088
CSmv08O	0,054	0,065
CS mv08A	0,054	0,048
CSmv08C	0,054	0,066
CSmv08E	0,054	0,049
CSmv08B	0,054	0,054
Mmv09H	0,166	0,121
Mmv09I	0,166	0,133
Mmv09J	0,166	0,107
Mmv09F	0,166	0,215
Mmv09K	0,166	0,143
Mmv09L	0,166	0,143
Msg609	0,106	0,077
Msg 1009	0,084	0,092
Msg1609	0,151	0,149
Msg1409	0,100	0,088
Msg809	0,141	0,092
Ms08F	0,116	0,121
Ms08si	0,116	0,091
Mlaf09	0,213	0,103
Mbeaum09	0,220	0,181
Mlev09	0,111	0,102
Msol09	0,142	0,088

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	0,015	0,008
Msg1007	0,011	0,016
Msg807	0,009	0,013
CShm908	0,011	0,008
Mhm 1008	0,011	0,011
CSsg 1808	0,012	0,013
Msg 408	0,010	0,012
Msg 308	0,012	0,011
Msg 208	0,012	0,010
Mmv08D	0,012	0,013
Mmv08A	0,012	0,015
Mmv08C	0,012	0,012
Mmv08E	0,012	0,013
Mmv08B	0,012	0,015
Mmv08 Si	0,012	0,010
CSmv08O	0,013	0,012
CS mv08A	0,013	0,011
CSmv08C	0,013	0,014
CSmv08E	0,013	0,013
CSmv08B	0,013	0,014
Mmv09H	0,018	0,020
Mmv09I	0,018	0,011
Mmv09J	0,018	0,016
Mmv09F	0,018	0,015
Mmv09K	0,018	0,014
Mmv09L	0,018	0,013
Msg609	0,014	0,016
Msg 1009	0,014	0,015
Msg1609	0,010	0,013
Msg1409	0,009	0,016
Msg809	0,015	0,017
Ms08F	0,014	0,018
Ms08si	0,014	0,027
Mlaf09	0,013	0,007
Mbeaum09	0,076	0,057
Mlev09	0,043	0,037
Msol09	0,015	0,010

Annexe 4

 γ -C8 en $\mu\text{g/l}$

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	0,883	0,941
Msg1007	0,883	1,123
Msg807	0,611	0,772
CShm908	1,27	1,22
Mhm 1008	1,63	1,65
CSsg 1808	0,83	0,79
Msg 408	1,22	1,19
Msg 308	1,28	1,10
Msg 208	0,96	0,93
Mmv08D	2,009	2,192
Mmv08A	2,009	1,901
Mmv08C	2,009	1,942
Mmv08E	2,009	1,957
Mmv08B	2,009	2,137
Mmv08 Si	2,009	2,287
CSmv08O	0,935	0,987
CS mv08A	0,935	0,831
CSmv08C	0,935	0,983
CSmv08E	0,935	0,954
CSmv08B	0,935	0,983
Mmv09H	1,835	1,845
Mmv09I	1,835	1,800
Mmv09J	1,835	1,847
Mmv09F	1,835	2,437
Mmv09K	1,835	1,941
Mmv09L	1,835	1,917
Msg609	0,876	0,920
Msg 1009	0,618	0,684
Msg1609	0,717	0,754
Msg1409	0,639	0,773
Msg809	0,730	0,779
Ms08F	1,130	0,620
Ms08si	1,130	0,876
Mlaf09	0,000	0,000
Mbeaum09	0,999	0,926
Mlev09	0,804	0,816
Msol09	1,441	2,287

 γ -C9 en $\mu\text{g/l}$

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	3,718	3,892
Msg1007	7,308	6,924
Msg807	4,666	5,058
CShm908	16,10	15,34
Mhm 1008	14,85	15,82
CSsg 1808	9,38	9,66
Msg 408	7,47	8,46
Msg 308	7,45	7,08
Msg 208	6,59	6,15
Mmv08D	16,673	16,563
Mmv08A	16,673	17,662
Mmv08C	16,673	16,059
Mmv08E	16,673	16,307
Mmv08B	16,673	16,117
Mmv08 Si	16,673	17,087
CSmv08O	8,623	9,134
CS mv08A	8,623	8,052
CSmv08C	8,623	8,385
CSmv08E	8,623	8,290
CSmv08B	8,623	8,916
Mmv09H	23,908	23,992
Mmv09I	23,908	22,699
Mmv09J	23,908	23,273
Mmv09F	23,908	26,198
Mmv09K	23,908	24,117
Mmv09L	23,908	21,877
Msg609	9,561	8,962
Msg 1009	5,065	5,187
Msg1609	5,203	5,268
Msg1409	4,622	5,722
Msg809	5,747	5,850
Ms08F	3,619	3,181
Ms08si	3,619	3,794
Mlaf09	3,601	3,252
Mbeaum09	6,742	6,404
Mlev09	4,611	4,502
Msol09	5,412	6,457

Annexe 4

 γ -C10 en $\mu\text{g/l}$

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	0,476	0,523
Msg1007	0,657	0,592
Msg807	0,437	0,497
CShm908	1,06	0,99
Mhm 1008	1,22	1,30
CSsg 1808	0,76	0,77
Msg 408	0,91	0,88
Msg 308	0,88	0,85
Msg 208	0,80	0,76
Mmv08D	1,291	1,359
Mmv08A	1,291	1,381
Mmv08C	1,291	1,398
Mmv08E	1,291	1,315
Mmv08B	1,291	1,279
Mmv08 Si	1,291	1,322
CSmv08O	0,873	0,876
CS mv08A	0,873	0,706
CSmv08C	0,873	0,773
CSmv08E	0,873	0,748
CSmv08B	0,873	0,791
Mmv09H	0,848	0,818
Mmv09I	0,848	0,746
Mmv09J	0,848	0,758
Mmv09F	0,848	0,924
Mmv09K	0,848	0,804
Mmv09L	0,848	0,802
Msg609	0,548	0,628
Msg 1009	0,477	0,501
Msg1609	0,400	0,407
Msg1409	0,388	0,477
Msg809	0,508	0,531
Ms08F	0,513	0,434
Ms08si	0,513	0,532
Mlaf09	0,425	0,374
Mbeaum09	0,528	0,513
Mlev09	0,896	0,696
Msol09	0,538	1,322

 γ -C11 en $\mu\text{g/l}$

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	0,076	0,076
Msg1007	0,108	0,090
Msg807	0,093	0,101
CShm908	0,11	0,10
Mhm 1008	0,11	0,12
CSsg 1808	0,10	0,11
Msg 408	0,11	0,10
Msg 308	0,10	0,09
Msg 208	0,08	0,08
Mmv08D	0,115	0,127
Mmv08A	0,115	0,127
Mmv08C	0,115	0,126
Mmv08E	0,115	0,121
Mmv08B	0,115	0,119
Mmv08 Si	0,115	0,120
CSmv08O	0,126	0,119
CS mv08A	0,126	0,096
CSmv08C	0,126	0,108
CSmv08E	0,126	0,105
CSmv08B	0,126	0,106
Mmv09H	0,120	0,106
Mmv09I	0,120	0,089
Mmv09J	0,120	0,111
Mmv09F	0,120	0,129
Mmv09K	0,120	0,113
Mmv09L	0,120	0,104
Msg609	0,071	0,076
Msg 1009	0,063	0,063
Msg1609	0,056	0,058
Msg1409	0,055	0,055
Msg809	0,064	0,075
Ms08F	0,058	0,050
Ms08si	0,058	0,076
Mlaf09	0,048	0,044
Mbeaum09	0,113	0,108
Mlev09	0,331	0,250
Msol09	0,089	0,120

Annexe 4

 γ -C12 en $\mu\text{g/l}$

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	0,092	0,098
Msg1007	0,092	0,099
Msg807	0,073	0,088
CShm908	0,11	0,10
Mhm 1008	0,12	0,13
CSsg 1808	0,10	0,12
Msg 408	0,14	0,14
Msg 308	0,13	0,13
Msg 208	0,14	0,13
Mmv08D	0,138	0,145
Mmv08A	0,138	0,155
Mmv08C	0,138	0,150
Mmv08E	0,138	0,144
Mmv08B	0,138	0,146
Mmv08 Si	0,138	0,141
CSmv08O	0,154	0,155
CS mv08A	0,154	0,123
CSmv08C	0,154	0,130
CSmv08E	0,154	0,136
CSmv08B	0,154	0,145
Mmv09H	0,128	0,115
Mmv09I	0,128	0,090
Mmv09J	0,128	0,119
Mmv09F	0,128	0,134
Mmv09K	0,128	0,116
Mmv09L	0,128	0,115
Msg609	0,064	0,082
Msg 1009	0,070	0,083
Msg1609	0,042	0,049
Msg1409	0,043	0,059
Msg809	0,053	0,072
Ms08F	0,124	0,084
Ms08si	0,124	0,116
Mlaf09	0,037	0,038
Mbeaum09	0,071	0,141
Mlev09	0,188	0,130
Msol09	0,065	1,861

 δ -C10 en $\mu\text{g/l}$

Vins	avant FML	après FML
Mhm607	1,779	2,681
Msg1007	4,435	4,010
Msg807	3,531	3,623
CShm908	3,23	3,03
Mhm 1008	4,41	4,35
CSsg 1808	3,04	3,19
Msg 408	4,36	4,61
Msg 308	4,39	4,62
Msg 208	4,32	4,30
Mmv08D	5,027	4,596
Mmv08A	5,027	4,830
Mmv08C	5,027	4,875
Mmv08E	5,027	4,972
Mmv08B	5,027	4,612
Mmv08 Si	5,027	4,793
CSmv08O	3,791	3,400
CS mv08A	3,791	2,914
CSmv08C	3,791	3,203
CSmv08E	3,791	3,260
CSmv08B	3,791	3,299
Mmv09H	4,236	3,675
Mmv09I	4,236	3,164
Mmv09J	4,236	3,549
Mmv09F	4,236	4,375
Mmv09K	4,236	3,709
Mmv09L	4,236	3,776
Msg609	3,216	2,625
Msg 1009	1,631	1,998
Msg1609	1,846	2,268
Msg1409	2,118	2,108
Msg809	2,725	2,647
Ms08F	2,404	1,992
Ms08si	2,404	2,229
Mlaf09	1,474	1,405
Mbeaum09	2,262	2,182
Mlev09	2,403	1,990
Msol09	2,282	4,793

Annexe 4

linalol en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	4,5	4,2
Mhm1207	3,5	3,4
CSsg507	3,1	4,1
MmcO7	9,6	10,8
Msg707	4,0	4,5
Mhm1307	2,3	3,4
Msg307	2,8	4,5
Mhm607	3,2	3,4
Msg1007	3,7	6,0
Msg807	2,6	3,4
CShm 908	5,0	9,3
Mhm 1008	13,3	13,7
CSsg 1808	8,9	19,8
Msg 408	5,8	14,6
Mmv08D	4,6	5,6
Mmv08A	4,6	3,9
Mmv08C	4,6	5,0
Mmv08E	4,6	5,6
Mmv08B	4,6	5,0
Mmv08 Si	4,6	5,6
CSmv08O	5,1	4,8
CS mv08A	5,1	5,2
CSmv08C	5,1	5,9
CSmv08E	5,1	5,5
CSmv08B	5,1	5,6
Mmv09H	2,7	3,2
Mmv09I	2,7	3,5
Mmv09J	2,7	3,1
Mmv09F	2,7	2,3
Mmv09K	2,7	1,7
Mmv09L	2,7	3,0
Msg609	5,0	9,3
Msg 1009	13,3	13,7
Msg1609	8,9	19,8
Msg1409	5,8	14,6
Ms08F	3,3	2,9
Ms08si	3,3	3,4
Ms08P1	3,3	3,5
Ms08P2	3,3	3,4
Ms08FM	3,3	2,9
Mlaf09	5,5	4,6
Mbeaum09	3,7	6,0
Msol09	5,4	5,6

Annexe 5 : Bilan analytique de la FML sur les acides branchés

iC4 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	1108	1108
Mhm1207	704	709
CSsg507	1354	1289
MmcO7	1302	1405
Msg1007	1153	1251
Msg707	1358	1352
Msg807	1401	1398
Mhm1307	720	718
Mhm607	630	584
Msg307	1326	1327
CShm 908	785	686
Mhm 1008	530	512
CSsg 1808	790	940
Msg 408	746	901
Msg 308	817	831
Msg 208	1128	1068
Mmv08D	503	829
Mmv08A	503	672
Mmv08C	503	645
Mmv08E	503	870
Mmv08B	503	573
Mmv08 Si	503	979
CSmv08O	1091	1290
CS mv08A	1091	1380
CSmv08C	1091	1328
CSmv08E	1091	1291
CSmv08B	1091	1477
Ms08si	1286	1199
Ms08F	1286	1218
Ms08P1	1286	1323
Ms08P2	1286	999
Ms08FM	1286	1218
Mmv09H	716	784
Mmv09I	716	687
Mmv09J	716	799
Mmv09F	716	716
Mmv09K	716	805
Mmv09L	716	642
Mlaf09	1792	1610
Msg109	1051	633
Msg609	1211	552
Msg 1009	1053	1219
Msg1609	1040	1384
Msg1409	1298	1360
Msg809	1455	1512
Mbeaum09	1613	1230
Mlev09	3142	3044
Msol09	1527	1558

iC5 en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	641	653
Mhm1207	532	583
CSsg507	586	576
MmcO7	860	975
Msg1007	552	620
Msg707	583	587
Msg807	545	534
Mhm1307	469	471
Mhm607	486	548
Msg307	585	580
CShm 908	527	470
Mhm 1008	381	338
CSsg 1808	388	453
Msg 408	476	521
Msg 308	518	524
Msg 208	533	577
Mmv08D	392	467
Mmv08A	392	422
Mmv08C	392	408
Mmv08E	392	466
Mmv08B	392	417
Mmv08 Si	392	495
CSmv08O	496	517
CS mv08A	496	576
CSmv08C	496	546
CSmv08E	496	593
CSmv08B	496	582
Ms08si	459	441
Ms08F	459	404
Ms08P1	459	483
Ms08P2	459	374
Ms08FM	459	404
Mmv09H	416	492
Mmv09I	416	377
Mmv09J	416	358
Mmv09F	416	401
Mmv09K	416	345
Mmv09L	416	366
Mlaf09	927	858
Msg109	591	786
Msg609	585	617
Msg 1009	668	766
Msg1609	587	772
Msg1409	655	739
Msg809	699	795
Mbeaum09	1048	1088
Mlev09	1314	1352
Msol09	1049	1075

Annexe 5

2mC4 en µg/l

Variations au cours FML de EEAB/AB (%)

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	134	200
Mhm1207	117	232
CSsg507	117	170
MmcO7	219	387
Msg1007	119	218
Msg707	132	187
Msg807	121	166
Mhm1307	99	215
Mhm607	107	342
Msg307	125	167
CShm 908	283	274
Mhm 1008	308	272
CSsg 1808	132	238
Msg 408	170	238
Msg 308	202	279
Msg 208	171	253
Mmv08D	307	317
Mmv08A	307	299
Mmv08C	307	322
Mmv08E	307	304
Mmv08B	307	327
Mmv08 Si	307	279
CSmv08O	226	238
CS mv08A	226	259
CSmv08C	226	247
CSmv08E	226	287
CSmv08B	226	282
Ms08si	116	162
Ms08F	116	123
Ms08P1	116	143
Ms08P2	116	130
Ms08FM	116	123
Mmv09H	491	1112
Mmv09I	491	807
Mmv09J	491	411
Mmv09F	491	457
Mmv09K	491	372
Mmv09L	491	663
Mlaf09	208	224
Msg109	163	347
Msg609	157	292
Msg 1009	189	312
Msg1609	161	299
Msg1409	173	283
Msg809	176	304
Mbeaum09	247	477
Mlev09	351	621
Msol09	242	359

Vins	iC4	iC5	2mC4
Msg1807	22	21	20
Mhm1207	17	15	7
CSsg507	67	38	51
MmcO7	106	61	79
Msg1007	-11	11	-7
Msg707	133	93	113
Msg807	27	36	27
Mhm1307	21	25	10
Mhm607	40	7	5
Msg307	35	34	31
CShm 908	9	4	5
Mhm 1008	1	6	4
CSsg 1808	-19	-12	-22
Msg 408	-18	-8	-16
Msg 308	-3	10	-5
Msg 208	23	-3	9
Mmv08D	-56	-25	-44
Mmv08A	-37	-2	-24
Mmv08C	-35	-7	-25
Mmv08E	-48	-15	-34
Mmv08B	-24	-12	-20
Mmv08 Si	-53	-33	-40
CSmv08O	-23	3	-18
CS mv08A	-22	-5	-17
CSmv08C	-24	-9	-20
CSmv08E	-21	-22	-22
CSmv08B	-40	-23	-36
Ms08si	11	8	10
Ms08F	3	15	8
Ms08P1	-25	-24	-42
Ms08P2	-6	-7	-21
Ms08FM	-29	1	-15
Mmv09H	2	3	7
Mmv09I	54	82	80
Mmv09J	86	83	61
Mmv09F	-26	-9	-6
Mmv09K	136	12	46
Mmv09L	242	26	102
Mlaf09	12	25	9
Msg109	-17	-22	-21
Msg609	-18	-23	-25
Msg 1009	-16	-11	-19
Msg1609	39	10	13
Msg1409	50	30	33
Msg809	5	10	3
Mbeaum09	13	9	5
Mlev09	22	21	20
Msol09	17	15	7

Annexe 6 : Bilan analytique de la FML sur les composés de la fraction lactique

diacétylène en mg/l

acétoïne en mg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	2,9	9,2
Mhm1207	1,4	4,9
CSsg507	7,2	13,1
MmcO7	1,3	5,5
Msg1007	3,9	6,3
Msg707	11,4	8,3
Msg807	6,2	9,0
Mhm1307	1,4	3,5
Mhm607	1,3	3,7
Msg307	6,2	6,4
CShm 908	4,8	14,5
Mhm 1008	3,6	9,2
CSsg 1808	2,1	19,1
Msg 408	5,5	15,8
Msg 308	4,3	14,5
Msg 208	4,4	14,2
Mmv08D	8,3	12,1
Mmv08A	8,3	12,7
Mmv08C	8,3	11,0
Mmv08E	8,3	12,4
Mmv08B	8,3	11,0
Mmv08 Si	8,3	12,2
CSmv08O	4,2	2,6
CS mv08A	4,2	5,1
CSmv08C	4,2	3,9
CSmv08E	4,2	8,4
CSmv08B	4,2	3,6
Ms08si	4,1	4,6
Ms08F	4,1	9,2
Mmv09H	2,2	6,6
Mmv09I	2,2	8,6
Mmv09J	2,2	11,7
Mmv09F	2,2	6,5
Mmv09K	2,2	13,8
Mmv09L	2,2	9,3
Mlaf09	1,1	3,2
Msg109	5,6	16,9
Msg609	6,3	13,4
Msg 1009	5,2	11,9
Msg1609	4,9	26,9
Msg1409	6,6	22,2
Msg809	10,9	25,6
Mbeaum09	1,0	1,8
Mlev09	1,0	1,6
Msol09	0,5	1,1

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	4,3	22,0
Mhm1207	6,7	22,7
CSsg507	8,1	22,6
MmcO7	6,2	17,1
Msg1007	6,6	22,2
Msg707	9,7	31,9
Msg807	12,6	27,0
Mhm1307	4,9	14,6
Mhm607	4,3	6,4
Msg307	7,9	28,5
CShm 908	36,2	73,2
Mhm 1008	21,0	43,1
CSsg 1808	6,1	19,6
Msg 408	8,4	28,2
Msg 308	9,1	33,8
Msg 208	9,7	31,0
Mmv08D	41,4	56,6
Mmv08A	41,4	51,9
Mmv08C	41,4	54,7
Mmv08E	41,4	23,0
Mmv08B	41,4	53,9
Mmv08 Si	41,4	57,7
CSmv08O	7,9	10,7
CS mv08A	7,9	12,4
CSmv08C	7,9	9,6
CSmv08E	7,9	15,0
CSmv08B	7,9	6,4
Ms08si	3,8	17,5
Ms08F	3,8	10,4
Mmv09H	11,8	25,6
Mmv09I	11,8	25,2
Mmv09J	11,8	28,4
Mmv09F	11,8	26,4
Mmv09K	11,8	26,7
Mmv09L	11,8	27,2
Mlaf09	10,0	23,1
Msg109	3,5	11,7
Msg609	0,3	26,4
Msg 1009	1,3	11,8
Msg1609	2,6	16,0
Msg1409	2,9	16,5
Msg809	4,0	22,7
Mbeaum09	2,2	14,4
Mlev09	3,9	11,9
Msol09	3,1	9,3

Annexe 6

butan-2,3-diol en mg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	72,0	85,2
Mhm1207	79,6	99,3
CSsg507	70,9	95,8
MmcO7	101,4	102,2
Msg1007	83,2	88,3
Msg707	90,6	95,6
Msg807	93,5	82,9
Mhm1307	84,2	89,0
Mhm607	75,8	97,1
Msg307	74,0	95,9
CShm 908	207,9	188,6
Mhm 1008	180,2	209,3
CSsg 1808	180,5	156,0
Msg 408	226,2	171,2
Msg 308	236,7	245,2
Msg 208	219,4	244,0
Mmv08D	188,5	182,6
Mmv08A	188,5	189,8
Mmv08C	188,5	212,5
Mmv08E	188,5	185,1
Mmv08B	188,5	214,1
Mmv08 Si	377,0	399,1
CSmv08O	122,0	235,2
CS mv08A	122,0	209,9
CSmv08C	122,0	234,9
CSmv08E	122,0	198,8
CSmv08B	122,0	249,9
Ms08si	101,5	172,3
Ms08F	101,5	196,1
Mmv09H	448,3	443,4
Mmv09I	448,3	440,3
Mmv09J	448,3	462,2
Mmv09F	448,3	448,6
Mmv09K	448,3	450,4
Mmv09L	448,3	453,8
Mlaf09	85,2	89,1
Msg109	72,4	75,0
Msg609	9,4	98,7
Msg 1009	62,8	76,5
Msg1609	79,3	18,1
Msg1409	129,2	114,2
Msg809	108,7	117,4
Mbeaum09	121,4	135,9
Mlev09	158,1	179,9
Msol09	144,1	145,9

méthylglyoxal en mg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	0,22	0,34
Mhm1207	0,35	0,48
CSsg507	0,31	56,81
MmcO7	2,06	1,29
Msg1007	0,30	0,19
Msg707	3,16	0,45
Msg807	0,71	0,25
Mhm1307	0,18	0,33
Msg307	0,51	0,52
CShm 908	0,99	1,30
Mhm 1008	0,30	0,81
CSsg 1808	1,78	0,44
Msg 408	0,46	0,68
Msg 308	0,35	0,68
Msg 208	0,44	0,52
Mmv08D	0,35	1,10
Mmv08A	0,35	1,84
Mmv08C	0,35	0,80
Mmv08E	0,35	0,94
Mmv08B	0,35	1,35
Mmv08 Si	0,35	0,89
CSmv08O	1,72	1,26
CS mv08A	1,72	0,83
CSmv08C	1,72	0,62
CSmv08E	1,72	0,59
CSmv08B	1,72	2,59
Ms08si	0,87	0,80
Ms08F	0,87	0,67
Mmv09H	0,41	0,58
Mmv09I	0,41	0,49
Mmv09J	0,41	0,45
Mmv09F	0,41	0,35
Mmv09K	0,41	0,49
Mmv09L	0,41	0,47
Mlaf09	0,39	0,57
Msg109	0,33	0,52
Msg609	0,38	0,45
Msg 1009	0,44	0,39
Msg1609	0,42	0,49
Msg1409	0,48	0,63
Msg809	0,41	0,66
Mbeaum09	0,02	0,04
Mlev09	0,09	0,17
Msol09	0,03	0,04

Annexe 6

acétol en mg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	23,8	20,9
Mhm1207	33,6	37,7
CSsg507	18,7	22,0
MmcO7	13,3	21,1
Msg1007	19,8	40,3
Msg707	57,2	37,6
Msg807	12,4	16,4
Mhm1307	25,2	28,9
Mhm607	30,3	20,6
Msg307	14,9	19,1
CShm 908	9,9	10,4
Mhm 1008	11,5	12,0
CSsg 1808	8,5	9,6
Msg 408	18,9	35,5
Msg 308	20,9	24,6
Msg 208	17,1	17,5
Mmv08D	16,3	25,9
Mmv08A	16,3	22,6
Mmv08C	16,3	22,0
Mmv08E	16,3	23,5
Mmv08B	16,3	22,7
Mmv08 Si	16,3	19,3
CSmv08O	10,9	17,3
CS mv08A	10,9	25,8
CSmv08C	10,9	21,6
CSmv08E	10,9	23,7
CSmv08B	10,9	13,5
Ms08si	3,1	9,0
Ms08F	3,1	7,5
Mmv09H	182,0	204,2
Mmv09I	182,0	181,2
Mmv09J	182,0	180,5
Mmv09F	182,0	188,6
Mmv09K	182,0	183,5
Mmv09L	182,0	184,2
Mlaf09	77,7	82,6
Msg109	2,7	1,5
Msg609	0,2	1,7
Msg 1009	0,8	1,9
Msg1609	4,7	12,0
Msg1409	8,3	12,0
Msg809	11,5	14,9
Mbeaum09	69,5	64,9
Mlev09	124,6	146,5
Msol09	82,7	67,3

pentan-2,3-dione en mg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	0,41	0,25
Mhm1207	0,17	0,05
CSsg507	0,58	0,33
MmcO7	0,13	0,09
Msg1007	0,36	0,17
Msg707	0,21	0,14
Msg807	0,31	0,18
Mhm1307	0,19	0,06
Mhm607	0,23	0,14
Msg307	0,34	0,35
CShm 908	0,21	0,28
Mhm 1008	0,14	0,15
CSsg 1808	0,28	0,43
Msg 408	0,75	0,35
Msg 308	0,73	0,36
Msg 208	0,82	0,45
Mmv08D	0,11	0,35
Mmv08A	0,11	0,39
Mmv08C	0,11	0,40
Mmv08E	0,11	0,38
Mmv08B	0,11	0,39
Mmv08 Si	0,11	0,14
CSmv08O	0,22	0,16
CS mv08A	0,22	0,14
CSmv08C	0,22	0,15
CSmv08E	0,22	0,26
CSmv08B	0,22	0,18
Ms08si	0,85	0,48
Ms08F	0,85	0,80
Mmv09H	0,86	0,32
Mmv09I	0,86	0,34
Mmv09J	0,86	0,59
Mmv09F	0,86	0,61
Mmv09K	0,86	0,66
Mmv09L	0,86	0,44
Mlaf09	0,84	0,98
Msg109	0,57	0,49
Msg609	0,61	0,34
Msg 1009	0,56	0,68
Msg1609	0,69	0,55
Msg1409	0,62	0,32
Msg809	0,74	0,33
Mbeaum09	0,23	0,08
Mlev09	0,26	0,10
Msol09	0,13	0,04

Annexe 7 : Bilan analytique de la FML sur les composés soufrés légers, l'éthanal et les alcools supérieurs

DMS en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	3,4	3,7
Mhm1207	3,3	4,9
CSsg507	3,0	3,5
MmcO7	4,5	5,3
Msg1007	2,2	4,1
Msg707	2,7	4,3
Msg807	4,0	5,0
Mhm1307	3,3	5,4
Mhm607	3,0	3,7
Msg307	3,6	4,0
CShm 908	6,7	6,1
Mhm 1008	7,4	7,2
CSsg 1808	6,9	6,9
Msg 408	6,5	7,0
Msg 308	7,2	7,1
Msg 208	7,0	7,4
Mmv08D	7,6	7,9
Mmv08A	7,6	7,9
Mmv08C	7,6	8,1
Mmv08E	7,6	7,0
Mmv08B	7,6	8,2
Mmv08 Si	7,6	7,3
CSmv08O	7,0	6,9
CS mv08A	7,0	7,7
CSmv08C	7,0	7,5
CSmv08E	7,0	7,3
CSmv08B	7,0	7,2
Ms08si	13,4	17,6
Ms08F	13,4	15,5
Ms08P1	13,4	14,0
Ms08P2	13,4	13,6
Ms08FM	13,4	15,7
Mmv09H	3,7	5,1
Mmv09I	3,7	5,8
Mmv09J	3,7	4,0
Mmv09F	3,7	4,5
Mmv09K	3,7	3,7
Mmv09L	3,7	4,7
Mlaf09	3,1	2,9
Msg109	2,7	3,9
Msg609	2,5	3,6
Msg 1009	2,7	3,4
Msg1609	3,5	4,2
Msg1409	2,7	4,1
Msg809	3,0	3,8
Mbeaum09	1,9	2,7
Mlev09	2,0	2,7
Msol09	3,6	3,6

H₂S en µg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	2,3	2,2
Mhm1207	1,6	3,3
CSsg507	2,6	2,0
MmcO7	2,4	2,3
Msg1007	1,9	2,5
Msg707	2,3	2,5
Msg807	2,5	2,8
Mhm1307	1,4	2,5
Mhm607	2,3	2,2
Msg307	2,0	1,9
CShm 908	1,8	2,8
Mhm 1008	3,1	2,3
CSsg 1808	1,8	1,6
Msg 408	1,6	1,9
Msg 308	1,4	3,1
Msg 208	2,5	2,3
Mmv08D	0,9	1,2
Mmv08A	0,9	1,9
Mmv08C	0,9	1,7
Mmv08E	0,9	0,6
Mmv08B	0,9	1,5
Mmv08 Si	0,9	0,8
CSmv08O	1,1	1,2
CS mv08A	1,1	1,3
CSmv08C	1,1	1,2
CSmv08E	1,1	1,0
CSmv08B	1,1	1,0
Ms08si	4,5	2,8
Ms08F	4,5	1,9
Ms08P1	4,5	nq
Ms08P2	4,5	nq
Ms08FM	4,5	nq
Mmv09H	2,7	4,0
Mmv09I	2,7	6,3
Mmv09J	2,7	3,7
Mmv09F	2,7	4,9
Mmv09K	2,7	3,2
Mmv09L	2,7	2,7
Mlaf09	3,6	2,4
Msg109	2,0	2,6
Msg609	2,8	2,4
Msg 1009	2,4	1,6
Msg1609	3,2	2,9
Msg1409	3,2	4,1
Msg809	3,2	2,9

Annexe 7

Ethanal en mg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	11,5	1,5
Mhm1207	12,2	3,6
CSsg507	1,9	0,0
MmcO7	9,8	5,1
Msg1007	6,6	2,3
Msg707	7,7	1,7
Msg807	10,5	1,8
Mhm1307	12,0	2,6
Mhm607	23,6	4,5
Msg307	7,3	2,3
CShm 908	23,3	11,1
Mhm 1008	15,2	7,9
CSsg 1808	4,1	2,1
Msg 408	25,2	3,3
Msg 308	10,9	7,4
Msg 208	4,6	8,0
Mmv08D	14,6	3,7
Mmv08A	14,6	4,3
Mmv08C	14,6	7,2
Mmv08E	14,6	5,9
Mmv08B	14,6	8,2
Mmv08 Si	14,6	4,8
CSmv08O	1,6	2,0
CS mv08A	1,6	2,1
CSmv08C	1,6	2,6
CSmv08E	1,6	2,7
CSmv08B	1,6	2,3
Ms08si	15,3	9,6
Ms08F	15,3	4,6
Ms08P1	15,3	6,0
Ms08P2	15,3	6,2
Ms08FM	15,3	7,5
Mmv09H	66,9	49,4
Mmv09I	66,9	52,4
Mmv09J	66,9	64,2
Mmv09F	66,9	55,3
Mmv09K	66,9	57,3
Mmv09L	66,9	58,9
Mlaf09	45,1	14,5
Msg109	19,6	18,7
Msg609	19,0	19,0
Msg 1009	16,2	15,9
Msg1609	17,4	19,2
Msg1409	17,4	18,0
Msg809	14,0	19,3
Mbeaum09	21,5	8,0
Mlev09	14,4	18,6
Msol09	19,7	10,2

Alcools supérieurs totaux en mg/l

Vins	avant FML	après FML
Msg1807	518	502
Mhm1207	430	451
CSsg507	589	575
MmcO7	406	392
Msg1007	472	496
Msg707	486	465
Msg807	538	492
Mhm1307	428	409
Mhm607	379	393
Msg307	478	489
CShm 908	485	489
Mhm 1008	452	434
CSsg 1808	489	523
Msg 408	480	544
Msg 308	474	433
Msg 208	467	497
Mmv08D	372	333
Mmv08A	372	377
Mmv08C	372	360
Mmv08E	372	358
Mmv08B	372	536
Mmv08 Si	372	350
CSmv08O	472	507
CS mv08A	472	542
CSmv08C	472	421
CSmv08E	472	523
CSmv08B	472	668
Ms08si	476	457
Ms08F	476	464
Ms08P1	476	452
Ms08P2	476	467
Ms08FM	476	462
Mmv09H	127	135
Mmv09I	127	132
Mmv09J	127	140
Mmv09F	127	136
Mmv09K	127	136
Mmv09L	127	137
Mlaf09	330	330
Msg109	653	650
Msg609	639	632
Msg 1009	616	636
Msg1609	620	663
Msg1409	637	627
Msg809	589	688

