THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Biochimie et physicochimie alimentaire

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Portée par
Unité Mixte de recherche Sciences Pour l'Œnologie (UMR-SPO)

Incidence de la viticulture biologique sur la genèse des thiols variétaux dans les vins de Côtes de Gascogne

Présentée par Gabriel DOURNES

Le 16 décembre 2022

Sous la direction de Jean-Roch MOURET

Devant le jury composé de

Sonia COLLIN, Professeur, UCLouvain, Belgique	Rapporteur
Stéphanie HEUX, Directrice de recherche, Toulouse Biotechnology Institute, France	Rapporteur
Laurent TORREGROSA, Professeur, Institut Agro, France	Président de Jury
Philippe COTTEREAU, Ingénieur de recherche, IFV, France	Examinateur
Jean-Roch MOURET, Directeur de recherche, INRAE, France	Directeur de thèse
Aurélie ROLAND, Maître de conférence, Institut Agro, France	Co-encadrante de thèse
Alain DESPRATS, Directeur du syndicat des producteurs de Côtes de Gascogne	Invité
Thierry DUFOURCQ, Ingénieur de recherche, IFV, France	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

L'INSTITUT agro Montpellier

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Mme Sonia Collin, Mme Stéphanie Heux, M. Laurent Torregrosa et M. Philippe Cottereau pour avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier le Syndicat des Côtes de Gascogne pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce travail. Je souhaite remercier Jean-Roch Mouret et Aurélie Roland pour m'avoir accompagné et encadré tout au long de ce projet. Je vous remercie également pour toutes les connaissances et compétences que vous m'avez permis d'acquérir. Je souhaite également remercier Thierry Dufourcq pour son encadrement lors des vendanges et pour son soutien tout au long de ce projet. Merci aussi à Frédéric Lopez pour son aide lors de ces trois années de vendanges. Mais aussi pour les très bons moments que nous avons passés tous ensemble.

Un grand merci à toutes les personnes ayant participé à ce projet, de près ou de loin, des équipes BIO et FLAM auxquelles j'appartiens mais aussi à celles de l'équipe ADEL, au PTV et à la PFP. Merci également à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer lors de ce projet pour nos discussions et les bons moments passés ensemble. Merci à Lucas Suc pour son aide en chimie organique et en chimie analytique. Et promis je rangerai le laboratoire ! Merci à Christine Le Guernevé pour son aide précieuse en RMN sans qui je n'aurais pu mener à bien une partie de ce travail. Je souhaite également remercier Somaya pour son aide lors de son stage, sa bonne humeur et son enthousiasme au quotidien.

Je souhaite ensuite remercier Rémi, Léa, Alice pour m'avoir supporté durant toutes ces années. Merci pour les très bons moments passés ensemble, pour les fous rires, les discussions sans fin, votre soutien moral mais aussi pour votre aide et les sessions tableaux.

Léa je ne peux pas ne pas te remercier particulièrement, merci pour avoir été là tout le long de cette thèse, de m'avoir soutenu, aidé dans mes choix et mes idées. Que ce soit face à face au bureau ou à distance lors des vendanges, on aura formé un sacré binôme et fait une bonne partie de nos deux thèses ensemble, et pour tout ça merci.

Merci à Joséphine, Charlie et Olivier et d'avoir été là dès mon arrivée malgré mon caractère, merci de m'avoir accueilli, merci de votre soutien, merci pour tous les bons moments ensemble. Merci aussi à Teddy, Ludovic, Cécile, Saul, Lauriane, Angèle, Marta, Giovana, Rafa, Irène, Carmen, Luca, Valérie et Pascale et encore bien d'autres que j'ai eu la chance de côtoyer tout au long de ce temps passé ici et avec qui j'ai passé d'excellents moments et je l'espère plein d'autres à venir. Merci Cécile Chenot pour m'avoir fait découvrir le monde de la bière, même si on ne s'est croisé que tard cela a toujours été un plaisir d'échanger avec toi sur nos travaux et j'espère que cela continuera.

Je souhaite également remercier tout particulièrement Hélène sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, merci de ton soutien, merci de m'avoir accompagné, merci pour nos moments de rigolade et de complicité au labo comme en dehors.

Finalement je souhaite remercier ma famille pour leur soutien et leur présence. Merci de m'avoir permis de réaliser mon rêve, de m'avoir permis d'arriver là où je suis aujourd'hui.

Valorisation des travaux de recherche

Publications à comité de lecture

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

Dournes, G., Dufourcq, T., Suc, L., Roland, A. and Mouret, J.R. (2022). **Unravelling copper effect on the production of varietal thiols during fermentation of Colombard and Gros Manseng grape juices by *Saccharomyces cerevisiae***. Soumis dans le journal Frontiers in Food Microbiology (Octobre 2022)

Dournes, G., Sachot, S., Suc, L., Le-Guernevé, C., Mouret, J. R., & Roland, A. (2022). **New light on the varietal thiols pathway during alcoholic fermentation: role of 3-S-(N-acetyl-cysteinyl)-hexan-1-ol (NAC3SH)**. Soumis au Journal of Agriculture and Food Chemistry (Juillet 2022)

Casalta, E., Sabatier, C., Girardi-Piva, G., Roland, A., Dournes, G., Mouret, J. R. (2022). **Impact of phytosterol content on fermentation progress and fermentative aromas synthesis during alcoholic fermentation.** Soumis dans le journal American Journal of Enology and Viticulture (Juillet 2022)

Congrès internationaux

Dournes, G., Casalta, E., Samson, A., Aguera, E., Mouret, J. R., & Roland, A. **Characterization of the thiol aromatic potential of a new resistant grape variety: Floreal.** Terroir – Virtuel –, Adélaïde (Australie), 17-18 Novembre 2020.

Dournes, G., Verbaere, A., Dufourcq, T., Mouret, J. R., & Roland, A. **Characterization of thiol aromatic potential of Colombard and Gros Manseng grapes from Côtes de Gascogne in organic vineyards**. Macrowine – Virtuel –, Vérone (Italie), 23-30 Juin 2021.

Dournes, G., Sachot, S., Suc, L., Le-Guernevé, C., Mouret, J. R., & Roland, A. **New insights on thiol precursors catabolism by yeast during wine fermentation: identification of the N-Acetyl-L-Cysteine conjugate.** In Vino Analytica Scientia, Neustadt an der Weinstraße (Allemagne), 3-7 Juillet 2022.

Roland, A., Dournes, G., Suc, L., Sachot, S., Dufourcq, T., Mouret, J. R., Wilhelm, L., Pellegrino, A., Ojeda, H., Torregrosa, L., Wang, X., Capone, D. L., Jeffery, D. W. **Varietal thiols: from vine to wine.** Montpellier Vine & Wine sciences international seminar, Montpellier (France), 11-13 Octobre 2022.

Congrès technique

Dournes, G., Verbaere, A., Dufourcq, T., Mouret, J. R., & Roland, A. **Impact du mode de culture sur le potentiel aromatique de type thiol du Colombard et du Gros Manseng**. JSVV Montpellier (France), 17 Mars 2022

Abréviations

3SH : 3-sulfanyl-hexanol

3SHA : acétate de 3-sulfanyl-hexyle

4MSP : 4-méthyl-4-sulfanyl-pentan-2-one

G3SH : *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-glutathion

G3SHal : *S*-(1-oxohexan-3-yl)-glutathion

γ-GluCys3SH: γ-glutamyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine

CysGly3SH : *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéinylglycine

Cys3SH : *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine

NAC3SH : *N*-acétyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine

G4MSP : *S*-(2-methyl-4-oxopentan-2-yl)-glutathion

Cys4MSP : *S*-(2-methyl-4-oxopentan-2-yl)-cystéine

TFA : Acide trifluoroacétique

TES : Triéthylsilane

NPM : *N*-phénylmaléimide

TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)-phosphine

INTRODUCTION GENERALE **9**

REVUE DE LITTERATURE **13**

I. Origines des thiols variétaux **17**

a. Origine de l'hex-2-enal 17

b. Précurseurs glutathionylés 18

c. Précurseurs dipeptidiques 19

d. Précurseur cystéinylé 20

e. Voie des C6 22

f. Occurrence dans les cépages 22

g. Pilotage viticole des précurseurs de thiols 24

h. Pilotage œnologique des précurseurs de thiols 25

II. Des précurseurs aux thiols **27**

a. Interconversions des précurseurs 27

b. Devenir des thiols après fermentation 30

c. Rendement de conversion 31

III. Le cuivre **32**

a. Le cuivre en viticulture 33

b. Le cuivre dans la levure 35

c. Le cuivre en œnologie 40

MATERIELS ET METHODES **41**

I. Parcelles **41**

II. Echantillonnage à la parcelle **42**

a. Millésime 2019 42

b. Millésime 2020 43

c. Millésime 2021 43

III. Opérations pré-fermentaires **43**

IV. Conduite des fermentations alcooliques **44**

a. Echelle laboratoire : 250 mL 44

b. Echelle expérimentale : 3 L 44

c. Echelle expérimentale : 20 L 45

V. Moût synthétique **46**

VI. Outils de synthèse organique **49**

a. Chromatographie gazeuse 49

b. Chromatographie liquide 49

c. RMN 50

d. HPLC préparative 50

VII. Synthèses chimiques des standards analytiques **51**

a. (E)-hex-2-enal-d_2 51

b. *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-glutathion 51

c. *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d_2)-glutathion 52

d. *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine 53

e. *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d_2)-cystéine 54

f. *S*-(2-methyl-4-oxopentan-2-yl)-glutathion 55

g. *S*-(2-(methyl-d_3)-4-oxopentan-2-yl-1,1,1,3,5,5,5-d_7)-glutathion 56
h. *S*-(2-methyl-4-oxopentan-2-yl)-cystéine 56
i. *S*-(2-(methyl-d_3)-4-oxopentan-2-yl-1,1,1,3,5,5,5-d_7)-cystéine 57
j. *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéinylglycine 58
k. *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d_2)-cystéinylglycine 58
l. γ-glutamyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine 59
m. γ -glutamyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d_2)-cystéine 60
n. *N*-acétyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine 60
o. 3-sulfanylhexan-2,3-d_2-1-ol 61
p. Acétate-d_3 de 3-sulfanylhexyle 62
VIII. Analyses chimiques 63
a. Analyse des métabolites fermentaires par HPLC 63
b. Analyses des paramètres œnologiques 63
c. Analyse du cuivre 63
d. Analyses des précurseurs de thiols 63
e. Analyse des thiols variétaux 68
IX. Modélisation chimique 69
X. Statistiques 69

01 CARACTERISATION DES PRECURSEURS DE THIOLS DANS LE COLOMBARD ET LE GROS MANSENG 71

02 EXTRACTION ET REVELATION DU POTENTIEL THIOL LORS DE LA VINIFICATION 89

03 LES VOIES D'INTERCONVERSION DES PRECURSEURS DE THIOLS DANS LA LEVURE 125

DISCUSSION GENERALE & CONCLUSION 157

LISTE DES FIGURES 165

LISTE DES TABLEAUX 167

LISTE DES EQUATIONS 167

BIBLIOGRAPHIE 168

Introduction générale

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le syndicat des Côtes de Gascogne, l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) et le l'Unité Mixte de Recherche « Sciences pour l'œnologie » (UMR-SPO) dont les tutelles de rattachement sont l'Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), l'Institut Agro Montpellier et l'Université de Montpellier. Ce projet vise à comprendre le lien entre la viticulture biologique et une diminution de l'intensité aromatique des vins blancs des Côtes de Gascogne.

Aujourd'hui, on assiste à une forte évolution des habitudes de consommation des produits issus de la filière vigne-vin. Dans ce contexte, les vins biologiques sont devenus des produits d'intérêt et recherchés, orientant ainsi les marchés. En France, la vente de boissons alcoolisées « bio » en 2021 représente 1,3 milliard d'euros, soit une augmentation de 10 % par rapport à 2020. Cette augmentation est due à la vente directe qui représente à elle seule 44 % des ventes (Agence BIO / ANDI). La préférence des consommateurs pour ces produits plus " naturels " ainsi que l'augmentation de la prise en compte de l'environnement poussent chaque année de plus en plus de vignerons à convertir leur production en bio. Ainsi, en 2021, une augmentation de près de 21 % des parcelles en conversion bio a été enregistrée par rapport à 2020, soit 69600 hectares en conversion pour un total de 90 298 hectares déjà certifiés (Agence Bio / Organismes certificateurs). Le Gers, principal département de l'appellation Côtes de Gascogne, a pris beaucoup de retard dans cette conversion nationale. En effet, entre 2020 et 2021, malgré une augmentation de 34 %, les surfaces certifiées et en conversion ne représentent que 1500 ha. Cette surface place le département en 24ème position au niveau national.

Plus en détail, la production viticole de l'appellation Côtes de Gascogne présente un profil assez atypique. En effet, cette Indication Géographique Protégée (IGP) produit 85 % de vin blanc issu de deux cépages principaux, le Colombard et le Gros Manseng. Ces deux variétés sont connues pour leurs arômes thiolés qui apportent aux vins des notes de pamplemousse et de fruit de la passion. Ce sont ces arômes, et plus précisément leur présence en grande quantité, qui confèrent aux vins des Côtes de Gascogne leur puissance aromatique et leur typicité.

Les cépages étudiés (Colombard et Gros Manseng) présentent le 3-sulfanylhexanol (3SH) et l'acétate de 3-sulfanylhexanyl (3SHA) comme les thiols variétaux majoritaires, avec respectivement le pamplemousse et le fruit de la passion comme descripteurs sensoriels. Un troisième thiol, le 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP), à l'odeur de bourgeon de cassis a été identifié dans certains vins de Colombard mais n'a pas été considéré dans cette étude car il ne représente pas les notes aromatiques caractéristiques de l'appellation. Ces arômes sont

présents dans le raisin sous forme de précurseurs inodores qui nécessitent l'action des levures pendant la fermentation alcoolique pour produire les thiols que l'on retrouve dans les vins.

Empiriquement, la production de thiols lors de la vinification est plus compliquée pour les parcelles en conversion ou certifiées bio que dans les parcelles conventionnelles. Ceci soulève la question principale :

Quelle est l'incidence de la viticulture biologique sur la genèse des thiols variétaux dans les vins de Côtes de Gascogne ?

De précédents travaux (Darriet *et al.*, 2001; Hatzidimitriou *et al.*, 1996) ont permis de cibler, dans le cadre de la pratique biologique, le cuivre comme étant responsable de cette perte aromatique. Cette étude a mis en évidence une diminution de la quantité des thiols dans les vins de Sauvignon blanc dont les parcelles étaient traitées à la bouillie bordelaise. Comme cet élément est présent tout au long de la vinification, le projet de thèse a été structuré en trois parties articulées autour des étapes clés de ce processus.

Dans le chapitre 1, il a été considéré que le cuivre pouvait avoir un effet sur la quantité de précurseurs de thiols produits par la vigne dès son application sur la parcelle ainsi que sur leur accumulation dans les raisins au cours de la maturation. Pour étudier ces possibilités, un réseau de 40 parcelles a été mis en place afin de couvrir les différentes pratiques et zones géographiques de l'appellation sur 3 millésimes (2019-2021). Les objectifs de ce réseau sont multiples :

- Caractérisation du potentiel aromatique de type thiol deux cépages emblématiques de l'IGP Côtes de Gascogne afin de combler le manque d'informations dans la littérature.
- Comparaison des modes de culture et de leurs impacts sur ce potentiel aromatique, tant au cours de la maturation du raisin qu'au moment de la récolte.

Les résultats issus de ce réseau parcellaire ont été valorisés sous forme d'article dans l'Australian Journal of Grape and Wine Research et de communication orale au congrès Macrowine (2020).

Dans le chapitre 2, il s'est posé la question de l'effet du cuivre lors des étapes pré-fermentaires et fermentaires. Pour cela, la vinification de raisins issus de 12 parcelles (issues du réseau précédent) a été réalisée lors des vendanges 2019 pour étudier le comportement de différentes matrices lors des étapes pré-fermentaires. Dans l'optique d'isoler l'effet du cuivre d'un effet plus global de la matière première (azote, sucre, précurseurs), les fermentations ont été réalisés à partir d'un même moût issu de culture conventionnelle. Cette matière première nous a permis de réaliser des fermentations en moût naturel où seule la concentration en cuivre

varie. Les résultats de ce travail ont été soumis sous forme d'article scientifique à la revue scientifique Frontiers in Food Microbiology.

Dans le chapitre 3, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au comportement de la levure par rapport au cuivre lors de la fermentation alcoolique. Dans la levure le voie de dégradation des précurseurs de thiols est très apparenté à la voie de détoxification des xénobiotiques. En poursuivant l'analogie entre ces deux voies nous avons pu définir de potentiels nouveaux intermédiaires de précurseurs dans la voie de dégradation. Un d'entre eux a pu être identifié lors d'essais de fermentation en présence de cuivre dans un moût synthétique. L'utilisation de cette matrice nous a permis de finement contrôler la composition du milieu afin de la simplifier par rapport à un moût de raisin naturel. Ce travail a été valorisé par un article scientifique, en cours de relecture auprès du Journal of Agriculture and Food Chemistry et d'une communication orale au congrès IVAS (2022).

Revue de littérature

Le vin est d'après l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) « une boisson résultant de la fermentation alcoolique complète ou partielle du raisin frais, foulé ou non, ou du moût de raisin ». Le processus de fabrication (Figure 1) appelé vinification correspond à toutes les étapes spontanées ou provoquées entre le raisin et le vin fini.

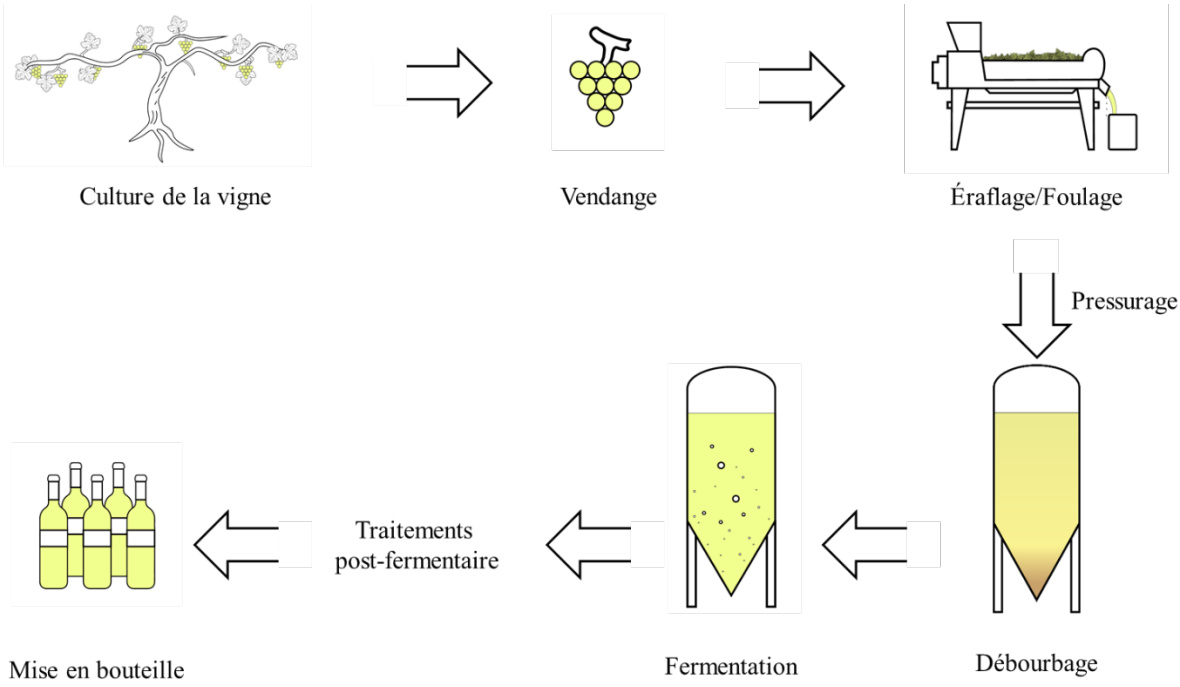


Figure 1: Processus simplifié de la vinification en blanc

Tout au long de ce processus, différents types d'arômes vont se développer. Environ un millier d'arômes a été identifié à ce jour (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) mais seule une faible partie d'entre eux participe au profil organoleptique du produit fini. Tous ces arômes sont classés en trois catégories (Drawert, 1974) : primaires, secondaires et tertiaires.

Les arômes variétaux (Figure 2) dit également primaires sont des composés originaires du raisin et de la vigne. Ils existent sous forme libre avec par exemple des pyrazines (ex : 3-isobutyl-2-méthoxypyrazine) apportant des notes herbacées et végétales (Augustyn *et al.*, 1982) ainsi que quelques monoterpénols (α-terpinéol) que l'on retrouve dans le Muscat (Ribereau-Gayon *et al.*, 1975). Ces arômes variétaux libres restent minoritaires en comparaison aux formes liées, les précurseurs d'arômes, existant dans le raisin. Ces derniers sont des composés non-odorants nécessitant une transformation chimique ou enzymatique pour libérer l'arôme. Parmi ces précurseurs, il est possible d'identifier les caroténoïdes (Razungles *et al.*, 1993), les précurseurs glycosidiques (Gunata *et al.*, 1985), les S-conjugués communément appelés précurseurs de

thiols (*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)cystéine/ *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)glutathion) (Tominaga *et al.*, 1998b) et potentiel en diméthylsulfure (*S*-méthylméthionine/diméthylsulfoxyde) (Segurel *et al.*, 2005). La présence de ces composés dans les vins n'est pas ubiquitaire et sera essentiellement liée aux cépages, au terroir, aux pratiques agronomiques et aux conditions environnementales.

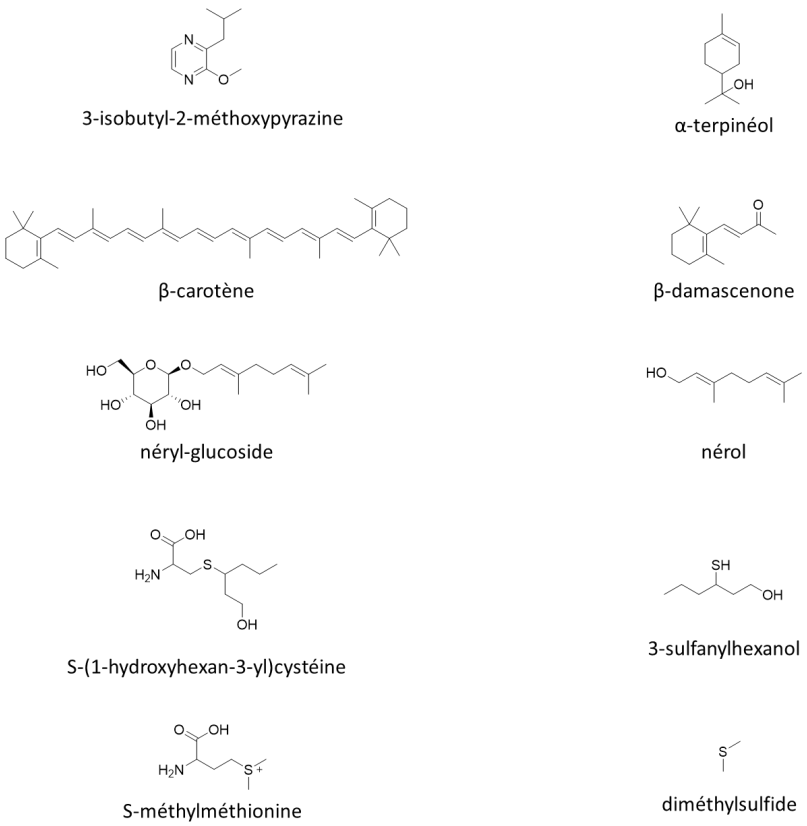


Figure 2: Exemple d'arômes variétaux et de formes de précurseurs

Le 3SH et son dérivé acétylé le 3SHA sont deux arômes variétaux avec un seuil de perception olfactif respectif particulièrement bas de 60 et 4,2 ng/L (Tominaga *et al.*, 1996; Tominaga *et al.*, 1998a). Dans les vins on retrouvera ces arômes à des concentrations allant jusqu'à 19000 et 2500 ng/L respectivement.

Deuxièmement, les arômes fermentaires ou secondaires sont produits par la levure lors de la fermentation alcoolique (FA) et par les bactéries lactiques lors de la fermentation malolactique (FML).

La fermentation alcoolique est un processus biologique d'équilibre de la balance rédox de la cellule lorsque la respiration cellulaire n'est pas possible. Elle permet la production d'éthanol à partir de pyruvate dans le but de reformer les cofacteurs nécessaires à la glycolyse. Associé à la glycolyse ce catabolisme permet l'oxydation partielle d'un sucre en éthanol et CO_2 pour la

production d'énergie et comme source de carbone. La vinification repose principalement sur la fermentation alcoolique du glucose et du fructose du moût de raisin par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, naturellement présente sur le raisin (levure indigène) ou ajoutée par le viticulteur (levure commerciale). La fermentation alcoolique est composée de quatre phases successives (Figure 3) :

- La phase de latence, soit la phase d'adaptation métabolique de la levure (Pérez-Torrado *et al.*, 2002). Elle est associée avec une faible activité cellulaire. La durée de cette phase est définie par les condition initiales, notamment par la teneur en SO_2 et la température (Ochando *et al.*, 2020).
- La phase de croissance, ou la phase de multiplication cellulaire, durant laquelle la population va atteindre entre 50 et 250.10^6 cellules/mL (Bely *et al.*, 1990). La durée de cette phase est définie par la teneur en azote dans le moût et par la température.
- La phase stationnaire, qui est la phase de consommation principale des sucres par la fermentation alcoolique. Durant ce laps de temps, la population de levure reste stable et viable.
- La phase de mortalité : la phase où l'activité fermentaire diminue progressivement jusqu'à la consommation totale des sucres et est concomitante avec la baisse de la viabilité cellulaire.

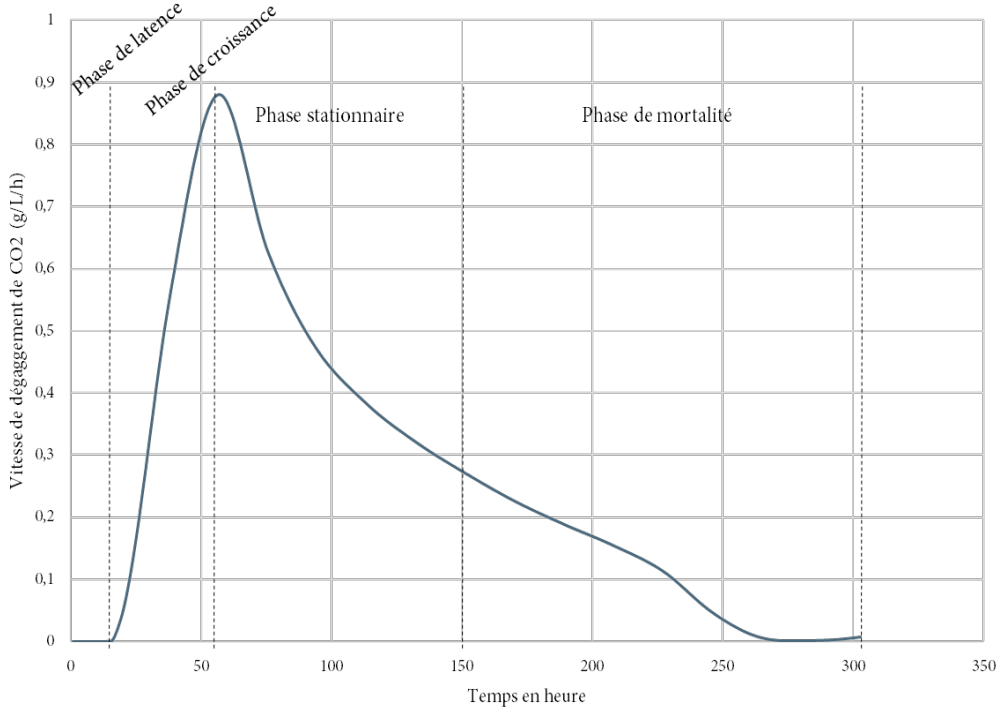


Figure 3: Exemple de suivi cinétique d'une fermentation avec les phases cellulaire associés

Pendant cette fermentation alcoolique, la levure va produire de nombreux métabolites secondaires qui sont pour la plupart des composés aromatiques odorants. Parmi eux, on retrouve les alcools dits « supérieurs » (plus de 3 carbones) et leurs esters d'acétate ainsi que les acides gras et leurs esters d'éthyle respectifs. Il s'agit essentiellement de composés dérivés du métabolisme carboné central (Figure 4) (Swiegers *et al.*, 2005).

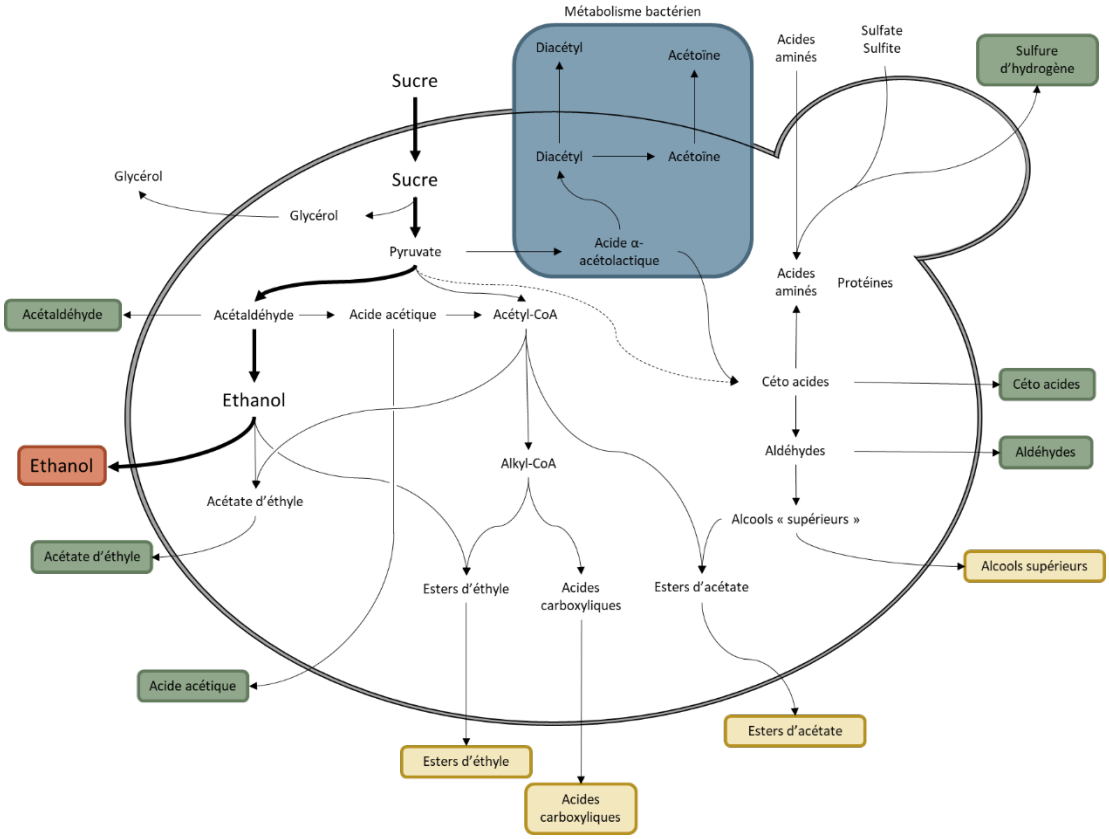


Figure 4: Schéma simplifié de la synthèse des arômes fermentaires par la levure. Encart bleu : bactérie.

Adapté de Swiegers 2005

D'un point de vue sensoriel, on peut différencier les arômes positifs principalement cités ci-dessus (esters d'éthyle et esters d'acétate) donnant des notes de fruités comme la banane, l'ananas, la poire ou encore la rose ; des négatifs, que sont généralement, les composés soufrés participant aux odeurs de chou, de poireau et d'œuf pourri (Mestres *et al.*, 2000). A la différence des arômes variétaux, ces arômes sont ubiquitaires puisque la fermentation alcoolique est une étape commune à tous les types de vins. Les levures mais plus également les bactéries de la FML vont générer d'autres composés comme l'acétoïne et le diacétyl qui apporteront un caractère « beurré-lacté » aux vins rouges et à certains vins blancs.

Finalement, les arômes de vieillissement ou tertiaires sont produits après la fermentation. Il est important de différencier les arômes issus du vieillissement chimique du vin en bouteille avec par exemple la micro-oxygénation, et les évolutions chimiques des arômes apportés par les

différentes étapes d'élevage comme par exemple l'élevage en barrique où l'on verra apparaitre des composés associés à l'extraction du bois du vin.

I. Origines des thiols variétaux

Les thiols variétaux (3SH et 3SHA) présents dans les vins ont pour origine principale la dégradation par la levure lors de la fermentation alcoolique, de composés inodores présents naturellement dans le raisin. Ils sont appelés précurseurs de thiols (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Ce sont des métabolites secondaires de la vigne dont le rôle biologique est à ce jour inconnu. Ils ont pour point commun la présence d'une liaison thioéther entre le groupement arôme et une cystéine, ou équivalent. La partie non volatile de ces précurseurs existe sous différente forme (glutathion, dipeptides, acide aminé). Les thiols peuvent également être indirectement issus du métabolisme de la levure, par la voie dites des C6 (Schneider *et al.*, 2006). Toutes ces voies de production reposent sur l'addition d'un soufre, que soit de la cystéine ou du sulfure d'hydrogène, sur une molécule de (*E*)-hex-2-enal ou sa forme réduite de (*E*)-hex-2-enol.

a. Origine de l'hex-2-enal

La production du G3SH par la plante grâce à l'action des glutathion-*S*-transférases nécessite la présence de (*E*)-hex-2-enal. Cette molécule est produite suite à la dégradation d'acides gras et plus particulièrement de l'acide α-linolénique (Figure 5) par une 13-lypoxygénase (13-LOX). Dans le cas de *Vitis vinifera*, deux enzymes capables de réaliser cette fonction ont été identifiées, VviLoxAp et VviloxOp (Podolyan *et al.*, 2010). Le peroxyde formé est ensuite clivé par des enzymes avec une activité hydroperoxide lyase pour former, d'une part, le (*Z*)-hex-3-enal, et d'autre part, l'acide (*Z*)-12-oxododeca-9-enoique. Cette fois encore deux enzymes ont été identifiées, la VviHpl1p et la VviHpl2p (Zhu *et al.*, 2012). Une fois produit, le (Z)-hex-3-enal est transformé en (*E*)-hex-2-enal soit par action enzymatique, soit par réarrangement chimique spontané.

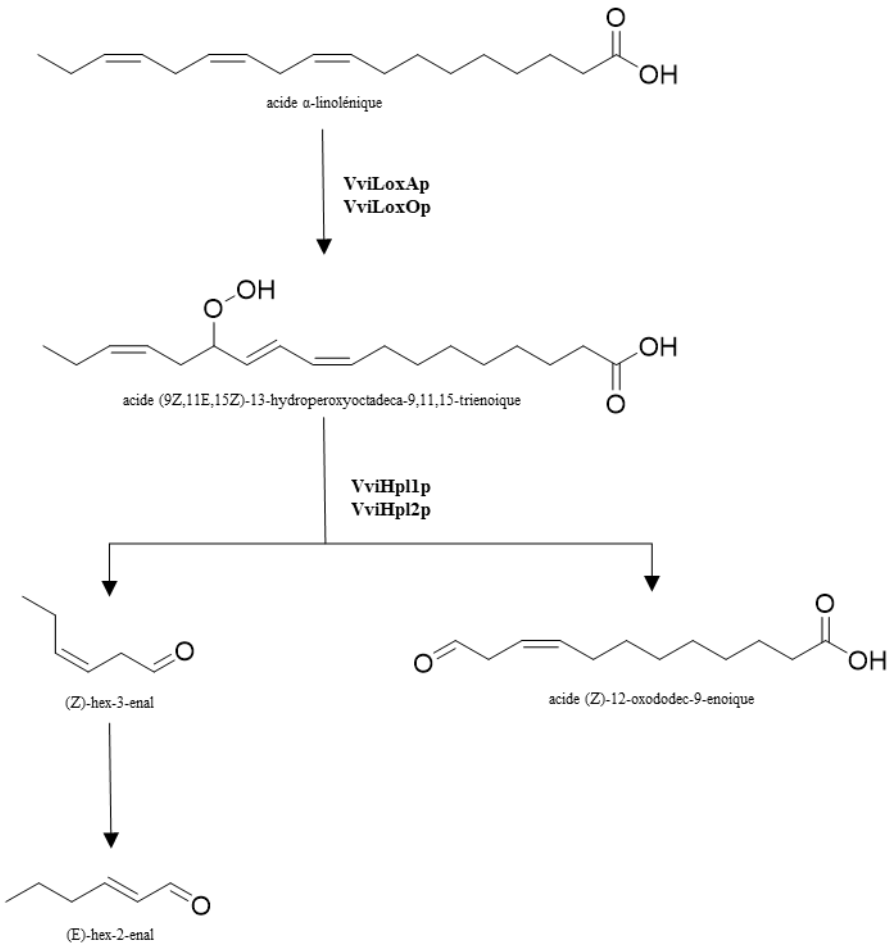


Figure 5: Dégradation de l'acide linolénique en (E)-hex-2-enal chez Vitis vinifera. Adapté de (Podolyan et al., 2010) et (Zhu et al., 2012)

b. Précurseurs glutathionylés

Le principal précurseur identifié pour les thiols variétaux est le dérivé glutathionylé (Peyrot Des Gachons *et al.*, 2002b). Il en existe plusieurs formes (Figure 6) comme le *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-glutathion (G3SH) (Roland *et al.*, 2010a) et le *S*-(1-oxohexan-3-yl)-glutathion (G3SHal) avec ses formes hemiacétal issues de la combinaison aux sulfites (Capone & Jeffery, 2011; Thibon *et al.*, 2016). La formation des conjugués glutathionylés est fortement apparentée à la voie de détoxification des xénobiotiques dans laquelle un glutathion est additionné à un électrophile (Habig *et al.*, 1974). Cette première étape est catalysée par une famille d'enzymes, les glutathion-*S*-transférases (EC 2.5.1.18), présente dans la quasi-totalité des organismes vivants. Dans le cas des thiols, le glutathion est supposé s'additionner à un (*E*)-hex-2-enal produisant le précurseur G3SHal, pouvant être ensuite réduit dans sa forme alcool G3SH par une enzyme de type alcool déshydrogénase. L'existence dans le jus de raisin de ces deux composés contribue à la validité de cette l'hypothèse. Chez *Vitis vinifera,* les trois enzymes

responsables de la production des précurseurs glutathionylés (G3SH ou G3SHal) sont VvGst3p, VvGst4p, VvGst5p (Kobayashi *et al.*, 2011; Sivilotti *et al.*, 2017).

Deux diastéréoisomères du G3SH ont été identifiés, dont la nomenclature est simplifiée en *(R)*-G3SH et *(S)*-G3SH (Grant-Preece *et al.*, 2010). L'occurrence naturelle de ces composés semble être en faveur du diastéréoisomère *(S)*.

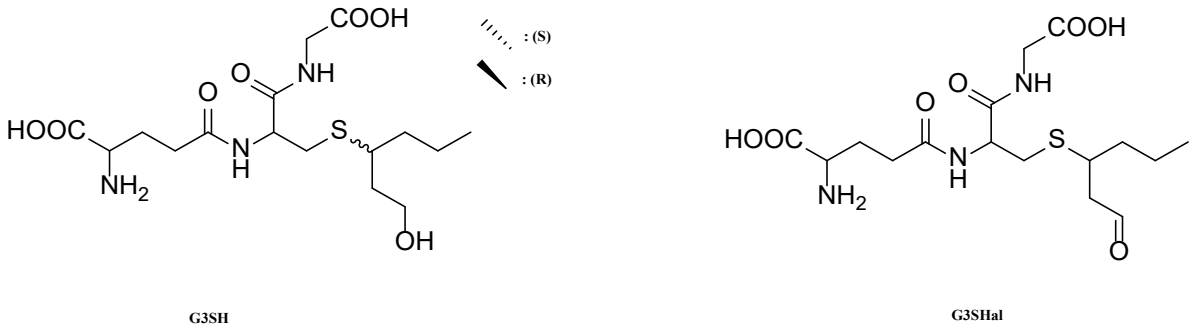


Figure 6: Structures chimique de G3SH, de ses deux diastéréoisomères et du G3SHal

c. Précurseurs dipeptidiques

Deux autres composés dont l'origine est liée au glutathion ont ensuite été identifiés : il s'agit du γ-glutamyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine (γ-GluCys3SH) et du *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéinylglycine (CysGly3SH) (Figure 7). Lors d'une première étude en 2010 (Grant-Preece *et al.*, 2010), ces deux composés ont été décrits comme étant des possibles intermédiaires métaboliques lors de la dégradation du G3SH par la levure lors de la fermentation mais n'ont pas été détectés. Un travail postérieur a permis d'identifier, dans le moût de raisin, le CysGly3SH (Capone *et al.*, 2011a). Ces travaux se sont basés sur une observation d'un produit de dégradation d'un précurseur de thiols dans du moût de raisin après traitement par une γ-glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2 / 3.4.19.13) (Peyrot Des Gachons *et al.*, 2002b). Plus récemment, des travaux ont permis d'identifier l'enzyme VvGgt3 comme étant responsable de cette dégradation dans la vigne (Philips *et al.*, 2019).

L'autre voie de dégradation impliquant le γ-GluCys3SH a été identifiée dans le moût de raisin de Sauvignon blanc (Bonnaffoux *et al.*, 2017). Ce dernier est supposé être issu de la dégradation du G3SH par une carboxypeptidase/γ-glutamylcysteinyltransferase (EC 2.3.2.15/ 3.4.17.25).

Ces deux voies de dégradations à partir du G3SH ont été identifiées par analogie avec la voie de dégradation des xénobiotiques (Lamoureux & Rusness, 1981).

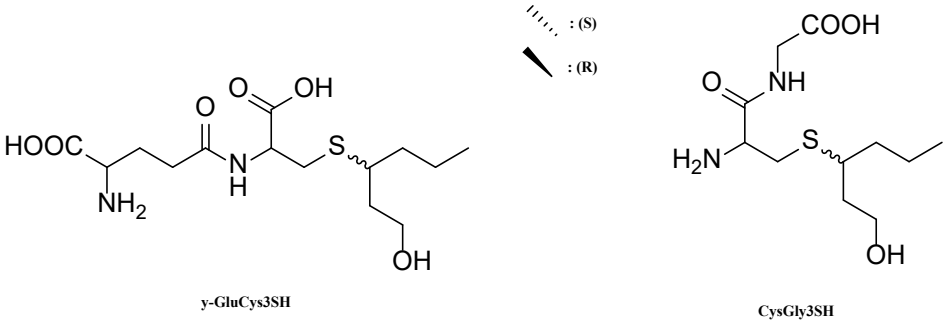


Figure 7: Structure chimique des diastéréoisomères du γ-GluCys3SH et du CysGly3SH

d. Précurseur cystéinylé

Historiquement premier précurseur découvert (Tominaga *et al.*, 1998b), le *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine (Cys3SH) (Figure 8), dérivé de la cystéine, est le plus « simple » précurseur du 3SH. Son identification s'est faite par dégradation enzymatique d'un moût traité avec un extrait enzymatique de *Eubacterium limosum* riche en activité cystéine β-lyase et analyse des arômes produits. Cette libération enzymatique a confirmé l'existence de ce précurseur préalablement théorisé (Darriet *et al.*, 1993) et a permis l'identification de sa structure.

De manière analogue au G3SH, il a également été identifié pour le Cys3SH deux diastéréoisomère *(R)* et *(S)* (Thibon *et al.*, 2008b).

Ce précurseur est considéré comme étant issu de la dégradation du CysGly3SH par une carboxypeptidase (Kobayashi *et al.*, 2011). Cependant sans preuve tangible à ce jour, cette voie reste hypothétique. Aucune donnée ni hypothèse n'a été émise sur la possible voie de dégradation du γ-GluCys3Sh en Cys3SH chez *Vitis vinifera*.

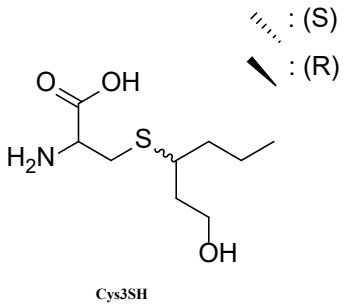


Figure 8: Structure chimique du Cys3SH

Il est donc possible de construire la voie métabolique présentée en Figure 8A. On ne peut que remarquer les importantes similitudes entre cette dernière et la voie de détoxification des xénobiotiques (Figure 8B). Ce lien de parenté est intéressant pour le pilotage des précurseurs d'un point de vue viticole mais aussi pour la suite des étapes de révélation des thiols lors de la fermentation.

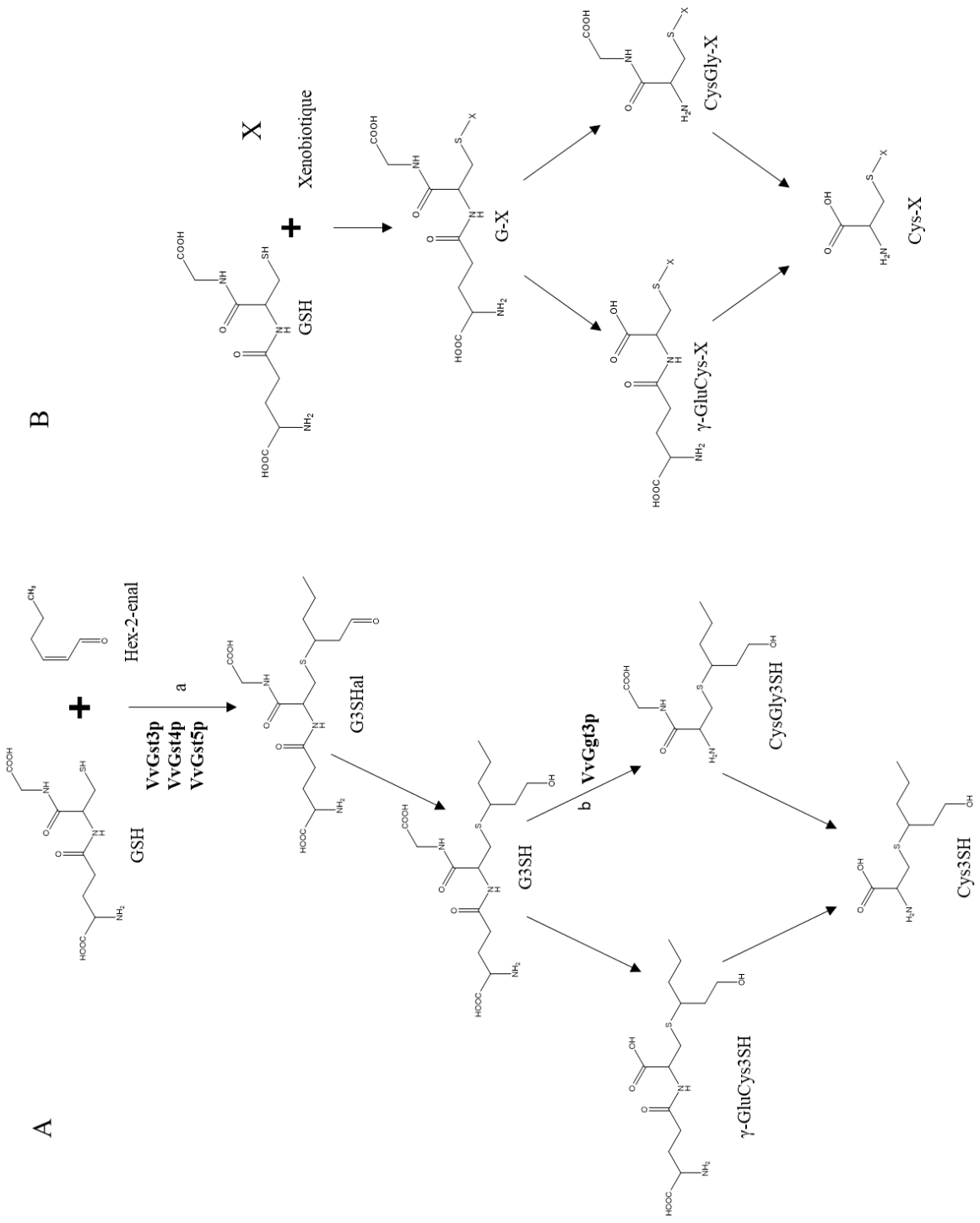


Figure 9 : Comparaison entre la voie de production des précurseurs de thiols chez Vitis vinifera (A) et la voie de dégradation des xénobiotiques (B). Le schéma (A) est adapté de a : (Kobayashi et al., 2011 ; Sivilotti et al., 2017) ; b : (Philips et al., 2019).

e. Voie des C6

Une dernière voie de biosynthèse pour le 3SH a été postulée en 2006 (Schneider *et al.*, 2006). A l'inverse de la voie précédemment décrite, celle-ci ne fait pas appel à une hydrolyse de précurseur. Elle repose sur l'addition d'H_2S sur de l'(*E*)-hex-2-enal pour former directement du 3SH. Comme aucune enzyme permettant la libération des thiols depuis les précurseurs n'a été identifiée chez *Vitis vinifera*, cette voie permettrait d'expliquer les rares détections d'arôme libre dans le raisin (Capone *et al.*, 2011b). De plus cette voie a été montré comme impliquée dans une partie de la production de 3SH lors de la fermentation alcoolique (Schneider *et al.*, 2006). En 2013, il a été montré que cette voie d'addition fonctionne avec un hydrogénosulfure comme donneur de soufre sur deux substrats différents, le (*E*)-hex-2-enal mais aussi le (*E*)-hex-2-enol (Harsch *et al.*, 2013). Quatre ans plus tard, en 2017, Araujo et al. met en évidence le rôle de cette voie d'addition lors de la fermentation avec des ajouts de soufre élémentaire résultant en une production des thiols produits jusqu'à 2,6 fois plus importante.

f. Occurrence dans les cépages

Les concentrations de précurseurs dans les cépages sont extrêmement variables allant de la centaine de ng/L à quelques mg/L. Cette disparité existe également au sein d'un même cépage avec une forte influence de tous les paramètres évoqués jusqu'à ce point. Les nombreuses analyses de potentiel aromatique dans les cépages ne sont malheureusement pas toujours comparables. En effet, dans les travaux antérieurs à 2010, seul le précurseur Cys3SH avait été identifié et son dosage se faisait uniquement par méthode indirecte sur les thiols libérés par clivage enzymatique. Or, on sait aujourd'hui qu'il existe de nombreuses formes de précurseurs et que les enzymes de clivage ne sont pas toujours spécifiques d'un type de précurseur.

Ces arômes couramment rencontrés dans les vins blancs expliquent l'abondance des données dans ce type de cépage. Néanmoins, des travaux tendent à montrer que les cépages rouges présentent également ce type de composés, parfois en très grande quantité comme le Merlot. Une liste non exhaustive de l'occurrence des précurseurs de thiols dans de nombreux cépage est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1: Exemple d'occurrence des précurseurs de thiols au sein de différents cépages (classement alphabétique)

Cépage	G3SH (µg/L)	γ-GluCys3SH (µg/L)	CysGly3SH (µg/L)	Cys3SH (µg/L)	G3SHal (µg/L)	Références
Cabernet Sauvignon	n.d.	n.a.	n.a.	2,1-2,2	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Catarratto Bianco Comune	183-512	n.d.	n.d.	11,8-54,9	584-11526	(Fracassetti *et al.*, 2018)
Chardonnay	111-517	n.a.	n.a.	7-38	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Chardonnay (µg/kg)	4420	n.a.	n.a.	420	n.a.	(Chenot *et al.*, 2022)
Grillo	402-516	n.d.	n.d.	18,9-33,2	2427-8342	(Fracassetti *et al.*, 2018)
Gros Manseng	n.a.	n.a.	n.a.	0-30	n.a.	(Dagan, 2006)
Gewurztraminer	5,6-7,1	n.a.	n.a.	52,9-65,2	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Incrocio Manzoni	17-27	n.a.	n.a.	9-14	n.a.	(Tonidandel *et al.*, 2021)
Johanniter (µg/kg)	3060	n.a.	n.a.	260	n.a.	
Koshu	4,1-40,7	n.a.	n.a.	2,2-11	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Lugana	7,1-173,7	n.a.	n.a.	36-363	n.a.	(Mattivi *et al.*, 2012)
Melon de bourgogne	0,08-0,2	n.a.	n.a.	0,4-1,05	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Merlot	9855	n.a.	n.a.	478	n.a.	(Concejero *et al.*, 2016)
Muller-Thurgau	21-62	n.a.	n.a.	1-6	n.a.	(Tonidandel *et al.*, 2021)
Petit Manseng	n.a.	n.a.	n.a.	0-120	n.a.	(Dagan, 2006)
Petite Arvine	n.d.	n.a.	n.a.	18-85	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Pinot Gris	338-467	n.a.	n.a.	23-27	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Riesling	0,7-275	n.a.	n.a.	10-30,8	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Sauvignon blanc	0,82-642	3,3-26,1	5,8-28,3	12-1585	16-14575	(Bonnaffoux *et al.*, 2017; Capone *et al.*, 2011a; Peña-Gallego *et al.*, 2012; Tirelli *et al.*, 2021)
Semillon	n.a.	n.a.	n.a.	3,6-686	n.a.	(Peña-Gallego *et al.*, 2012)
Solaris (µg/kg)	1180	n.a.	n.a.	50	n.a.	
Syrah	100-200	n.a.	n.a.	0-10	n.a.	(Wang *et al.*, 2022)
Traminer	23-42	n.a.	n.a.	8-23	n.a.	(Tonidandel *et al.*, 2021)

g. Pilotage viticole des précurseurs de thiols

La concentration des précurseurs de thiols dans les raisins peut être affectée par l'environnement et le mode de culture de la vigne.

Le changement climatique provoque un réchauffement global de la planète qui se répercute sur la composition des matières végétales. En 2019, il a été montré qu'une température plus élevée de 1,5 °C pouvait négativement impacter certains précurseurs de thiols avec une diminution de l'ordre de 75 % de la concentration en G3SHal dans du Sauvignon blanc (Wu *et al.*, 2019), l'impact sur les autres précurseurs ne pouvant être interprété. Un autre travail montre une hausse de 25 à 50 % du G3SH et du Cys3SH avec l'augmentation de la température (40 °C) dans les baies de Sauvignon blanc, Chardonnay, Merlot et Koshu (Kobayashi *et al.*, 2011).

De plus le changement climatique engendre une hausse des radiations UV reçues. Ce paramètre est important dans le cadre de certaines pratiques comme l'effeuillage qui vise à augmenter l'exposition des grappes aux rayonnements. Il s'agit donc d'un paramètre « subi » mais aussi qui peut être ajustable au vignoble par les pratiques viticoles. En pratique, il est observé une augmentation entre 10 et 50 % du G3SH et Cys3SH suite à l'exposition UV dans les baies mais aussi dans les feuilles de Sauvignon blanc, Chardonnay, Merlot et Koshu (Kobayashi *et al.*, 2011). En revanche, l'augmentation dans les baies n'est pas permanente et une diminution est visible dès 50 h d'exposition.

Une troisième conséquence du changement climatique est le déficit hydrique subi par la vigne. Ce déficit représenté par la mesure du potentiel hydrique des feuilles (Ψ pd) a un impact visible sur la concentration des précurseurs. Il a par exemple été montré que les raisins provenant de parcelles irriguées (0< Ψ pd < -0.45 MPa) ont une concentration en G3SH et Cys3SH plus importante entre + 9,1 et + 133,1 % en comparaison à ceux issus de parcelles moyennement irriguées (-0.45 < Ψ pd <-0,85 MPa) et, entre + 73,1 % et + 182 % par rapport aux raisins de parcelles en déficit hydrique (Ψ pd >-0,85 MPa) (Cataldo *et al.*, 2021). Une autre étude a montré des résultats similaires sur les feuilles de Chardonnay, Merlot et Koshu avec des augmentations mesurées entre 75 et 2250 ng/g de G3SH et Cys3SH (Kobayashi *et al.*, 2011).

Une pratique courante pour permettre une augmentation de l'azote du moût passe par la hausse de la vigueur générale de la plante avec une la pulvérisation foliaire d'azote. L'effet de cette pratique sur la concentration en acides aminés étant important (Neilsen *et al.*, 2010), il a été également considéré que cela pouvait affecter la production de certains métabolites secondaires comme les précurseurs de thiols. Une augmentation significative des précurseurs de thiols dans le Sauvignon jusqu'à 341 % a été observée avec des mesures indirectes de précurseurs (Choné *et al.*, 2006). Dans un second temps, avec des méthodes analytiques ciblées, le détail des précurseurs a pu être suivi et l'augmentation observée, bien que plus faible, porte

essentiellement sur le G3SH et non le Cys3SH entre 28 et 35 jours après véraison (Helwi *et al.*, 2016).

En 2019, Chen et al., montrent qu'il semble exister dans le jus de Sauvignon blanc une corrélation modérée entre la concentration du G3SH et du Cys3SH et celle du Glutamate et entre le G3SH et le GABA (coefficient de corrélation linéaire $r < -0,74$ et $r > 0,72$; $0,5 < r^2 < 0,6$). D'autres travaux sur des variétés hybrides canadiennes font quant à eux état d'une absence de corrélation entre la concentration en précurseurs et la concentration en acides aminés (Nicolle *et al.*, 2022).

En 2010 et 2012, Kobayashi et al. ont montré que la date de récolte, et plus précisément le moment de la récolte dans la journée, avait une influence sur la concentration des précurseurs dans les raisins (Kobayashi *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2010). Le G3SH et le Cys3SH présentent un maximum d'accumulation entre 16 et 18 semaines après floraison dans tous les tissus de la plante (pépin, pulpe et pellicule de la baie, feuille et la rafle).

La taille de la vigne peut également avoir une influence. Il a été montré que des vignes de Grechetto taillées en cordon de Royat présentaient une concentration moyenne de précurseurs de thiols systématiquement plus élevées (+22%) que les vignes taillées en Guyot (Cerreti *et al.*, 2016).

Finalement, le dernier pilotage viticole est biologique avec la contamination par des « pourritures nobles » résultat d'une contamination par *Botrytis cinerea.* La présence de ce champignon sur la vendange peut augmenter jusqu'à 100 fois la concentration en précurseurs de 3SH dans les raisins (Thibon *et al.*, 2009).

h. Pilotage œnologique des précurseurs de thiols

Les étapes pré-fermentaires (macération pelliculaire, pressurage, stabulation sur bourbes, débourbage) sont une partie importante de la vinification durant lesquelles l'objectif va être d'extraire tous les composants nécessaires pour une fermentation optimale tout en évitant les éléments pouvant l'impacter négativement. Dans le raisin, les précurseurs de thiols sont répartis dans deux fractions (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002a; Roland *et al.*, 2011) : dans la pulpe qui est directement extraite lors du pressurage et la pellicule qui nécessite différentes techniques pour l'extraire. Ainsi, dans le Sauvignon blanc, 78 % du Cys3SH et 57 % du G3SH sont présents dans la pellicule.

Afin de favoriser l'extraction des précurseurs majoritairement localisés dans la pellicule, des opérations de macération pelliculaire peuvent être utilisées. Les travaux de Maggu et al., démontrent une augmentation d'un facteur entre 2 et 3 du Cys3SH (Maggu *et al.*, 2007) pour une macération d'au moins 32 h. Par contre, lors d'une macération plus courte (24 h), aucun

effet significatif de cette pratique sur l'extraction des précurseurs de thiols n'est observé (Bonnaffoux *et al.*, 2017).

Le pressurage permet également une meilleure extraction des précurseurs de thiols. En effet, il a été montré qu'une augmentation de la pression de 0,4 bar à 2 bars permet de multiplier par 2 la concentration en Cys3SH pour des raisins de Sauvignon blanc (Maggu *et al.*, 2007). De la même manière, les jus obtenus à la fin du pressurage sont plus concentrés en précurseurs (+40 % pour le G3SH) que ce soit pour le Sauvignon blanc ou le Melon blanc (Roland *et al.*, 2011).

Lors des étapes pré-fermentaires, les phénomènes d'oxydation peuvent également moduler les teneurs en précurseurs, En effet, un pressurage sans protection vis-à-vis de l'oxygène induit une formation *in-situ* du G3SH dans des moûts de Sauvignon blanc et de Melon blanc. Des augmentations de teneurs en G3SH jusqu'à 40 % ont même été relevées dans le cas de moût de Melon blanc ; ceci pouvant significativement moduler le profil aromatique des vins résultants (Roland *et al.*, 2010c).

La stabulation sur bourbes est une pratique pré-fermentaire qui consiste à laisser en contact le moût avec les bourbes sur de longues périodes permettant de nombreux échanges entre ces deux phases. L'impact de cette opération sur les précurseurs de thiols et la concentration des thiols dans les vins semblent dépendant du terroir et du millésime. En effet, sur les millésimes 2015 et 2016 du Sauvignon blanc du Languedoc, seule la concentration des précurseurs en 2015 a été augmentée par la stabulation. Cette augmentation en précurseurs dans le moût n'a pas permis une augmentation des thiols variétaux dans le vin (Bonnaffoux *et al.*, 2020). Ces mêmes travaux ont, en revanche, montré une augmentation des thiols variétaux dans le vin sans augmentation des précurseurs pour du Sauvignon en Val de Loire. Lors de la stabulation sur bourbes, la hausse de la teneur en thiols dans les vins pourrait être liée à une hausse de la concentration en lipides. En effet, une quantité plus élevée de lipides a été corrélée à une augmentation des thiols variétaux dans les vins (Deroite *et al.*, 2018) probablement par la voie des C6 (Harsch *et al.*, 2013). Par conséquent, l'impact « variable » de la stabulation sur la libération des thiols pourraient s'expliquer par des teneurs différentes en lipides dans les bourbes en fonction des millésimes et terroirs. Ainsi, si la concentration en lipides dans les bourbes est faible, l'utilisation de la stabulation aurait un effet limité sur la libération des thiols.

Finalement, le débourbage et le collage des moûts ne présente pas d'effet significatif sur les précurseurs de thiols à l'exception du collage au charbon qui diminue les précurseurs de thiols (G3SH et Cys3SH) de 20 % (Roman *et al.*, 2016).

II. Des précurseurs aux thiols

a. Interconversions des précurseurs

Transport des précurseurs de thiols

Pendant la fermentation, les précurseurs de thiols vont être métabolisés par la levure (Figure 10) dans un processus fortement apparenté à leur voie de production. La première étape va consister à l'absorption des précurseurs de manière non spécifique à travers des transporteurs d'acides aminés et de peptides, le G3SH par Opt1p (Cordente *et al.*, 2015; Subileau *et al.*, 2008a), les dipeptides par Ptr2p (Cordente *et al.*, 2015) et le Cys3SH par Gap1p en moût synthétique uniquement (Subileau *et al.*, 2008b). Il n'existe pas de donnée sur le mode d'absorption du G3SHal, néanmoins de par sa similitude structurale avec le G3SH il doit probablement être intégré via le même transporteur. Le précurseur G3SHal est métabolisé par la levure en G3SH par l'action d'une enzyme avec une activité alcool déshydrogénase, probablement de la famille ADH (Thibon *et al.*, 2016). Le transporteur Ptr2p est extrêmement intéressant car sa délétion provoque une augmentation de la production de thiols variétaux par la levure lors de la fermentation laissant supposer une boucle de rétrocontrôle négatif de la part des aux dipeptides (Cordente *et al.*, 2015). A l'intérieur de la cellule, plusieurs voies de dégradations du G3SH parallèles sont possibles (Figure 10).

Dégradation vacuolaire

Après absorption par la levure (Figure 10), le G3SH et les dipeptides sont majoritairement orientés vers la vacuole grâce au transporteur Ybt1p où ils empruntent la voie de dégradation qui empruntent deux alternatives (Cordente *et al.*, 2015).

Tout d'abord, le passage par le CysGly3SH se fait par une première dégradation du G3SH sous l'action de la γ-glutamyltransferase Ecm38p. Ce dipeptide néoformé ou préalablement présent dans le moût peut être ensuite dégradé par une enzyme avec une action cysteinylglycine peptidase à ce jour encore non identifié (Bonnaffoux *et al.*, 2018).

Ensuite, la voie de dégradation peut passer par le dipeptide γ-GluCys avec pour première étape une dégradation du G3SH par une carboxypeptidase (Bonnaffoux *et al.*, 2018). Une fois formé, le γ-GluCys3SH peut être dégradé par Ecm38p pour produire le Cys3SH (Cordente *et al.*, 2015).

Après formation par les deux voies, le Cys3SH est excrété vers le cytosol.

Dégradation cytosolique

Après absorption, le G3SH et les dipeptides peuvent intégrer la voie de recyclage du glutathion catalysée par les enzymes de la voie DUG (deficient in utilization of glutathione). Cette voie mal caractérisée pour son action sur les S-conjugués semble ne jouer qu'un rôle minoritaire dans la dégradation des précurseurs de thiols en conditions œnologiques (Cordente *et al.*, 2015). Néanmoins, il a été identifié que l'hétéromère de Dug2p-Dug3p pouvait dégrader le G3SH en CysGly3SH dans le cytosol. Une fois formé, ce précurseur peut être dégradé par la dernière enzyme de cette famille, Dug1p, en Cys3SH. Durant ce processus cytosolique, les précurseurs peuvent être amenés à être excrétés dans le milieu extracellulaire puis à être réabsorbés. Le G3SH peut être excrété par le transporteur Gex1p, les dipeptides n'ont pas de transporteur identifié pour leur excrétion.

Les deux voies, vacuolaire ou cytosolique, amènent à la production du précurseur Cys3SH. Il sera principalement métabolisé par Irc7p et minoritairement par Str3p, des enzymes ayant une activité β-lyase et ayant pour action de libérer le 3SH du résidu cystéine (Holt *et al.*, 2011; Thibon *et al.*, 2008a). Cette molécule pourra ensuite éventuellement être acétylée par Atf1p en 3SHA *via* l'addition d'acétyl-COA selon le même principe que les alcools supérieurs (Swiegers *et al.*, 2006).

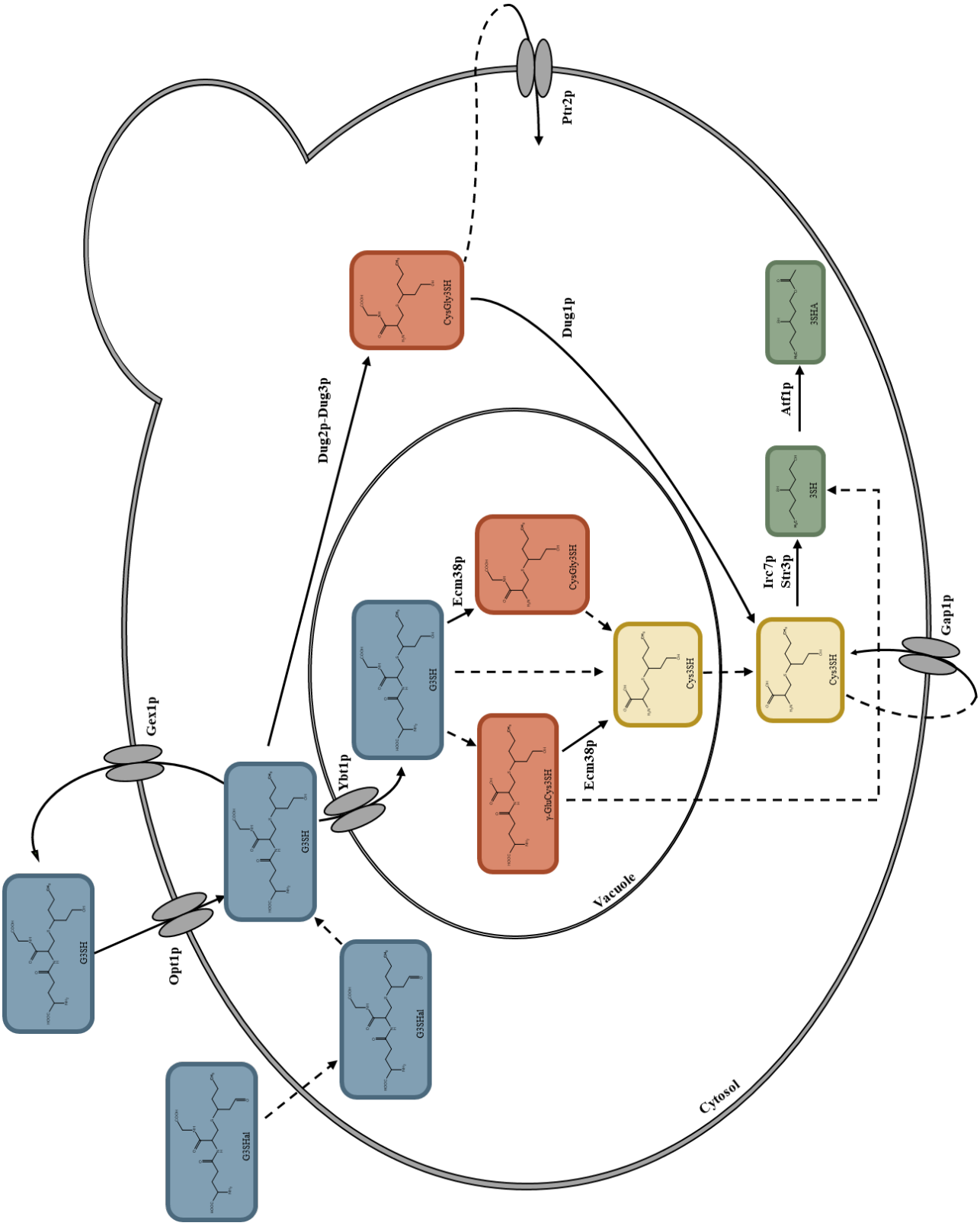
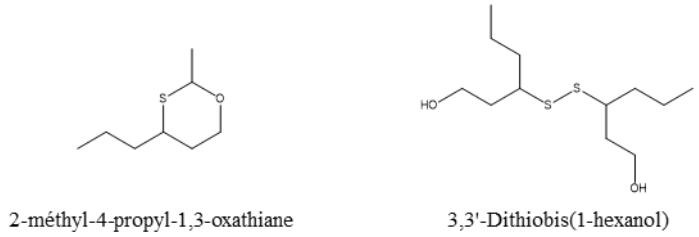


Figure 10: Catabolisme du G3SH et G3SHal chez Saccharomyces cerevisiae. En bleu les précurseurs glutathionylés, en rouge les précurseurs dipeptidiques, en jaune le précurseur cystéinylé, en vert les deux thiols variétaux. Adapté de (Cordente et al. 2015)

b. Devenir des thiols après fermentation

Une fois produits par la levure, le 3SH et le 3SHA vont être libérés dans le milieu en fermentation. En raison de leur réactivité importante, ces thiols vont former de nombreux dérivés dans le vin. Trois différents devenirs ont été identifiés, la réaction avec l'acétaldéhyde pour former un oxathiane (Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020) (Figure 11), les polyphénols pour former des adduits thioéthers (Nikolantonaki *et al.*, 2012) ou d'autres thiols pour former des di- et poly-sulfures (Roland et al., 2016, Dekker et al., 2020) (Figure 11).



2-méthyl-4-propyl-1,3-oxathiane 3,3'-Dithiobis(1-hexanol)

Figure 11: Exemple de produit issus d'une réaction du 3SH, à gauche avec l'acétaldéhyde, à droite avec un second 3SH

Parmi toutes ces formes, seulement les thiols libres (SH) et l'oxathiane sont odorantes. Ainsi l'oxydation des thiols libres en disulfure et la formation d'adduits mènent à une perte d'arôme dans le vin. La connaissance de la proportion entre la forme réduite et la forme oxydée des thiols est essentielle pour interpréter et comprendre le profil sensoriel. Cette analyse des thiols réduits et thiols oxydés (disulfure) est permise par une méthode mise au point en 2016 (Roland *et al.*, 2016). Cette méthode se compose d'une double analyse : l'analyse des thiols réduits, et l'analyse des thiols totaux après une étape de réduction, qui permet d'accéder en plus des formes réduis aux formes oxydées de formule générale R-S-S-R'. Cette réduction permet un clivage de la liaison entre les deux arômes de soufre les rendant ainsi réactifs vis-à-vis du dérivatisant utilisé. La différence entre ces deux fractions donne accès aux thiols oxydés.

D'un point de vue technologique, la fraction réduite est la plus intéressante puisqu'elle représente la partie odorante des thiols du milieu. Le dosage des thiols totaux traduit la production globale des thiols durant la fermentation. Enfin, la fraction oxydée rend compte de l'évolution de ces thiols et de leur devenir chimique en solution.

c. Rendement de conversion

Compte tenu de la forte réactivité des thiols et de leur présence sous différentes formes dans le vin, le calcul des rendements de conversion et sa comparaison en fonction des conditions sont complexes. Pendant longtemps, le calcul se basait sur le ratio entre la production d'arôme 3SH + 3SHA et la quantité de précurseurs initialement présente dans le milieu.

$$Méthode\ A = \frac{Thiols\ réduits}{Précurseurs\ initiaux} * 100$$

Équation 1: Calcul selon la méthode "A" du rendement de conversion des précurseurs en thiols. Avec « Thiol réduits » la concentration des thiols réduits en µmol/L et « Précurseurs initiaux » la somme des précurseurs initiaux en µmol/L.

Avec l'analyse des précurseurs en fin de fermentation, il est possible de définir d'une part la consommation des précurseurs et par conséquent un second calcul de la conversion.

$$Méthode\ B = \frac{Thiols\ réduits}{Précurseurs\ consommés} * 100$$

Équation 2: Calcul selon la méthode "B" du rendement de conversion des précurseurs en thiols. Avec « Thiol réduits » la concentration des thiols réduits en µmol/L et « Précurseurs consommés » la somme des précurseurs consommés en µmol/L.

Enfin, depuis 2016, il est possible de définir deux nouveaux calculs qui de par l'utilisation des thiols totaux permettent l'accès à des information plus pertinentes pour la recherche.

$$Méthode\ C = \frac{Thiols\ totaux}{Précurseurs\ initiaux} * 100$$

Équation 3: Calcul selon la méthode "C" du rendement de conversion des précurseurs en thiols. Avec « Thiol totaux » la concentration des thiols totaux en µmol/L et « Précurseurs initiaux » la somme des précurseurs initiaux en µmol/L

$$Méthode\ D = \frac{Thiols\ totaux}{Précurseurs\ consommés} * 100$$

Équation 4: Calcul selon la méthode "D" du rendement de conversion des précurseurs en thiols. Avec « Thiol totaux » la concentration des thiols totaux en µmol/L et « Précurseurs consommés » la somme des précurseurs consommés en µmol/L.

Ces différentes méthodes de calculs ont été utilisés au fil des développements de méthode et des connaissances autour des thiols, de leurs précurseurs et de leur révélation. Ces données sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Exemple de rendement de conversion des précurseurs en thiols selon la méthode de calcul utilisée.

Précurseur	Conditions	Méthode de calcul	Rendement	Souche	Référence
G3SHal	Synthétique	A	0,40-0,80%	X5	(Thibon *et al.*, 2016)
G3SH	Naturelle	A	4,40%	VIN13	(Roland *et al.*, 2010b)
	Synthétique	A	0,60%	VIN13	(Roland *et al.*, 2010a)
	Synthétique	A	0,30%	X5	(Santiago & Gardner, 2015)
	Synthétique	A	0,20%	EC1118	(Santiago & Gardner, 2015)
	Synthétique	A	3,00%	VIN13	(Grant-Preece *et al.*, 2010)
	Naturelle	C	0,19%	Esperide	(Bonnaffoux *et al.*, 2018)
	Naturelle	D	0,27%	Esperide	(Bonnaffoux *et al.*, 2018)
γ-GluCys3SH	Naturelle	C	0,07%	Esperide	(Bonnaffoux *et al.*, 2018)
	Naturelle	D	0,24%	Esperide	(Bonnaffoux *et al.*, 2018)
CysGly3SH	Naturelle	C	0,17%	Esperide	(Bonnaffoux *et al.*, 2018)
	Naturelle	D	0,17%	Esperide	(Bonnaffoux *et al.*, 2018)
Cys3SH	Naturelle	A	0,48-0,81%	ES1-ES2	(Subileau *et al.*, 2008a)

On peut remarquer la grande variabilité de cette conversion au sein d'une même expérience sur les résultats du γ-GluCys3SH par exemple, allant de 0,07% à 0,24 % en fonction de la méthode de calcul utilisée. Ceci rend compte de l'absolue nécessité de comparer les résultats issus d'une même méthode de calcul. Aux vues de la diversité des méthodes utilisées dans la littérature, il est aujourd'hui très compliqué de trouver des travaux avec des conditions parfaitement comparables : souche de levure, matrice utilisée et paramètres de fermentation notamment.

III. Le cuivre

Le cuivre est un élément chimique qui existe principalement sous trois états d'oxydation différents : Cu(0) ou cuivre métallique, Cu(I) ou ion cuivreux, Cu(II) ou ion cuivrique.

Cet élément fait partie des microéléments essentiels aux organismes avec de nombreux rôles d'oxydo-réduction au sein de la cytochrome c oxydase de la chaine respiratoire (Capaldi *et al.*, 1983), le contrôle des espèces oxydantes et radicalaires avec les superoxydes dismutases (Tainer

et al., 1983), ainsi que de par son implication dans le transport de l'oxygène de certains organismes grâce à l'hémocyanine (Murray & Jeffrey, 1974). Cette activité lui apporte également une toxicité intrinsèque ce qui en fait un micronutriment étroitement contrôlé et dont l'homéostasie est très fine.

D'un point de vue chimique, cet élément est considéré comme acide de Lewis « mou » selon la théorie HSAB (Pearson, 1963). Cette caractéristique le rend capable de s'associer au soufre et, dans une moindre mesure, à l'azote, tous deux étant des bases de Lewis « molles ».

a. Le cuivre en viticulture

Pour *Vitis vinifera* et comme pour toutes les autres plantes, les micronutriments, dont le cuivre fait partie, sont essentiels pour leur bon développement. Un apport équilibré est la clé pour éviter une vigueur végétale excessive ou une carence minérale (Etchebarne *et al.*, 2009). L'absorption du cuivre par la plante se fait principalement au niveau racinaire et est ensuite distribuée au sein de la plante sous forme de complexes avec des acides aminés via le xylème (Reichman, 2002).

Malgré une présence possiblement très importante de cuivre dans le sol, le transport de cet élément principalement ascendant (système racinaire vers système aérien) dans la plante est, de manière surprenante, indépendant de la concentration dans le sol (Miotto *et al.*, 2013). Ainsi, des sols avec de fortes concentrations naturelles en cuivre ou résultant de l'utilisation de produits à base de cuivre n'affecteront que très peu les organes annuels de la plante (sarments, feuille, fruit). Sur la plupart de ces organes, le principal facteur associé à l'augmentation de la concentration en cuivre est lié à la pulvérisation de produits phytosanitaires à base de cuivre (Miotto *et al.*, 2013). Par ailleurs, pour les baies de raisins, aucune corrélation entre la concentration en cuivre résiduelle et les traitements appliqués n'a pu être établie. Il a également été montré que des jeunes plants de vignes cultivés en présence de concentrations importantes de cuivre dans le sol présenteront une diminution de croissance du réseau racinaire, une accumulation de cuivre dans les racines ainsi qu'une chlorose des feuilles mais très peu de translocation du cuivre vers les branches (Toselli *et al.*, 2009). Un des mécanismes d'adaptation de la plante à la présence excessive de cuivre en condition modèle est la réduction du transport d'eau entre ses organes, ce qui peut expliquer les conséquences observées sur les jeunes plants de vignes (Romeu-Moreno & Mas, 1999).

Malgré tous les mécanismes de contrôle existant chez la plante, l'application de traitement au cuivre augmente la concentration en cuivre dans le moût de raisin et donc dans la fermentation (Clark *et al.*, 2015).

En viticulture, le cuivre est depuis très longtemps utilisé comme antifongique. Son utilisation remonte à 1887 (Prillieux, 1887) avec l'apparition du mildiou américain (*Plasmopara viticola*) suite à l'utilisation des portes greffes américains en réponse au développement du phylloxéra de la vigne (*Daktulosphaira vitifoliae*). La formulation principale du cuivre pour le traitement de ce nouveau pathogène devient la bouillie bordelaise, c'est-à-dire une solution de sulfate de cuivre stabilisée par de la chaux éteinte. La même année, de nombreux détails sur ces paramètres d'utilisation sont publiés (Millardet, 1887).

Le traitement préventif s'avère être plus efficace que le traitement après l'apparition des symptômes. Le mécanisme d'action du cuivre ne sera expliqué que bien plus tard ; il correspond à l'interaction de ce métal avec les protéines de *P. viticola* perturbant le métabolisme du champignon et inhibant sa croissance et sa pénétration dans la plante (Spencer-Phillips *et al.*, 2002).

La pluie est un paramètre qu'il faut considérer pour évaluer l'efficacité de la protection de la plante par le cuivre. Son rôle, est néanmoins plus complexe. D'une part, un apport modéré d'eau va répandre le cuivre pulvérisé sur une plus grande surface, parfois inatteignable lors du traitement. D'autre part, une quantité de pluie trop importante va provoquer un lessivage massif du cuivre résultant en une accumulation du cuivre dans le sol au pied de la vigne (Ortega *et al.*, 2022).

Les différents lessivages amènent également un phénomène de ruissellement du cuivre sur le sol et d'accumulation dans ce dernier avec des concentrations allant jusqu'à 2500 mg/kg au Brésil (Mirlean *et al.*, 2005) pour des sols très contaminés mais étant plus souvent entre 30 et 400 mg/kg en France (Chaignon *et al.*, 2003).

De nos jours, il existe de nombreuses formulations de cuivre avec l'hydroxyde de cuivre, l'oxychlorure de cuivre, le sulfate de cuivre tribasique, la bouillie bordelaise ou encore l'oxyde de cuivre (Chambre d'Agriculture des PO). Malgré différentes formes de cuivre (Cu^{+} ou Cu^{2+}) ainsi que différents contre ions ou composants, une étude de la Chambre d'Agriculture de la Gironde a montré entre 2010 et 2014 que ces différentes formulations n'ont pas d'incidence sur l'efficacité antifongique. Elles sont ainsi toutes utilisées de manière équivalente sans considération pour de possible effet sur le processus de vinification.

b. Le cuivre dans la levure

L'utilisation du cuivre en viticulture depuis plus de 150 ans est considérée comme un facteur important sur la domestication des levures utilisées en œnologie et a façonné la diversité génétique que l'on connait aujourd'hui dans les levures pour la fermentation. On se retrouve ainsi avec une variabilité génétique des levures domestiquées pour l'œnologie orientée vers une résistance au cuivre importante (Ruiz *et al.*, 2021; Warringer *et al.*, 2011). Chez la levure, le contrôle du cuivre est un mécanisme cellulaire relativement complexe impliquant de nombreuses voies de régulation, dont trois sont identifiées à ce jour. Cette régulation génétique permet la modification de certaines voies métaboliques conférant ainsi la résistance au cuivre mais aussi amenant à une modification des voies liés à la production des arômes dont les thiols variétaux.

La voie MAC1

Premièrement, il y a une régulation par le gène *MAC1* (Figure 12) (Jungmann *et al.*, 1993). Ce gène produit un facteur de transcription nommé Mac1p qui est un activateur de l'absorption du cuivre par levée d'inhibition des gènes *CTR1* et *FRE1* (Serpe *et al.*, 1999) qui codent respectivement pour une perméase des ions Cu^{+} et une réductase du Cu^{2+} en Cu^{+}. L'activité de Mac1p est dépendante du cuivre grâce à un domaine de reconnaissance de l'ion. Ce domaine peut lier un cuivre afin de déclencher un signal de dégradation du facteur de transcription. Ainsi, en absence de cuivre ou en faible présence de cuivre (≤1 µM ; 0,065 mg/L) (Figure 12 ; gauche), le facteur de transcription Mac1p permet l'activation de toutes ses cibles et notamment l'entrée de cuivre dans la cellule. A l'inverse, en présence d'une concentration en cuivre plus élevée (≥10 µM ; 0,65 mg/L) (Figure 12 ; droite), le complexe Mac1p-Cu est rendu inactif et est dégradé, levant l'activation des gènes cibles (Zhu *et al.*, 1998) ; le transport du cuivre sera est donc stoppé.

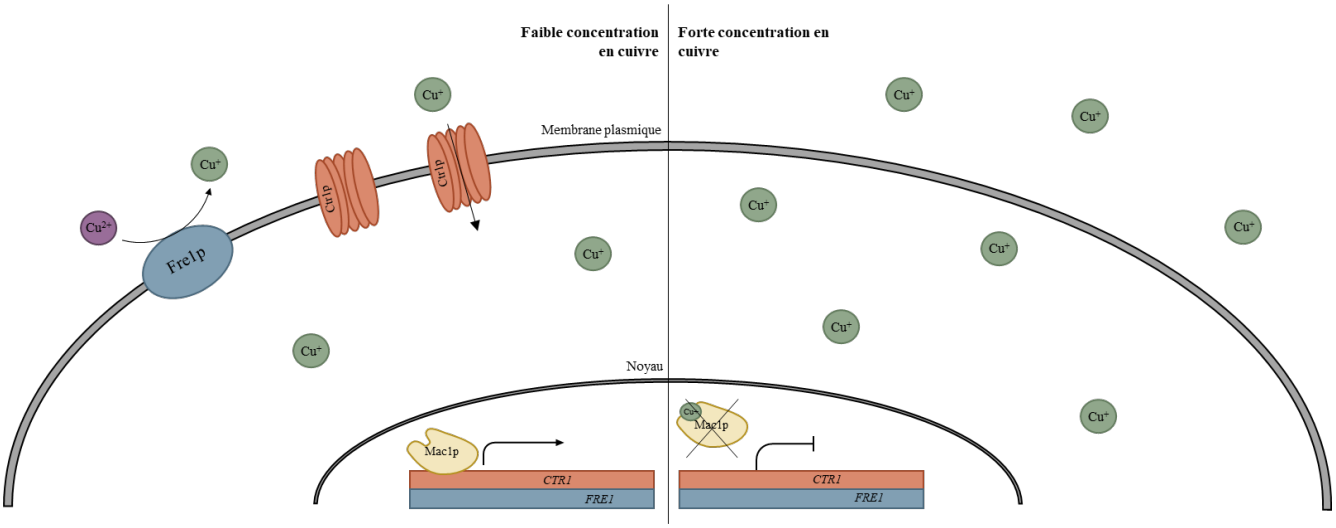


Figure 12 : Système de régulation MAC1 chez Saccharomyces cerevisiae en présence d'une faible (≤1µM) (gauche) et forte concentration en cuivre (≥10µM) (droite).

La voie CUP1/CUP2

Deuxièmement, le cuivre est contrôlé par le couple Cup1p/Cup2p (Figure 11) (Thiele, 1988). De manière similaire à Mac1p, Cup2p (ou Ace1p) est un facteur de transcription senseur de cuivre. En revanche, son fonctionnement est opposé. En effet, Cup2p devient actif une fois lié au cuivre. Pour une « faible » concentration en cuivre (<25 µM), Cup2p est donc inactif et les gènes qu'il régule comme *CUP1* sont inactifs. En présence d'une concentration cuivre plus forte (>25 µM), le facteur de transcription sera rendu actif, activant les gènes contrôlés en permettant leur transcription. Ces deux gènes produisent des enzymes appelées métallothionéines ayant pour rôle la captation de certains ions métallique dans la cellule, ici Cu^+. Il a été montré que Cup1p peut complexer 8 équivalents cuivre (Winge *et al.*, 1985) par l'intermédiaire de 12 résidus de cystéine dans sa structure (Butt *et al.*, 1984). Une autre cible de la régulation de Cup2p est le gène *CRS5* codant également pour une métallothionéine (Culotta *et al.*, 1994). Cette dernière joue le même rôle que Cup1p dans la séquestration des ion Cu^+ dans la cellule. Cette séquestration, plus labile, est supposée permettre la création d'une fraction de cuivre plus facilement mobilisable dans la cellule (Jensen *et al.*, 1996).

système de régulation CUP1/CUP2 chez Saccharomyces cerevisiae faible (≤25 µM) (gauche) et forte concentration en cuivre (>25 µM) (droite)

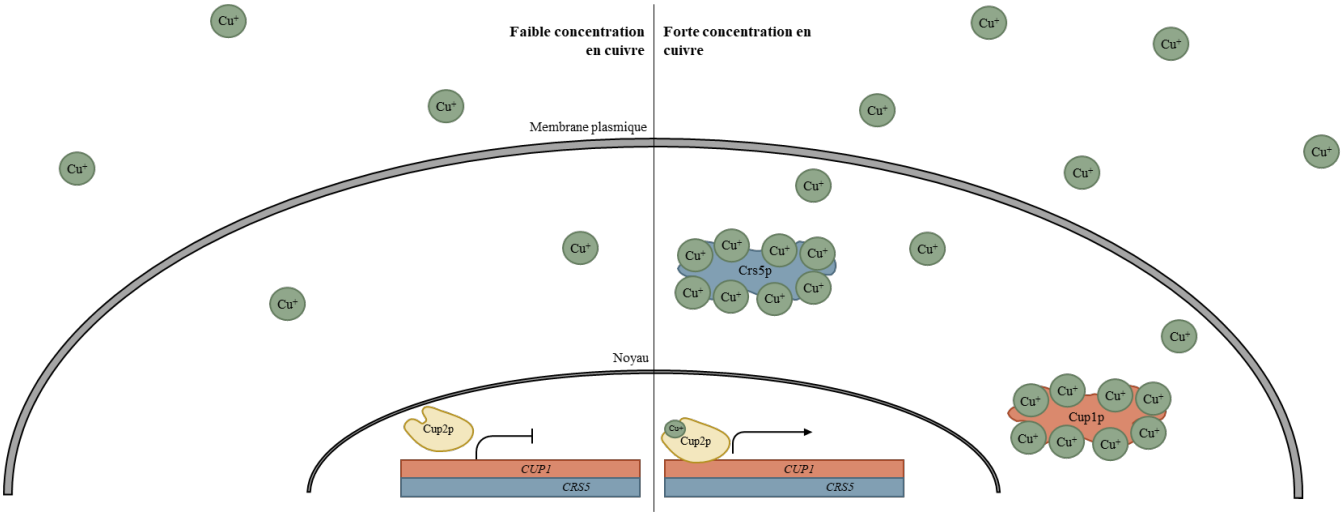


Figure 13: Système de régulation CUP1/CUP2 chez Saccharomyces cerevisiae faible (≤25 µM) (gauche) et forte concentration en cuivre (>25 µM) (droite)

La voie Cup9

Troisièmement, il a été proposé qu'un mécanisme impliquant un facteur de transcription appelé Cup9p intervenait dans la régulation du cuivre dans la levure. Ce dernier régule l'expression d'un important transporteur de peptides, mais a été identifié comme étant responsable de la résistance au cuivre chez *Saccharomyces cerevisiae* lorsque le glucose n'est pas la source de carbone (Knight *et al.*, 1994). Ce mécanisme de résistance reste à ce jour inexpliqué.

Application aux thiols variétaux

Les facteurs de transcription de ces trois voies sont également impliqués dans la régulation d'autres gènes dans la levure dont l'activation ou l'inhibition sera dépendante du cuivre. Parmi ces gènes, quatre sont d'intérêt ou intéressants dans le contexte des thiols variétaux : *CYS4* (Hodgins-Davis *et al.*, 2012), *CYS3* (Yasokawa *et al.*, 2008), *IRC7* (Gross *et al.*, 2000), *PTR2* (Byrd *et al.*, 1998) (Figure 14).

Les trois premiers font partie de la dernière phase de la voie d'assimilation du soufre avec la production de cystéine. La β-synthase codée par *CYS4* catalyse la production de cystathionine depuis l'homocystéine (Ono *et al.*, 1994). Cette cystathionine sera ensuite clivée en cystéine par la γ-lyase codée par *CYS3* (Ono *et al.*, 1992). Leur expression est sous l'égide de la régulation par Cup2p (Hodgins-Davis *et al.*, 2012; Yasokawa *et al.*, 2008). Ces gènes seront donc surexprimés en forte concentration en cuivre permettant ainsi la surproduction de cystéine nécessaire pour la synthèse des métallothionéine (Momose & Iwahashi, 2001). A l'opposé, la β-lyase codée par *IRC7* qui catalyse la production d'homocystéine depuis la cystathionine (Howell *et al.*, 2005; Thomas & Surdin-Kerjan, 1997) est inhibée par Mac1p

(Gross *et al.*, 2000) permettant ainsi de conserver le flux dans la direction opposée pour la production de cystéine.

Ainsi l'inhibition d'*IRC7* est la clé de la résistance au cuivre. Or ce gène existe sous deux formes, $IRC7^F$ (full) produisant une enzyme fonctionnelle de 400 acides aminés et $IRC7^S$ (short) issu d'une délétion de 38pb, menant à la production d'une enzyme de 360 acides aminés peu voire non fonctionnelle (Roncoroni *et al.*, 2011). Les souches de levure peuvent donc être déclinées sous trois formes ; homozygote pour la forme courte, homozygote pour la forme longue et enfin hétérozygote pour cette enzyme. Plusieurs travaux ont montré la forte prévalence (85%) de la forme courte dans les souches œnologiques (Ruiz *et al.*, 2021) ainsi que son impact négatif sur la production des thiols variétaux (Belda *et al.*, 2016; Cordente *et al.*, 2019; Roncoroni *et al.*, 2011). Précisément, il a été montré que l'homozygotie pour la forme courte procurait à la souche une meilleure fitness et de meilleures performances fermentaires en présence de cuivre (Ruiz *et al.*, 2021). Ainsi la sélection des souches « thiol » basées sur la présence de deux $IRC7^F$ dans le sélectionne indirectement des souches sensibles au cuivre.

Ainsi dans un contexte de forte présence de cuivre, ces trois gènes préparent un terrain peu propice à la révélation des thiols en fermentation. En effet la β-lyase catalysant l'étape clef de la révélation est inhibée et une voie des soufrés orientée vers la production massive de cystéine est activée.

Le quatrième gène d'intérêt est *PTR2*. Ce gène déjà vu précédemment code pour un transporteur membranaire permettant l'absorption de précurseurs dipeptidiques. Il a été montré que la transcription de ce gène est inhibée par Cup9p lorsque la concentration en cuivre est importante (Yamada *et al.*, 2005).

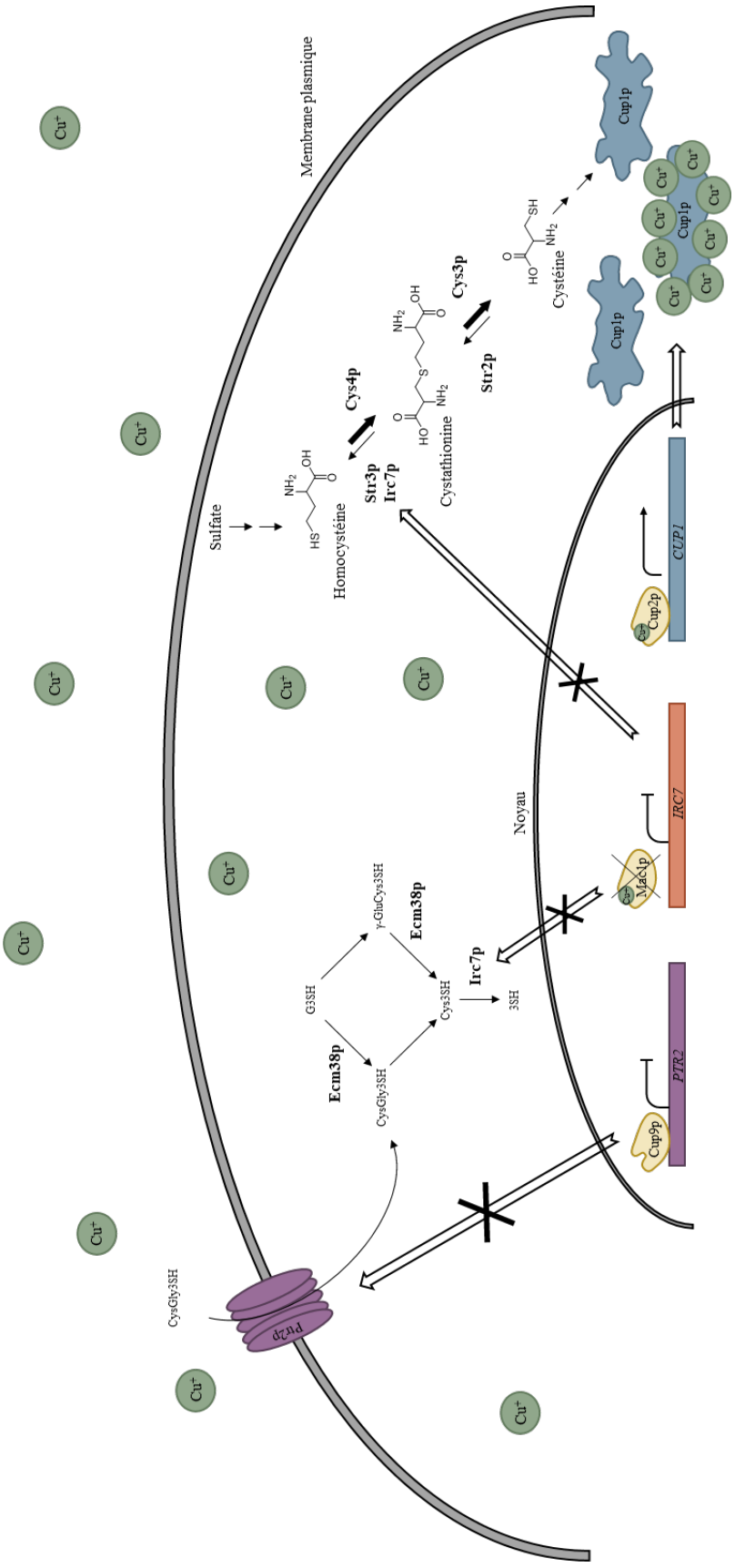


Figure 14 : Schéma des activation et inhibition associées au cuivre et appliquées au contexte des thiols variétaux. Sur la gauche la voie impliquant Ptr2p et Irc7p. Sur la droite la voie impliquant Irc7p et Cup1p

c. Le cuivre en œnologie

Dans certains contextes, des odeurs négatives associées à des composés volatils soufrés apparaissent après la fermentation. Pour pallier à ce problème, il est possible d'ajouter du cuivre (Harbertson, 2009) dans le vin selon un protocole établi par l'OIV (Oeno 1/2008, OIV).

Cette méthode cible principalement le sulfure d'hydrogène, le méthanethiol, l'éthanethiol ayant respectivement une odeur d'œuf pourri, de choux et de poireau/oignon (Mestres *et al.*, 2000). La diminution d'odeur associée à l'ajout du cuivre vient de son rôle complexant et oxydant des thiols permettant jusqu'à 100 % de transformation des composés ci-dessus en une forme non-odorante (Franco-Luesma & Ferreira, 2014). Cependant l'action du cuivre n'est pas spécifique à ces molécules et ciblera également les thiols variétaux comme le 3SH (Bencomo-Rodriguez *et al.*, 2012; Ugliano *et al.*, 2011) amenant à une perte de 80 % des thiols réduits (Roland *et al.*, 2016). Une proposition de mécanisme de réaction et de structure de complexe a été proposée sans confirmation (Kreitman *et al.*, 2016).

Matériels et Méthodes

I. Parcelles

Le dispositif expérimental consiste en un réseau de 40 parcelles au sein du vignoble des Côtes de Gascogne. Ce réseau couvre les deux cépages de l'étude, le Colombard et le Gros Manseng, ainsi que les deux modes de culture, conventionnel et biologique. Cela représente 10 parcelles par cépage et par modes de culture choisies pour avoir la meilleure représentation possible de l'appellation. Le réseau de parcelle a été étudié sur les millésimes 2019, 2020 et 2021.

Tableau 3: Réseau de parcelles dans l'appellation Côtes de Gascogne

N° parcelle	Localité	Cépage	Mode de conduite
1	Réjaumont	Colombard	Biologique
2	Eauze	Colombard	Biologique
3	Fourcés	Colombard	Biologique
4	Gondrin	Colombard	Biologique
5	Eauze	Colombard	Hybride
6	Montréal	Colombard	Hybride
7	Fourcès	Colombard	Biologique
8	Gondrin	Colombard	Hybride
9	St Paul de Baïse	Colombard	Biologique
10	Ayguetinte	Colombard	Biologique
11	Cazaubon	Colombard	Conventionnel
12	Caussens	Colombard	Conventionnel
13	Gondrin	Colombard	Conventionnel
14	St Orens Pouy Petit	Colombard	Conventionnel
15	Montréal	Colombard	Conventionnel
16	Larroque	Colombard	Hybride
17	Sainte Christie	Colombard	Conventionnel
18	Lanne-Soubiran	Colombard	Conventionnel
19	Mouchan	Colombard	Hybride
20	Larroque	Colombard	Conventionnel
21	Réjaumont	Gros Manseng	Biologique
22	Eauze	Gros Manseng	Biologique
23	Mouchan	Gros Manseng	Biologique

24	Mouchan	Gros Manseng	Biologique
25	Eauze	Gros Manseng	Hybride
26	Montréal	Gros Manseng	Hybride
27	Fourcès	Gros Manseng	Biologique
28	Lelin-Lapujolle	Gros Manseng	Biologique
29	St Paul de Baïse	Gros Manseng	Biologique
30	Ayguetinte	Gros Manseng	Biologique
31	Cazaubon	Gros Manseng	Conventionnel
32	Caussens	Gros Manseng	Conventionnel
33	Gondrin	Gros Manseng	Conventionnel
34	Eauze	Gros Manseng	Hybride
35	Eauze	Gros Manseng	Conventionnel
36	Larroque	Gros Manseng	Hybride
37	Ste Christie	Gros Manseng	Conventionnel
38	Lanne-Soubiran	Gros Manseng	Conventionnel
39	Mouchan	Gros Manseng	Hybride
40	Larroque	Gros Manseng	Conventionnel

II. Echantillonnage à la parcelle

Chaque prélèvement sur les parcelles consiste en 1 kg de portion de grappe réparti sur un rang complet. Cet échantillon est congelé à -20 °C puis 200 baies sont aléatoirement égrappées. Après décongélation, les 200 baies sont pesées et broyées en présence de métabisulfite de sodium à raison de 4,5 mg/mL de volume de jus estimé.

a. Millésime 2019

La maturation des raisins a été suivie dans 12 parcelles (tableau 3) parcelles 1 à 4, 11 à 13, 21 à 23 et 31 à 33, à la vendange (V), V-7 jours et V+7 jours pour le Colombard et V, V+9 j et V+16 j ou V+18 j pour le Gros Manseng. Les 28 autres parcelles ont été échantillonnées uniquement le jour de la récolte. Dans la plupart des cas, les raisins d'un même cépage ont été récoltés dans un délai d'une semaine.

Les 12 parcelles utilisées pour le suivi maturité ont également servies pour les vinifications de ce millésime. Pour cela, 100 kg de raisins ont été prélevés sur le même rang que les prélèvements de suivi maturité.

b. Millésime 2020

Le suivi maturité a été répété sur quelques parcelles du millésime précédent (tableau 2 et 3) à savoir la 1 et 2, de la 11 à la 13, la 22, la 32 et la 33 avec pour objectif de commencer à prélever plus en amont de la vendange. Toujours avec V le prélèvement à la vendange, il y a pour le Colombard conventionnel V-43 j, V-26 j, V-12 j, V ; pour le Gros Manseng biologique V-53 j, V-36 j, V-23 j, V-15 j, V ; pour le Gros Manseng conventionnel V-33 j ; V-14 j ; V-6 j.

Lors de ces vendanges, 150 kg de raisins ont également été prélevés pour la réalisation de moût à l'échelle pilote.

c. Millésime 2021

Le suivi maturité a été réalisé sur deux nouvelles parcelles du réseau précédemment utilisé pour l'échantillonnage à la vendange (parcelles 9 et 29) ainsi que sur deux parcelles déjà étudiée lors des millésimes 2019 et 2020 à savoir les parcelle 12 et 32. Toujours avec V le prélèvement à la vendange, il y a pour le Colombard biologique V-35 j, V-23 j, V-14 j, V-7 j, V ; pour le Colombard conventionnel V-42 j, V-30 j, V-21 j, V-14 j, V ; pour le Gros Manseng biologique V-23 j, V-14 j, V-7 j, V ; pour le Gros Manseng conventionnel V-30 j ; V-21 j ; V-14 j, V-7 j, V.

Lors de ces vendanges, 50 kg de raisins ont également été prélevés pour la réalisation de moût à l'échelle pilote.

III. Opérations pré-fermentaires

Les étapes pré-fermentaires ont été réalisés sur tous les raisins prélevés dans l'optique d'être vinifié. Pour cela, la vendange est tout d'abord éraflée et foulée (Le Cube, Socma, Narbonne, France) selon un protocole établi pour les vendanges expérimentales par l'IFV Sud-Ouest. Le raisin foulé est homogénéisé en présence de sulfites à raison de 2 g/hL (solution liquide à 10% de metabisulfite (Solution 10, Laffort, Bordeaux, France)) et d'enzymes de macération Vinozym® FCE G (Novo Holdings, Hellerup, Denmark) à 2 g/hL puis laissé à 4 °C pendant 48 h (macération pelliculaire à froid). Le raisin est ensuite pressé à l'aide d'une presse pneumatique modifiée (Marchisio, Vertova, Italy) pendant 10 minutes avec des cycles de pression allant jusqu'à 2 bars. Le jus de raisin récupéré est à nouveau sulfité à 4 g/hL, traité avec 4 g/hL d'enzymes de clarification Novoclair® Speed (Novo Holdings, Hellerup, Denmark) et laissé à 4 °C pendant 72 h pour débourbage statique. Le jus clair ou moût est soutiré et ajusté à une turbidité de 150 NTU mesuré avec un turbidimètre 2100 AN IS (Hach, Loveland, USA).

IV. Conduite des fermentations alcooliques

a. Echelle laboratoire : 250 mL

Les fermentations de 250 mL sont effectuées dans des fermenteurs en verre de 300 mL. Ils sont munis d'un septum à mi-hauteur pour l'échantillonnage et d'une cloche en position haute pour permettre la libération du CO2 produit tout en maintenant l'anaérobiose. Ils sont placés sur des plaques agitantes à 12 positions et 150 tr/min dans une pièce thermostatée à la température de fermentation souhaitée. Les fermentations sont suivies par des pesées manuelles quotidiennes.

L'inoculation à 20 g/hL se fait à l'aide d'un agent levant préparé avec 2 g de LSA dans 20 mL d'eau enrichie en glucose (20 g/L) pendant 20 minutes à 37°C. Chaque fermenteur est inoculé avec 0,5 mL de ce levain.

Les échantillons prélevés (10mL) de ces fermentations sont centrifugés à 4500 g pendant 10 minutes pour éliminer les levures du milieu. Le surnageant est ensuite sulfité à 4,5 mg/mL et congelé à -20°C avant analyse.

b. Echelle expérimentale : 3 L

Les fermentations en 3 L sont réalisées dans des bocaux LeParfait® au chai expérimental de l'IFV Sud-Ouest dans le Gers. Pour cela les bocaux sont inertés avec de la neige carbonique avant d'être rempli avec 2,5 L de moût. Chaque modalité est réalisée en triplicat et les fermentations sont suivies par densité avec un densimètre manuel DMA 35 (Anton Paar, Graz, Autriche). Les fermenteurs sont laissés 3 h à 18 °C et sont ensuite inoculés avec 0,6 g de levure sous forme de levain préalablement préparé avec de l'eau enrichie en glucose (20 g/L) puis enrichis avec 20 g/hL d'activateur Go-Ferm® protect (Lallemand, Canada) et est également ajouté au fermenteur 200 mg/L d'acide aminé Vivactiv Arôme (Sofralab, Magenta, France) et 100 mg/L de DAP dissous dans un petit volume de moût. Le suivi densimétrique est commencé après 3 jours de fermentation pour éviter une oxydation initiale du moût. Trois jours après l'inoculation, est à nouveau ajouté 100 mg/L de DAP.

Les échantillons prélevés (15 mL, à l'inoculation J puis à J+3 jours, J+6 jours et à la fin de la fermentation) sont sulfités à 4,5 mg/mL et congelé à -20 °C. Lors de la décongélation une centrifugation (5 min, 4500 g) est nécessaire pour retirer les particules et levures en suspension.

c. Echelle expérimentale : 20 L

Les fermentations sont réalisées dans des fûts de bières en acier inoxydable selon un protocole établi par l'IFV. Pour cela 20 L de moût y sont transférés et mis à température à 18°C pour la nuit. Le lendemain les fûts sont inoculés par 4g de levure sous forme de levain préalablement préparé avec de l'eau enrichie en glucose (20 g/L) puis enrichis avec 20 g/hL d'activateur Go-Ferm® protect (Lallemand, Canada) et est également ajouté 200 mg/L d'acide aminé Vivactiv Arôme (Sofralab, Magenta, France) dissous dans un petit volume de moût. Trois jours après l'inoculation, un tiers du volume du fermenteur est soutiré puis réintroduit pour l'aération du milieu. Lors de cette étape, 100mg/l de DAP sont également ajoutés. Le suivi de la fermentation est réalisé de la même manière que pour les fermentations en 3L. Dans le format 20L le suivi fermentaire commence dès l'inoculation.

Les prélèvements sont réalisés de la même manière que les fermentations en 3L avec un prélèvement à l'inoculation J, J+3 et à la fin de la fermentation.

V. Moût synthétique

Le moût synthétique (MS) utilisé dans ce travail de thèse se base sur la composition moyenne d'un moût de raisin (Bely *et al.*, 1990). On y retrouve, selon les proportions détaillées dans le Tableau 4, une concentration importante de sucre (mélange équimolaire de glucose et de fructose), d'azote dit assimilable (acides aminés et ammonium en proportion 70/30) (Tableau 5), des vitamines (Tableau 6), des acides gras ou facteurs anaérobies (Tableau 7), divers minéraux et sels (Tableau 8 et 9) et un pH ajusté à 3,5.

Tableau 4: Composition générale du moût synthétique

Composés	**Quantité par litre**
Glucose	100 g
Fructose	100 g
Acide malique	6 g
Acide citrique	6 g
KH_2PO_4	0,75 g
K_2SO_4	0,5 g
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,25 g
$CaCl_2$, $2H_2O$	0,155 g
NaCl	0,2 g
NH_4Cl	0,46 g
Solution mère acides aminés	13,09 mL
Solution mère facteurs anaérobie	0.25 mL
Solution mère fer (ml)	1 mL
Solution mère oligoéléments	1 mL
Solution mère vitamines	10 mL

Tableau 5: Composition de la solution mère d'acide aminé

Composés	**Quantité par litre**
$NaHCO_3$	20 g
Acide aspartique	3.4 g
Acide glutamique	9.2 g
Alanine	11.1 g
Arginine	28.6 g
Cystéine	1.0 g
Glutamine	38.6 g
Glycine	1.4 g
Histidine	2.5 g
Isoleucine	2.5 g
Leucine	3.7 g
Lysine	1.3 g
Méthionine	2.4 g
Phénylalanine	2.9 g
Proline	46.8 g
Sérine	6.0 g
Thréonine	5.8 g
Tryptophane	13.7 g
Tyrosine	1.4 g
Valine	3.4 g

Tableau 6: Composition de la solution mère de vitamines

Composés	**Quantité par litre**
Acide Nicotinique	0,2 g
Biotine	3 mL
Chlorure de thiamine	0,025 g
Myo-inositol	2 g
Panthoténate de calcium	0,15 g
Pyridoxine	0,025 g

Tableau 7 : Composition de la solution mère d'acide gras ou facteur anaérobies

Composés	Quantité par litre
β-sytostérol	2 mg
Tween 80	50 mL
Ethanol absolu	qsp 100 mL

Tableau 8 : Composition de la solution de fer

Composé	Quantité par litre
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	20 g

Tableau 9: Composition de la solution mère de minéraux

Composés	Quantité par litre
H_3BO_3	1 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$	1 g
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,4 g
KI	1 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	4 g
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	4 g

VI. Outils de synthèse organique

a. Chromatographie gazeuse

Le suivi des synthèses des volatils est réalisé sur une GC 6890 (Agilent, Technologies, Santa Clara, CA, USA) couplée à un spectromètre de masse 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). La chromatographie gazeuse est réalisée avec une colonne ZB-WAX (0,25 µm, 30 m x 0,25 mm) avec de l'hélium en gaz vecteur, avec un débit constant de 1,2 mL/min. La température initiale du four est de 60 °C commençant par un palier de 3 min. Ensuite une rampe de 10 °C/min jusqu'à 180 °C, maintenu pendant 1 minute, puis une rampe de 20 °C/min jusqu'au 230 °C maintenu pendant 5 minutes puis retour aux conditions initiales pour une durée totale de run de 20 minutes. L'injection est réalisée en mode split avec un ratio de 10, un split flow de 12 mL/min. L'injecteur et la ligne de transfert sont maintenu à 250 °C, la source à une température de 230 °C, en mode impact électronique avec une fenêtre de scan de 29 à 250 amu.

b. Chromatographie liquide

Les deux méthodes pour les suivis de synthèses sont réalisées une UPLC Acquity (Waters, Milford, MA, USA) couplée à une trappe ionique AmazonX (Bruker, Billerica, Massachusetts, États-Unis). La partie chromatographique est réalisée à un débit de 0,55 mL/min avec pour solvant A de l'eau acidifié à 0,1 % par de l'acide formique et pour solvant B un mélange 80/20 acétonitrile/eau acidifié à 0,1 % par de l'acide formique. La séparation est réalisée par une colonne Hypersyl Gold (1.9 µm, 100 mm x 2,1 mm). La détection est réalisée en MS_n avec pour paramètres de source le voltage du capillaire à 4500 V, une pression de gaz de 3,03 bar, un débit de 12 L/min et une température de 250 °C et une fenêtre de scan entre 90 et 800 m/z.

i. Méthode 1

Pour la première méthode la proportion de B augmente de 1 à 15 % en 5 minutes puis à 99% en 2 minutes, reste constante pendant 1 minute puis redescend à 1 % en 1 minute pour un run total de 9 minutes.

ii. Méthode 2

Pour la seconde méthode la proportion de B augmente de 0,1 à 40 % en 5 minutes puis à 99 % en 2 minutes, reste constante pendant 1 minute puis redescend à 0,1 % en 1 minute pour un run total de 9 minutes.

c. RMN

Tous les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Agilent DD2 500 MHz (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), fonctionnant à 500,05 et 125,74 MHz pour les noyaux de proton et de carbone-13 respectivement, à l'aide d'une sonde de détection indirecte de 5 mm équipée d'une bobine à gradient en z. Des expériences de spectroscopie de corrélation 1H et 13C homonucléaire (COSY), de spectroscopie de corrélation totale (TOCSY) et de spectroscopie nucléaire à effet Overhauser à cadre tournant (ROESY) 1D et 2D, ainsi que de spectroscopie de corrélation quantique simple (HSQC) et de spectroscopie de corrélation de liaisons multiples (HMBC) hétéronucléaires $^{1}H/^{13}C$ ont été réalisées à l'aide de séquences d'impulsions conventionnelles et analysées avec VNMRJ4. 2 et MestReNova 14.2.1 (Mestrelab Research, Espagne). Les paramètres d'acquisition de la séquence d'impulsions DgcsteSL étaient les suivants : le temps de retard de diffusion et la largeur d'impulsion du gradient étaient fixés à 50 ms et 2 ms respectivement, la force du gradient (g) était incrémentée en 16 étapes avec un espacement g2 égal de 0,3 à 32 G.cm-1.

Les solvants utilisés étaient l'acétone-d_6 pour le NAC3SH et le D_2O pour tous les autres.

Les mesures de concentration absolue ont été effectuées par qNMR en utilisant une méthode d'étalonnage externe. La diméthylsulfone (DMS) (20 mg) et l'acide gallique (20 mg) ont été pesés avec précision et dissous dans un volume précis de D2O (5 mL) et de diméthylsulfoxyde-d6 (5 mL), respectivement. Après l'ajustement de la sonde, un spectre RMN 1D ^{1}H de DMS a été réalisé en utilisant une impulsion de 90 degrés. La zone du signal DMS a été utilisée pour calibrer la sonde à l'aide du logiciel VNMRJ. L'étalonnage de la sonde a ensuite été vérifié en utilisant l'échantillon d'acide gallique.

d. HPLC préparative

La purification des synthèses du *S*-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d2)-cystéinylglycine et du *N*-acétyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine a été réalisé sur chromatographie semi-préparative NGC Bio-Rad en utilisant une colonne Microsorb C18 5µm 21.2x250 mm. La détection a été effectuée par UV à 214 nm. Les phases mobiles étaient l'eau avec 0,05 % d'acide trifluoroacétique (TFA) (A) et 80:20 acétonitrile/eau avec 0,05 % de TFA (B). Le conditionnement de la colonne a commencé à 10 % de B pendant 10 min, le gradient d'élution a continué à 10 % de B pendant 5 min, a augmenté à 25 % en 10 min et s'est maintenu pendant 10 min, a augmenté à 45 % en 5 min et s'est maintenu à pendant 10 min, a augmenté à 95 % en 3 min et s'est maintenu pendant 5 min avant de diminuer à 50 % de B en 1 min et s'est maintenu pendant 5 min.

VII. Synthèses chimiques des standards analytiques

a. (E)-hex-2-enal-d_2

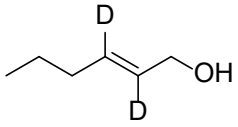


Figure 15: (E)-hex-2-enal-d_2

D'après (Roland *et al.*, 2010a), l'hex-2-ynol (1 mL ; 1 eq ; 9,11 mmol) est dissous dans l'éthanol-OD (2 mL) avec du palladium de Lindlar (9,7 mg ; 1% du poids de l'hex-2-ynol) en suspension. Le système est purgé et maintenu sous atmosphère de deutérium (D_2) La réaction est agitée pendant 48 h à température ambiante avec suivi par GC-MS. Le brut réactionnel est filtré sur un fritté (pore 4). Le volume de la phase organique est réduit à l'évaporateur rotatif pour obtenir un liquide fluide de couleur légèrement jaune.

Le hex-2-enol-d_2 obtenu précédemment (930 mg m_{th} ; 1 eq ; 9,11 mmol) est repris dans de l'hexane (100 mL). L'oxyde de manganèse (MnO_2) est ensuite ajouté (11,19 g ; 12 eq ; 109 mmol ; pureté 85%). La réaction est agitée pendant 78 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par GC-MS.

Un excès de MnO_2 est additionné (22 h, 1,9 g, 18 mmol ; 32 h, 3,8 g, 18 mmol ; 48 h, 1,9 g, 18 mmol ; 72 h, 1,9 g, 18 mmol) pour terminer la réaction.

En fin de réaction, le milieu réactionnel est filtré sur célite (environ 1 cm) et la phase organique est évaporée à sec. Une huile très fluide légèrement jaune (412 mg, rendement de 45 %) d'une pureté chromatographique de 95 % avec une répartition isomérique à 46 % pour l'isomère Z et 54 % pour le E.

b. S-(1-hydroxyhexan-3-yl)-glutathion

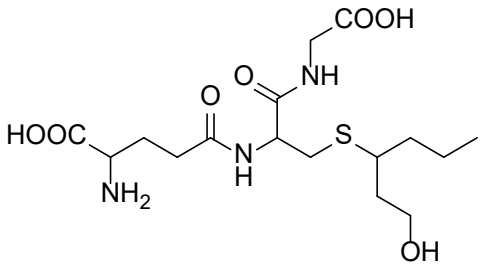


Figure 16: G3SH

D'après (Roland *et al.*, 2010a) et modifié comme suit, le glutathion (500 mg ; 1eq ; 1,63 mmol) est dissous dans un tampon phosphate (Na_2HPO_4 0,11 M ; NaH_2PO_4 0,096 M ; pH 8 ; 15 mL) puis le (E)-hex-2-enal est ajouté (75 µL ; 0,4 eq ; 0,63 mmol). La réaction est agitée

pendant 5 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS (méthode 1). L'ajout du (E)-hex-2-enal est renouvelé au bout de 1 h 45 et 3 h 45 de réaction (total de 226,5 µL ; 1,2 eq).

Du $NaBH_4$ (66,1 mg ; 2,8 eq ; 4,55 mmol) est dissous dans de l'eau (2 mL) puis cette solution est ajoutée au brut réactionnel goutte à goutte. La réaction est maintenue agitée pendant 1 h sous atmosphère inerte.

Le milieu réactionnel est acidifié avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 3. Le produit est ensuite congelé et lyophilisé pour obtenir un produit solide blanc correspondant au G3SH sous forme de sel de chlorhydrate.

Le produit est purifié par flash chromatographie (puriflash430, Interchim, Montluçon, France) en phase inverse avec une colonne C18 AIT de 50 g, l'éluant A : eau et l'éluant B : acétonitrile, le débit est de 30 mL/min et est suivi par détection UV à 214nm. Le gradient commence à 0% de B pendant 10 minutes puis augmente à 5% sur 10 minutes, est stabilisé pendant 5 minutes, augmente à 10 % sur 10 minutes, est stabilité pendant 5 minutes puis augmente jusqu'à 40% en 5 minutes et est stabilisé pendant 5 minutes.

Le produit élue à 36 minutes, les fractions sont évaporées pour éliminer l'acétonitrile puis sont congelées et lyophilisées pour obtenir 200 mg de produit soit un rendement de 42 %. L'analyse par résonnance magnétique nucléaire (RMN) a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 87 %.

c. S-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d_2)-glutathion

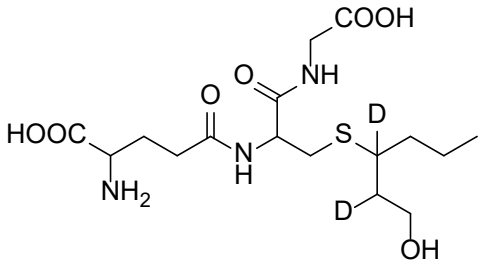


Figure 17: G3SH-d_2

D'après (Roland *et al.*, 2010a) et modifié comme suit, le glutathion (192 mg ; 1 eq ; 0,625 mmol) est ajouté dans un tampon phosphate (Na_2HPO_4 0,11M ; NaH_2PO_4 0,096M ; pH 8 ; 6 mL) puis le (E)-hex-2-enal-d_2 est ajouté (180 µL ; 0,4 eq ; 0,250mmol ; pureté 16%). La réaction est agitée pendant 5 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. L'ajout du (E)-hex-2-enal-d_2 est renouvelé au bout de 1 h 45 et 3 h 45 de réaction.

Du $NaBH_4$ (172 mg ; 2,8 eq) est dissous dans de l'eau (4 mL) puis cette solution est ajoutée au brut réactionnel goutte à goutte. La réaction est maintenue agitée pendant 1 h sous atmosphère inerte.

Le milieu réactionnel est acidifié avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 3. Le produit est ensuite congelé et lyophilisé pour obtenir un produit solide blanc correspondant au G3SH-d_2 sous forme de sel de chlorhydrate.

Le produit est purifié par flash chromatographie en phase inverse avec une colonne C18 AIT de 50 g, l'éluant A : eau et l'éluant B : acétonitrile, un débit de 30 mL/min et est suivi par détection UV à 214 nm. Le gradient commence à 0 % de B pendant 10 minutes puis augmente à 10% sur 30 minutes, est stabilisé pendant 15 minutes, puis augmente à 30 % sur 10 minutes et est stabilité pendant 10 minutes.

Le produit élue à 38 minutes, les fractions sont évaporées pour éliminer l'acétonitrile puis sont congelées et lyophilisées pour obtenir 119 mg de produit soit un rendement de 46 %. L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 83 %.

d. S-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine

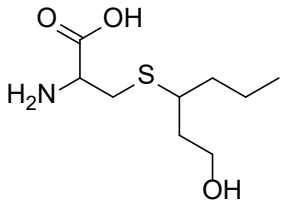


Figure 18: Cys3SH

Couplage

D'après (Dagan, 2006) et modifié comme suit, le (Boc-Cys-OH)$_2$ (500 mg ; 1 eq ; 1,14 mmol) est ajouté dans du dichlorométhane (15 mL), y est ensuite successivement ajouté la triéthylamine (475 µL ; 3 eq ; 3,41 mmol) et le dithiotréitol (263 mg ; 1,5 eq ; 1,7 mmol). La réaction est agitée pendant 22 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS.

Au milieu réactionnel est ensuite ajouté le (E)-hex-2-enal (316 µL ; 1,2 eq ; 2,74 mmol). La réaction est agitée pendant 3h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. Du (E)-hex-2-enal (105 µL ; 0,4 eq ; 0,91 mmol) est à nouveau ajouté au bout de 2 h.

Réduction

Du $NaBH_4$ (223 mg ; 2,6 eq ; 5,91 mmol) est dissous dans de l'eau (10 mL). Cette solution est ajoutée au brut réactionnel goutte à goutte. La réaction est maintenue agitée pendant 3 h sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est acidifié avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à un pH de 3 puis repris dans de l'eau (20 mL) d'eau. Est ensuite réalisé une extraction liquide-liquide au dichlorométhane (3 x 20 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées avec une solution saturée de NaCl (50 mL) puis séchées sur $MgSO_4$, filtrées et évaporées. On obtient une huile jaune.

Déprotection

Le produit est repris dans du TFA (9 mL) dans lequel est ajouté le triéthylsilane (TES) (1 mL). La réaction est agitée pendant 20 minutes à température ambiante.

L'excès de TFA est évaporé sous flux d'argon, le milieu huileux est repris avec de l'éther diéthylique (20 mL) ce qui fait précipiter le produit qui est ensuite extrait par lavage à l'eau (3 x 10 mL). Les phases aqueuses sont réunies, lavées à l'acétate d'éthyle et ensuite séchées sous flux d'azote. Le produit est ensuite congelé et lyophilisé pour obtenir un produit solide blanc correspondant au Cys3SH sous forme de sel de chlorhydrate.

Le produit est ensuite congelé et lyophilisé pour obtenir 348 mg d'un produit solide blanc correspondant au Cys3SH sous forme de sel de chlorhydrate, rendement de 64 %. L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 42 %.

e. S-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d_2)-cystéine

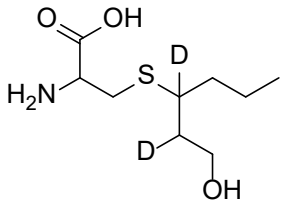


Figure 19: Cys3SH-d_2

Couplage

D'après (Dagan, 2006) et modifié comme suit, le Boc-Cys-OH (250 mg ; 1 eq ; 1,13 mmol) est ajouté dans du dichlorométhane (5 mL), y est ensuite successivement ajouté le (E)-hex-2-enal-d_2 (211 mg ; 1,2 eq ; 1,35 mmol ; pureté 63 %) puis la triéthylamine (315 µL ; 2 eq ; 2,26 mmol). La réaction est agitée pendant 22h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS.

Réduction

Du $NaBD_4$ (123 mg ; 2,6 eq ; 2,94 mmol) est dissous dans de l'eau (5 mL). Cette solution est ajoutée au brut réactionnel goutte à goutte. La réaction est maintenue agitée pendant 3 h sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est acidifié avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à un pH de 3 puis repris dans de l'eau (20 mL) d'eau. Est ensuite réalisé une extraction liquide-liquide au dichlorométhane (3 x 20 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées avec une solution saturée de NaCl (50 mL) puis séchées sur $MgSO_4$, filtrées et évaporées. On obtient une huile jaune.

Déprotection

Le produit est repris dans du TFA (4,5 mL) dans lequel est ajouté le TES (0,5 mL). La réaction est agitée pendant 20 minutes à température ambiante.

L'excès de TFA est évaporé sous flux d'Argon, le milieu huileux est repris avec de l'éther diéthylique (20 mL) ce qui fait précipiter le produit qui est ensuite extrait par lavage à l'eau (3 x 10 mL). Les phases aqueuses sont réunies, lavées à l'acétate d'éthyle (20 mL) et ensuite séchées sous flux d'azote. Le produit est ensuite congelé et lyophilisé pour obtenir un produit solide blanc correspondant au Cys3SH-d_2 sous forme de sel de chlorhydrate.

Le produit est ensuite congelé et lyophilisé pour obtenir 94 mg d'un produit solide blanc correspondant au Cys3SH-d_2 sous forme de sel de chlorhydrate, rendement de 37 %. L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 50 %.

f. S-(2-methyl-4-oxopentan-2-yl)-glutathion

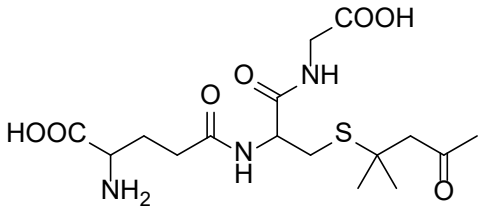


Figure 20: G4MSP

D'après (Fedrizzi *et al.*, 2009) et modifié comme suit, le glutathion réduit (500 mg ; 1 eq ; 1,63 mmol) est ajouté dans 4 mL d'eau, y est ensuite successivement ajouté la pyridine (226 µL ; 1,72 eq ; 2,80 mmol) puis l'oxyde de mésityle (186 µL ; 1 eq ; 1,63 mmol). La réaction est agitée pendant 42 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. L'ajout d'oxyde de mésityle est renouvelé (62 µL ; 0,33 eq ; 0,54 mmol) au bout de 17 h et 22 h de réaction.

Le milieu réactionnel est lavé au dichlorométhane (3 x 10 mL). La phase aqueuse est ensuite évaporée. Cette huile est reprise dans de l'éthanol absolu (20 mL), le précipité est filtré et séché

puis repris dans l'eau pour lyophilisation. Ce qui amène à 366 mg d'un produit sous forme de poudre blanche correspondant au G4MSP soit un rendement de 55 %. L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 37 %.

g. S-(2-(methyl-d_3)-4-oxopentan-2-yl-1,1,1,3,5,5,5-d_7)-glutathion

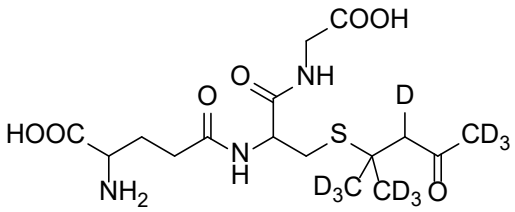


Figure 21: G4MSP-d_{10}

D'après (Grant-Preece *et al.*, 2010) et modifié comme suit, le glutathion réduit (500 mg ; 1 eq ; 1,63 mmol) est ajouté dans de l'eau (4 mL), y est ensuite successivement ajouté la pyridine (226 µL ; 1,72 eq ; 2,80 mmol) puis l'oxyde de mésityle-d_{10} (205 µL ; 1 eq ; 1,63 mmol). La réaction est agitée pendant 77 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. L'ajout d'oxyde de mésityle-d_{10} est renouvelé (88 µg ; 0,5 eq ; 0,8 mmol) au bout de 8 h, 24 h et 32 h de réaction (total de 469 µL ; 2,5 eq). Au bout de 47 h est également ajouté de la pyridine (130 µL ; 1 eq ; 1,62 mmol).

Le milieu réactionnel est lavé au dichlorométhane (3 x 10 mL). La phase aqueuse est ensuite évaporée. Cette huile est reprise dans de l'éthanol absolu (20 mL), le précipité est filtré et séché puis repris dans l'eau pour lyophilisation. Ce qui amène à 685mg d'un produit sous forme de poudre blanche correspondant au G4MSP-d_{10} soit un rendement quantitatif. L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 22 %.

h. S-(2-methyl-4-oxopentan-2-yl)-cystéine

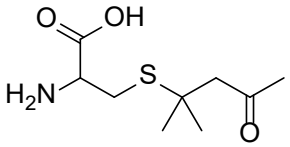


Figure 22: Cys4MSP

D'après (Dagan, 2006) et modifié comme suit, la Boc-Cys-OH (200 mg ; 1 eq ; 0,91 mmol) est ajoutée à une solution de Na_2CO_3 (6 mL ; 13 g/L), y est ensuite ajouté l'oxyde de mésityle (383 µL ; 3,7 eq ; 3,36 mmol). La réaction a été agitée pendant 4 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS.

La phase aqueuse est lavée à l'éther diéthylique (3 x 10 mL). Le milieu est acidifié avec une solution aqueuse d'acide acétique à 25 % jusqu'à pH 5. La phase aqueuse est extraite à l'acétate

d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées avec une solution de NaCl saturée (50 mL), séchées sur MgSO4 puis évaporées.

Le produit (huile incolore) est repris dans du TFA (1,8 mL) dans lequel est ajouté TES (200 µL). Le milieu est agité pendant 20 minutes et devient légèrement jaune. Le TFA est évaporé avec un flux d'Argon ce qui rend le milieu très épais. Le produit est repris dans de l'éther diéthylique (10 mL) ce qui le fait précipiter, le milieu est lavé à l'eau (3 x 10 mL). Les phases aqueuses sont réunies, lavées à l'acétate d'éthyle (20 mL) et ensuite séchées sous flux d'azote.

Le produit est ensuite congelé puis lyophilisé pour obtenir 150mg d'un produit cristallin collant correspondant au Cys4MSP, rendement 53 %. L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 51 %.

i. S-(2-(methyl-d_3)-4-oxopentan-2-yl-1,1,1,3,5,5,5-d_7)-cystéine

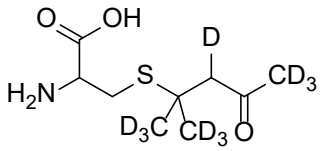


Figure 23: Cys4MSP-d_{10}

D'après (Dagan, 2006) et modifié comme suit, la Boc-Cys-OH (200 mg ; 1 eq ; 0,91 mmol est ajoutée à une solution de Na_2CO_3 (6 mL ; 13 g/L), y est ensuite ajouté l'oxyde de mésityle-d_{10} (379 µL ; 3,7 eq ; 3,35 mmol). La réaction est agitée pendant 4 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS.

La phase aqueuse est lavée trois fois avec 10mL d'éther diéthylique pour éliminer l'oxyde de mésityle restant. Le milieu est acidifié avec une solution aqueuse d'acide acétique à 25 % jusqu'à pH 5. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées à la saumure, séchées sur MgSO4 puis évaporées.

La phase aqueuse est lavée à l'éther diéthylique (3 x 10 mL). Le milieu est acidifié avec une solution aqueuse d'acide acétique à 25 % jusqu'à pH 5. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées avec une solution de NaCl saturée (50 mL), séchées sur MgSO4 puis évaporées.

Le produit (huile incolore) est repris dans du TFA (1,8 mL) dans lequel est ajouté le TES (200 µL). Le milieu est agité pendant 20 minutes et devient légèrement jaune. Le TFA est évaporé avec un flux d'argon ce qui rend le milieu très épais. Le produit est repris dans de l'éther diéthylique (10 mL) ce qui le fait précipiter, le milieu est lavé à l'eau (3 x 10 mL). Les phases aqueuses sont réunies, lavées à l'acétate d'éthyle (20 mL) et ensuite séchées sous flux d'azote.

Le produit est ensuite congelé puis lyophilisé pour obtenir 128 mg d'un produit cristallin collant correspondant au Cys4MSP-d_{10}, rendement 42 %. L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 94 %.

j. S-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéinylglycine

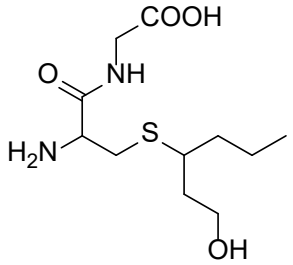


Figure 24: CysGly3SH

D'après (Capone *et al.*, 2011a) et modifié comme suit, le CysGly (75 mg ; 1 eq ; 0,35 mmol) est repris dans l'éluant (eau/acétonitrile 50/50 ; 10 mL) et sont successivement ajoutés la pyridine (60 µL ; 2 eq ; 0,7 mmol) et le (E)-hex-2-enal (86 µL ; 2 eq ; 0,7 mmol). La réaction est agitée pendant 48h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. Une coloration orangée apparait pendant la réaction.

Le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau (5 mL) et lavé au dichlorométhane (2 x 3 mL). Les phases aqueuses sont conservées et leurs volumes est réduit à l'évaporateur rotatif.

A cette phase aqueuse est ajouté le $NaBH_4$ (26,5 mg ; 2 eq ; 0,7 mmol). La réaction est agitée à 0 °C pendant 2 h sous gaz inerte et suivi en LC-MS. La réaction est ensuite stoppée à l'acide chlorhydrique 1 M jusqu'à un pH 3. La réaction a ensuite été lyophilisée pour donner un produit cristallin sous forme de sel de chlorhydrate.

Le produit est ensuite congelé puis lyophilisé pour obtenir 108 mg d'un produit cristallin, rendement quantitatif.

L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 6 %.

k. S-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d_2)-cystéinylglycine

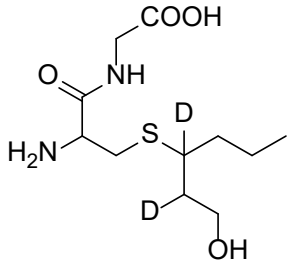


Figure 25: CysGly3SH-d_2

D'après (Capone *et al.*, 2011a) et modifié comme suit, le CysGly (125 mg ; 1 eq ; 0,7 mmol) est repris dans l'éluant (eau/acétonitrile 50/50 ; 10 mL) et sont successivement ajoutés la pyridine (120 µL ; 2 eq ; 1,4 mmol) et le (E)-hex-2-enal-d_2 (179 µL ; 2 eq ; 1,4 mmol). La réaction a été agitée pendant 48 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. Une coloration orangée apparait pendant la synthèse.

Le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau (5 mL) et lavé au dichlorométhane (2 x3 mL). Les phases aqueuses sont conservées et leurs volumes est réduit à l'évaporateur rotatif.

A cette phase aqueuse est ajouté le $NaBD_4$ (52,96 mg ; 2 eq ; 1,4 mmol). La réaction est agitée à 0 °C pendant 2 h sous gaz inerte et suivi en LC-MS. La réaction est ensuite stoppée à l'acide chlorhydrique 1 M jusqu'à un pH 3. La réaction a ensuite été lyophilisée pour donner un produit cristallin sous forme de sel de chlorhydrate.

Le produit est ensuite congelé puis lyophilisé pour obtenir un produit cristallin collant. Le produit est ensuite purifié par HPLC préparative pour obtenir après lyophilisation 24,6 mg d'une poudre blanche correspondant au CysGly3SH-d_2, rendement de 13 %.

L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 48 %.

l. γ-glutamyl-S-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine

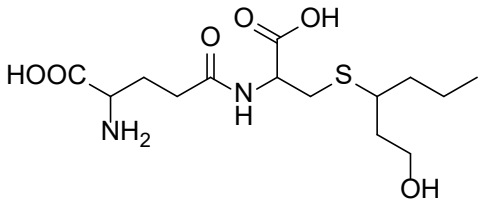


Figure 26: GluCys3SH

D'après (Bonnaffoux *et al.*, 2017) et modifié comme suit, le sel trifluoroacétique du γ-GluCys (100 mg ; 1 eq ; 0,27 mmol) est repris dans l'éluant (eau/acétonitrile 50/50 ; 10 mL) et sont successivement ajoutés la pyridine (139 µL ; 1,8 eq ; 0,5 mmol) et le (E)-hex-2-enal (33 µL ; 1 eq ; 0,27 mmol). La réaction est agitée pendant 24 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. Une coloration orangée apparait pendant la réaction.

Le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau (5 mL) et lavé au dichlorométhane (2 x 3 mL). Les phases aqueuses sont conservées et leurs volumes est réduit à l'évaporateur rotatif.

A cette phase aqueuse est ajoutée le $NaBH_4$ (15 mg ; 1,4 eq ; 0,4 mmol). La réaction est agitée à 0 °C pendant 2 h sous gaz inerte et suivi en LC-MS. La réaction est ensuite quenchée à l'acide chlorhydrique 1M jusqu'à un pH 3.

Le produit est ensuite congelé puis lyophilisé pour obtenir 136mg d'un produit cristallin sous forme de sel de TFA correspondant au γ-GluCys3SH, rendement quantitatif.

L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 15 %.

m. γ -glutamyl-S-(1-hydroxyhexan-3-yl-2,3-d_2)-cystéine

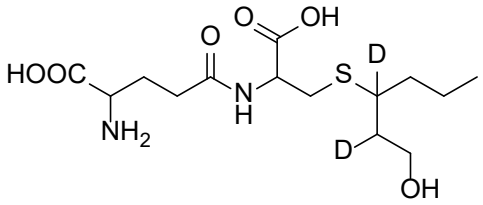


Figure 27: GluCys3SH-d_2

D'après (Bonnaffoux *et al.*, 2017) et modifié comme suit, le sel d'ammonium du γ-GluCys (72 mg ; 1 eq ; 0,28 mmol) est repris dans l'éluant (eau/acétonitrile 50/50 ; 10mL) et sont successivement ajoutés la pyridine (39 µL ; 1,8 eq ; 0,5 mmol) et le (E)-hex-2-enal-d_2 (35 µL ; 1eq ; 0,28 mmol). La réaction est agitée pendant 24 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. Une coloration orangée apparait pendant la réaction.

Le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau (5 mL) et lavé au dichlorométhane (2 x 3 mL). Les phases aqueuses sont conservées et leurs volumes est réduit à l'évaporateur rotatif.

A cette phase aqueuse est ajoutée le $NaBD_4$ (16,7 mg ; 1,4 eq ; 0,4 mmol). La réaction est agitée à 0 °C pendant 2 h sous gaz inerte et suivi en LC-MS. La réaction est ensuite quenchée à l'acide chlorhydrique 1 M jusqu'à un pH 3.

Le produit est ensuite congelé puis lyophilisé pour obtenir 150 mg d'un produit cristallin sous forme de sel d'ammonium, rendement quantitatif.

L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de 14 %.

n. N-acétyl-S-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine

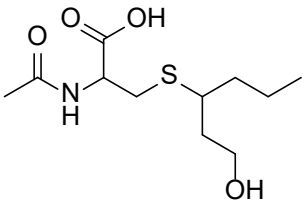


Figure 28: NAC3SH

D'après (Wakabayashi *et al.*, 2004) et modifié comme suit, le N-acétyl-L-cystéine (91,4 mg ; 1 eq ; 0,56 mmol) est repris dans l'éluant (eau/acétonitrile 50/50 ; 10 mL) et sont successivement ajoutés la pyridine (78 µL ; 1,8 eq ; 1 mmol) et le (E)-hex-2-enal (65 µL ; 1 eq ;

0,56 mmol). La réaction est agitée pendant 48 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par LC-MS/MS. Le brut réactionnel est ensuite été diluée avec de l'eau (5 mL), puis lavée deux fois avec du dichlorométhane (2 x 3 mL). La fraction aqueuse est ensuite concentrée sous volume réduit à environ 4 mL.

La solution est traitée avec du $NaBH_4$ (29,5 mg ; 1,4 eq ; 0,8 mmol) pendant 2 h à 0 °C et suivi par LC-MS/MS puis acidifiée avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 3.

Le produit est ensuite congelé puis lyophilisé pour obtenir 159,6mg d'un produit cristallin sous forme de sel de chlorhydrate, rendement quantitatif. Le produit est ensuite purifié par HPLC préparative pour obtenir après lyophilisation, deux isomères (R,R) et (R,S) avec 5 et 6 mg d'une poudre blanche respectivement, soit 11 mg de produit global et donc un rendement de 7 %.

L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de >99 % pour les deux produits.

o. 3-sulfanylhexan-2,3-d_2-1-ol

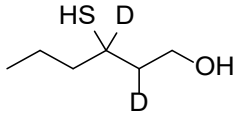


Figure 29: 3SH-d_2

D'après (Roland *et al.*, 2016), du (E)-hex-2-enal-d_2 (500 mg ; 1 eq ; 5 mmol) est repris dans du trétrahydrofurane (10 mL), puis sont successivement ajouté de la triéthylamine (912 µL ; 1,3 eq ; 6,5mmol), puis du l'acide thioacétique (714 µL ; 2 eq ; 10 mmol). La réaction est agitée pendant 16h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par GC-MS. Le brut réactionnel a ensuite été diluée avec du dichlorométhane (20 mL) puis lavé par de l'acide chlorhydrique 1 M (3 x 20 mL). La phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaCl saturée (50 mL), séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée sous pression réduite. L'intermédiaire et obtenu sous forme d'huile jaune.

Il est repris dans du EtOD (5ml). Une ampoule de coulée est remplie de $NaBD_4$ (166 mg ; 1,2 eq ; 3,96 mmol) préalablement dissous dans du D_2O (5 mL). La réaction est agitée pendant 5h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par GC-MS. Après évaporation de l'éthanol du milieu réactionnel, le résidu est repris avec de l'acide chlorhydrique 1 M (10 mL). Le milieu est extrait avec de l'éther diéthylique (3 x 50 mL). Les phases organiques sont ensuite lavées avec une solution de NaCl saturée (50 mL), séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée sous pression réduite. L'intermédiaire et obtenu sous forme d'huile orangée.

Ce produit est repris avec du NaOH 1 M (10 mL) et laissé avec agitation sous atmosphère inerte (Argon) pendant 30 minutes avec un suivi en GC-MS.

Le brut réactionnel est neutralisé avec une solution d'acide chlorhydrique 1 M jusqu'à un pH de 3. La phase aqueuse est ensuite extraite avec de l'éther diéthylique (3 x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées avec $MgSO_4$ puis évaporé à l'évaporateur rotatif.

Le 3SH-d_2 est alors obtenu sous forme d'huile orangée d'une masse de 201 mg soit un rendement de 32 %. L'analyse RMN a confirmé la structure du produit attendu et donne une pureté de produit à 18 %.

p. Acétate-d_3 de 3-sulfanylhexyle

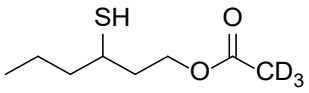


Figure 30: 3SHA-d_3

D'après (Roland *et al.*, 2016), le 3-sulfanylhexan-1-ol (750 µL ; 1 eq ; 5,43 mmol) est dilué dans du dichlorométhane (7,5 mL), est ajouté le chlorure d'acétyle-d_3 (1,2 µL ; 3 eq ; 16,29 mmol). La réaction est agitée pendant 5 h à température ambiante sous gaz inerte (Argon) avec suivi par GC-MS.

L'éthanol et l'excès de chlorure d'acétyle du brut réactionnel sont évaporés sous pression réduite. Le 3SHA-d_3 est obtenu sous forme d'huile d'une masse 1,028 g soit un rendement quantitatif.

VIII. Analyses chimiques

a. Analyse des métabolites fermentaires par HPLC

L'analyse du glucose, fructose, acétate, α-cétoglutarate, citrate, lactate, malate, pyruvate, succinate, éthanol et glycérol est réalisée sur une HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), la séparation est effectuée à l'aide d'une colonne Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %) (8 µm, 300 mm x 7,8 mm) à 60 °C. L'élution s'est faite de manière isocratique avec une phase mobile composée d'eau avec de l'acide sulfurique à 2,5 mM. La détection est faite par un détecteur RI pour le glucose et le fructose, et avec un détecteur UV pour les acides, l'éthanol et le glycérol.

b. Analyses des paramètres œnologiques

La concentration en sucre est mesurée avec un réfractomètre numérique PAL (Atago, Japon). L'acidité totale est mesurée selon la méthode potentiométrique de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV 2009). Un analyseur Gallery® (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) est utilisé pour analyser les acides aminés (Megazyme, Wicklow, Irlande), l'ammonium (Megazyme, Wicklow, Irlande). L'acide tartrique est quantifié par titrage colorimétrique (Megazyme, Wicklow, Irlande). Le pH des échantillons est mesuré avec un pH-mètre Titromatic (Hachlange, Düsseldorf, Allemagne).

c. Analyse du cuivre

La concentration en cuivre dans les échantillons est analysée avec un kit EnzytecColor COPPER (R-Biopharm, Darnstadt, Allemagne) sur un analyseur Gallery® (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). L'étalonnage du cuivre a été réalisé à partir d'une solution standard de nitrate de cuivre à 1 g/L d'équivalent cuivre (Avantor, Radnor, PA, USA) dans la gamme suivante : de 0 à 1,6 mg/L. L'absorbance a été mesurée à 580 nm.

d. Analyses des précurseurs de thiols

Les analyses des précurseurs de thiols se font en injection directe et dilution isotopique par LC-MS/MS selon la procédure de Bonaffoux et *al.,* 2017 et sont adaptées aux différents appareillages du laboratoire

i. Triple Quadripôle

Cet appareillage a été utilisé pour l'analyse des précurseurs cystéinylés et glutathionylés du 3SH et de la 4MSP des raisins issus du millésime 2019 (Dournes *et al.*, 2022). Le système d'analyse était composé d'une UPLC Acquity (Waters, Milford, MA, USA) associé à un spectromètre de masse de type triple quadripôle TQD de Waters. Les analytes ont été séparés

sur une colonne Hypersil gold (1,9 µm, 100 mm x 2,1 mm) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) avec une température de four de 40 °C et un temps d'analyse de 13 min. La phase mobile était composée (A) d'eau avec 0,1 % d'acide formique et (B) de méthanol avec 0,1 % d'acide formique. Le gradient a commencé à 2 % de B et a été augmenté à 5 % en 3 min, à 10 % en 2 min, à 20 % en 3 min, puis augmenté à 80 % en 4 min pour revenir aux conditions initiales. Les paramètres de la source étaient les suivants : température de désolvatation de 350 °C, température de la source de 80 °C ; débit de gaz égal à 800 mL/min et tension capillaire égale à 3,0 kV en mode positif. L'ionisation a été réalisée en utilisant l'électrospray positif (ESI+) et la détection a été faite en mode de surveillance des réactions multiples (MRM). Les transitions de quantification et de qualification sont décrites dans le Tableau 13.

Tableau 10: Transition MRM pour l'analyse des précurseurs de thiols en triple quadripôle

Précurseurs de thiols	Ion père (m/z)	Ion fils (m/z)	Type de transition	Temps d'arrêt (min)	Voltage de cône (V)	Energie de collision (V)
Cys4MSP-d_6	**226**	**105**	**Quantifier**	**0.100**	**18**	**13**
Cys4MSP-d_6	226	122	Qualifier	0.100	18	13
Cys4MSP	**220**	**99**	**Quantifier**	**0.100**	**18**	**18**
Cys4MSP	220	105	Qualifier	0.100	18	22
Cys4MSP	220	122	Qualifier	0.100	18	10
G4MSP-d_{10}	**416**	**269**	**Quantifier**	**0.050**	**28**	**16**
G4MSP-d_{10}	416	179	Qualifier	0.050	28	16
G4MSP-d_{10}	416	162	Qualifier	0.050	28	28
G4MSP	**406**	**259**	**Quantifier**	**0.050**	**28**	**16**
G4MSP	406	179	Qualifier	0.050	28	18
G4MSP	406	162	Qualifier	0.050	28	24
Cys3SH-d_2	**224**	**85**	**Quantifier**	**0.050**	**20**	**16**
Cys3SH-d_2	224	103	Qualifier	0.050	20	12
Cys3SH	**222**	**53**	**Quantifier**	**0.050**	**20**	**16**
Cys3SH	222	101	Qualifier	0.050	20	12
Cys3SH	222	105	Qualifier	0.050	20	16
G3SH-d_2	**410**	**162**	**Quantifier**	**0.100**	**32**	**22**
G3SH-d_2	410	264	Qualifier	0.100	32	16
G3SH-d_2	410	281	Qualifier	0.100	32	12
G3SH-d_2	410	335	Qualifier	0.100	32	18
G3SH	**408**	**162**	**Quantifier**	**0.100**	**30**	**20**
G3SH	408	262	Qualifier	0.100	30	16
G3SH	408	279	Qualifier	0.100	30	14
G3SH	408	333	Qualifier	0.100	30	16

ii. Trappe ionique

Les analyses du millésimes 2020 ont été une chaine UPLC Acquity (Waters, Milford, MA, USA) couplée à un spectromètre de masse de type trappe ionique AmazonX (Bruker, Billerica, Massachusetts, États-Unis). En complément des cibles présentes sur le premier appareil, le γ-GluCys3SH et le CysGly3SH sont analysés en dilution isotopique ainsi que le NAC3SH en étalonnage interne. La séparation est réalisée sur une colonne Hypersil gold (1,9 µm, 100 mm x 2,1 mm).

La séparation chromatographique a été réalisée à une température de four de 38 °C et la durée d'analyse était de 21 minutes. Les phases mobiles étaient composées de (A) eau avec 0,1 % d'acide formique et (B) acétonitrile / eau (80/20) avec 0,1 % d'acide formique. Le gradient a commencé à 2 % de B pendant 5 min, a augmenté à 6,9 % sur 7 min, à 25 % en 3 min, à 98 % en 2 min maintenu pendant 2 min avant de revenir aux conditions initiales pendant 2 min. Les paramètres de la source étaient les suivants : température de désolvatation : 200 °C, pression du nébuliseur : 3,03 bars, gaz sec : 12,0 L/min et tension capillaire : 4,5 kV en mode positif. L'ionisation a été réalisée par électrospray positif (ESI+) et la détection a été faite en mode MS/MS avec de l'argon comme gaz de collision avec une gamme de masse entre 90 et 500 m/z. La quantification a été effectuée sur le profil MS2 pour chaque analytes.

Tableau 11: Transitions MS2 pour l'analyse des précurseurs de thiols en trappe ionique

Précurseurs de thiols	Etalon interne	Ion parent pour le CID (m/z)	Gamme de balayage (m/z)	Ion fils pour la quantification (m/z)
Cys4MSP	Cys4MSP-d_6	220	90-240	122
Cys4MSP-d_6		226	90-240	122
Cys3SH	Cys3SH-d_2	222	70-240	205
Cys3SH-d_2		224	70-240	207
G4MSP	G4MSP-d_7	406	90-450	259
G4MSP-d_7		413	90-450	266
CysGly3SH	CysGly3SH-d_2	279	90-300	262
CysGly3SH-d_2		280	90-300	264
G3SH	G3SH-d_2	408	90-430	264
G3SH-d_2		410	90-430	264
γ-GluCys3SH	γ-GluCys3SH-d_2	351	70-290	205
γ-GluCys3SH-d_2		353	70-290	207
NAC3SH	Cys3SH-d_2	264	70-290	246

iii. Triple Quadripôle

Les analyses du millésime 2021 ont été réalisées sur une chaine 1290 Infinity II UHPLC couplée à un spectromètre de masse 6470B de type triple quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Les analyses en dilution isotopique sont les mêmes que précédemment et le NAC3SH est maintenu en étalonnage interne. La séparation est réalisée sur une colonne Hypersil gold (1,9 µm, 100 mm x 2,1 mm).

La séparation est réalisée avec une température de four de 40 °C à un débit de 0,6mL/min pour une durée d'analyse de 15 minutes. Les phases mobiles sont composées de (A) eau avec 0,1 % d'acide formique et (B) méthanol avec 0,1 % d'acide formique. Le gradient commence à 5 % de B pendant 1 min, augmente à 35 % en 9 min, puis à 98 % en 3 min, est maintenu pendant 2 min, puis redescend à 5 % en 10 secondes et est maintenu pendant 2 min. Les paramètres de la source sont les suivants : température de désolvatation : 230 °C, débit du gaz de désolvatation : 4 L/min, température du « sheath gas » : 400 °C, débit du « sheath gas » : 11 L/min pression du nébuliseur : 3,79 bars, tension du capillaire : 3 kV en mode positif, tension de la buse 0 V et un delta positif de l'EMV à 400 V. L'ionisation est réalisée par électrospray positif (ESI+) et la détection a été faite en mode MRM. La quantification est effectuée sur une transition spécifique pour chaque composé.

Tableau 12: Transition MRM pour l'analyse des précurseurs de thiols en triple quadripôle

Précurseurs de thiols	Ion père (m/z)	Ion fils (m/z)	Type de transition	Temps de rétention (min)	Fragmenteur (V)	Energie de collision (V)
Cys4MSP	**220**	**99**	**Quantifier**	**1,9**	**80**	**8**
Cys4MSP	220	105	Qualifier	1,9	80	8
Cys4MSP	220	122	Qualifier	1,9	80	8
Cys4MSP-d_6	**226**	**105**	**Quantifier**	**1,9**	**80**	**8**
Cys4MSP-d_6	226	122	Qualifier	1,9	80	8
G4MSP	**406**	**259**	**Quantifier**	**3,7**	**120**	**20**
G4MSP	406	179	Qualifier	3,7	120	20
G4MSP	406	162	Qualifier	3,7	120	20
G4MSP-d_{10}	**416**	**269**	**Quantifier**	**3,7**	**120**	**16**
G4MSP-d_{10}	416	179	Qualifier	3,7	120	16
G4MSP-d_{10}	416	162	Qualifier	3,7	120	16
Cys3SH	**222**	**83**	**Quantifier**	**3,8**	**80**	**16**
Cys3SH	222	101	Qualifier	3,8	80	16
Cys3SH	222	105	Qualifier	3,8	80	16
Cys3SH-d_2	**224**	**85**	**Quantifier**	**3,8**	**80**	**8**
Cys3SH-d_2	224	103	Qualifier	3,8	80	8
CysGly3SH	**279**	**162**	**Quantifier**	**4,5**	**90**	**12**
CysGly3SH	279	262	Qualifier	4,5	90	12
CysGly3SH	279	116	Qualifier	4,5	90	12
CysGly3SH-d_2	**281**	**162**	**Quantifier**	**4,5**	**90**	**12**
CysGly3SH-d_2	281	264	Qualifier	4,5	90	12
CysGly3SH-d_2	281	116	Qualifier	4,5	90	12
G3SH	**408**	**162**	**Quantifier**	**5,6**	**130**	**24**
G3SH	408	262	Qualifier	5,6	130	24
G3SH	408	279	Qualifier	5,6	130	24
G3SH-d_2	**410**	**162**	**Quantifier**	**5,6**	**130**	**24**
G3SH-d_2	410	264	Qualifier	5,6	130	24
G3SH-d_2	410	281	Qualifier	5,6	130	24
γ-GluCys3SH	**351**	**205**	**Quantifier**	**5,9**	**120**	**24**
γ-GluCys3SH	351	83	Qualifier	5,9	120	24
γ-GluCys3SH	351	222	Qualifier	5,9	120	24
γ-GluCys3SH-d_2	**353**	**207**	**Quantifier**	**5,9**	**120**	**16**
γ-GluCys3SH-d_2	353	85	Qualifier	5,9	120	16
γ-GluCys3SH-d_2	353	224	Qualifier	5,9	120	16
NAC3SH	**264**	**130**	**Quantifier**	**8**	**90**	**8**
NAC3SH	264	122	Qualifier	8	90	8
NAC3SH	264	83	Qualifier	8	90	8

e. Analyse des thiols variétaux

L'analyse des thiols (3SH et 3SHA) libres (réduits) et totaux (réduits+oxydés) se fait en LC-MS/MS avec une méthode en dilution isotopique suite à une dérivatisation avec du N-phénylmaléimide (NPM) (Roland *et al.*, 2016).

Pour les thiols libres, la dérivatisation utilise un aliquot (1 mL) de vin ou de gamme de calibration auquel est ajouté successivement la solution d'étalons internes (14 µL), le tampon ammonium (NH_4HCO_3 ; 1 M ; pH 8,5 ; 150 µL) et le NPM (25 mM dans un mélange 50/50 d'éthanol absolu et de tampon ammonium ; 180 µL). L'échantillon est ensuite laissé à agiter pendant 1h, la dérivatisation est stoppée par l'ajout d'acide acétique glacial (100 µL).

Pour les thiols totaux, la dérivatisation utilise un aliquot (1 mL) de vin ou de gamme de calibration auquel est ajouté successivement de la solution d'étalons internes (14 µL), le tampon ammonium (NH_4HCO_3 ; 1 M ; pH 8,5 ; 150 µL). A cette étape est ajoutée le tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) (0,25 M dans l'eau ; 10 µL). Après 30 minutes de réaction sous agitation, le NPM est ajouté (25 mM dans un mélange 50/50 d'éthanol absolu et de tampon ammonium ; 180 µL). L'échantillon est ensuite laissé à agiter pendant 1 h, la dérivatisation est stoppée par l'ajout d'acide acétique glacial (100 µL).

Les thiols sont analysés sur une chaine 1290 Infinity II UHPLC couplée à spectromètre de masse 6470B de type triple quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La séparation est réalisée avec une température de four de 40 °C à un débit de 0,5 mL/min pour une durée d'analyse de 10 minutes. Les phases mobiles sont composées de (A) eau avec 0,1 % d'acide formique et (B) méthanol avec 0,1% d'acide formique. Le gradient commence à 20 % de B, augmente à 80 % en 4 min, puis à 99 % en 2 min, est maintenu pendant 1 min, puis redescend à 20 % en 1 secondes et est maintenu pendant 2 min. La séparation est réalisée sur une colonne La séparation est réalisée sur une colonne Synchronis C18 (1,7 µm, 100 mm x 3 mm). Les paramètres de la source sont les suivants : température de désolvatation : 230 °C, débit du gaz de désolvatation : 10 L/min, température du « sheath gas » : 300 °C, débit du « sheath gas » : 12L/min pression du nébuliseur : 3,79 bars, tension du capillaire : 3 kV en mode positif, tension de la buse 1000V et un delta positif de l'EMV à 200V. L'ionisation est réalisée par électrospray positif (ESI+) et la détection a été faite en mode MRM. La quantification est effectuée sur une transition spécifique pour chaque composé.

Tableau 13: Transition MRM pour l'analyse des thiols avec dérivatisation au NPM en triple quadripôle

Précurseurs de thiols	Ion père (m/z)	Ion fils (m/z)	Type de transition	Temps d'arrêt (ms)	Fragmenteur (V)	Energie de collision (V)
3SH-NPM	**308**	**208**	**Quantifier**	**20**	**96**	**12**
3SH-NPM	308	146	Qualifier	20	96	28
3SH-d_3-NPM	**311**	**208**	**Quantifier**	**20**	**100**	**12**
3SH-d_3-NPM	311	146	Qualifier	20	100	28
3SHA-NPM	**350**	**290**	**Quantifier**	**20**	**128**	**8**
3SHA-NPM	350	146	Qualifier	20	128	16
3SHA-NPM	350	208	Qualifier	20	128	28
3SHA-d_3-NPM	**353**	**290**	**Quantifier**	**20**	**118**	**8**
3SHA-d_3-NPM	353	146	Qualifier	20	118	16
3SHA-d_3-NPM	353	208	Qualifier	20	118	32

IX. Modélisation chimique

La modélisation chimique a été réalisée avec ChemDraw Professional 19.1 (PerkinElmer, Waltham, MA, United States). La modélisation 3D a été réalisée sur le même logiciel avec l'optimisation MM2.

X. Statistiques

Les statistiques ont été réalisées avec Excel 2016 (Microsoft, Richmond, WA, USA) ainsi que R Studio (version 3.6.2).

01 Caractérisation des précurseurs de thiols dans le Colombard et le Gros Manseng

Comparaison de deux modes de cultures

Selon une étude de FranceAgriMer en 2018, le Colombard et le Gros Manseng sont relativement bien représentés en France avec respectivement 11 316 et 3 912 ha de surface plantée. Dans le monde, le Colombard est aujourd'hui également très présent en Afrique du Sud et historiquement en Californie. Malgré leur culture relativement importante, ces cépages sont peu cités dans la littérature sur les précurseurs de thiol en comparaison du Sauvignon blanc, ce qui limite nos connaissances à leur sujet. Ainsi les précurseurs de thiol du Colombard n'ont jamais été caractérisé. Pour le Gros Manseng, seul le Cys3SH a été quantifié, une fois de manière indirecte avec une concentration de 4199 ng/L d'équivalent 3SH. Et une deuxième fois de manière directe avec des concentrations allant de 0,3 à 29,1 µg/L (Dagan, 2006).

Ainsi, l'objectif premier de ce chapitre est de décrire ces deux cépages dans les Côtes de Gascogne à travers un observatoire construit avec l'IFV. Celui-ci est composé de 50 % de parcelles ayant un parcours viticole conventionnel et 50 % de biologiques. Ce réseau de 40 parcelles se veut représentatif des pratiques rencontrées dans cette appellation mais aussi des différences géographiques. Les données générées permettront de compléter les connaissances sur ces cépages en mettant l'accent sur les précurseurs de thiol et le cuivre liés aux pratiques viticoles. Elles permettront également de positionner ces deux cépages par rapport au célèbre Sauvignon blanc, référence absolue pour la problématique des thiols.

Ce jeu de données sera étudié non pas du point de vue de la variété mais du point de vue du mode de conduite viticole. Sur l'ensemble des 40 parcelles, les pratiques viticoles ont été laissées à la discrétion des viticulteurs pour permettre de représenter au mieux cette diversité. Par

conséquent, même si chaque parcelle peut être classée en bio ou en conventionnel, les doses et qualités des traitements viticoles appliquées sur chaque parcelle sont très variables. L'effet des pratiques biologiques sur la biogénèse des précurseurs de thiols dans les raisins sera comparé au conventionnel sur 20 parcelles pour chaque cépage.

Par la suite, certaines parcelles ont fait l'objet d'un suivi plus détaillé tout au long de la maturation. Ce suivi s'est concentré sur l'analyse des précurseurs de thiols, premièrement pour compléter la connaissance de ces cépages en décrivant la cinétique d'accumulation de ces composés dans le raisin et deuxièmement pour apporter un début de réponse concernant l'effet du cuivre sur le métabolisme des précurseurs de thiols dans la vigne.

Ce premier travail sur le millésime 2019 a fait l'objet d'une publication dans l'Australian Journal of Grape and Wine Research.

Cet observatoire a été reconduit lors des vendanges 2020 et 2021 en conservant dans la mesure du possible les mêmes parcelles utilisées lors du millésime 2019. Ces résultats nous ont permis d'étudier la répétabilité ainsi que l'effet millésime des tendances observées en 2019. Ainsi que le comportement d'une catégorie de parcelles définies comme intermédiaire, qui ont suivi une culture conventionnelle avec application de cuivre en complément des antifongiques de synthèse.

Check for updates

First characterisation of thiol precursors in Colombard and Gros Manseng: comparison of two cultivation practices

G. DOURNES[1], A. VERBAERE[1], F. LOPEZ[2], T. DUFOURCQ[2], J.-R. MOURET[1] and A. ROLAND[1]

[1] Sciences pour l'Œnologie, Université de Montpellier, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Institut Agro, Montpellier 34060, France; [2] Institut Francais de la Vigne et du Vin Sud-Ouest, Pôle Sud-Ouest, Caussens 32100, France

Corresponding author: Dr Aurélie Roland, email aurelie.roland@supagro.fr

Abstract

Background and Aims: The thiol aromatic potential of the grape cultivars, Colombard and Gros Manseng, from Côtes de Gascogne was characterised for the first time.

Methods and Results: We demonstrated that both cultivars contained a concentration of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-sulfanylhexan-1-ol up to 454 and 21 µg/kg, respectively, which makes them good cultivars for the production of wines rich in thiols. No precursors, however, of the 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one were detected. We then studied the impact of cultivation practices by comparing conventional and organic training systems on the biosynthesis of thiol precursors in grapes. We showed that the concentration of glutathionylated precursors of 3-sulfanylhexan-1-ol in Gros Manseng varied significantly according to the type of cultivation, whereas they remained unaffected in Colombard grapes. Organic Gros Manseng grapes (copper concentration of 466 ± 275 µg/kg) exhibited up to 30% loss of thiol precursors compared to that found in conventional grapes (copper concentration 199 ± 91 µg/kg).

Conclusions: The free copper concentration at harvest does not correlate with the decrease in thiol precursor concentration, leading to the conclusion that differences found between the management of the two vineyard practices are not simply related to copper but are a multifactorial phenomenon.

Significance of the Study: Colombard and Gros Manseng contain a high concentration of thiol-type aromatic compounds, the concentration of which can be modulated by agronomic practices.

Keywords: *Colombard, copper, Gros Manseng, organic viticulture, thiol precursor, wine*

Introduction

The sensory notes of Côtes de Gascogne white wines are reminiscent of grapefruit, passionfruit and box tree that have long been attributed to the varietal thiols, 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH), 3-sulfanylhexyl acetate (3SHA) and 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP), respectively (Roland et al. 2011b). 3-Sulfanylhexan-1-ol and 4MSP are derived from odourless precursors in grapes which are mainly cleaved by β-lyase enzymatic activity from the yeast during alcoholic fermentation (Tominaga et al. 1998) and to a lesser extent by LAB during the MLF (Takase et al. 2018, Li et al. 2021). The 3SHA is the acetylation product of 3SH catalysed by the alcohol acetyltransferase from the yeast (Swiegers et al. 2006).

Varietal thiols have been identified in some white wines, such as Sauvignon Blanc, Riesling, Gewürztraminer, Colombard (Tominaga et al. 2000), Petit Arvine (Luisier et al. 2008), Petit and Gros Manseng (Peyrot Des Gachons et al. 2002, Dagan 2006), Verdicchio (Mattivi et al. 2012), Arneis (Piano et al. 2014) and Catarratto Bianco Comune and Grillo (Fracassetti et al. 2018). The precursors of 3SH and 4MSP are produced in grapes and belong to four different families: *S*-cysteine conjugates (Tominaga et al. 1998), *S*-glutathione conjugates including aldehyde and bisulfite adduct (Peyrot Des Gachons et al. 2002, Fedrizzi et al. 2009, Roland et al. 2010a, Thibon et al. 2016), dipeptidic derivatives (only for 3SH) with *S*-γ-Glu-Cys moiety (Bonnaffoux et al. 2017) and *S*-Cys-Gly moiety (Capone et al. 2011). For 3SH specifically, an alternative biogenesis pathway through the C6-compounds such as hexenal and hexenol has been identified (Schneider et al. 2006, Harsch et al. 2013). Both aromas and their precursors have been intensively studied for 25 years in Sauvignon Blanc grapes and wine (Darriet et al. 1995, Belda et al. 2017, Ruiz et al. 2019). The distinct varietal thiol notes of Colombard and Gros Manseng, however, have been little studied. In 2008, one study in Côtes de Gascognes showed that Colombard and Gros Manseng wines have a significant concentration of both 3SH and 3SHA without any characterisation of thiol aromatic potential in these cultivars (Dufourcq et al. 2008).

Thiol precursors exist at trace concentration in grapes (ppb) (Pena-Gallego et al. 2012) and their concentration can be influenced by cultivation practices. Indeed, it has been demonstrated that high nitrogen status in the vineyard increased cysteinylated precursor concentration by a factor of four (Choné et al. 2006), as well as increasing the concentration of varietal thiols in the corresponding finished wines (Geffroy et al. 2016). Furthermore, pruning vines (Cerreti et al. 2016), canopy management (Sivilotti et al. 2017) as well as *Botrytis cinerea* contamination could modulate precursor concentration in grapes (Thibon et al. 2009). Today in France, many vineyards are switching to organic practices with a considerable increase in 2018 of +23% and corresponding to 112 057 ha in France. The impact of organic protection practices (mainly based upon spraying copper) on the biogenesis of thiol precursors in

doi: 10.1111/ajgw.12547
© 2022 Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.

grapes has not been studied to our knowledge. One study pointed out the negative influence of copper treatment on varietal thiols in Sauvignon Blanc wines but did not assess its effect on thiol precursors (Darriet et al. 2001). Today, no formal rule regarding the consequences of copper application on precursor level in the vineyard can be established.

Therefore, the aim of this work was to characterise the thiol precursor concentration of two understudied grape cultivars, Colombard and Gros Manseng. The second objective was to evaluate the impact of organic practices on these two cultivars and especially on their thiol aromatic potential.

Materials and methods

Chemicals

Water and methanol LC–MS grade (>99.9%) were purchased from Fisher Scientific, Illkirch, France; deuterium (99.8% D), (*E*)-2-hexenal (98%), 2-hexyn-1-ol (≥97%), Boc-Cys-OH (≥98.5%), (Boc-Cys-OH)$_2$ (≥98%), ethanol-OD (≥99%), hydrochloric acid (37%), L-glutathione reduced (98%), Lindlar catalyst, manganese(IV) oxide (≥99%), mesityl oxide (≥90%), mesityl oxide d$_{10}$ (>98% D), triethylamine (≥99%) from Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France; triethylsilane (≥98%) from TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium; and disodium hydrogen phosphate (≥99%), sodium carbonate (≥99%), sodium dihydrogen phosphate dihydrate (≥99%), trifluoroacetic acid (≥99.9%) from Carl Roth, Karsruhe, Germany.

Grape sampling

A network of vine plots in 30 vineyards was selected in the Côtes de Gascogne region during vintage 2019. Each sample consisted of 1 kg of grapes which were hand-picked from one row (between 50 and 100 vines) in each vineyard and then stored at −20°C before analysis. These vineyards covered a large part of the Protected Geographical Indication Côtes de Gascogne as detailed in Table S1. One-half of the plots of each cultivar was managed under conventional practices, which means without any copper application, and the other half following the rules of organic cultivation [only copper treatment as a fungicide up to the maximum legal dose of 4 kg/(ha · year)]. The ripening of grapes was followed in 12 plots (three conventional + three organic plots of Colombard; three conventional + three organic plots of Gros Manseng), at harvest (H), H − 7 days and H + 7 days for Colombard and H, H + 9 and H + 16 or H + 18 for Gros Manseng. The other 18 plots were sampled only on the day of harvest. In most cases, the grapes from the same cultivar were harvested within 1 week, with the exact harvest date listed in Table S2 along with viticultural data on copper treatment on these plots. Additional information on plot 11 must be given, as this plot, which is considered conventional, received a copper treatment 130 days before harvest. This was a pre-flowering treatment which, together with the data on the concentration of copper in the grapes from this plot, led us to consider it as not having been treated with copper.

Sample preparation

For each frozen grape sample (1 kg), 200 berries were selected and weighed. After thawing, grapes were crushed with sodium metabisulfite (4.5 mg/mL of expected volume of must) then centrifuged (4500 *g*, 15 min, 4°C). The clear juice was then collected and stored at −20°C before analysis.

Copper analysis

Copper concentration in grapes was analysed with EnzytecColor COPPER (R-Biopharm, Darnstadt, Germany) on a Gallery Discrete Analyser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The copper calibration was made from a standard solution at 1 g/L Cu (Avantor, Radnor, PA, USA) in the following range: from 0 to 1.6 mg/L. Absorbance was measured at 580 nm.

Oenological parameters

Sugar concentration was measured with a PAL digital handheld pocket refractometer (Atago, Tokyo, Japan). Total acidity was measured following the method of the Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin 2008). A Gallery Discrete Analyser was used to analyse amino acids, ammonium (Megazyme, Wicklow, Ireland) and malic acid (Thermo Fisher Scientific). Tartaric acid was measured by colorimetric titration (Hill and Caputi 1970). The pH in samples was measured with a Titromatic pH meter (Hachlange, Düsseldorf, Germany). All analyses were done on 12 fresh samples before freezing.

Chemical synthesis of natural and deuterated thiol precursors

3-*S*-Glutathionylhexan-1-ol (G3SH/G3SH d$_2$) (Roland et al. 2010b), 4-*S*-glutathionyl-4-methylpentan-2-one (G4MSP/G4MSPd$_{10}$) (Fedrizzi et al. 2009, Grant-Preece et al. 2010), 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol (Cys3SH/Cys3SH d$_2$) and 4-*S*-cysteinyl-4-methylpentan-2-one (Cys4MSP/Cys4MSP d$_6$) (Dagan 2006) were synthesised according to the published methods. Synthetic and natural compounds were characterised and quantified with ^{1}H NMR.

Analysis of thiol precursors by stable isotope dilution assay and UPLC-MS/MS

Cysteinylated and glutathionylated precursors of 3SH and 4MSP were analysed by stable isotope dilution assay and UPLC-MS/MS through direct injection of Colombard and Gros Manseng grapes must as previously reported (Bonnaffoux et al. 2017) and modified as follows. The analytical system consisted of an Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) attached to a Waters TQD triple quadrupole MS. Analytes were separated on a Hypersil gold column (1.9 µm, 100 mm × 2.1 mm) (Thermo Fisher Scientific) with an oven temperature of 40°C and total run time of 13 min. The mobile phase was composed of (A) water with 0.1% formic acid and (B) methanol with 0.1% formic acid. The gradient started at 2% of B and was increased to 5% over 3 min, to 10% in 2 min, to 20% in 3 min, then increased to 80% over 4 min to return to initial conditions. Source parameters were as follows: desolvation temperature was 350°C, source temperature was 80°C, gas flow equal to 800 mL/min and capillary voltage equal to 3.0 kV under the positive mode. Ionisation was carried out using positive electrospray (ESI+) and detection was made under multiple reaction monitoring mode. Quantification and qualification transitions are described in Table S3.

Statistical analysis

Means, SD values and one-way ANOVA followed by Fisher's multiple comparisons ($\alpha = 0.1$) were determined with EXCEL 2016 (Microsoft, Richmond, WA, USA).

© 2022 Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.

Results and discussion

Characterisation of grape cultivars

The network of vineyards was used to describe the basic oenological parameters and the thiol aromatic potential of 15 lots of Colombard and Gros Manseng grapes.

Basic oenological parameters. At harvest, sugar concentration averaged 188 ± 23 g/L for Colombard and 245 ± 13 g/L for Gros Manseng which would correspond to a probable alcohol concentration of 11.2 ± 1.4% and 14.6 ± 0.8%, respectively. The average concentration of yeast assimilable nitrogen (amino acid and ammonium) was 261 ± 75 mg/L for Colombard and 191 ± 103 mg/L for Gros Manseng. Relative to the sugar concentration, Gros Manseng grapes have a low nitrogen status which could interfere with the synthesis of secondary metabolites such as the thiol precursors (Choné et al. 2006). Total acidity was 6.2 ± 0.8 g/L H_2SO_4 (9.5 ± 1.2 g/L of tartaric acid) for Colombard and 5.5 ± 0.5 g/L H_2SO_4 (8.4 ± 0.8 g/L of tartaric acid) for Gros Manseng, and pH was 2.9 ± 0.1 for both cultivars (Table S4). The average berry mass (200 berries) was 362 ± 32 g for Colombard and 209 ± 14 g for Gros Manseng, resulting in 253 ± 24 mL and 123 ± 13 mL of juice on average (Table 1).

Precursors of 4MSP. Both cultivars had no detectable Cys4MSP and G4MSP, which is consistent with two previous reports. In 2000, Tominaga and co-workers detected no 4MSP in Colombard wines suggesting an absence of precursors in the corresponding grapes (Tominaga et al. 2000). In later work, Dagan (2006) detected no 4MSP precursors in Gros Manseng must (limit of detection of the analytical method estimated to be 500 ng/L). Due to the congruence between our results and previous studies, we can conclude that the absence of thiol precursors of 4MSP in both Colombard and Gros Manseng grapes should not give blackcurrant bud and boxtree notes to the finished wines.

Glutathiolynated precursor of 3SH. Colombard and Gros Manseng grapes had a relatively high concentration of G3SH. In order to account for the variation in berry size, we expressed the concentration on a mass basis (µg/kg of fresh grapes). The G3SH in Colombard grapes ranged from 129 to 446 µg/kg of fresh grapes averaging at 249 µg/kg, whereas the G3SH in Gros Manseng grapes varied from 145 to 454 µg/kg with a mean of 250 µg/kg (Table 1). This is at least tenfold greater than the values of 14.5–22 µg/kg of G3SH reported for Sauvignon Blanc from north-eastern Italy (Sivilotti et al. 2017). In order to compare with previous work, we converted mass concentration into a volumetric measurement (µg/L of grape must obtained from fresh grapes) despite the solid nature of the samples. The average volumetric concentration of G3SH was 363 µg/L in Colombard and 425 µg/L in Gros Manseng. Thus, these two cultivars are in the same range as Sauvignon Blanc from France, Chardonnay and Pinot Gris from Australia; higher than Riesling from France and Australia; and more than tenfold higher than Melon Blanc from France, Gewürztraminer from France and Koshu grapes from Japan (Pena-Gallego et al. 2012). It is also in the same range as Australian Sauvignon Blanc (Chen et al. 2019), and as Grillo and Catarratto Bianco Comune from Italy (Fracassetti et al. 2018). The highest volumetric concentration of G3SH reached 705 µg/L in Colombard and 751 µg/L in Gros Manseng, achieving values as high as that obtained for Sauvignon Blanc (642 µg/L) in Australia (Capone et al. 2010). This is a first step towards indicating the high thiol aromatic potential of these two grape cultivars.

Cysteinylated precursor of 3SH. Both cultivars had a per mass concentration of Cys3SH of about 8 µg/kg. Colombard grapes reached up to 21 µg/kg, whereas Gros Manseng grapes had only 14 µg/kg (Table 1). The highest Cys3SH volumetric concentration was 34 µg/L for Colombard and 26 µg/L for Gros Manseng; positioning them in the same order of magnitude as Chardonnay, Riesling, Pinot Gris and Koshu must (Kobayashi et al. 2010) and of Grillo and Catarratto Bianco Comune (Fracassetti et al. 2018), higher than Melon Blanc and Merlot (Roland et al. 2010c) and in the low range of Petite Arvine, Sémillon and Sauvignon Blanc (Luisier et al. 2008, Thibon et al. 2009). These data are in accordance with a previous analysis of Gros Manseng which reported values in the range of 2.1–29.1 µg/L (Dagan 2006).

The classification of thiol aromatic potential (sum of cysteinylated and glutathionylated precursors) of grape cultivars is difficult and depends on several critical parameters:

- analytical strategies: direct analysis of thiol precursors (Roland et al. 2010c, Capone et al. 2012) or indirect approaches mainly based upon enzymatic release of varietal thiol (Thibon et al. 2009); and
- sample preparation: freezing effect (Sivilotti et al. 2017, Chen et al. 2019) or anti-oxidant addition before freezing (Bonnaffoux et al. 2017).

Ratio of thiol precursors. The precursor ratio of both Colombard and Gros Manseng was 97/3 in favour of G3SH. The overall high proportion of G3SH is similar to that of Chardonnay or Pinot Gris with 94/6 and 95/5, respectively (Capone et al. 2010). Surprisingly, this is different from Sauvignon Blanc grapes which have a ratio of around 75/25 (Chen et al. 2019). Because thiol precursors are either directly or indirectly metabolised by the yeast during the alcoholic fermentation, the ratio of thiol precursors in grapes has significance for wine quality. Indeed, the G3SH can be: (i) directly cleaved into 3SH; and/or (ii) first converted into γ-GluCys-3SH then into Cys3SH and finally converted into 3SH (Grant-Preece et al. 2010, Bonnaffoux et al. 2018). Each thiol precursor has a different conversion yield to volatile thiol by the yeast and knowing the exact ratio of thiol precursor would be useful to modulate the final concentration of varietal thiols in wine. The highest thiol precursor in Colombard and Gros Manseng grapes is G3SH, thus we can assume that more interconversion mechanisms may lead to different wine aroma profiles than those normally found in Sauvignon Blanc (Lund et al. 2009).

Effect of cultivation practices on basic oenological parameters and thiol precursors. The cultivation practices (organic vs conventional protection) for Colombard grapes significantly affected the pH [on average of 2.87 ± 0.04 for the organic grapes and 3.02 ± 0.06 for the conventional ones (*P*-value = 0.02)] and the tartaric acid concentration 3.8 ± 0 g/L and 2.8 ± 0.3 g/L, respectively (*P*-value = 0.008) (Table S4). These changes linked to the cultivation practices have already been reported in the literature for several grape cultivars (Henick-Kling 1995, Darriet et al. 2001). Martins et al. (2014) recently showed that the application of

© 2022 Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.

Table 1. Effect of organic and conventional cultivation practices on the composition of Colombard and Gros Manseng grapes at harvest during the 2019 vintage.

Plots	Mass (g)	Volume (mL)	Copper (µg/kg)	Cys3SH (µg/kg)	G3SH (µg/kg)	Cys3SH/G3SH ratio (%)	Cys4MSP	G4MSP
Organic Colombard								
Parcel 1†	343	268	372	5	**129**	4.1	n.d.	n.d.
Parcel 2†	333	**214**	**622**	20	275	7.3	n.d.	n.d.
Parcel 3†	**305**	**220**	105	8	210	3.8	n.d.	n.d.
Parcel 4	376	238	633	6	211	2.7	n.d.	n.d.
Parcel 5	348	260	115	6	227	2.6	n.d.	n.d.
Parcel 6	332	250	167	4	202	2.2	n.d.	n.d.
Parcel 7	373	246	122	9	232	4.1	n.d.	n.d.
Mean	344	242	305	8	212	3.8	n.d.	n.d.
Min	305	214	105	4	129	2.2	n.d.	n.d.
Max	376	268	633	20	275	7.3	n.d.	n.d.
SD	25	20	238	5	44	1.7	n.d.	n.d.
Conventional Colombard								
Parcel 8†	354	**220**	127	7	275	2.6	n.d.	n.d.
Parcel 9†	381	265	197	6	159	3.8	n.d.	n.d.
Parcel 10†	411	260	222	21	446	4.8	n.d.	n.d.
Parcel 11	334	246	85	4	288	**1.5**	n.d.	n.d.
Parcel 12	354	278	184	9	401	2.2	n.d.	n.d.
Parcel 13	420	304	62	3	**143**	1.9	n.d.	n.d.
Parcel 14	361	274	105	1	160	**0.9**	n.d.	n.d.
Parcel 15	400	248	95	12	379	3.0	n.d.	n.d.
Mean	377	262	135	8	281	2.6	n.d.	n.d.
Min	334	220	62	1	143	0.9	n.d.	n.d.
Max	420	304	222	21	446	4.8	n.d.	n.d.
SD	31	25	59	6	119	1.2	n.d.	n.d.
Colombard								
Mean	362	253	214	8	249	3.2	n.d.	n.d.
Min	305	214	62	1	129	0.9	n.d.	n.d.
Max	420	304	633	21	446	7.3	n.d.	n.d.
SD	32	24	184	6	96	1.6	n.d.	n.d.
Organic Gros Manseng								
Parcel 16†	206	120	279	13	170	7.5	n.d.	n.d.
Parcel 17†	208	129	949	3	216	**1.5**	n.d.	n.d.
Parcel 18†	**192**	124	321	7	325	2.1	n.d.	n.d.
Parcel 19	201	**100**	413	11	192	5.6	n.d.	n.d.
Parcel 20	197	110	209	8	177	4.6	n.d.	n.d.
Parcel 21	236	134	483	6	235	2.8	n.d.	n.d.
Parcel 22	192	118	821	**2**	**145**	1.7	n.d.	n.d.
Parcel 23	203	110	252	14	**162**	8.8	n.d.	n.d.
Mean	204	118	466	8	203	4.3	n.d.	n.d.
Min	192	100	209	2	145	1.5	n.d.	n.d.
Max	236	134	949	14	325	8.8	n.d.	n.d.
SD	14	11	275	4	57	2.8	n.d.	n.d.
Conventional Gros Manseng								
Parcel 24†	222	130	106	11	364	2.9	n.d.	n.d.
Parcel 25†	**195**	118	221	12	454	2.6	n.d.	n.d.
Parcel 26†	230	142	155	9	251	3.6	n.d.	n.d.
Parcel 27	214	**108**	152	7	317	2.1	n.d.	n.d.
Parcel 28	219	140	135	8	292	2.8	n.d.	n.d.
Parcel 29	224	139	370	8	232	3.3	n.d.	n.d.
Parcel 30	197	128	251	7	221	3.0	n.d.	n.d.
Mean	214	129	199	9	305	2.9	n.d.	n.d.
Min	195	108	106	7	221	2.1	n.d.	n.d.
Max	230	142	370	12	454	3.6	n.d.	n.d.
SD	13	13	91	2	83	0.5	n.d.	n.d.
Gros Manseng								
Mean	209	123	341	8	250	3.7	n.d.	n.d.
Min	192	100	106	2	145	1.5	n.d.	n.d.
Max	236	142	949	14	454	8.8	n.d.	n.d.
SD	14	13	246	3	86	2.1	n.d.	n.d.

Mean, minimum (min), maximum (max), SD (σ) are calculated for each cultivation practice and for each grape cultivar at the end of the table. For each parameter and vineyard management, values in bold below $m - \sigma$ and the values underlined above $m + \sigma$. n.d., not detected. †Parcels for the grape ripening kinetics studies. Cys4MSP, 4-*S*-cysteinyl-4-methylpentan-2-one; Cys3SH, 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol; G4MSP, 4-*S*-glutathionyl-4-methylpentan-2-one; G3SH, 3-*S*-glutathionylhexan-1-ol.

Bordeaux mixture did not change the composition of grape must with respect to sugar concentration, organic acids and lipids compared to the control. It did, however, significantly reduce the concentration of free amino acids and some forms of mineral nitrogen (NO_3^- and NO_2^-) but not NH_4^+. This could indicate that the change in our samples can be attributed to the overall organic practice and not only to copper. It is important to mention that cultivation practices

© 2022 Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.

Table 2. One-way ANOVA tests between the two cultivation practices for Colombard and Gros Manseng at harvest.

	Mass (g)	Volume of juice (mL)	Copper (µg/kg)	Cys3SH (µg/kg)	G3SH (µg/kg)	Cys3SH/ G3SH ratio
Colombard						
P-value organic vs conventional	**0.04**	0.12	**0.07**	0.89	0.17	0.14
Gros Manseng						
P-value organic vs conventional	0.19	**0.09**	**0.03**	0.76	**0.01**	0.21

P-values lower than 0.1 are in bold. Cys3SH, 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol; G3SH, 3-*S*-glutathionylhexan-1-ol.

did not affect yeast assimilable nitrogen under our conditions. Cultivation practices also significantly affected the mass of 200 berries at harvest with an average of 344 ± 25 g for the organic protected grapes versus 377 ± 31 g for the conventional grapes (*P*-value = 0.04). Copper concentration was also significantly different at harvest with an average concentration of 305 ± 238 µg/kg for copper-treated grapes and only 135 ± 59 µg/kg for conventional grapes (*P*-value = 0.07) (Table 2).A similar concentration of 8 ± 6 µg/kg of cysteinylated precursors was found under both practices. For glutathionylated precursors, 212 ± 44 µg/kg and 281 ± 119 µg/kg were found under organic protection (305 ± 238 µg/kg of copper) and conventional practices (135 ± 59 µg/kg of copper), respectively. There is no significant difference (*P*-value = 0.17) in G3SH despite lower copper concentration in protected grapes. Moreover, the precursor ratio remained statistically similar with 96.2 ± 1.7% of G3SH for organic grapes against 97.4 ± 1.2% for conventional ones.

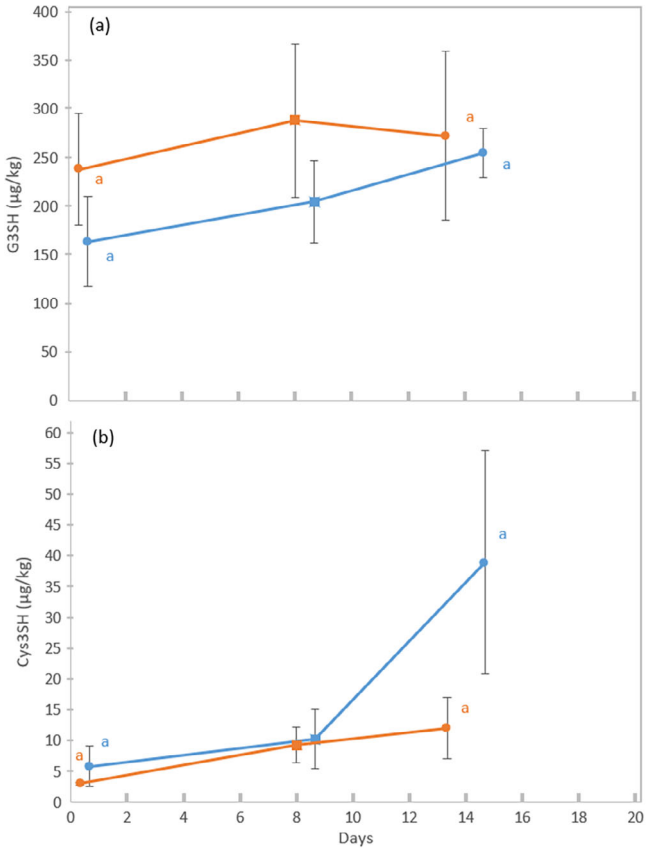


Figure 1. Effect of copper treatment on the accumulation during ripening of the varietal thiol precursors (a) 3-*S*-glutathionylhexan-1-ol (G3SH) and (b) 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol (Cys3SH) by Colombard in conventional vineyards (●) and in organic vineyards (●). Time of harvest (■); error bars represent the variation in concentration found in three separate plots for each viticultural practice; one-way ANOVA has been performed with $\alpha = 0.05$, groups are significant at 5%.

Cultivation practices did not affect the composition of the Gros Manseng grapes except for the pH which was on average 2.85 ± 0.06 for organic grapes and 2.99 ± 0.10 for conventional grapes (*P*-value = 0.09). Also significantly affected was the volume of juice resulting from 200 crushed berries, the copper concentration at harvest and the concentration of G3SH (Table 2). There was a significant decrease in the volume of juice from organic protected grapes with 118 ± 11 mL on average compared to that of conventional grapes with a mean of 129 ± 13 mL (*P*-value = 0.09). At harvest, copper concentration was significantly higher in organic treated grapes with an average 466 ± 275 µg/kg against 199 ± 91 µg/kg for conventional lots (*P*-value = 0.03). This observation is consistent with the application of copper for organic protection rather than conventional practices that use synthetic fungicides. As sugar concentration and TA were equivalent for both cultivation practices, a lower maturity can be ruled out, contrary to what has been observed in a previous study (Hatzidimitriou et al. 1996). Of the thiol precursors, G3SH was significantly lower in organic samples, 203 ± 57 µg/kg on average, against 305 ± 83 µg/kg for conventional samples (*P*-value = 0.01). This could be linked with cultivation practices (copper of organic lots at 466 ± 275 µg/kg and conventional at 199 ± 91 µg/kg) that could influence the thiol precursor production pathway in grapes and the extractability of the precursors from grapes as their distribution between different parts of the berry can vary (Roland et al. 2011a). The G3SH concentration was 30% lower in organic protected grapes which could represent a loss ranging from 166 to 985 ng/L of 3SH in the final wine (hypothetical conversion rates from 0.5 to 3%) (Roland et al. 2010a, 2011b). This calculation highlighted the importance of cultivation practices on both the raw material and wine composition. Such an observation is consistent with winemaker feedback for vineyards currently under organic transition.

In wine, copper exists in two states: free and complexed copper (Green et al. 1997). We first tried to identify a correlation between free copper and G3SH concentration in Gros Manseng grapes. A Pearson test showed no correlation (*P*-value = 0.844) which suggests that the concentration of G3SH was not dependent on free copper in the following range: 466 ± 275 µg/kg. In other words, higher copper concentration does not mean lower G3SH concentration in organic protected grapes. This decrease of G3SH is probably multifactorial and the fact that Gros Manseng grapes have a low nitrogen status in regard to their sugar concentration has to be considered. Indeed, nitrogen status of grapes influenced cysteinylated precursors in grapes (Choné et al. 2006) but no data are available for glutathionylated

© 2022 Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.

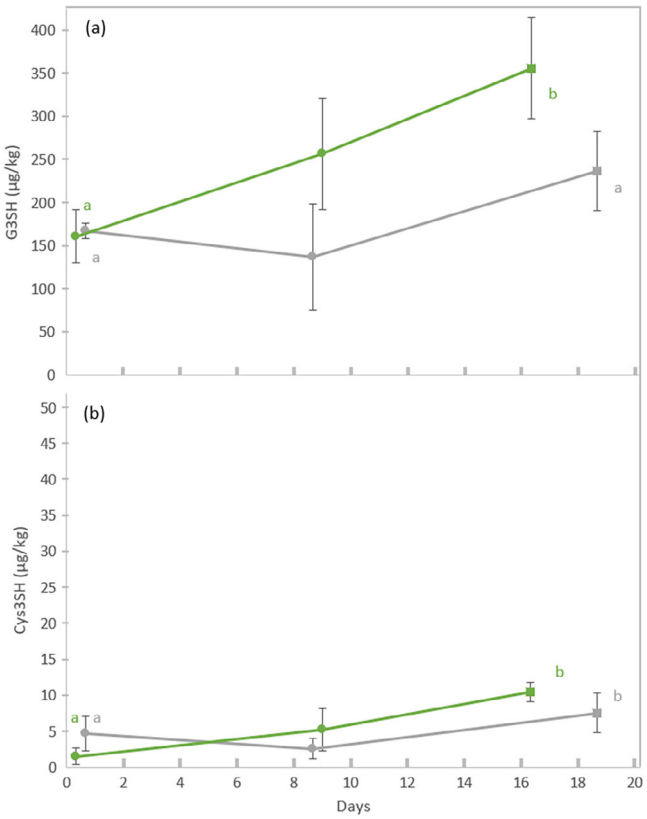


Figure 2. Effect of copper treatment on the accumulation during ripening of the varietal thiol precursors (a) 3-*S*-glutathionylhexan-1-ol (G3SH) and (b) 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol (Cys3SH) by Gros Manseng in conventional vineyards (●) and in organic vineyards (◉). Time of harvest (■); error bars represent the variation in concentration found in three separate plots for each viticultural practice. One-way ANOVA has been performed with $\alpha = 0.05$, groups are significant at 5%.

precursors, which represent 97% of thiol aromatic potential of Gros Manseng grapes.

Consequently, we proposed several hypotheses to explain the lower concentration of G3SH in organic protected grapes. Copper is well known in oenology for its reactivity towards off-odours caused by sulfur compounds after alcoholic fermentation (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin 2008). Following Hard, Soft, Acid, Base theory, copper and sulfur (atomic or derivative compounds) have strong affinities and they bind forming complexes that are partly removed from the matrix during wine filtration.

The interaction between varietal thiols and copper has been well established (Darriet et al. 2001) and some new detailed work has been done on this interaction using volatile sulfur compounds as a model (Kreitman et al. 2016a,b). By analogy with volatile sulfur compounds complexed with copper (Franco-Luesma and Ferreira 2014), we can hypothesise that thiol precursors can also be trapped by copper. The main difference between volatile sulfur compounds and thiol precursors is the nature of the sulfur bond: the first case is a free thiol (RSH) whereas the second is a thioether (RSR′). As shown in biological systems, it has been demonstrated that thioether compounds can be complexed with copper (Lu 2003), thus potentially explaining the decrease of G3SH in organic Gros Manseng grapes.

Following this idea, six different samples containing synthetic must with a copper concentration ranging from 0 to 2.5 mg/L and containing 1 mg/L of G3SH for each were analysed. The initial analysis before copper addition showed no difference between the samples. The second analysis 2 h after the copper addition showed no significant difference in G3SH concentration in the samples. This led us to believe that the analytical method used for quantification of the precursors does reflect reality and the G3SH concentration was not affected by the copper concentration in the sample. Consequently, the difference in the G3SH concentration in grapes has a biogenetic origin and further studies are required to understand the regulation pathways due to copper excess.

Effect of cultivation practices on accumulation of thiol precursors

To further understand the influence of cultivation practices on thiol precursors in grapes, we monitored the evolution of thiol aromatic potential during 2 weeks for both Colombard and Gros Manseng grapes. Figures 1 and 2 represent the accumulation of Cys3SH and G3SH for three separate plots of each grape cultivar and each type of vineyard management. It has been clearly demonstrated that both Cys3SH and G3SH increase during ripening of Sauvignon Blanc and Melon Blanc grapes under conventional cultivation practices (Roland et al. 2010c, Cerreti et al. 2015) and we expected a similar increase.

Colombard grapes. Interestingly, there was no significant evolution of G3SH and Cys3SH during the ripening of Colombard grapes (Figure 1). The sudden increase of Cys3SH for organic Colombard was due to only one lot presenting a high level of *Botrytis cinerea* which is known to increase Cys3SH concentration (Thibon et al. 2009).

Gros Manseng grapes. The overall accumulation of G3SH in 2 weeks was significant for the conventional parcels starting from 161 ± 54 µg/kg to reach 365 ± 101 µg/kg ($P < 0.05$), while for the organic group, there was no significant evolution (Figure 2). For Cys3SH, the accumulation was also significant in these lots starting at 2 ± 1 µg/kg to reach 10 ± 1 µg/kg ($P < 0.01$). We can hypothesise that the copper concentration in grapes might influence the biosynthesis of thiol precursors in grapes.

Thus, it appears that the thiol aromatic potential of Colombard grapes is not affected by cultivation practices whereas that of Gros Manseng was negatively influenced by the organic practice in vineyard. At this point, it is impossible to fully explain this phenomenon and particularly its origin, that is whether it is copper, assimilable nitrogen or a combination of both.

Conclusion

Two grape cultivars from south-west France have been described for the first time as having a high thiol aromatic potential. They may join with Sauvignon Blanc as leading grape cultivars in terms of varietal thiol potential. Cultivation practices (conventional or organic protection) had no effect on thiol precursors in Colombard grapes whereas a significant decrease in G3SH was observed for Gros Manseng grapes during ripening. Surprisingly, the concentration of free copper at harvest was not correlated with a lower concentration of G3SH in organic protected grapes.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Occitanie Region and Syndicat des Côtes de Gascogne for funding this project. Winemakers from Côtes de Gascogne are thanked for allowing their

© 2022 Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.

vineyards to be sampled. Mélanie Veyret and Faiza Macna are also thanked for their technical support on copper and sugar analysis. Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) is acknowledged for its help with the oenological analysis. The authors sincerely thank Will White and Charlie Cotton for proofreading this article.

References

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernandez, A., Navascues, E., Marquina, D., Santos, A. and Moreno-Arribas, M.V. (2017) Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. Molecules **22**, 189.

Bonnaffoux, H., Delpech, S., Remond, E., Schneider, R., Roland, A. and Cavelier, F. (2018) Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. Food Chemistry **268**, 126–133.

Bonnaffoux, H., Roland, A., Remond, E., Delpech, S., Schneider, R. and Cavelier, F. (2017) First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)-gamma-glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. Food Chemistry **237**, 877–886.

Capone, D.L., Black, C.A. and Jeffery, D.W. (2012) Effects on 3-mercaptohexan-1-ol precursor concentrations from prolonged storage of Sauvignon blanc grapes prior to crushing and pressing. Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**, 3515–3523.

Capone, D.L., Pardon, K.H., Cordente, A.G. and Jeffery, D.W. (2011) Identification and quantitation of 3-S-cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**, 11204–11210.

Capone, D.L., Sefton, M.A., Hayasaka, Y. and Jeffery, D.W. (2010) Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS: resolution and quantitation of diastereomers of 3-S-cysteinylhexan-1-ol and 3-S-glutathionylhexan-1-ol. Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**, 1390–1395.

Cerreti, M., Esti, M., Benucci, I., Liburdi, K., de Simone, C. and Ferranti, P. (2015) Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during grape ripening of *Vitis vinifera* L. cvs Grechetto, Malvasia del Lazio and Sauvignon Blanc. Australian Journal of Grape and Wine Research **21**, 411–416.

Cerreti, M., Ferranti, P., Benucci, I., Liburdi, K., De Simone, C. and Esti, M. (2016) Thiol precursors in Grechetto grape juice and aromatic expression in wine. European Food Research and Technology **243**, 753–760.

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

Choné, X., Lavigne-Cruège, V., Tominaga, T., Van Leeuwen, C., Castagnède, C., Saucier, C. and Dubourdieu, D. (2006) Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grape juice. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin **40**, 1–6.

Dagan, L. (2006) Potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne. PhD Thesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montellier.

Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.N. and Dubourdieu, D. (1995) Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. Flavour and Fragrance Journal **10**, 385–392.

Darriet, P., Bouchilloux, P., Poupot, C., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Sauris, P., Medina, B. and Dubourdieu, D. (2001) Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. Vitis: Journal of Grapevine Research **40**, 93–99.

Dufourcq, T., Bonneau, F., Desprats, A. and Serrano, E. (2008) Contribution des facteurs viticoles et œnologiques au potentiel aromatique des vins blancs de Colombard en Gascogne. Fraga, H., ed. Proceedings of the 7th international terroir congress; 19-23 May 2008; Nyon, Switzerland (Agroscope Changins-Wädenswil: Changins, Switzerland) pp. 530–535.

Fedrizzi, B., Pardon, K.H., Sefton, M.A., Elsey, G.M. and Jeffery, D. W. (2009) First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**, 991–995.

Fracassetti, D., Stuknytė, M., La Rosa, C., Gabrielli, M., De Noni, I. and Tirelli, A. (2018) Thiol precursors in Catarratto Bianco Comune and Grillo grapes and effect of clarification conditions on the release of varietal thiols in wine. Australian Journal of Grape and Wine Research **24**, 125–133.

Franco-Luesma, E. and Ferreira, V. (2014) Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compounds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. Journal of Chromatography A **1359**, 8–15.

Geffroy, O., Charrier, F., Poupault, P., Schneider, R., Lopez, R., Gontier, L. and Dufourcq, T. (2016) Boosting varietal thiols in white and rosé wines through foliar nitrogen and sulfur spraying. Beames, K., Robinson, E., Dry, P. and Johnson, D., eds. Proceedings of the Australian wine industry technical conference; 24-28 July 2016; Adelaide, SA, Australia (The Australian Wine Industry Technical Conference: Urrbrae, SA, Australia) pp. 102–105.

Grant-Preece, P.A., Pardon, K.H., Capone, D.L., Cordente, A.G., Sefton, M.A., Jeffery, D.W. and Elsey, G.M. (2010) Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**, 1383–1389.

Green, A.M., Clark, A.C. and Scollary, G.R. (1997) Determination of free and total copper and lead in wine by stripping potentiometry. Fresenius Journal of Analytical Chemistry **358**, 711–717.

Harsch, M.J., Benkwitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R.C. and Salmon, J.M. (2013) New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**, 3703–3713.

Hatzidimitriou, E., Bouchilloux, P., Darriet, P., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Poupot, C., Médina, B. and Dubourdieu, D. (1996) Incidence of a vine protection using a commercial formula of Bordeaux mixture on the Sauvignon grapes maturity and the wines varietal aroma (results of a 3-year study). Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin **30**, 133–150.

Henick-Kling, T. (1995) Summary of effects of organic and conventional grape production practices on juice and wine composition. Communications Services, N.Y.S.A.E.S., ed. Proceedings of the organic grape and wine production symposium; 21-22 March 1995; Geneva, NY, USA (Cornell University, Department of Horticultural Science, New York State Agricultural Experiment Station: Ithaca, NY, USA) pp. 89–102.

Hill, G. and Caputi, A. (1970) Colorimetric determination of tartaric acid in wine. American Journal of Enology and Viticulture **21**, 153.

Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S. and Konno, T. (2010) Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. American Journal of Enology and Viticulture **61**, 176–185.

Kreitman, G.Y., Danilewicz, J.C., Jeffery, D.W. and Elias, R.J. (2016a) Reaction mechanisms of metals with hydrogen sulfide and thiols in model wine. Part 1: copper-catalyzed oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry **64**, 4095–4104.

Kreitman, G.Y., Danilewicz, J.C., Jeffery, D.W. and Elias, R.J. (2016b) Reaction mechanisms of metals with hydrogen sulfide and thiols in model wine. Part 2: iron- and copper-catalyzed oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry **64**, 4105–4113.

Li, H.-K., Chang, C.-F., Lin, H.-J., Lin, J.-L., Lee, Y.-T., Wu, Y.-H., Liu, C.-Y., Lin, T.-C., Hsu, P.-H. and Lin, H.-T.V. (2021) Conversion of a thiol precursor into aroma compound 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone using microbial cell extracts. Fermentation **7**, 129.

Lu, Y. (2003) 8.4 – Electron transfer: cupredoxins. McCleverty, J.A. and Meyer, T.J., eds. Comprehensive coordination chemistry II (Pergamon: Oxford, England) pp. 91–122.

Luisier, J.L., Buettner, H., Volker, S., Rausis, T. and Frey, U. (2008) Quantification of cysteine S-conjugate of 3-sulfanylhexan-1-ol in must and wine of Petite Arvine vine by stable isotope dilution analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**, 2883–2887.

Lund, C.M., Thompson, M.K., Benkwitz, F., Wohler, M.W., Triggs, C.M., Gardner, R., Heymann, H. and Ncolau, L. (2009) New Zealand Sauvignon Blanc distinct flavor characteristics: sensory, chemical, and consumer aspects. American Journal of Enology and Viticulture **60**, 1–12.

© 2022 Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.

Martins, V., Teixeira, A., Bassil, E., Blumwald, E. and Gerós, H. (2014) Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. Plant Physiology and Biochemistry **82**, 270–278.
Mattivi, F., Fedrizzi, B., Zenato, A., Tiefenthaler, P., Tempesta, S., Perenzoni, D., Cantarella, P., Simeoni, F. and Vrhovsek, U. (2012) Development of reliable analytical tools for evaluating the influence of reductive winemaking on the quality of Lugana wines. Analytica Chimica Acta **732**, 194–202.
Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2008) Wine – treatment with copper citrate. Oeno-1/2008 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin: Paris, France).
Pena-Gallego, A., Hernandez-Orte, P., Cacho, J. and Ferreira, V. (2012) S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. Food Chemistry **131**, 1–13.
Peyrot Des Gachons, C., Tominaga, T. and 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**, 4076–4079.
Piano, F., Petrozziello, M., Vaudano, E., Bonello, F., Ferreira, V., Zapata, J. and Hernández-Orte, P. (2014) Aroma compounds and sensory characteristics of Arneis Terre Alfieri DOC wines: the concentration of polyfunctional thiols and their evolution in relation to different ageing conditions. European Food Research and Technology **239**, 267–277.
Roland, A., Schneider, R., Razungles, A. and Cavelier, F. (2011b) Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. Chemical Reviews **111**, 7355–7376.
Roland, A., Schneider, R., Le Guernevé, C., Razungles, A. and Cavelier, F. (2010a) Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: elements for understanding the 3MH production in wine. Food Chemistry **121**, 847–855.
Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guerneve, C. and Cavelier, F. (2010b) Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**, 10684–10689.
Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P. and Schneider, R. (2010c) Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**, 4406–4413.
Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M. and Razungles, A. (2011a) Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. Food Chemistry **125**, 139–144.
Ruiz, J., Kiene, F., Belda, I., Fracassetti, D., Marquina, D., Navascues, E., Calderon, F., Benito, A., Rauhut, D., Santos, A. and Benito, S. (2019) Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. Applied Microbiology and Biotechnology **103**, 7425–7450.
Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A. and 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**, 58–64.
Sivilotti, P., Falchi, R., Herrera, J.C., Skvarc, B., Butinar, L., Sternad Lemut, M., Bubola, M., Sabbatini, P., Lisjak, K. and Vanzo, A. (2017) Combined effects of early season leaf removal and climatic conditions on aroma precursors in Sauvignon Blanc grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry **65**, 8426–8434.
Swiegers, J.H., Willmott, R., Hill-Ling, A., Capone, D.L., Pardon, K.H., Elsey, G.M., Howell, K.S., de Barros Lopes, M.A., Sefton, M.A., Lilly, M. and Pretorius, I.S. (2006) Modulation of volatile thiol and ester aromas by modified wine yeast. Bredie, W.L.P. and Petersen, M.A., eds. Flavour science – recent advances and trends (Elsevier: Amsterdam, The Netherlands) pp. 113–116.
Takase, H., Sasaki, K., Kiyomichi, D., Kobayashi, H., Matsuo, H. and Takata, R. (2018) Impact of *Lactobacillus plantarum* on thiol precursor biotransformation leading to production of 3-sulfanylhexan-1-ol. Food Chemistry **259**, 99–104.
Thibon, C., Bocker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P. and Dubourdieu, D. (2016) Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. Food Chemistry **199**, 711–719.
Thibon, C., Dubourdieu, D., Darriet, P. and Tominaga, T. (2009) Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexanol content in *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc and Semillon grape juice. Food Chemistry **114**, 1359–1364.
Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Des Gachons, C.P. and Dubourdieu, D. (2000) Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. American Journal of Enology and Viticulture **51**, 178–181.
Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C. and Dubourdieu, D. (1998) A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates. Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**, 5215–5219.

Manuscript received: 8 September 2021
Revised manuscript received: 4 November 2021
Accepted: 29 November 2021

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's website: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ajgw.12547/abstract.

Table S1. Location in south-west France of the 30 plots of Colombard and Gros Manseng.

Table S2. Viticultural information on copper tre atment on the lots of Colombard and Gros Manseng used in the study.

Table S3. Quantification and qualification transitions of thiol precursors in multiple reaction monitoring.

Table S4. Composition of musts from Colombard and Gros Manseng grapes at harvest during the 2019 vintage.

© 2022 Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.

A la lumière des résultats précédents, il a été mis en évidence une diminution de 30 % du G3SH dans le Gros Manseng lié au mode de culture biologique en 2019, probablement due à une accumulation moins importante de ce précurseur lors des 2 dernières semaines de la maturation du raisin. En revanche, cette diminution n'a pas pu être corrélée à la concentration de cuivre résiduelle dans le jus de raisin. En parallèle, le Colombard n'a pas été affecté par ce mode de culture. La culture biologique semble affecter uniquement le Gros Manseng, c'est une observation surprenante et unique à notre connaissance. Pour compléter ces résultats et obtenir des informations quant à la répétabilité de ces effets nous avons poursuivi cet observatoire de 40 parcelles lors des vendanges 2020 et 2021.

Au sein de ce réseau, certaines parcelles, ont en pratique, été conduites selon un parcours que l'on pourrait décrire comme « hybride » ou intermédiaire. Ce mode de culture se base selon un calendrier phytosanitaire conventionnel avec l'ajout de cuivre en complément des antifongiques de synthèse. Cette donnée complémentaire nous a fait reconsidérer les données des vendanges 2019 sous un nouvel angle avec trois catégories de parcelles :

- 33 % de parcelles biologiques pour le Colombard et 36 % pour le Gros Manseng
- 27 % de parcelles hybrides ou intermédiaires pour le Colombard et 27% pour le Gros Manseng
- 40 % de parcelles conventionnelles pour le Colombard et 36 % pour le Gros Manseng

Les teneurs en précurseurs de thiols et en cuivre ont été analysées dans les raisins à la date de vendange pour chaque modalité. Dans ces cépages, le G3SH représente plus de 95 % du potentiel aromatique de type thiol, ainsi uniquement la concentration de ce dernier a été considérée.

Effet du mode de conduite par millésime

Au cours des 3 millésimes (Figure 31) pris individuellement, on note l'absence d'effet du mode de culture sur la concentration en G3SH pour le Colombard.

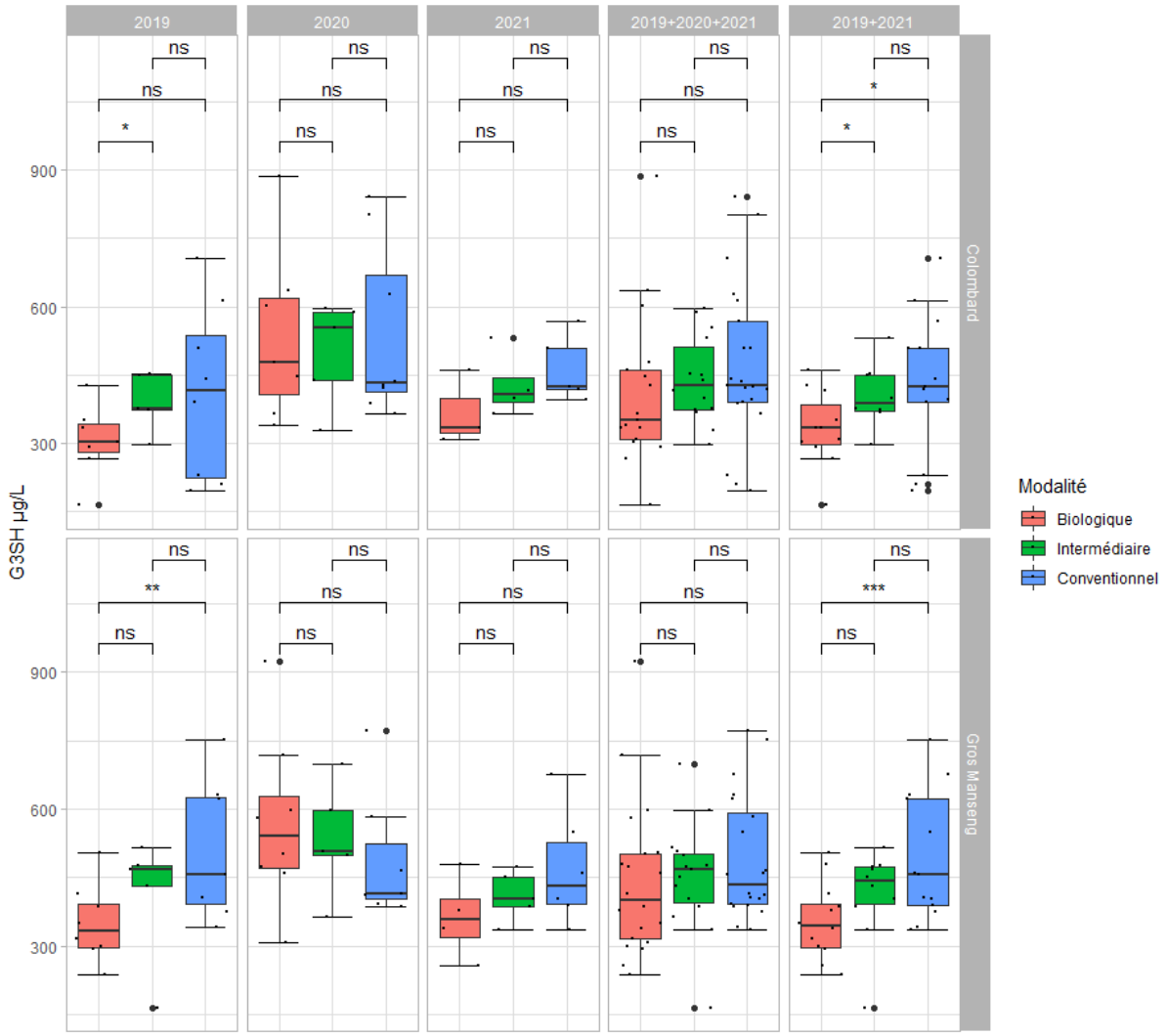


*Figure 31: Concentration en G3SH dans les raisins de Colombard et Gros Manseng en fonction des différents millésimes. Les p-value ont été calculées avec un test de student à 95%. Significativité : * ≤ 10%, **≤ 5%, *** ≤ 1 %.*

On obtient le même résultat en considérant les trois millésimes ensemble. En revanche lorsque l'on exclut les données issues de la récolte 2020, un effet du mode de culture devient observable sur le Colombard à un seuil de 10 %. Ainsi sur ces deux millésimes, la moyenne du G3SH pour la modalité biologique était de 333 ± 82 contre 432 ± 154 µg/l pour la modalité conventionnelle, soit une diminution de 23 %.

La même observation a pu être faite sur le Gros Manseng avec une moyenne sur les deux millésimes de 354 ± 82 µg/L pour la modalité biologique et de 476 ± 138 µg/L pour la conventionnelle, soit une diminution de 25 %.

Globalement, le mode de conduite biologique altère les teneurs en précurseurs de thiols des raisins de Colombard et Gros Manseng. Selon le millésime, les diminutions observées sont plus ou moins marquées voire non significatives. En revanche, la conduite biologique ne favorise jamais les teneurs en précurseurs de thiols dans les raisins. Ces données complémentaires étayent les résultats publiés (Dournes *et al.*, 2022) et corrèlent parfaitement avec les diminutions des thiols observées dans les vins de Sauvignon blanc issus de parcelles traitées au cuivre (Darriet *et al.*, 2001).

A ce stade, il convient d'être prudent et de ne pas attribuer les résultats ci-dessus à la seule présence du cuivre. En effet, la gestion de cet élément n'est pas la seule différence entre bio et conventionnel ; parmi les autres distinctions, nous pouvons citer la gestion des nutriments azotés (Choné *et al.*, 2006; Helwi *et al.*, 2016).

Le millésime 2020 semble être particulier en estompant les effets négatifs de la modalité biologique observés en 2019. En effet, les concentrations en G3SH sont identiques pour un même cépage quelle que soit la modalité de culture. Ainsi les parcelles biologiques ont produit la même quantité de précurseurs que les parcelles conventionnelles.

Effet du millésime par mode de culture



*Figure 32: Représentation de la concentration en G3SH selon les millésimes en fonction du cépage et le mode de culture. Les p-value ont été calculées avec un test de student à 95%. Significativité : * ≤ 10%, **≤ 5%, *** ≤ 1 %.*

Dans la Figure 32, on peut observer que la concentration en G3SH varie selon les millésimes pour les parcelles biologiques mais est globalement stable pour les cultures intermédiaires et conventionnelles. Pour le Colombard biologique, la concentration moyenne en G3SH pour les millésimes 2019, 2020, 2021 était respectivement de 306 ± 81, 536 ± 188, 367 ± 81 µg/L. Pour le Gros Manseng, les concentrations étaient de 349 ± 83, 570 ± 186, 362 ± 91 µg/L. On peut noter ici que, pour les deux cépages, les concentrations en G3SH pour les années 2019 et 2021 sont équivalentes et significativement différentes de celle de 2020. Ainsi, l'effet de la culture biologique semble être réversible et donc n'affecte que la production de l'année. Le millésime 2020 semble donc avoir créé un contexte propice à l'absence d'effet de la modalité biologique sur la concentration en G3SH. La collecte des données météorologiques sur ces trois millésimes permettrait peut-être d'identifier les différences et d'expliquer ce comportement atypique.

Également, l'analyse des calendriers phytosanitaires de cette année pourrait mettre en évidence une variation des pratiques, comme la quantité de cuivre apportées lors des traitements.

Globalement, ces données montrent une forte similitude du Colombard et du Gros Manseng dans leur production des précurseurs de thiols mais aussi dans le comportement vis-à-vis de la pratique biologique.

Vers un outil de caractérisation des pratiques agronomiques

L'analyse des précurseurs de thiols restent à ce jour une analyse difficile et encore loin d'être déployée sur le terrain à proximité des viticulteurs. L'absence de diagnostic rapide du potentiel aromatique des raisins limite le pilotage aromatique depuis le vignoble. Aujourd'hui, il est clairement établi que les précurseurs de thiols s'accumulent au cours de la maturation du raisin (Roland *et al.*, 2010c), selon les teneurs en azote (Choné *et al.*, 2006; Helwi *et al.*, 2016) et en cuivre (Dournes *et al.*, 2022) au vignoble. Nous avons donc tenté d'établir, pour la première fois, un indicateur simple combinant l'ensemble de ces paramètres pour rendre compte du mode de culture des parcelles.

Pour faciliter son utilisation, nous avons choisi de faire reposer cet indicateur sur des éléments simples à mesurer et d'être le plus fiable possible. Au vu des résultats et hypothèses précédentes, nous sommes arrivés à la formulation suivante :

$$Indicateur\ du\ mode\ de\ culture = \frac{Azote}{Sucre * Cuivre}$$

Azote : concentration (mg/L) en azote assimilable, Sucre : concentration (g/L) en Glucose + Fructose, Cuivre : concentration (mg/L) en cuivre (II)

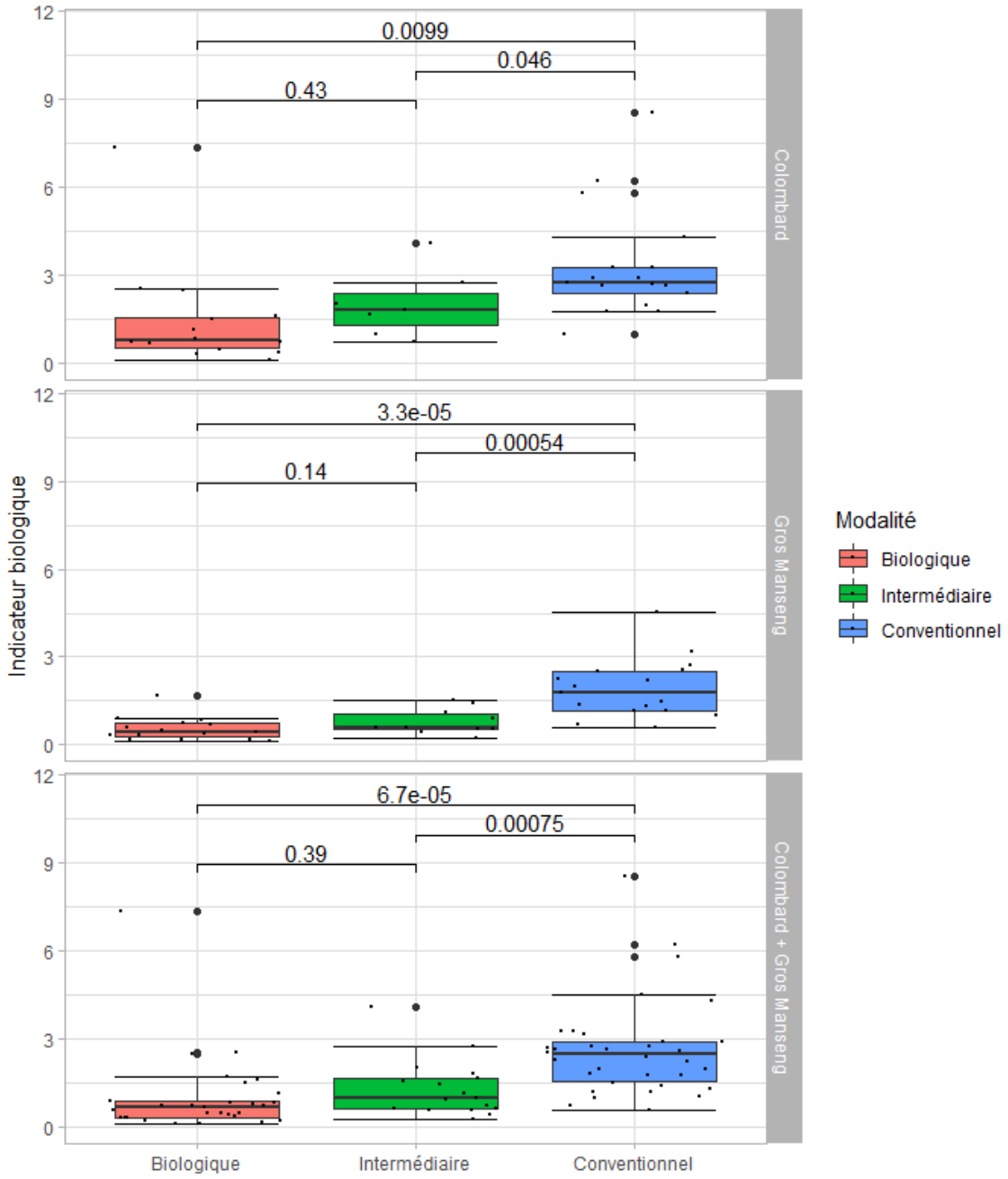


Figure 33: Représentation de l'indicateur du mode de culture en fonction de la modalité de culture pour le Colombard, Gros Manseng. Les p-value ont été calculées avec un test de student à 95%. N=86

Cet indicateur a été testé avec succès sur les parcelles de l'étude (Figure 33). Il permet de différencier de manière significative une culture biologique d'une conventionnelle (p-value : Colombard <1% ; Gros Manseng <1% ; Global <1%).

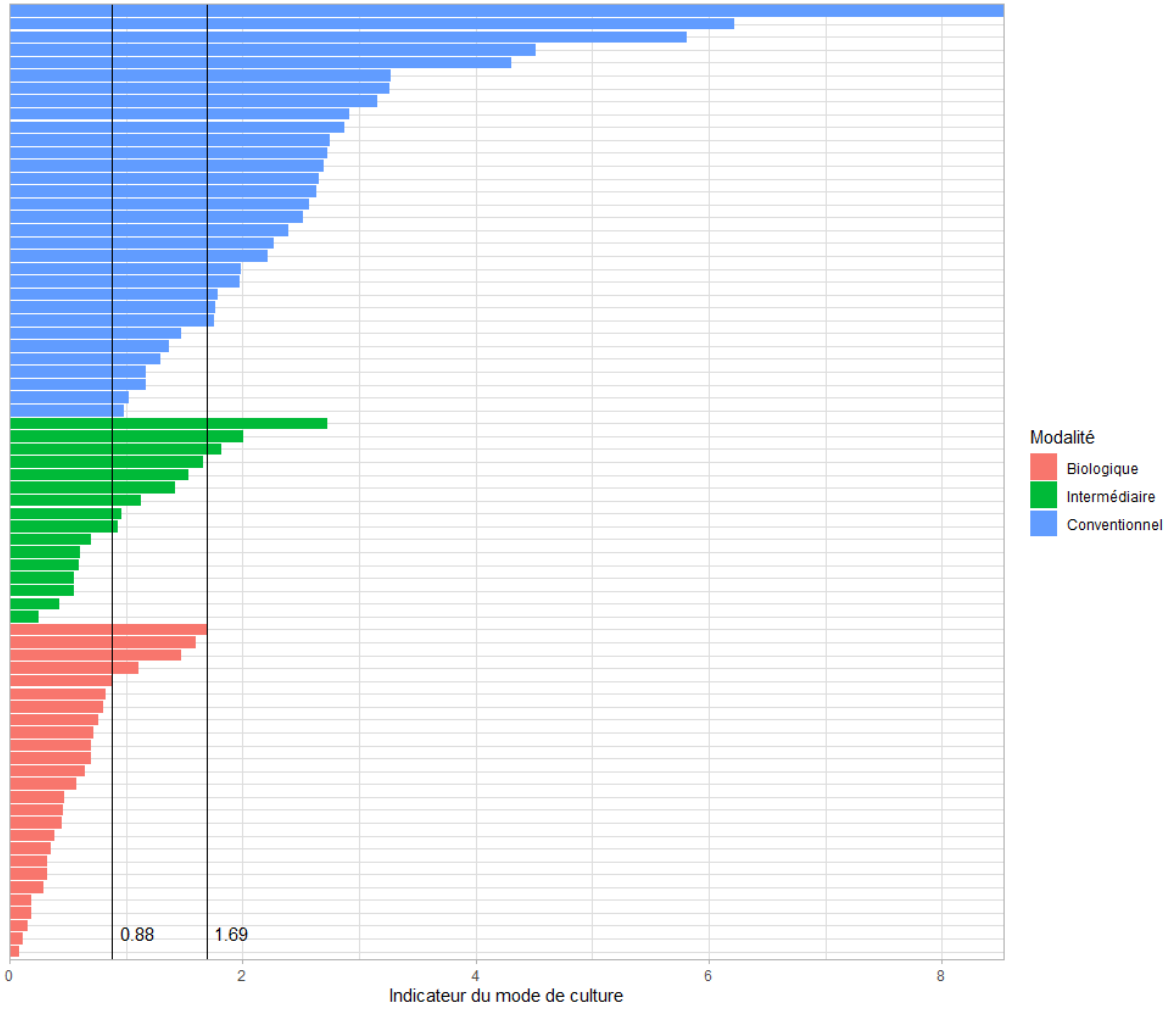


Figure 34: Représentation des valeurs d'indicateur du mode de culture pour chaque parcelle de l'étude. Les deux limites à 0,88 et 1,69 représente respectivement la limite supérieure pour du biologique et la limite inférieure pour du conventionnel

Néanmoins, il ne permet pas encore de différencier les parcelles intermédiaires qui sont pour l'instant classées avec les biologiques. De plus, il n'existe pas de corrélation directe entre cet indicateur et la quantité de précurseurs de thiols dans les raisins telle qu'on la dose aujourd'hui. Il est donc nécessaire de continuer à construire cet indicateur avec d'autres éléments, permettant de différencier le mode de culture intermédiaire. La représentation en barre de cet indicateur (Figure 34) permet de définir deux limites. La première à 0,88 est la valeur maximale de l'indicateur qui attribuera un mode de culture biologique à la parcelle, au-delà, l'attribution ne sera pas fiable. La deuxième à 1,69 est la valeur minimale pour justifier d'un parcours conventionnel. Cela pourrait permettre à de grosses structures tel que des coopératives d'adapter le processus de vinification en fonction de cet indicateur sur chaque parcelle.

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence un effet négatif de la culture biologique sur les teneurs en précurseurs de thiols. Cette diminution du G3SH de l'ordre de 25% représente une perte importante de potentiel thiol pour les vins. Cet effet se retrouve sur plusieurs millésimes (2019 et 2021) mais il est réversible et dépendant des conditions agronomiques de l'année de production (2020). La construction d'un indicateur rendant compte du mode de conduite au vignoble est une première étape vers la définition d'un outil d'aide à la décision permettant à termes un meilleur pilotage de la révélation aromatiques de ces cépages. Cet indicateur n'est en rien un outil de définition de la qualité d'une parcelle ni de sa vendange.

02 Extraction et révélation du potentiel thiol lors de la vinification

Cas du cuivre

Le précédent chapitre a permis de décrire le potentiel thiol important du Colombard et du Gros Manseng au travers de l'étude de trois millésimes. Il a été montré qu'à la parcelle, le cuivre a un effet marqué sur la teneur en précurseurs de thiols des deux cépages.

Dans ce chapitre, l'extraction et la révélation du potentiel aromatique de type thiol au cours du processus de vinification seront étudiées en détails et nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que le transfert du potentiel aromatique du raisin au moût est affecté par le mode de culture de la vigne ?
- Comment est-ce que la concentration du cuivre évolue au cours des étapes pré-fermentaires ?
- Est-ce que la révélation des thiols variétaux lors de la fermentation alcoolique est modifiée par la présence de cuivre ?

En pratique, des vinifications à partir de raisins provenant de 12 parcelles ont été réalisées pendant le millésime 2019. L'objectif était de suivre la concentration des précurseurs de thiols et du cuivre lors des étapes pré-fermentaires sur les deux cépages et sur les deux modes de cultures. Ces résultats seront détaillés dans la première partie de ce chapitre.

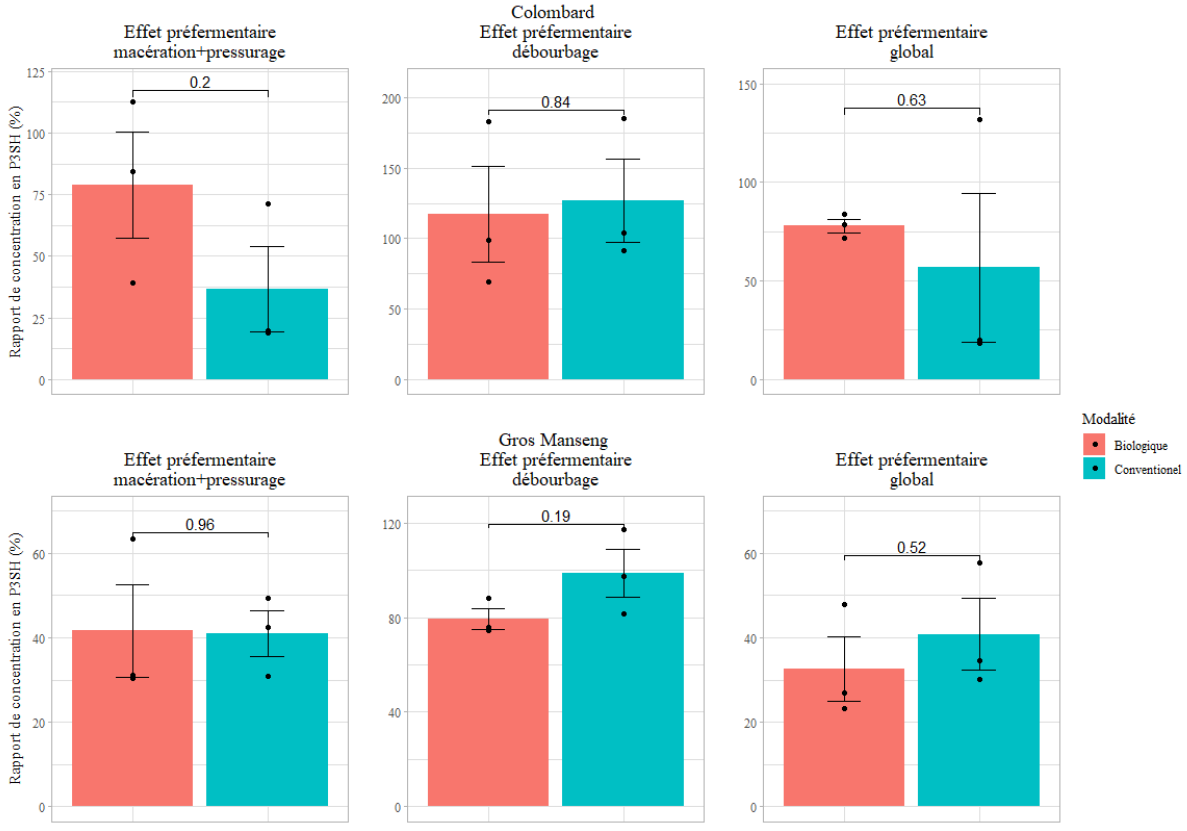
Dans la seconde partie de ce chapitre, le rôle du cuivre dans la révélation des thiols lors de la fermentation sera présenté. En pratique, nous avons utilisé des moûts de chaque cépage avec des concentrations croissantes en cuivre. Pour chaque cépage un moût unique conventionnel a été utilisé afin de faire varier uniquement la concentration en cuivre. Les doses de cuivre utilisées reprennent des niveaux observés lors des vendanges et permettent de couvrir la gamme de l'indicateur biologique définit précédemment. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article soumis à Frontiers in Food Microbiology.

Extraction du potentiel aromatique de type thiols lors des étapes pré-fermentaires

La mise en œuvre des étapes pré-fermentaires sont détaillées en section III du Matériels et Méthodes. Pour évaluer l'extraction du potentiel aromatique, différents rapports de concentrations ont été calculés entre les différentes étapes. Pour cela, trois ratios ont été définis tels que :

- Effet pré-fermentaire « macération+pressurage », décrit les étapes de macération et de pressurage
- Effet pré-fermentaire « débourbage », décrit l'étape de débourbage
- Effet pré-fermentaire « global », décrit la totalité des étapes pré-fermentaires jusqu'au moût avant fermentation

Ces trois ratios sont appliqués aux précurseurs de thiols nommés P3SH (µmol/L) pour le Colombard et le Gros Manseng (Figure 35).



Les barres d'erreur représentent l'erreur standard, chaque modalité est représentée par la moyenne d'un triplicat et les p-value ont été calculé par un t-test (95%).

Figure 35: Rapport de concentration en P3SH (%) pour le Colombard et le Gros Manseng, « macération+pressurage » : rapport entre la sortie pressurage et le raisin, « débourbage » : rapport entre fin de débourbage et sortie pressurage, « global » : ratio entre fin débourbage et raisin.

L'extraction du potentiel thiol du raisin au moût est en moyenne assez faible avec une extraction entre 50-75 % pour le Colombard et entre 30-40 % pour le Gros Manseng. Ces valeurs obtenues sur les deux cépages emblématiques du Gers sont faibles par rapport au Sauvignon blanc. En effet, pour ce dernier cépage, les rendements d'extraction effectués avec une méthode de calcul similaire sont de 100 % (Capone & Jeffery, 2011). Ce rendement d'extraction quasi-total pour le Sauvignon blanc rend compte d'une accessibilité relativement aisée à la fraction pelliculaire des précurseurs pour ce cépage dans lequel plus de 50% des précurseurs sont pourtant contenus dans la pellicule (Roland *et al.*, 2011). L'extraction assez faible des précurseurs pour les matrices Colombard et Gros Manseng laisse donc supposer une fraction pelliculaire des précurseurs encore plus importante que celle du Sauvignon blanc et/ou une extractibilité plus faible des précurseurs de thiols de cette fraction. Une structure macromoléculaire plus complexe de la pellicule pourrait expliquer cette diminution d'extraction. Cette analyse des précurseurs pelliculaire pour ces cépages devra être réalisée pour valider ou non cette hypothèse.

Plus spécifiquement, les étapes de macération et pressurage sont à l'origine du faible rendement observé sur la totalité des étapes. En comparaison, le débourbage n'affecte que très peu la concentration en précurseurs avec un ratio autour de 100%. Ceci souligne une absence d'extraction de précurseurs supplémentaire depuis les bourbes mais aussi dans le sens inverse une absence de perte.

Que ce soit pour le Colombard ou le Gros Manseng, le mode de conduite au vignoble ne module pas l'extractibilité de la matière première lors des étapes pré-fermentaires pour ce qui est des teneurs en précurseurs de thiols.

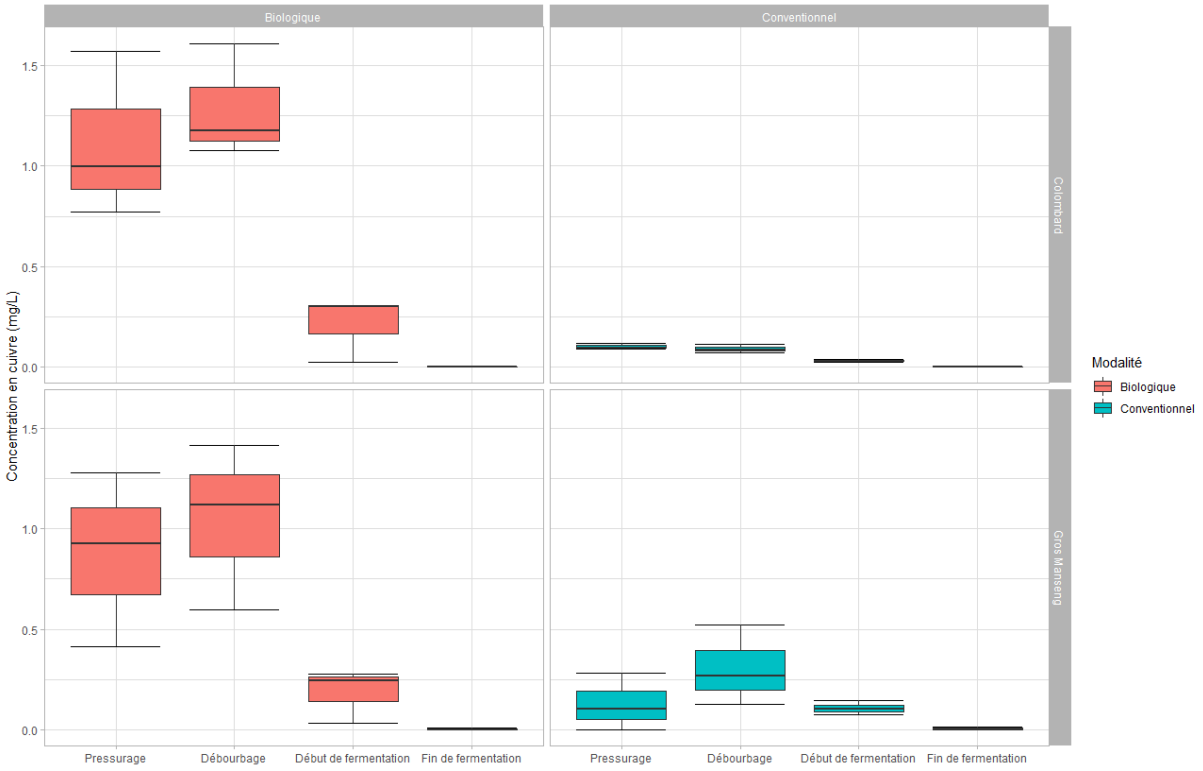


Figure 36: Evolution de la concentration en cuivre au cours de la vinification du Colombard et du Gros Manseng selon deux modes de cultures. « Pressurage », « Débourbage » et « Fin de fermentation » : prélèvement à la fin des étapes du même nom ; « Début de fermentation » : prélèvement trois jours après inoculation.

En parallèle de l'étude du rendement d'extraction des précurseurs de thiols, nous nous sommes intéressés à la question du cuivre et de son évolution au fil des étapes préfermentaires mais aussi lors de la fermentation. Pour cela, nous avons mesuré la concentration en cuivre lors des étapes de pressurage, débourbage, 3 jours après l'inoculation et en fin de fermentation (Figure 36).

Les résultats obtenus indiquent une baisse très forte de la concentration en cuivre lors des étapes de vinifications (Capece *et al.*, 2017). Ainsi, quelle que soit la concentration initiale en cuivre dans le moût, à la fin de la fermentation, la teneur en cuivre sera toujours inférieure à la limite de quantification de la méthode utilisée (0,1 mg/L). Il apparaît clairement que cette diminution se fait lors de la seconde partie de la vinification c'est-à-dire au cours de la fermentation. En effet, les concentrations en cuivre n'évoluent que très peu lors des étapes pré-fermentaires que ce soit pour les matrices conventionnelles ou biologiques, pour les deux cépages.

Cette évolution importante du cuivre lors de la fermentation impose un questionnement sur les effets de ce dernier sur la révélation des thiols variétaux par la levure, qui a donc été l'objet principal du travail présenté dans la publication suivante.

Unravelling copper effect on the production of varietal thiols during Colombard and Gros Manseng grape juices fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

G. DOURNES[1], T. DUFOURCQ[2], L. SUC[1], A. ROLAND[1] and J.-R. MOURET[1]

[1]SPO, Université de Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

[2]Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Sud-Ouest, Caussens, France

Corresponding author: Dr Jean-Roch Mouret, email jean-roch.mouret@inrae.fr

Abstract

Nowadays the rapidly increasing organic vineyard management with the utilization of copper as sole fungal control pesticide against downy mildew raises once again the question of copper impact on varietal thiols in wine. For this purpose, Colombard and Gros Manseng grape juices were fermented under different copper levels (from 0.2 to 3.88 mg/L) to mimic the consequences in must of organic practices. The consumption of thiol precursors and the release of varietal thiols (both free and oxidized forms of 3-sulfanylhexanol and 3-sulfanylhexyl acetate) were monitored by LC-MS/MS. It was found that the highest copper level (3.6 and 3.88 mg/L for Colombard and Gros Manseng respectively) significantly increased yeast consumption of precursors (by 9.0 and 7.6 % for Colombard and Gros Manseng respectively) . For both grape varieties, free thiol content in wine significantly decreased (by 84 and 47 % for Colombard and Gros Manseng respectively) with the increase of copper in the starting must as already described in the literature. However, the total thiol content produced throughout fermentation was constant regardless of copper conditions for the Colombard must, meaning that the effect of copper was only oxydative for this variety. Meanwhile, in Gros Manseng fermentation, the total thiol content increased along with copper content, resulting in an increase up to 90 %; this suggests that copper may affect regulation pathways of varietal thiols, also underlining the key role of oxydation. These results complement our knowledge on copper effect during thiol-oriented fermentation and the importance of considering the total thiol production (reduced+oxydized) to better understand the effect of studied parameters and differenciate chemical from biological effects.

1. Introduction

Varietal thiols are interesting aromas for white wines, especially as they are imparting notes of grapefruit with 3-sulfanylhexanol (3SH) (Tominaga et al., 1998a), passion fruit with 3-sulfanylhexyl acetate (3SHA) (Tominaga et al., 1996) as well as blackcurrant bud with 4-methyl-4-sulfanyl-pentanone (4MSP) (Darriet et al., 1995). These aromas are produced during fermentation by yeast from odorless precursors found in grapes of different varieties such as Sauvignon blanc, Colombard and Gros Manseng (Dournes et al., 2022, Roland et al., 2011a).

The precursors of 3SH, which is the most ubiquitous varietal thiol, are either bound to glutathione (Peyrot Des Gachons et al., 2002, Roland et al., 2010a, Thibon et al., 2016), dipeptides (Bonnaffoux et al., 2017, Capone et al., 2011) or cysteine (Tominaga et al., 1998b). These precursors once consummed by yeast will enter a degradation pathway that ressembles in every way the xenobiotic detoxification pathway, which will convert them to Cys3SH (Bonnaffoux et al., 2018); this precursor will then be cleaved into 3SH and pyruvate by the action of an enzyme with β-lyase activity such as Irc7p (Thibon et al., 2008) or Str3p (Holt et al., 2011). This polyfunctional thiol (thiol and alcohol functions) can then enter the same route as the higher alcohols produced by yeast and be acetylated on the alcohol function, mainly by Atf1p, to produce 3SHA (Swiegers et al., 2006).

Varietal thiol formation during fermentation is a key process for the production of wines with powerfull aromatic profiles. Over the years, many parameters have been identified to regulate thiol final concentration in wine. Among them, yeast strain could be the most important, as Irc7p exists under two different forms of which only one is active (Roncoroni et al., 2011). Secondly, thiol precursors consumption and degradation are controlled by yeast nitrogen catabolite repression (NCR) (Thibon et al., 2008, Subileau et al., 2008) and therefore by the nitrogen status of the must. Thirdly, as varietal thiols are readily reactive and particularly prone to oxidation, oxygen management is particularly important at the end of fermentation (Blanchard et al., 2004, Lopes et al., 2009, Roland et al., 2010c).

Copper has been used on grapevine for more than 120 years for its antifungal properties (Prillieux, 1887). Its utilization was the main line of defense against fungal parasites such as

downy mildew (*Plasmopara viticola*), it was remplaced in the early 50s with synthetic alternatives. However, for grapevine organic cultivation, theses synthetic fungicides are forbidden, which implies the excluside use of copper as sole fungicide. In organically managed vineyards, copper concentration in must can reach up to 15 mg/L (García-Esparza et al., 2006). Copper impact has been studied soon in the early days of varietal thiols science (Darriet et al., 2001). It was shown that copper spraying on parcels of Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot significantly decreased 3SH content in wine, between 89 and 37 % (for 1 copper treatment) and between 94 and 63 % (for two copper treatments). The same work also demonstrated limited to no impact of foliage copper spraying on wine varietal thiol content, traducing no assimilation of copper by the plant through aerial organs. At that time, knownledge about varietal thiols, their precursors and their fates was limited and conclusions were only incomplete. Since then, it was shown that copper spraying at the vineyard could affect the precursors content of specific varieties (Dournes et al., 2022) with 30% less precursors in copper -reated Gros Manseng grapes compared to their control while Colombard remained unaffected, revealing a possible biological effect of copper in the vineyard.

Due to thiolreactivity, their fates are quite various, including the reaction with either acetaldehyde to form oxathiane (Chen et al., 2018, Wang et al., 2020), polyphenols to form thioether adduct (Nikolantonaki et al., 2012) or other thiols to form di- and poly- sulfides (Roland et al., 2016, Dekker et al., 2020). Until 2016 and the developpement of the N-phenylmaleimide (NPM) method by Roland et al., only the reduced form of thiols was studied, providing only an incomplete view of these aromas. Furthermore, the same work showed the involvement of copper sulfate in the oxydation of thiols into disulfide with up to 90% of 3SH being transformed.

It is therefore necessary to analyse the thiols forms in their entirety in order to fully understand the impact of copper during winemaking.

In this work, the impact of copper on the consumption of thiol precursors by *Saccharomyces cerevisiae* was studied during the fermentation of Colombard and Gros Manseng grape juices as well as its impact on the content of free and total 3SH produced in the corresponding wines.

2. Material & Methods

a. Chemicals

UPLC/MS grade water, methanol and formic acid (>99.98%) were purchased from Biosolve Chimie, Dieuze, France; deuterium (99.8% D), dithiotreitol (98%), (*E*)-2-hexenal (98%), 2-hexyn-1-ol (≥97%), Boc-Cys-OH (≥98.5%), $(Boc\text{-}Cys\text{-}OH)_2$ (≥98%), ethanol-OD (≥99%), hydrochloric acid (37%), L-glutathione reduced (98%), Lindlar catalyst, manganese(IV) oxide (≥99%), mesityl oxide (≥90%), mesityl oxide d_{10} (>98% D), triethylamine (≥99%) were purchased from Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France, and H-Cys-Gly-OH (98%), H-Glu(Cys-OH)-OH (98%)from Bachem, Bubendorf, Suisse; triethylsilane (≥98%) was obtained from TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium; while di-sodium hydrogen phosphate (≥99%), sodium carbonate (≥99%), sodium dihydrogen phosphate dihydrate (≥99%)and trifluoroacetic acid (≥99.9%) were purchased from Carl Roth, Karlsruhe, Germany.

b. Grape sampling

Two plots grown with either Colombard and Gros Manseng were selected in the region of Côtes de Gascogne in France during the 2020 vintage. At harvest, 100kg of grapes were handpicked for vinifications.

c. Mini Vinifications

The 100 kg of grapes were received and processed immediately upon reception at the wine cellar. The first step consisted in destemming and crushing with Bucher DeltaE1 (Bucher Vaslin, Chalonnes sur Loire, France). The resulting crushed berries were sulfited at 30 mg/L using a 10% bisulfite liquid solution (Solution 10, Laffort, Bordeaux, France) and left to macerate for 15 hours at 4°C. After maceration, crushed grapes were pressed under inert gas using a modified pneumatic press (Marchisio, Vertova, Italy) for 600 s at 2 bars with another dose of 40 mg/L of sulfites during this process. Grape juice (80L) was then split equally into two 50L plastic barrels per variety and cooled at 4°C for 72h to clarify to 150 nephelometric turbidity units (NTU) measured with a 2100 AN IS turbidimeter (Hach, Loveland, USA). For each

variety, the clarified musts from the two barrels were pulled and homogenized before being transferred into LeParfait® 3L jar previously inerted with dry ice.

The jars were filled with 2.5L of must corresponding to 30L of each grape variety juices and stored in a controlled room at 18°C. The three copper levels (+0.41, +0.8 and +3.45 mg/L of Cu) were achieved with the addition of 0.5, 1, 4.25mL of Sulfiredox ® solution (Laffort, Bordeaux, France) respectively. These four conditions were denominated 'Control', 'Cu1', 'Cu2', 'Cu3'.

Fermentation started with the inoculation of 200 mg/L of rehydrated active dried *Saccharomyces cerivisiae* yeast (Zymaflore X5, Laffort, Bordeaux, France) and the addition of 200 mg/L of Vivactiv Arôme (Sofralab, Magenta, France) and 200 mg/L of Go-Ferm® protect (Lallemand, Canada). Fermentations further received 100 mg/L of Vitaferment® (Lamothe-Abiet, Canéjan, France) at inoculation time and three days after. All fermentations were carried out in triplicate at 18°C; density was monitored every day and fermentations were stopped at density <0.92.

d. Copper analysis

Copper concentration in musts was analyzed with EnzytecColor COPPER (R-Biopharm, Darnstadt, Germany) on a Gallery Discrete Analyzer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) (Dournes et al., 2022).

e. Oenological parameters

Glucose, fructose, ethanol, glycerol, acetate and succinate contents were determined using a 1260 Infinity HPLC (Agilent™ Technologies, Santa Clara, California) with a separation performed using a Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) column (8 µm, 300 mm x 7.8 mm) at 60°C. Detection was performed using a refractive index and UV detectors. The mobile phase was composed of H_2SO_4 (2.5 mM) in water and the separation was made with a constant flow rate of 0.6mL/min (Rollero et al., 2015).

A Gallery Discrete Analyzer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) was used to analyze amino acids and ammonium using a Primary Amino Nitrogen Assay Kit and Ammonia Assay Kit respectively (Megazyme, Wicklow, Ireland).

f. Chemical syntheses of natural and deuterated thiol precursors

3-*S*-glutathionylhexan-1-ol (G3SH/G3SH-d_2) (Roland et al., 2010a), 4-*S*-glutathionyl-4-methylpentan-2-one (G4MSP/ G4MSP-d_{10}) (Roland et al., 2010b), 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol (Cys3SH/Cys3SH-d_2), 4-*S*-cysteinyl-4-methylpentan-2-one (Cys4MSP/Cys4MSP-d_6) (Dagan 2006), 3-*S*-(cysteinylglycine)-hexan-1-ol (CysGly3SH) (Fedrizzi et al., 2012), 3-*S*-(glutamylcysteinyl)-hexan-1-ol (GluCys3SH) (Fedrizzi et al., 2012) as well as 3SH-d_3 and 3SHA-d_3 (Kotseridis et al., 2000) were synthesized according to published methods. 3-*S*-(cysteinylglycine)-hexan-1-ol-d_2 (CysGly3SH-d_2) and 3-*S*-(glutamylcysteinyl)-hexan-1-ol-d_2 (GluCys3SH-d_2) were synthesized using 2-hexenal-d_2, which was obtained by 2-hexynol deuteration as reported by Roland *et al.*, 2010. NMR characterizations of CysGly3SH-d_2 and GluCys3SH-d_2 were consistent with those reported by Bonnaffoux *et al.*, 2017 (data not shown). Synthetic and natural compounds were characterized and quantified with ^{1}H NMR (data not shown).

g. Analysis of thiol precursors by stable isotope dilution assay (SIDA) and UPLC-MS/MS

Aforementioned precursors of 3SH and 4MSP were analyzed by SIDA-UPLC-MS/MS through direct injection of Colombard and Gros Manseng grape must as previously reported (Bonnaffoux et al., 2017) modified as follows: the analytical system consisted of a 1290 Infinity II UHPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) hyphenated to a 6470B Agilent Triple Quadrupole. Analytes were separated on a Hypersil gold column (1.9 µm, 100 mm x 2.1 mm) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) with a 40°C oven temperature and a 15 min total run time. The mobile phases were composed of (A) water or (B) methanol each with 0.1% formic acid. The gradient started at 5% of B for 1 min, was increased to 35% over 9 min, to 98% in 3 min, held for 2 min, then to 5% in 10 seconds and held for 2 min at a flow rate of 0.6 mL/min. Source parameters were as follows: gas temp was 230°C, gas flow was 4L/min, nebulizer at 3.79 bar, sheath gas temp at 400 °C, sheath gas flow at 11 L/min, capillary voltage at 3000 V in positive mode, nozzle voltage at 0V and positive Delta EMV set to 400 V. Ionization was carried

out using positive electrospray (ESI+) and detection was made using Multiple Reaction Monitoring (MRM). Quantification and qualification transitions were described in Table S2.

h. Analysis of thiols by stable isotope dilution assay (SIDA) and UPLC-MS/MS

Reduced and total 3SH were analyzed by SIDA-UPLC-MS/MS following a previously established method (Roland et al., 2016) based upon derivatisation with N-phenylmaleimide and tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) reduction for total thiols.

The analytical system consisted of a 1290 Infinity II UHPLC hyphenated to a 6470B Triple Quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Analytes were separated on a Hypersil gold column (1.9 µm, 100 mm x 2.1 mm) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) with a 40°C oven temperature and total run time of 10 min. The mobile phases were composed of (A) water with 0.1% formic acid and (B) methanol with 0.1% formic acid. The gradient started at 20% of B, was increased to 80% over 4 min, to 99% in 2 min, held for 1 min, then decreased to 20% in 1 min and held for 2 min at a flow rate of 0.5 mL/min. Source parameters were as follows: gas temp was 230°C, gas flow was 10L/min, nebulizer at 3.79 bar, sheath gas temp at 300 °C, sheath gas flow at 12 L/min, capillary voltage at 3000 V in positive mode, nozzle voltage at 1000 V and positive Delta EMV set to 200 V. Ionization was carried out using positive electrospray (ESI+) and detection was made using Multiple Reaction Monitoring (MRM). Quantification and qualification transitions are described in Table S2.

i. Statistical analysis

Statistical analyses (t-test) were performed with RStudio software (version 3.6.2). Copper effect on fermentation metabolites for each variety was analyzed using an analysis of variance (ANOVA).

3. Results and discussion

a. Composition of the grape musts used for fermentation

The musts used in this study originated from the two Colombard and Gros Manseng varieties cultivated in Côtes de Gascogne region without copper. This conventional cultivation practice was selected to produce a must unaffected by organic practices, offering the possibility to design the copper range as desired. Sugar, assimilable nitrogen and copper content values (Table 1) were found to be within the range of the natural diversity encountered within these varieties for conventional cultivation practices (Dournes et al., 2022).

Table 1: Basic oenological parameters and 3SH precursors of Colombard and Gros Manseng musts

Variety	Colombard	Gros Manseng
Fructose (g/L)	103 ± 10	121 ± 12
Glucose (g/L)	105 ± 10	112 ± 11
Ammonium (mgN/L)	69 ± 7	109 ± 11
Amino acids (mgN/L)	114 ± 11	164 ± 16
Copper (mg/L)	0.20 ± 0.02	0,40 ± 0.04
G3SH (µg/L)	109 ± 1	336 ± 3
γ-GluCys3SH (µg/L)	n.d.	n.d.
CysGly3SH (µg/L)	13.1 ± 0.1	13.6 ± 0.1
Cys3SH (µg/L)	5.9 ± 0.3	11.2 ± 0.6

Measure error was standardized at 10% for all analyses except for the precursors for which error represents the relative standard error of the method.

On the precursors side, it can be noted that G3SH at 109 µg/L for Colombard is lower than the previously established composition for this variety at 129 – 446 µg/L (Dournes et al., 2022). As to Gros Manseng, the 336 µg/L G3SH average is on the higher side of the range (145 – 454 µg/L) for this variety, also based on Dournes *et al.* work. These authors established that G3SH represented the majority of the precursors forms (more than 90%), which was also the case here especially for Gros Manseng grapes. Interestingly, it can be noted the presence of CysGly3SH at 13.1 and 13.6 µg/L in both grape varieties. These quantities are in the same order of

magnitude as those found in Sauvignon blanc that vary from 0 to 20 µg/L (Capone et al., 2011) or from 5,8 to 28,3 µg/L in macerated Sauvignon blanc (155 samples) with an 11,9 µg/L average. Precursors of 4MSP and GluCys3SH were not detected in the musts. Both musts presented natural concentration of copper at 0.2 and 0.4 mg/l for Colombard and Gros Manseng respectively.

b. Monitoring of fermentations under copper stress

Copper is a necessary microelement for all organisms, however, at high concentration this metal becomes toxic to cells (Avery et al., 1996). In winemaking, a high copper concentration has been shown to be responsible for longer fermentations and a lower alcohol production (Ferreira et al., 2006). This work also showed a strain-dependent effect as the copper concentration used (15.89 mg/L) resulted in a particularly important impairment of yeast growth for VIN13, a varietal thiol-optimized yeast strain.

While high doses of copper are used to study the impact of copper on primary metabolites and microbiological aspects during fermentation, no study has, to our knowledge, covered the impact of oenological copper doses on secondary metabolites such as varietal thiols and their precursors during fermentation. To investigate this, both Colombard and Gros Manseng juices were spiked with a $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (25g/L) solution to obtain 3 different copper concentrations plus a control experiment without any addition. For both varieties, the different levels of spiking were as follows:

- The first condition consisted in the addition of 0.5 mL of the copper sulfate solution for the 2.5 L of must to obtain a final concentration of 0.6 mg/L of copper, corresponding to a tipping point in term of thiols in these matrices (Dufourcq et al., 2010).
- The second condition was a final copper concentration of 1 mg/L.
- Finally, adding 4,25 of the copper solution resulted in a 3.6 mg/L concentration, which was the highest measured copper content in musts in Côtes de Gascogne during this vintage.

Gros Manseng conditions were based on the same additions. Fermentations advancement was monitored with density measurements (Figure 1).

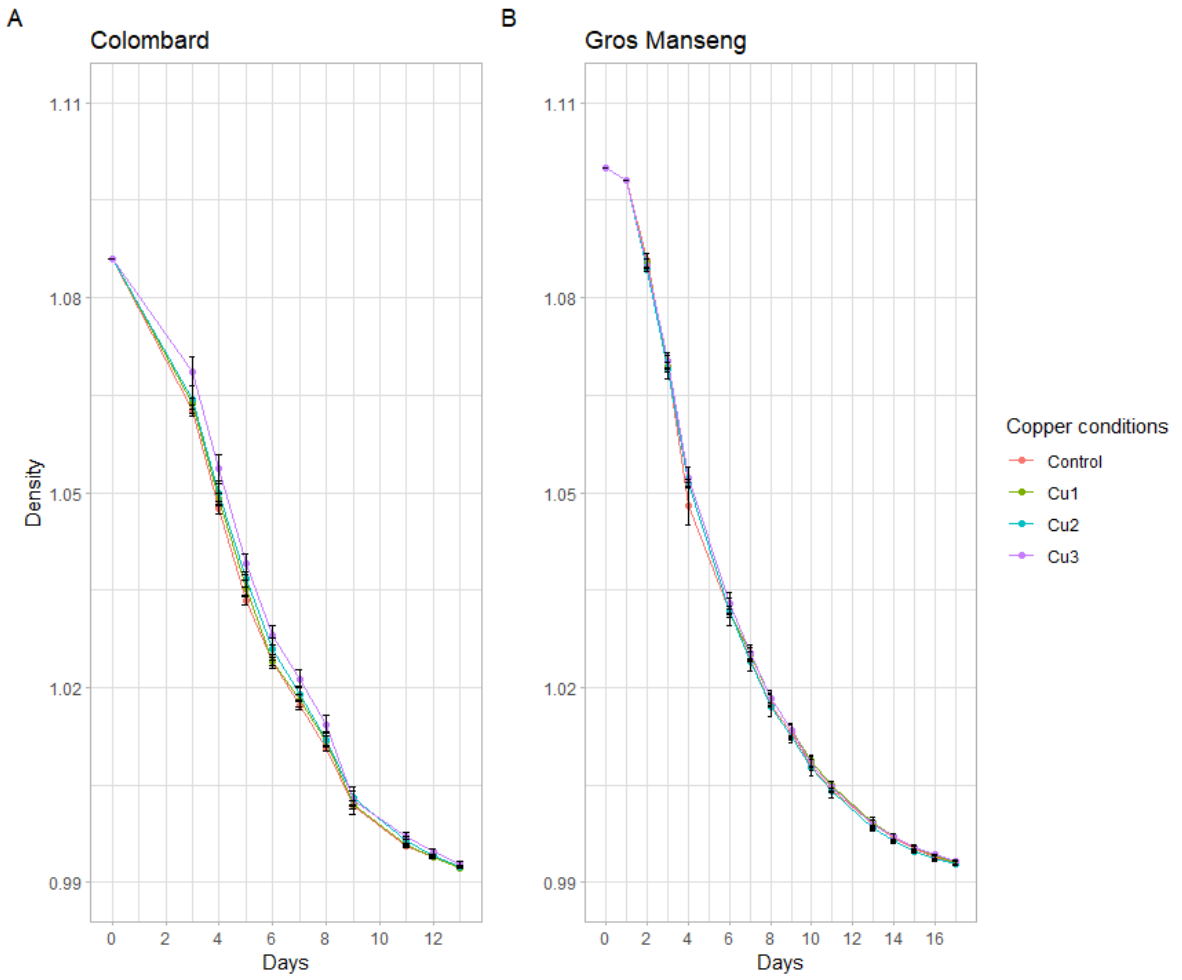


Figure 1: Fermentation kinetics expressed as density decrease. (A) Colombard and (B) Gros Manseng fermentation. Each point represents the mean of a biological triplicate and errors bars represent the standard error. Copper conditions in mg/L: Colombard control (0.2), Cu1 (0.6), Cu2 (1), Cu3 (3.6); Gros Manseng control (0.4), Cu1 (0.8), Cu2 (1.2), Cu3 (3.9).

All conditions led to the same density decrease throughout fermentation with no difference at any point between the conditions. For both varieties, the different copper conditions led to fermentations with identical overall behaviour. These results are in accordance with published results (Gava et al., 2016) where the fermentation parameters of strain X5 were unaffected by copper concentration and formulation with the exception of a slightly longer lag phase for copper oxychloride (23.40h) compared to copper hydroxide (22.44h), while copper sulfate was intermediate (23.03h). For other strains such as Anaferm Riesling, fermentation parameters remained unchanged up to 25 mg/L of copper while Oenoferm X-trem showed slower fermentation from 10 mg/L upwards. Other works have reported that fermentation kinetics

were differently affected at 15 mg/L of copper (Ferreira et al., 2006), suggesting that yeast strain was the most important factor in copper resistance, as reported later (Capece et al., 2016, Capece et al., 2017).

Table 2: Concentration of the main fermentation metabolites at the end of fermentation

Variety	Modality	Ethanol (g/L)	Fructose (g/L)	Glucose (g/L)	Glycerol (g/L)	Acetate (g/L)	Succinate (g/L)
Colombard	Control	95.8 ± 0.4	3.1 ± 0.1	n.d.	5.1 ± 0.5	0.26 ± 0.04	2.5 ± 0.3
	Cu1	95.9 ± 1.2	2.5 ± 0.1	n.d.	5.8 ± 0.1	0.28 ± 0.01	2.7 ± 0.1
	Cu2	95.3 ± 1.2	2.5 ± 0.2	n.d.	5.7 ± 0.2	0.27 ± 0.01	2.7 ± 0.1
	Cu3	91.6 ± 3.3	2.7 ± 0.3	n.d.	5.5 ± 0.3	0.27 ± 0.02	2.6 ± 0.1
Gros Manseng	Control	111.0 ± 0.7	6.2 ± 0.4	0.5 ± 0.1	8.3 ± 0.1	0.76 ± 0.01	7.5 ± 0.2
	Cu1	112.9 ± 0.4	5.6 ± 0.1	0.4 ± 0.2	8.2 ± 0.1	0.75 ± 0.02	7.5 ± 0.1
	Cu2	112.5 ± 0.3	5.9 ± 0.4	0.4 ± 0.1	8.2 ± 0.1	0.75 ± 0.01	7.5 ± 0.1
	Cu3	112.6 ± 0.4	5.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	8.3 ± 0.1	0.75 ± 0.01	7.5 ± 0.1

For each value, are presented the average and the standard deviation for the fermentation triplicate. A statistical test using ANOVA produced no significant difference between modalities in each variety. Copper conditions in mg/L: Colombard control (0.2), Cu1 (0.6), Cu2 (1), Cu3 (3.6); Gros Manseng control (0.4), Cu1 (0.8), Cu2 (1.2), Cu3 (3.9).

In this work, neither fermentation kinetics nor the main fermentation metabolites (Table 2) were affected by the copper concentrations used. For each copper modality of the two grape varieties, none of the final concentrations of the central carbon metabolism were different compared to the control. It can be assumed that there was no effect of copper at these concentrations on the analyzed elements of the yeast central metabolism. However, other metabolites, such as acetaldehyde, that are known to be influenced by copper (Zimdars et al., 2019, Capece et al., 2017) were not covered in this study.

c. Precursors consumption by the yeast during alcoholic fermentation

Thiol precursors were analyzed at the end of fermentation to assess yeast consumption of these compounds under the different copper levels (Fig 2). The consumption of precursors across all the conditions was in average 55% and 65% for Colombard and Gros Manseng respectively. These values are lower than the majority of those observed in red grape must of Pinot noir with precursors consumption (G3SH + Cys3SH + CysGly3SH) ranging from 4 to 99.5% with an average of 76% for the 11 AWRI yeast strains studied (Cordente et al., 2022) with an initial content of 1176, 129.7 and 24.9 µg/L for G3SH, Cys3SH and CysGly3SH respectively .In Merlot juices with an initial precursor content between 2028 and 9855 µg/L, consumption ranged from 13 to 47% if considering only Cys3SH and G3SH (Concejero et al., 2016). If we take into account each precursor independently, this latter work suggested that Cys3SH was more assimilated by yeast (over 84%) than G3SH (up to 45%) (Concejero et al., 2016), this last observation corroborating our findings on G3SH assimilation in Colombard and Gros Manseng fermentations where G3SH represented more than 90% of precursors. A similar assimilation of G3SH-d_2, around 68%, was measured by Bonnaffoux *et al.,* 2018 using 1429 µg/L labelled tracers in Sauvignon blanc must with yeast strain Esperide, suggesting that G3SH was possibly never totally assimilated by yeast during alcoholic fermentation in contrast to Cys3SH. All these claims seem to support a mechanism of G3SH uptake that might not be correlated to yeast strain and initial precursors levels in grapes.

For both varieties, the highest precursors consumption (60% for Colombard and 70% for Gros Manseng) was achieved in the 'Cu3' condition, which is the highest copper content for both varieties (p-values = 0.01 and 0.00012 respectively). This is the first time an abiotic factor such as copper stress has been evidenced in precursor uptake regulation.

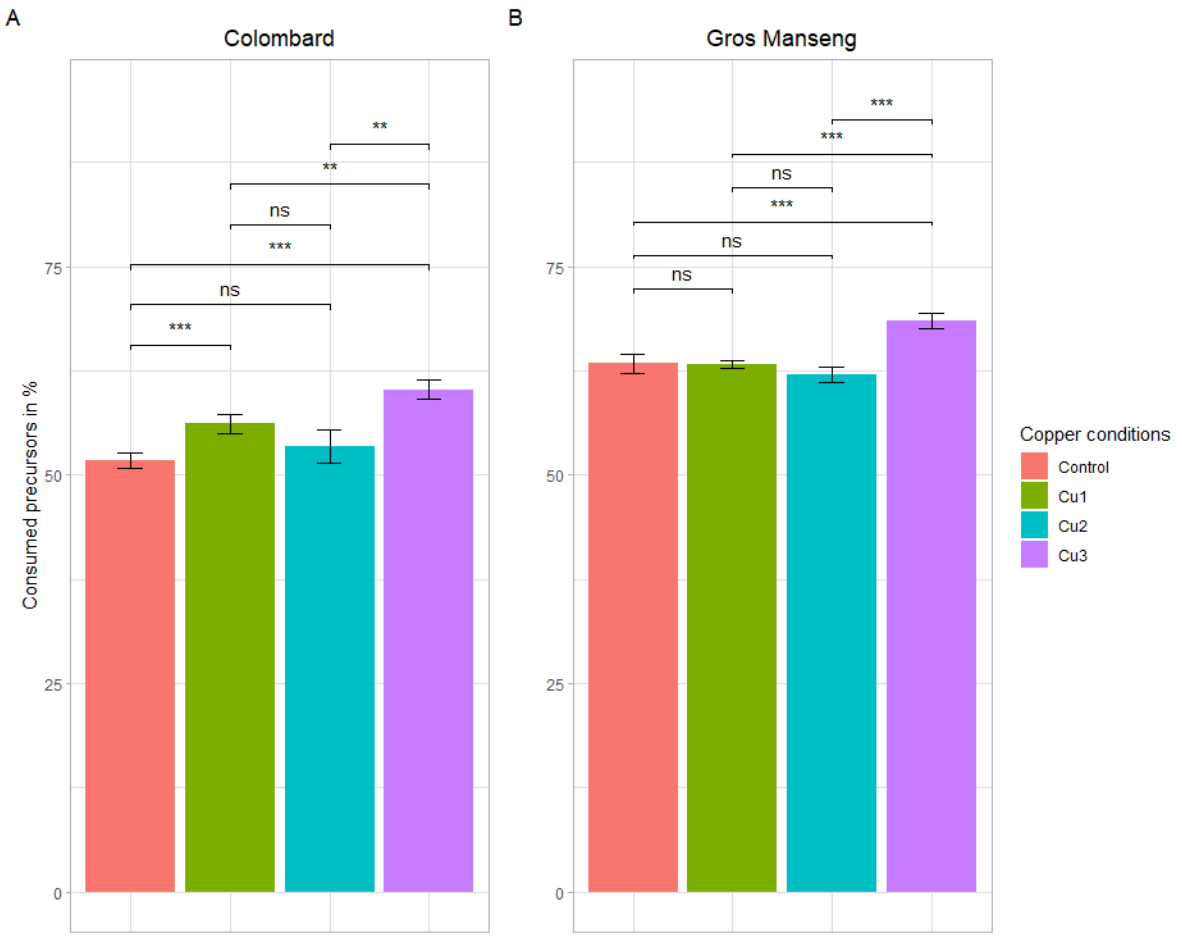


*Figure 2: Total precursors consumption in %. (A) Colombard (B) Gros Manseng. Each plot represents the average of the biological triplicate and the error bars represent the standard errors. p-value were calculated with t-test (95%); * low significant (p<0.1), ** significant (p<0.05), *** highly significant (p<0.01). Copper conditions in mg/L: Colombard control (0.2), Cu1 (0.6), Cu2 (1), Cu3 (3.6); Gros Manseng control (0.4), Cu1 (0.8), Cu2 (1.2), Cu3 (3.9).*

High copper content during fermentation is toxic to yeast that requires several copper resistance mechanisms to maintain homeostasis. One of them starts with Cup2p (also known as Ace1p), a copper-binding transcription factor, that leads to the activation of the *CUP1* gene present in two copies in the *Saccharomyces cerevisiae* genome (Thiele, 1988). This gene codes for a metalothionein, a specific protein that binds copper thanks to numerous cysteine residues (Premakumar et al., 1975). The overproduction of Cup1 proteins containing precisely 12 cysteines in a relatively conserved motif across high eukaryotic cells (Butt et al., 1984) requires

an increase in sulfur assimilation and turnover that was later identified in yeast after copper exposure (Yasokawa et al., 2008).

The increased requirement for sulfur might also involve an overproduction of sulfur transporters such as the glutathione transporter Opt1p or the amino acid permease Gap1p. These two transporters have in fact been identified as the main entry mechanism for thiol precursors into yeast (Cordente et al., 2015). It is then possible to attribute the higher consumption of thiol precursors in presence of high copper concentrations to the overproduction of these two transporters.

In addition to global precursors consumption, we also assessed the evolution of precursors content during fermentation with sampling at 3 and 6 days after inoculation (Fig3).

In Colombard, precursors were consumed throughout fermentation with Cys3SH (Fig 3A) and CysGly3SH (Fig 3E) being completely consumed within 6 days for all conditions except for control fermentations that stabilized at 0.01 µmol/L. Surprisingly, the consumption of G3SH (Fig 3C) was not concomitant with any CyS3SH accumulation as observed in a previous work (Bonnaffoux et al., 2017); this can however be explained by larger sampling intervals under our conditions and by the utilization of a different yeast strain (here strain X5 compared to VIN13 and Esperide). The absence of γ-GluCys3SH might imply that the strain used for these fermentations either do not degrade G3SH *via* this dipeptide but directly into cysteine or CysGly conjugates. All the reported works (Bonnaffoux et al., 2018, Cordente et al., 2015) assumed that precursors are always excreted in the medium by yeast. If we consider that yeast does not excrete all the compounds, it could be possible that γ-GluCys3SH was just not excreted into the fermentation medium, considerably blurring the metabolic mechanisms involved. Both of these hypotheses are consistent with the idea that precursor consumption and degradation are strain-dependent processes and thus cannot easily be generalized. In the different Colombard conditions of this work, no effect of copper stress on the overall mechanism of precursor degradation was observed.

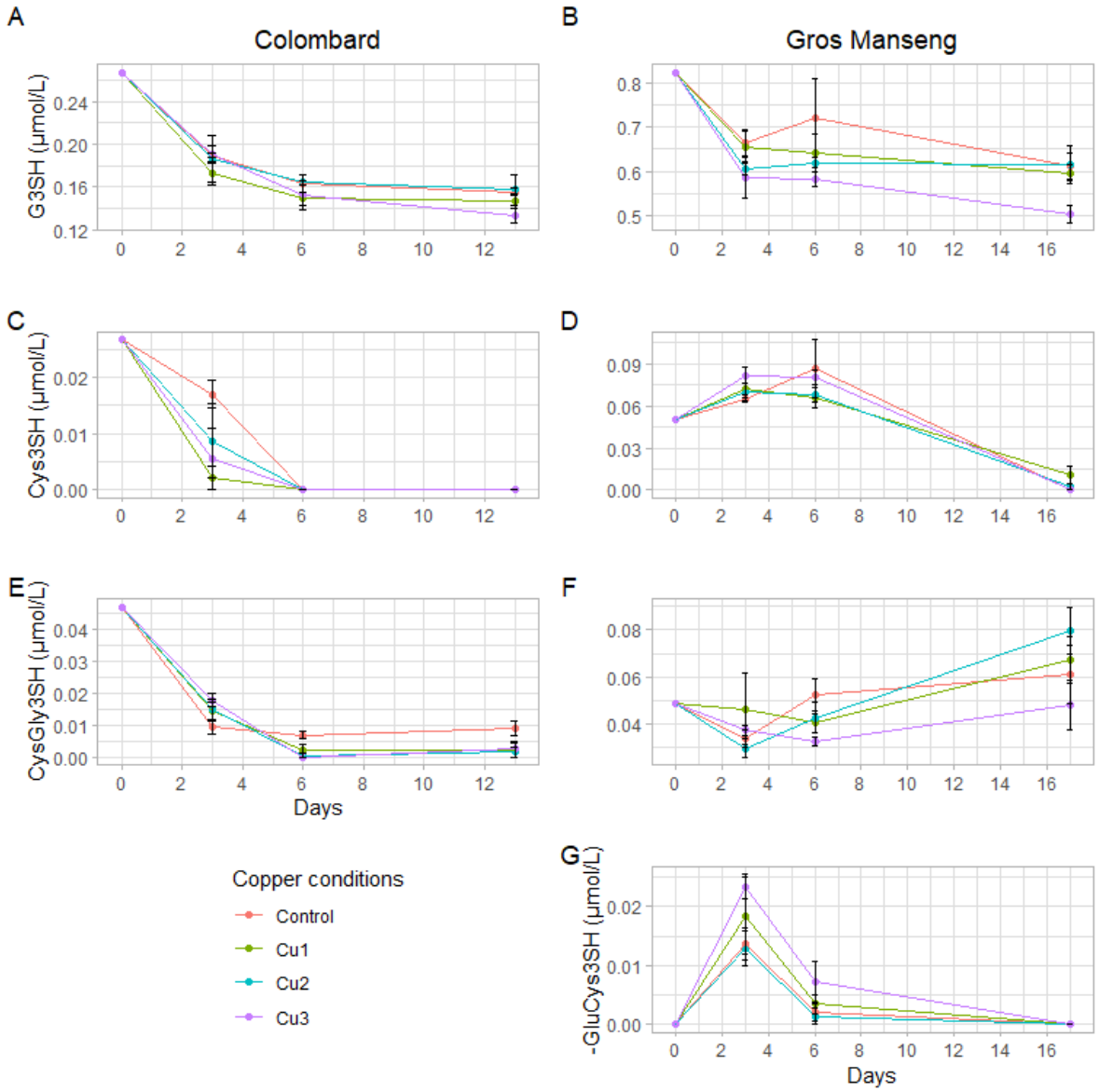


Figure 3: Evolutions of precursors concentration in µmol/L during Colombard (left-side) and Gros Manseng (right-side) fermentations. G3SH in Colombard (A) and in Gros Manseng (B); Cys3SH in Colombard (C) and in Gros Manseng (D); CysGly3SH in Colombard (E) and in Gros Manseng (F); (G) γ-GluCys3SH in Gros Manseng. Each point represented the average of biological triplicates and error-bars represented the standard errors. Copper conditions in mg/L: Colombard control (0.2), Cu1 (0.6), Cu2 (1), Cu3 (3.6); Gros Manseng control (0.4), Cu1 (0.8), Cu2 (1.2), Cu3 (3.9).

In Gros Manseng, fermentation showed results more consistent with the literature with an accumulation of Cys3SH (Fig 3B) and γ-GluCys3SH (Fig 3G) correlated with a consumption of G3SH (Fig 3D). The presence of this dipeptide during fermentation confirms the capacity of strain X5 to use this degradation pathway as seen by Bonnaffoux *et al.* with VIN13 and Esperide

strains. Surprisingly, CysGly3SH (Fig 3F) was produced throughout fermentations, leading one to believe that either X5 was capable of producing this dipeptide from the degradation of G3SH, which to our knowledge has never been reported, or that Gros Manseng could harbor unidentified precursors that could be degraded into this dipeptide. Indeed, we can assume that an aldehyde form or sulfite adduct of CysGly3SH might be naturally present in grape juice and could constitute a yet unsuspected precursor pool similar to G3Shal (Thibon et al., 2016, Muhl et al., 2022).

G3SH was the only precursor whose consumption was significantly increased at the highest copper concentration as already seen for total precursors consumption.

The identification of both dipeptides in Gros Manseng fermentation reopened the question about the absence of γ-GluCys3SH in Colombard fermentation and the presence of CysGly3SH. Indeed, we observed a production of γ-GluCys3SH in Gros Manseng (initial G3SH level = 335 µg/L) but not in Colombard (initial G3SH level = 109 µg/L); similarly, γ-GluCys3SH was identified in spiked Sauvignon musts (initial level of G3SH-d_i = 579 µg/L) (Bonnaffoux et al., 2018).

As CysGly3SH, γ-GluCys3SH could be the result of the degradation of unknown precursors that may be variety dependent, thus explaining the presence of this dipeptide only in Gros Manseng. Alternatively, considering that γ-GluCys3SH was observed at 'high' concentrations of G3SH, the presence of this dipeptide might be linked to the initial level of G3SH in juices. This could correspond to a metabolic route where γ-GluCys3SH would be the result of the overflow of another degradation route (probably CysGly3SH) activated only in presence of high G3SH concentrations.

d. Varietal thiol revelation

Varietal thiol aromas are extremely reactive compounds that can exist in wine under numerous forms:

- Their reduced form (-SH) in equilibrium with their oxidized (RS-SR') (Bencomo-Rodriguez et al., 2012) or (R-Sn-R) counterparts (Dekker et al., 2020)
- Complexed with metal such as copper (Franco-Luesma and Ferreira, 2014)
- Oxathianes from the reaction with acetaldehyde (Chen et al., 2018, Wang et al., 2020)
- Thioether bound to polyphenol (Nikolantonaki et al., 2010)

Among these forms, only reduced thiols and oxathianes are odorous compounds participating in the wine organoleptic profile. Oxathianes are found in bottled ageing wine, and correlated with the increase of acetaldehyde content due to oxidation or for some strains, to copper-induced stress during fermentation (Zimdars et al., 2019, Capece et al., 2017). The oxidized and complexed forms can be considered as thiol sinks and therefore positively contribute to the wine aroma profile during ageing. To the best of our knowledge, there is no method to quantify 3SH and 3SHA copper complexes/products in wines. Consequently, we decided to monitor only reduced and oxidized forms of 3SH and 3SHA according to Roland *et al.* (2016) approach to obtain a picture of the mechanisms involved under copper stress more complete than through monitoring the reduced forms only. Indeed, the quantification of oxidized forms considered all the combinations of 3SH or 3SHA with other sulfur compounds in the wine matrix, allowing more accurate material balances.

i. Reduced thiols

Free 3SH and 3SHA (reduced form) were analyzed in triplicate (n=3) in all biological fermentation replicates s (n=3) allowing the recovery of a set of 9 data for statistical purpose (Fig 4). 3SHA was detected but remained below the quantification threshold in all samples.

Colombard control conditions produced in average 791 ± 38 ng/L of 3SH against 347 ± 22, 209 ± 10 and 121 ± 15 ng/L for Cu1, Cu2 and Cu3 conditions respectively. This decrease of

3SH content in wine was significant (p-value <1%) and clearly correlated with copper concentration.

In Gros Manseng fermentation, 3SH production was 617 ± 23, 439 ± 31, 365 ± 28 and 325 ± 56 ng/L for control, Cu1, Cu2, Cu3 respectively. The same trend as the one in Colombard could be observed but the difference between the conditions was less pronounced, only the control was significantly higher than the other conditions (p-value <1%). Our observations were consistent with literature: indeed, high copper concentration before fermentation correlated with 3SH content diminution (Darriet et al., 2001). In the present work, 3SH remained twice higher than its perception threshold of 60 ng/L (Tominaga et al., 1998a) for the lowest concentrations in wine. Interestingly, up to 3.6 and 3.8 mg/L of copper in Colombard and Gros Manseng juices respectively, the thiol content of the experimental wines was technically sufficient to contribute perceptibly to the organoleptic profile.

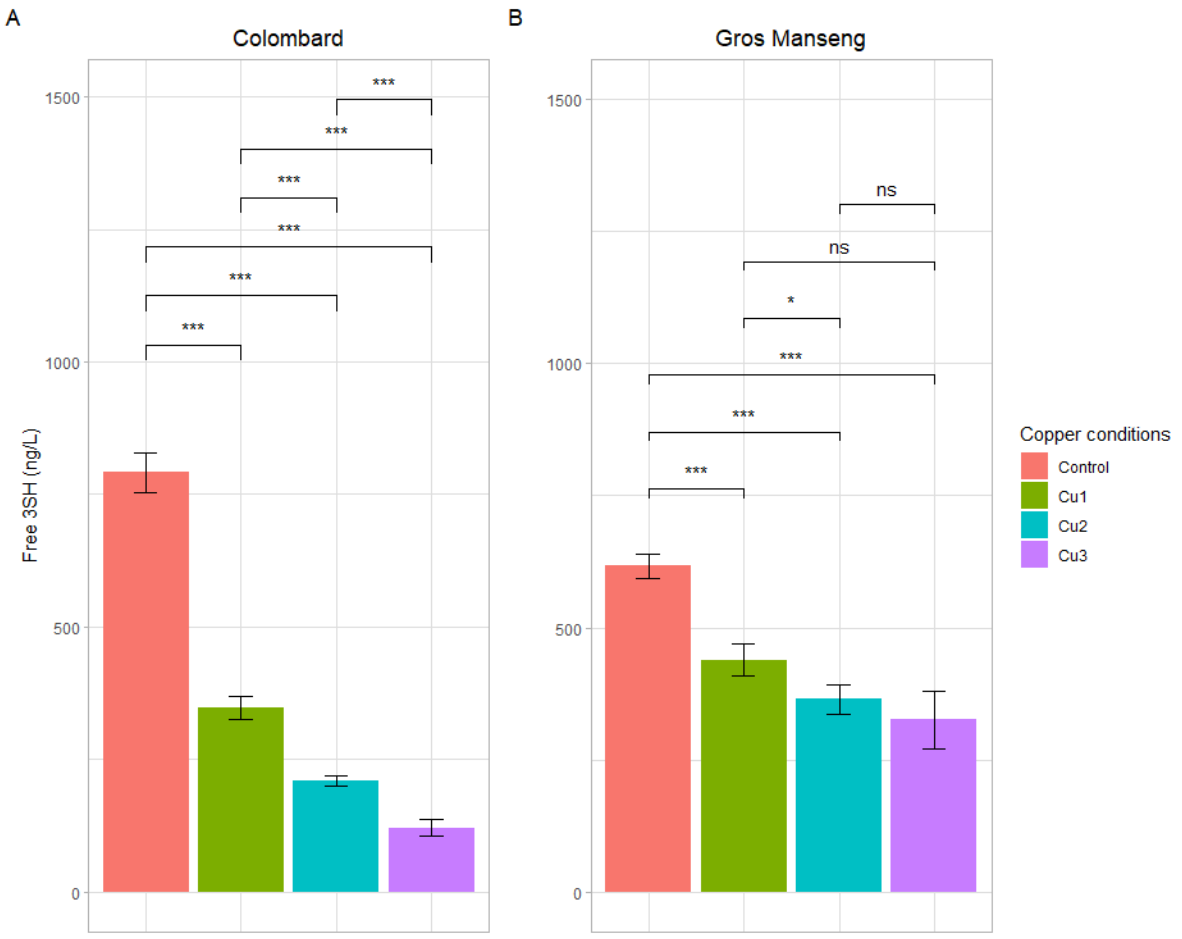


*Figure 4: Free 3SH (reduced form) contents in ng/L in all the finished fermentation. (A) Colombard (B) Gros Manseng. Each plot represents the average of 9 analytical values, errors bars represent the standard error. p-value were calculated with t-test (95%); * low significant (p<0.1), ** significant (p<0.05), *** highly significant (p<0.01). Copper conditions in mg/L: Colombard control (0.2), Cu1 (0.6), Cu2 (1), Cu3 (3.6); Gros Manseng control (0.4), Cu1 (0.8), Cu2 (1.2), Cu3 (3.9). One biological replicate of Gros Manseng Cu3 condition was divergent and therefore excluded of the analysis.*

At first, 3SH could be involved both in copper complexes formation as reported for volatile sulfur compounds in wine (Franco-Luesma and Ferreira, 2014) or in oxidation reactions leading to disulfides (Roland et al., 2016) or polysulfides compounds (Dekker et al., 2020). Therefore, the lower 3SH content could be explained by a chemical interaction with copper during fermentation.

Secondly, as already mentioned about precursors consumption, the copper resistance metabolism can also offer a reasonable biological explanation for the observed decrease in 3SH. As explained above, copper resistance is based upon copper sensing with the transcription

factor Cup2p and copper sequestration by protein Cup1p. Another mechanism also used by *Saccharomyces cerevisiae* is Mac1p regulation (Jungmann et al., 1993). Similarly, to Cup2p, this protein is a transcription factor susceptible to copper. In contrast to Cup2 that is activated at high copper contents, Mac1p is inhibited in copper-replete cells (Keller et al., 2005). The targets of Mac1p regulation are many; among those, gene IRC7 is of particular interest in the case of thiol production. Indeed, this gene codes for a β-lyase enzyme responsible for the last step of precursor degradation s (Thibon et al., 2008). Following this regulation by Mac1p, it has been shown that IRC7 transcription level decreases at high copper concentrations (Gross et al., 2000). This decrease results in in a lower enzyme content and therefore in a potentially lower thiol release during fermentation performed at high cooper concentrations.

ii. Total thiols (reduced + oxidized)

As explained at the beginning of this section, analysis of the reduced form of thiol aromas is of relevance for industrial purposes but it does not take into account all derived forms of 3SH. To explore all these different hypotheses, the analysis of total thiols (Roland et al., 2016) was carried out to access the total production of thiols during fermentation (Fig 5).

Colombard presented similar levels of total 3SH (Fig 5A) with an average of 794 ± 21 ng/L across all copper conditions tested in this work. Considering the difference observed for precursors consumption, conversion yield for total aroma (reduced + oxidized) and all precursors were in average respectively 3.282 ± 0.001, 3.013 ± 0.001, 3.123 ± 0.001, 3.184 ± 0.001 % for 'Control', 'Cu1', 'Cu2', 'Cu3' modalities for Colombard. These figures are in the upper range of those encountered in natural conditions, i.e. from 0.08 to 4.4% (Bonnaffoux et al., 2018, Roland et al., 2011b, Cordente et al., 2022), even if to date comparisons with other research works remain difficult as calculation methods for conversion yield are not always identical. Based on the results presented here, copper could not be correlated with thiol production during fermentation.

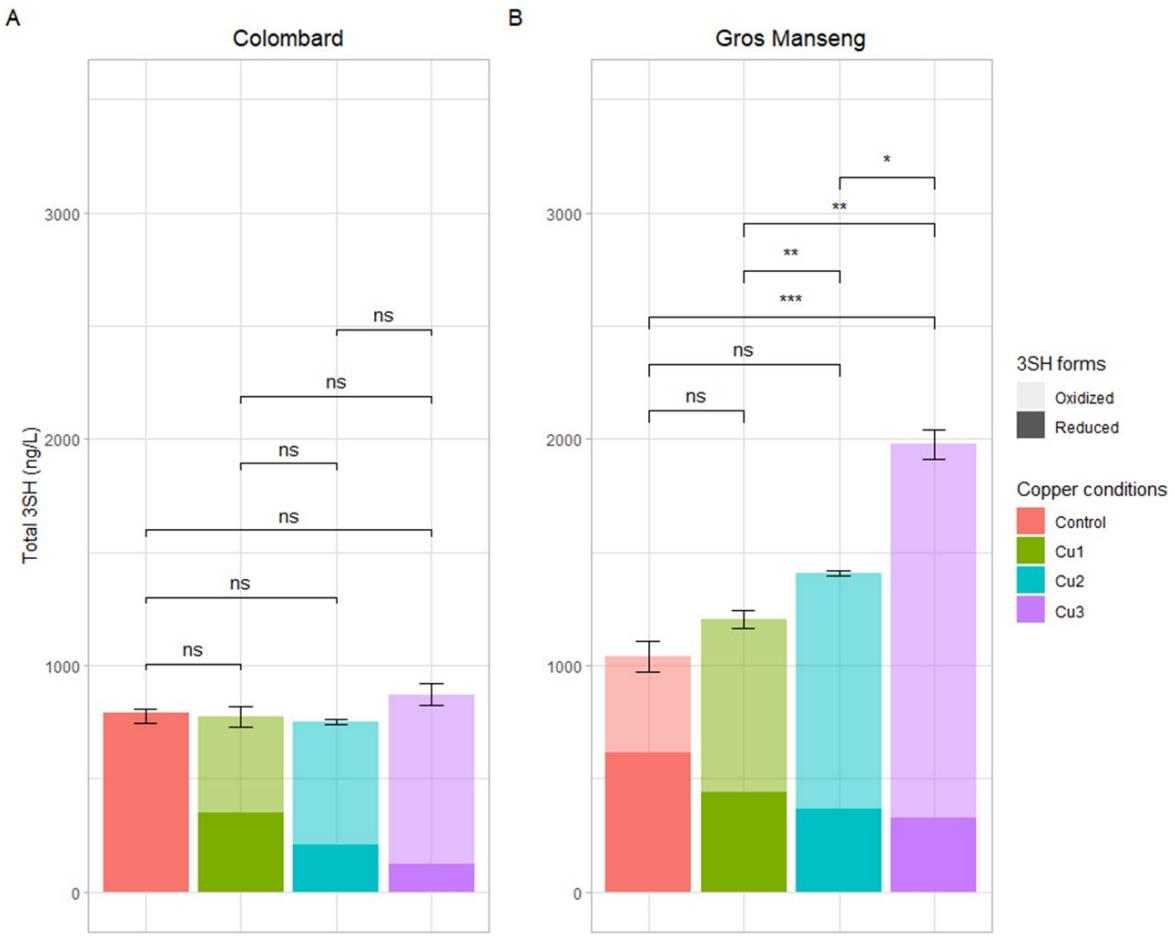


*Figure 5: Total (reduced + oxidized) 3SH content in ng/L analyzed with TCEP method in all the finished fermentations (A) Colombard (B) Gros Manseng. Each plot represents the average of 3 values (biological replicates), errors bars represent the standard error. p-value were calculated with t-test (95%); * low significant (p<0.1), ** significant (p<0.05), *** highly significant (p<0.01). Copper conditions in mg/L: Colombard control (0.2), Cu1 (0.6), Cu2 (1), Cu3 (3.6); Gros Manseng control (0.4), Cu1 (0.8), Cu2 (1.2), Cu3 (3.9). Control and Cu3 conditions for Gros Manseng were only duplicated.*

Reduced forms of 3SH are fully offset by an oxidized fraction inversely proportional to copper concentration, leading to a similar level of 3SH being produced. For Colombard, the reduced form of 3SH is therefore solely correlated to the chemical effect of copper as biological aspects (conversion and total production) remained constant across all conditions.

Fermentation of Gros Manseng (Fig 5B) showed even more surprising results with an increase in total 3SH content along with copper concentration increase. This difference was most pronounced for the 'Cu3' condition (1977 ± 63 ng/L), which is significantly higher than the other three conditions: the control (1041 ± 67 ng/L, p-value <1%), 'Cu1' (1204 ± 41 ng/L, p-value <5%), 'Cu2' (1406 ± 11 ng/L, p-value <10%). For this variety, the conversion yield increased with copper content increase with 0.657 ± 0.001, 0.774 ± 0.001, 0.922 ± 0.001, 1.149 ± 0.001 % for the 'Control', 'Cu1', 'Cu2', 'Cu3' conditions respectively. These values are relatively low compared to the literature already cited for Colombard. The increased thiol production could be quite simply explained by the increase in precursors consumption, linking copper content to a possible biological modulation of precursors revelation by yeast during fermentation. Further, considering the pattern of precursors evolution during the fermentation of Gros Manseng must, it cannot be excluded that this must could contain unknown precursors whose conversion could be enhanced by copper. However, increased copper concentrations in grape must have been shown to decrease Adh1p and Adh2p activity in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation (Zimdars et al., 2019). This reduced activity rules out the possible existence of unknown aldehyde precursors as a key step for this kind of precursors is the reduction of the aldehyde function to an alcohol.

iii. Oxidized thiols

When considering only oxidized thiols, a clear correlation with copper content appeared, which was then plotted (Figure 6) and a regression model was tentatively applied.

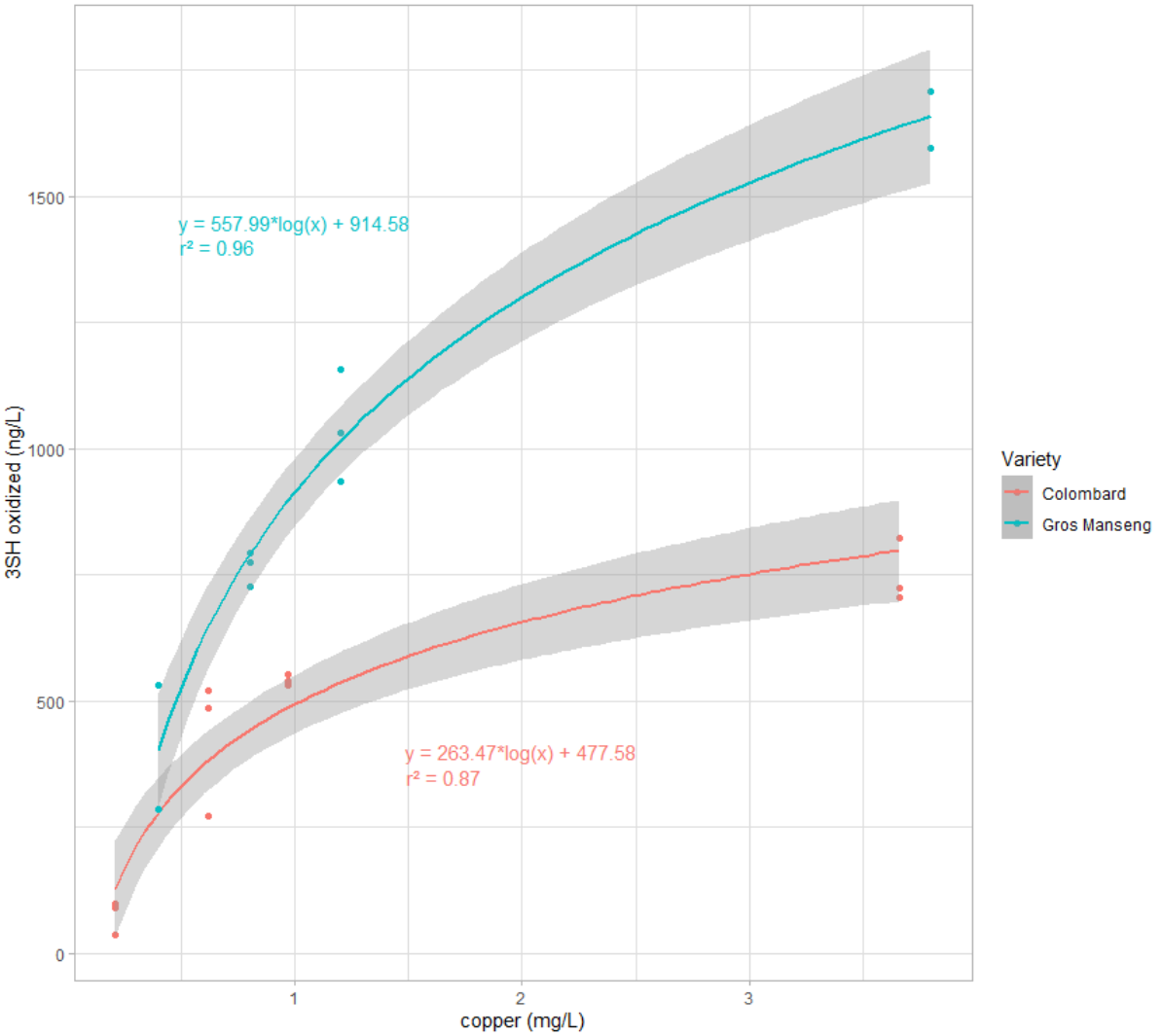


Figure 6: 3SH oxidized forms for each copper modalities in both grapes varieties (Red) Colombard, (Blue) Gros Manseng. For each variety a logarithmic fitting was performed. The grey area around each regression represents the standard error of the fitting model.

A copper oxidizing effect on varietal thiols was previously clearly observed during wine ageing with more than 90 % of 3SH being oxidized after the addition of 10 mg/L of copper (Roland et al., 2016). The two different logarithmic regression models applied for each varieties (Fig6) revealed high correlation coefficients of 0.87 and 0.96 for Colombard and Gros Manseng respectively. This last variety seems more susceptible to oxidation as demonstrated by the

higher oxidized 3SH content than Colombard juices at the same copper condition. This could be explained by a higher concentration of hydroxycinnamic acid (HA) and a higher ratio between HA and glutathione (Cheynier et al., 1990).

As to Colombard, the ratios between the 3SH oxidized fraction and 3SH total production are 10 ± 4 %, 54 ± 13%, 72 ± 3%, and 86 ± 5% for control, Cu1, Cu2, Cu3 modalities respectively while in Gros Manseng, the results in the same order are 39 ± 13%, 64 ± 6%, 74 ± 7 %, and 84 ± 8%. With the exception of the controls, it seems that this ratio is not dependent on the quantity of thiols but rather on the quantity of copper. Surprisingly, this ratio does not seem to be correlated with the grape variety.

Thus, as the production of thiols increases with must copper content, at least for Gros Manseng, it would seem that it is possible to compensate for the presence of copper in the environment and to obtain aromatically powerful wines (thiol-wise) by producing more thiols through the management of yeast strain and fermentation parameters.

4. Conclusion

In this work, we have evidenced the multiple effects of copper on varietal thiol aromas during wine fermentation. For the first time, copper was shown to have an important oxidation effect on varietal thiols during fermentation, which had previously been observed in wine ageing. Furthermore, new insights on precursors consumption by yeast during fermentation bring into light a biological effect of copper in cells by increasing precursors uptake. Moreover, in Gros Manseng wines, the analysis of total 3SH revealed a completely unsuspected increase in 3SH production by yeast under high copper concentration, strongly suggesting the presence of control pathways or even the existence of still unknown precursors. The absence of such effect in Colombard wines implies a variety-dependent copper effect that has never been shown before. In terms of methodology, this work revealed the importance of jointly analyzing reduced and total 3SH to better understand studied parameters as well as to avoid any premature conclusion.

Overall, we have shown both a chemical and a biological effect of copper on thiols precursors consumption and interconversion as well as on varietal thiol production and RSH/RSSR' ratio during alcoholic fermentation.

5. Acknowledgements

The authors thank Frédéric Lopez for his participation in the harvest and the realization of fermentations. We also thank Anne Kabakian for her technical assistance in the analysis of nitrogen and copper as well as Faiza Macna for the analysis of sugars and fermentative metabolites.

6. References

Avery, S. V., Howlett, N. G. & Radice, S. (1996). Copper toxicity towards Saccharomyces cerevisiae: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Appl Environ Microbiol,* 62**,** 3960-3966.

Bencomo-Rodriguez, J. J. J., Gambetta, J., Rigou, P., Canelo, N., Roland, A., Salmon, J.-M. & Bouvier, N. Quantitative determination of varietal disulfides in wine and their behavior during alcoholic fermentation. 9e Symposium international d'œnologie de Bordeaux-Oeno 2011, 2012 2012 Bordeaux, France. Dunod.

Blanchard, L., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (2004). Reactivity of 3-Mercaptohexanol in Red Wine: Impact of Oxygen, Phenolic Fractions, and Sulfur Dioxide. 55**,** 115.

Bonnaffoux, H., Delpech, S., Remond, E., Schneider, R., Roland, A. & Cavelier, F. (2018). Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. 268**,** 126-133.

Bonnaffoux, H., Roland, A., Remond, E., Delpech, S., Schneider, R. & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)-gamma-glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. 237**,** 877-886.

Butt, T. R., Sternberg, E. J., Gorman, J. A., Clark, P., Hamer, D., Rosenberg, M. & Crooke, S. T. (1984). Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. 81**,** 3332-3336.

Capece, A., Granchi, L., Guerrini, S., Mangani, S., Romaniello, R., Vincenzini, M. & Romano, P. (2016). Diversity of Saccharomyces cerevisiae Strains Isolated from Two Italian Wine-Producing Regions. 7**,** 1018.

Capece, A., Romaniello, R., Scrano, L., Siesto, G. & Romano, P. (2017). Yeast Starter as a Biotechnological Tool for Reducing Copper Content in Wine. 8**,** 2632.

Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G. & Jeffery, D. W. (2011). Identification and quantitation of 3-S-cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. 59**,** 11204-10.

Chen, L., Capone, D. L. & Jeffery, D. W. (2018). Identification and Quantitative Analysis of 2-Methyl-4-propyl-1,3-oxathiane in Wine. 66**,** 10808-10815.

Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J.-M., Duprat, F. & Moutounet, M. (1990). Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. 41**,** 346.

Concejero, B., Hernandez-Orte, P., Astrain, J., Lacau, B., Baron, C. & Ferreira, V. (2016). Evolution of polyfunctional mercaptans and their precursors during Merlot alcoholic fermentation. 65**,** 770-776.

Cordente, A. G., Capone, D. L. & Curtin, C. D. (2015). Unravelling glutathione conjugate catabolism in Saccharomyces cerevisiae: the role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. 99**,** 9709-9722.

Cordente, A. G., Curtin, C. D., Solomon, M., Kulcsar, A. C., Watson, F., Pisaniello, L., Schmidt, S. A. & Espinase Nandorfy, D. (2022). Modulation of Volatile Thiol Release during Fermentation of Red Musts by Wine Yeast. 10**,** 502.

Darriet, P., Bouchilloux, P., Poupot, C., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Sauris, P., Medina, B. & Dubourdieu, D. (2001). Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *Vitis,* 40**,** 93-99.

Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N. & Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of Vitis vinifera L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. 10**,** 385-392.

Dekker, S., Nardin, T., Mattana, M., Fochi, I. & Larcher, R. (2020). Identification and characterisation of thiolated polysulfides in must and wine using online SPE UHPLC-HRMS. 412**,** 5229-5245.

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

Dufourcq, T., Alain, D., Serrano, E., Lallemand, J. & Roussel, S. Understanding the leverage of the Colombard wine aromatic quality produced in Gascony by modeling climatic, agronomical, enological and analytical data. 2010.

Fedrizzi, B., Guella, G., Perenzoni, D., Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U. & Mattivi, F. (2012). Identification of intermediates involved in the biosynthetic pathway of 3-mercaptohexan-1-ol conjugates in yellow passion fruit (Passiflora edulis f. flavicarpa). 77**,** 287-93.

Ferreira, J., Toit, M. D. & Toit, W. J. D. (2006). The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. 12**,** 50-56.

Franco-Luesma, E. & Ferreira, V. (2014). Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compouds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. 1359**,** 8-15.

García-Esparza, M. A., Capri, E., Pirzadeh, P. & Trevisan, M. (2006). Copper content of grape and wine from Italian farms. 23**,** 274-280.

Gava, A., Ficagna, E., Rossato, S. B., Cisilotto, B., Miotto, S. P. & Gabbi, H. T. Change in kinetic parameters of commercial yeast in the presence of copper fungicides. BIO Web of Conferences, 2016. EDP Sciences, 02029.

Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O. & Winge, D. R. (2000). Identification of the copper regulon in Saccharomyces cerevisiae by DNA microarrays. 275**,** 32310-6.

Holt, S., Cordente, A. G., Williams, S. J., Capone, D. L., Jitjaroen, W., Menz, I. R., Curtin, C. & Anderson, P. A. (2011). Engineering Saccharomyces cerevisiae to release 3-Mercaptohexan-1-ol during

fermentation through overexpression of an S. cerevisiae Gene, STR3, for improvement of wine aroma. *Applied and environmental microbiology,* 77**,** 3626-32.

Jungmann, J., Reins, H. A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D. & Jentsch, S. (1993). MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. 12**,** 5051-5056.

Keller, G., Bird, A. & Winge, D. R. (2005). Independent metalloregulation of Ace1 and Mac1 in Saccharomyces cerevisiae. 4**,** 1863-71.

Kotseridis, Y., Ray, J. L., Augier, C. & Baumes, R. (2000). Quantitative determination of sulfur containing wine odorants at sub-ppb levels. 1. Synthesis of the deuterated analogues. 48**,** 5819-23.

Lopes, P., Silva, M. A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., Darriet, P., Teissedre, P.-L. & Dubourdieu, D. (2009). Impact of Oxygen Dissolved at Bottling and Transmitted through Closures on the Composition and Sensory Properties of a Sauvignon Blanc Wine during Bottle Storage. 57**,** 10261-10270.

Muhl, J. R., Pilkington, L. I., Fedrizzi, B. & Deed, R. C. (2022). Unraveling the Mystery of 3-Sulfanylhexan-1-ol: The Evolution of Methodology for the Analysis of Precursors to 3-Sulfanylhexan-1-ol in Wine. 11**,** 2050.

Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre, P.-L. & Darriet, P. (2010). Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. 660**,** 102-109.

Nikolantonaki, M., Jourdes, M., Shinoda, K., Teissedre, P.-L., Quideau, S. & Darriet, P. (2012). Identification of Adducts between an Odoriferous Volatile Thiol and Oxidized Grape Phenolic Compounds: Kinetic Study of Adduct Formation under Chemical and Enzymatic Oxidation Conditions. 60**,** 2647-2656.

Peyrot Des Gachons, C., Tominaga, T. & 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. 50**,** 4076-9.

Premakumar, R., Winge, D. R., Wiley, R. D. & Rajagopalan, K. V. (1975). Copper-chelatin: Isolation from various eucaryotic sources. 170**,** 278-288.

Prillieux, E. (1887). Les Maladies De La Vigne En 1887. 34**,** VII-XVIII.

Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Ducasse, M. A., Cavelier, F. & Schneider, R. (2016). Innovative analysis of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexylacetate and their corresponding disulfides in wine by stable isotope dilution assay and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry. 1468**,** 154-163.

Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M. & Razungles, A. (2011a). Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chem,* 125**,** 139-144.

Roland, A., Schneider, R., Le Guernevé, C., Razungles, A. & Cavelier, F. (2010a). Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: elements for understanding the 3MH production in wine. 121**,** 847-855.

Roland, A., Schneider, R., Razungles, A. & Cavelier, F. (2011b). Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. 111**,** 7355-76.

Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guerneve, C. & Cavelier, F. (2010b). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. 58**,** 10684-9.

Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P. & Schneider, R. (2010c). Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. 58**,** 4406-13.

Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S. & Mouret, J.-R. (2015). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation. 99**,** 2291-2304.

Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D. O., Moroney, S., Harsch, M. J., Lee, S. A., Richards, K. D., Nicolau, L. & Gardner, R. C. (2011). The yeast IRC7 gene encodes a beta-lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. 28**,** 926-35.

Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J. M. & Degryse, E. (2008). Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon Blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Research,* 8**,** 771-80.

Swiegers, J. H., Willmott, R., Hill-Ling, A., Capone, D. L., Pardon, K. H., Elsey, G. M., Howell, K. S., de Barros Lopes, M. A., Sefton, M. A., Lilly, M. & Pretorius, I. S. 2006. Modulation of volatile thiol and ester aromas by modified wine yeast. *In:* BREDIE, W. L. P. & PETERSEN, M. A. (eds.) *Flavour science - recent advances and trends.* Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Thibon, C., Bocker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (2016). Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. 199**,** 711-9.

Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D. & Tominaga, T. (2008). Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation. 8**,** 1076-86.

Thiele, D. J. (1988). ACE1 regulates expression of the Saccharomyces cerevisiae metallothionein gene. 8**,** 2745-52.

Tominaga, T., Darriet, P. & Dubordieu, D. (1996). Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. 35**,** 207-210.

Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R. & Dubourdieu, D. (1998a). Identification of new volatile thiols in the aroma of Vitis vinifera L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Frag J,* 13**,** 159-162.

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. 46**,** 5215-5219.

Wang, X., Chen, L., Capone, D. L., Roland, A. & Jeffery, D. W. (2020). Evolution and Correlation of cis-2-Methyl-4-propyl-1,3-oxathiane, Varietal Thiols, and Acetaldehyde during Fermentation of Sauvignon blanc Juice. 68**,** 8676-8687.

Yasokawa, D., Murata, S., Kitagawa, E., Iwahashi, Y., Nakagawa, R., Hashido, T. & Iwahashi, H. (2008). Mechanisms of copper toxicity in Saccharomyces cerevisiae determined by microarray analysis. 23**,** 599-606.

Zimdars, S., Schrage, L., Sommer, S., Schieber, A. & Weber, F. (2019). Influence of Glutathione on Yeast Fermentation Efficiency under Copper Stress. 67**,** 10913-10920.

Dans ce chapitre, une extraction incomplète des précurseurs de thiols lors des étapes pré-fermentaires a été mis en évidence pour les deux cépages étudiés. Malgré la mise en place de pratiques – macération pelliculaire et pressurage important – visant à améliorer au mieux l'extraction des précurseurs de thiols dans les moûts, les rendements d'extraction restent inférieurs à ceux obtenus avec le Sauvignon blanc. Cette faible extraction souligne le besoin de continuer à questionner ces pratiques et à les améliorer pour le Colombard et le Gros Manseng. Lors de ces mêmes étapes, nous avons également montré un important transfert du cuivre jusqu'à la fermentation. Ce constat nous a orienté sur la question de l'impact du cuivre en fermentation et notamment de son effet vis-à-vis de la levure. Lors de cette étape, de multiples effets biologiques et chimiques du cuivre ont été observés.

Tout d'abord, la consommation des précurseurs de thiol augmente de 10% lorsque le cuivre est présent dans le milieu en forte concentration (3,6 mg/L). Ce phénomène place l'assimilation des précurseurs de thiol par la levure au cours de la fermentation sous l'influence de mécanismes de résistance au cuivre. Il s'agit très probablement d'une conséquence de l'augmentation de l'assimilation de composés soufrés (Yasokawa *et al.*, 2008) pour la production de métallothionéines nécessaires à la résistance au cuivre.

L'utilisation de deux matrices nous a permis d'observer un schéma unique d'interconversion des précurseurs pour chaque cépage au cours du procédé fermentaire. Pour le Gros Manseng, la concentration de CysGly3SH augmente tout au long de la fermentation alcoolique ; à l'inverse, ce phénomène n'est pas observé pour le Colombard où il est consommé. Dans le même temps, le GluCys3SH est produit et consommé uniquement dans le Gros Manseng, comme cela a été précédemment observé dans le Sauvignon blanc (Bonnaffoux *et al.*, 2018). Ces différents comportements semblent liés aux cépages ; ils ne peuvent pas être directement attribués au cuivre puisqu'il est présent en même quantité pour les deux matrices.

Après les précurseurs, l'intérêt s'est porté sur les thiols. Pour cela, des analyses des formes réduites et oxydées ont été réalisées afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. Deux effets majeurs du cuivre sont apparus.

Dans un premier temps, l'effet oxydant du cuivre a été mis en évidence. Cet effet est majeur. En effet, à la fin de la fermentation, jusqu'à 85% des thiols produits se retrouvent sous forme oxydée, quel que soit le cépage. La découverte de cet effet pendant la fermentation vient compléter de précédent travaux (Bonnaffoux *et al.*, 2018) et confirme l'existence de phénomène d'oxydation durant la fermentation. Jusqu'à présent, cet effet été considéré comme presque exclusif au vieillissement (Roland *et al.*, 2016). D'un point de vue technologique, plus la concentration en cuivre augmente, plus la quantité de thiols réduits (odorants) diminue. Plus généralement, la forme oxydée des thiols variétaux au cours de la fermentation est corrélée à la

concentration en cuivre dans le moût. Cette corrélation avec le cuivre implique également une corrélation des thiols réduits avec l'indicateur du mode de culture défini au chapitre 1.

Par rapport à la production totale, ces formes oxydées représentent une proportion étonnamment identique entre les cépages. En effet, pour la plus forte dose de cuivre (3,6 et 3,8 mg/L pour le Colombard et le Gros Manseng, respectivement), la proportion de thiols sous forme oxydée est identique et égale à 85% des thiols produits pour les deux cépages alors que les concentrations de thiols produits sont très différentes (794 ng/L pour le Colombard et 1977 ng/L pour le Gros Manseng). Ce résultat présente un intérêt technologique ; il met en évidence la possibilité de produire des thiols en forte présence de cuivre mais souligne la nécessité d'une gestion de l'oxydation dans ces conditions. Il présente également un intérêt fondamental ; cet effet oxydant semble respecter un équilibre rédox particulier qu'il serait intéressant d'approfondir.

03 Les voies d'interconversion des précurseurs de thiols dans la levure

Milieu synthétique

Le chapitre précédent a mis en évidence un double effet à la fois biologique et chimique du cuivre lors de la fermentation alcoolique du moût de raisin. Si l'effet chimique était déjà connu lors du vieillissement, sa description lors de la fermentation est "nouvelle". De plus, l'identification d'un effet biologique du cuivre sur la consommation, l'interconversion et la révélation des précurseurs de thiols apporte une nouvelle perspective à ce sujet.

La mise en évidence de cette influence du cuivre lors de la fermentation soulève plusieurs questionnements afin de mieux appréhender ce phénomène :

- Les variations de mécanismes d'interconversion sont-elles dues à des précurseurs inconnus ou seulement imputable au cuivre ?
- Existe-t-il des voies de détournement des précurseurs dans la levure ?

Pour répondre à ces questions, il est nécessaire d'utiliser un environnement contrôlé. Pour cela le passage en moût synthétique permet la création d'une matière première « sur-mesure » pour la mise en évidence de phénomènes lors de la fermentation. Dans le cas de cette étude, il est ainsi possible de mener des fermentations en absence totale de cuivre ainsi que de maitriser les précurseurs de thiols présents dans le milieu.

Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article soumis à Food Chemistry.

New light on the varietal thiols pathway during alcoholic fermentation: role of 3-S-(N-acetyl-cysteinyl)-hexan-1-ol (NAC3SH)

G. DOURNES[1], S. SACHOT[1], L. SUC[1], C. Le-GUERNEVE[1], J.-R. MOURET[1] and A. ROLAND[1]

[1]SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

Corresponding author: Dr Aurélie Roland, email aurelie.roland@supagro.fr

Abstract

For many years, knowledge on thiols precursors has been limited to *S*-conjugates of glutathione, cysteine and later on the dipeptides γ-GluCys and CysGly. In this work we took the parallel between precursors degradation and glutathione mediated detoxification pathway a step further by considering a new type of derivative, 3-*S*-(N-acetyl-cysteinyl)-hexan-1-ol (NAC3SH). We developped a specific synthesis and an analytical method in LC-MS/MS for this compound which was not detected in grapes and must. This intermediate was identified during fermentation in synthetic must in presence of copper above 1.25mg/L which demonstrate for the first time the existence of this new derivative. Its status as precursors was also studied with fermentation, in which a release of 3-sulfanylhexanol was noted. This work completed the thiol precursors degradation pathway in *Saccharomyces cerevisiae* with a new intermediate, confirming its connection with the xenobiotic detoxification pathway and giving new insights on the precursors fate.

Keywords

3-S-(N-acetyl-cysteinyl)-hexan-1-ol, Detoxification, Copper, Varietal thiol, Precursors

1. Introduction

Varietal thiols are desirable aromas found in white wines from specific varieties such as Sauvignon, Colombard, Gros Manseng and others varieties (Dournes, et al., 2022; Roland, et al., 2011). These compounds, namely 3-sulfanyl-hexan-1-ol (3SH) responsible for grapefruit and passion fruit aromas (Tominaga, Furrer, et al., 1998) and 4-methyl-4-sulfanyl-pentan-2one (4MSP) responsible for box tree and blackcurrant aromas (Darriet, et al., 1995) are released by yeast during fermentation from odorless precursors bound to either glutathione (Fedrizzi, et al., 2009; Peyrot Des Gachons, et al., 2002; Roland, Schneider, Le Guernevé, et al., 2010; Thibon, et al., 2016), dipeptides (Bonnaffoux, et al., 2017; Capone, et al., 2011) or cysteine (Tominaga, Furrer, et al., 1998). During fermentation, these precursors will undergo different interconvertion steps toward the formation of the cysteine derivative, 3-S-cysteinylhexan-1-ol (Cys3SH). This compound is then cleaved into 3SH by a beta-lyase enzyme produced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast (Tominaga, Peyrot des Gachons, et al., 1998).

Despite involving a enzymatic cleavage, this degradation pathway yields a very low quantity of 3SH considering the initial quantity of precursors. Several studies have pointed out molar conversion often under 1%, only exceptionally reaching 4% (Bonnaffoux, et al., 2018; Kobayashi, et al., 2010; Roland, Schneider, Le Guernevé, et al., 2010). From these low conversion yields arose the question of the fate of thiol precursors during alcoholic fermentation and the possible existence of unidentified precursors. One study described the interconversion mechanisms of thiol precursors during alcoholic fermentation (Bonnaffoux, et al., 2018). Indeed, G3SH could only be cleaved directly into ɣ-GluCys3SH or Cys3SH and not into CysGly3SH. However, our knowledge of this pathway is not sufficient to fully explain the free thiols concentrations in wine and understand the resulting fate of unconverted precursors.

The idea of drawing a parallel between the precursors degradation and the glutathione mediated detoxification pathway has been already mentioned in the past (Kobayashi, et al., 2011; Thibon, et al., 2011) but not fully "exploited" as this pathway does not necessarily end with the cysteine derivative. Indeed this compound can be cleaved by a β-lyase to produce the sulfanyl-adduct of xenobiotics or, in animals, it can also be *N*-acetylated to form the mercapturate derivative (*ie N*-acetyl-cysteine), which is then excreted in the urine (Hinchman,

et al., 1991). This class of molecules that would be produced in the metabolism 'after' Cys3SH, despite being closely related to the precursors structure, has to our knowledge never been considered as potential end product of the precursors.

In this work we addressed the possible existence of the N-acetyl-cysteine (NAC) derivative of 3SH termed NAC3SH and its integration in the thiols precursors degradation pathway.

2. Material & Methods

a. Colombard and Gros Manseng samples

Grape, grape must, on-going fermentation, end of fermentation and wine samples from the two grape varieties Colombard and Gros Manseng were selected from the Côtes de Gascognes region throughout the 2019, 2020, 2021 vintages. Samples were sulfited at 4.5mg/mL using sodium metabisulfite at crushing for grapes or at the time of freezing for other type of matrices and then stored at -20°C until analysis.

b. Chemicals

Water and methanol LC-MS grade (>99.9%), *N*-acetyl-cysteine (99%) were purchased from Fisher Scientific, Illkirch, France; deuterium (99.8% D), *(E)*-2-hexenal (98%), 2-hexyn-1-ol (≥97%), Boc-Cys-OH (≥98.5%), $(Boc\text{-}Cys\text{-}OH)_2$ (≥98%), ethanol-OD (≥99%), D_2O (≥99%), hydrochloric acid (37%), L-glutathione reduced (98%), Lindlar catalyst, manganese (IV) oxide (≥99%), mesityl oxide (≥90%), mesityl oxide d_{10} (>98% D), triethylamine (≥99%) from Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France; triethylsilane (≥98%) from TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium; and di-sodium hydrogen phosphate (≥99%), sodium carbonate (≥99%), sodium dihydrogen phosphate dihydrate (≥99%), trifluoroacetic acid (≥99.9%) from Carl Roth, Karlsruhe, Germany.

c. Organic synthesis

i. Synthesis of 3-S-(N-acetyl-cysteinyl)-hexan-1-ol (NAC3SH)

To a solution of *N*-acetyl-L-cysteine (91,4 mg, 0.56 mmol) in 50 % aqueous acetonitrile (10 mL), were successively added pyridine (78 µL, 1 mmol, 1.8 eq), then *(E)*-2-hexenal (65 µL, 0.56 mmol,

1.2 eq). The reaction was stirred for 48 h at room temperature under inert gas (Argon) with LC-MS/MS monitoring. After completion, the reaction was diluted with 5 mL of water and then washed twice with dichloromethane (2x3 mL). The aqueous fraction was concentrated under reduced pressure to around 4 mL. The solution was treated with $NaBH_4$ (29.5 mg, 0.78 mmol, 1.4 eq) for 2h at 0°C and monitored with LC-MS/MS and then acidified with HCl to pH 3. The reaction was then lyophilized to obtain a yellowish oily product as the chlorhydrate salt of a racemic mixture (159 mg, quantitative yield).

ii. Purification of 3-S-(N-acetyl-cysteinyl)-hexan-1-ol (NAC3SH) by preparative chromatography hyphenated with UV detector

The lyophilized product (159 mg) was resuspended in 500 µL water and purified in two batchesthrough NGC Bio-Rad semi-preparative chromatography using a Microsorb C18 column (5 µm 21.2x250 mm). UV detection was performed at 214 nm. The mobile phases were water with 0.05 % of trifluoroacetic acid (A) and 80:20 acetonitrile/water with 0.05 % of trifluoroacetic acid (B). Column conditioning started at 10 % B for 15 min, increased to 25 % over 10 min and maintained for 10 min, increased to 45% in 5 min and maintained for 10 minutes, increased to 95% in 3 min and maintained for 5 min before decreasing to 50 % B in 1 min and held for 5 minutes. The first diastereomer eluted at 31.5 min and the second one at 32.45 min. The yield after purification was equal to 8% taking into account the purity of both compounds by qNMR.

iii. NMR characterization

All the NMR spectra were recorded on an Agilent DD2 500 MHz spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), operating at 500.05 and 125.74 MHz for ^{1}H and ^{13}C nuclei respectively, using a 5 mm indirect detection probe equipped with a z gradient coil. 1D ^{1}H and ^{13}C, 2D homonuclear ^{1}H COSY, TOCSY and ROESY, and heteronuclear $^{1}H/^{13}C$ HSQC and HMBC experiments were performed using classical pulse sequences and analyzed using both VNMRJ4.2 and MestReNova 14.2.1 (Mestrelab Research, Spain) softwares. The acquisition parameters of the DgcsteSL pulse sequence were as follows: the diffusion delay time and the gradient pulse width were set at 50 ms and 2 ms, respectively, the gradient strength (g) was

incremented in 16 steps with equal g2 spacing from 0.3 to 32 $G.cm^{-1}$. All spectra were referenced to the solvent acetone-d_6 signals (^{1}H residual signal at 2.05 ppm and ^{13}C signal at 29.92 ppm).

Absolute concentration measurements were carried out by qNMR using an external calibration method (Ferreira-Lima, et al., 2016). Dimethyl sulfone (DMS) (20 mg) and gallic acid (20 mg) were accurately weighed and dissolved in a precise volume of D_2O (5 mL) and DMSO-d_6 (5 mL), respectively. After probe tuning, a single-scan 1D 1H NMR spectrum of DMS was collected using a 90 deg pulse. The surface area of the DMS signal was used for probe calibration using VNMRJ absolute intensity qNMR utility software. The probe calibration was then verified using the gallic acid sample. The calibration probe was checked on a regular basis.

iv. Other chemical syntheses of natural and deuterated thiol precursors

3-*S*-glutathionylhexan-1-ol (G3SH/G3SH d_2) (Roland, Schneider, Razungles, et al., 2010); 4-*S*-glutathionyl-4-methylpentan-2-one (G4MSP/ G4MSPd_7) (Fedrizzi, et al., 2009; Grant-Preece, et al., 2010); 3-*S*-(cysteinylglycine)-hexan-1-ol (CysGly3SH/CysGly3SH d_2) (Capone, et al., 2011); 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol (Cys3SH/Cys3SH d_2), 3-*S*-(glutamatecysteinyl)-hexan-1-ol (γ-GluCys3SH/γ-GluCys3SH d_2) and 4-*S*-cysteinyl-4-methylpentan-2-one (Cys4MSP/Cys4MSP d_6) (Bonnaffoux, et al., 2017) were synthesized according to published methods. Synthetic and natural compounds were characterized with 1D and 2D homonuclear ^{1}H and heteronuclear ^{1}H /^{13}C NMR spectroscopy and their signal assignments were in total accordance with the literature. Absolute quantification was done by 1D 1H NMR (qNMR) for each compound to precisely define their purity (Ferreira-Lima, et al., 2016).

d. Chemical analyses

i. Thiol precursors analysis by stable isotope dilution assay (SIDA) and UPLC-MS/MS

Thiol precursors of 3SH (glutathionylated – G3SH, dipeptidic – CysGly3SH and γ-GluCys3SH, cysteinylated – Cys3SH, *N*-acetylated-cysteine – NAC3SH) were analyzed by SIDA-UPLC-MS/MS through direct injection of Colombard and Gros Manseng grape must or synthetic sample as previously reported (Bonnaffoux et al. 2017) and modified as follows: the analytical system consisted of an Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) hyphenated with an ion

trap mass spectrometer (Bruker, Amazon). Analytes were separated on a Hypersil gold column (1.9 µm, 100 mm x 2.1 mm) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Separation was done with a 38°C oven temperature and total run lasted 21 min. Mobile phases were composed of (A) water with 0.05% TFA and (B) acetonitrile / water (80/20) with 0.05% TFA. The gradient started at 2% of B for 5 min, increased to 6.9% over 7 min, to 25% in 3 min, to 98% in 2 min maintained for 2 min before returning to initial conditions for 2 min. Source parameters were as follows: desolvatation temperature: 200°C, nebulizer pressure: 3.03 bars, dry gas: 12.0 L/min and capillary voltage: 4.5 kV under the positive mode. Ionization was carried out using positive electrospray (ESI+) and detection was made under MS/MS mode with argon as gas collision with a mass range equal to m/z 90-500. Quantification was performed on the MS2 profile for each analyte (Table S1). Samples above the calibration range were diluted to theappropriate level and analysed again.

ii. Analytical validation

The method was validated using several parameters : linearity, accuracy, repeatability, limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ). We used an equimolar mix of both diastereomers as the analytical method used did not allow individual quantification.

Linearity was calculated with a lack-of-fit model on 11 spiked model matrices (must and wine) with both NAC3SH diastereomers including their internal standard at a constant concentration.

Accuracy expressed as the recovery percentage of each diastereomer was measured on all matrices (must and wine, naturel and synthetic) spiked at two different levels (low, medium) for both diastereomers (n =5). Repetability was assesed as the RSD (%) on the same samples.

LOD and LOQ were calculated with a signal-to-noise ratio of 3 and 10 respectively (n=5, for each matrix).

iii. Varietal thiol analysis by SIDA-LC-MS/MS

3SH and 3SHA analyses were performed by LC-MS/MS and stable isotope dilution assay (SIDA) approach as reported in literature (Roland, et al., 2016).

e. Fermentation experiments

Fermentations were conducted in a synthetic must whose composition was as follows: 180 g/L of sugars (50:50 glucose/fructose), 250 mg/L of assimilable nitrogen (mixture of 30% ammonium and 70% amino acids) and 5 mg/L of β-Sitosterol (70% in 50/50 Tween80/ethanol) (Mouret, et al., 2014). They were carried out in triplicate at 18°C in 300 mL glass fermentors filled with 250 mL of the aforementioned synthetic must and inoculated at 20 g/hL with X5 yeast strain (Laffort ®, Bordeaux, France), covered by a glass airlock system filled with water in order to maintain anaerobiosis.

Set 1.

The must was spiked with the synthetic G3SH precursor at 1 mg/L before being divided into six different batches. Each batch was in turn also spiked with copper sulfate at one of the following levels : 0, 0.125, 0.25, 0.625, 1.25, 2.5 mg/L.

Set 2.

The must was split in three fractions of which twowere spiked separately with synthetic NAC3SH at 1 and 1.2 mg/L for the (R,S) and (R,R) forms respectively. The third one was used as control with no added precursor

Fermentors were weighed every day throughout the fermentation process to monitor CO_2 losses. Fermentations were considered complete when the sugar content was below 2 g/L. Sampling was done at the end of fermentation in a 50 mL Falcon tube, centrifuged at 4500 g for 10 minutes, from which the supernatant was then recovered and frozen at -20°C until analysis.

f. 2D-3D Chemical drawing and modelling

Chemical drawing was made with ChemDraw Professional 19.1 (PerkinElmer, Waltham, MA, United States). Spatial modelling was done on the same software with MM2 calculation.

g. Statistical analysis

Means, SD values and one-way ANOVA followed by Fisher's multiple comparisons ($\alpha = 0.05$) were determined with EXCEL 2016 (Microsoft, Richmond, WA, USA).

3. Results and discussion

a. Chemical synthesis of N-Acetyl-Cysteine-3SH

In order to study the putative role of NAC3SH as thiol precursor under enological conditions, was designed a chemical strategy to obtain this compound both as i) a pure analytical standard to develop a targeted analytical method and ii) a tracer to be spiked into synthetic must to follow its degradation. To reach both objectives, it was necessary to produce a sufficient quantity of this compound using simple and efficient synthesis.

i. Synthesis and isolation of each diastereomer of NAC3SH

Was proposed a two-step synthesis (Figure 1) using commercial (L)-N-acetyl-cysteine and *(E)*-2-hexenal as starting material to yield the corresponding aldehyde conjugate through a Michael addition. Using a 50/50 water/acetonitrile mixture allowed the complete dissolution of both reagents in the same solution. This chemical strategy was inspired from published syntheses of others precursors (Fedrizzi, et al., 2012) and one synthesis of this adduct (Wakabayashi, et al., 2004). The second step consisted in the aldehyde reduction of the hexenal moiety into an alcohol using $NaBH_4$, yielding, NAC3SH as its chlorhydrate salt after neutralization with HCl. This chemical synthesis was quick and efficient enough to produce a sufficient quantity of raw NAC3SH as a mixture of 2 diastereomers.

To resolve each compound, we developed a specific gradient of water and acetonitrile acidified with TFA on a C18 prepacked column. The two compounds were successfully separated to afford 5 and 6 mg of product respectively.

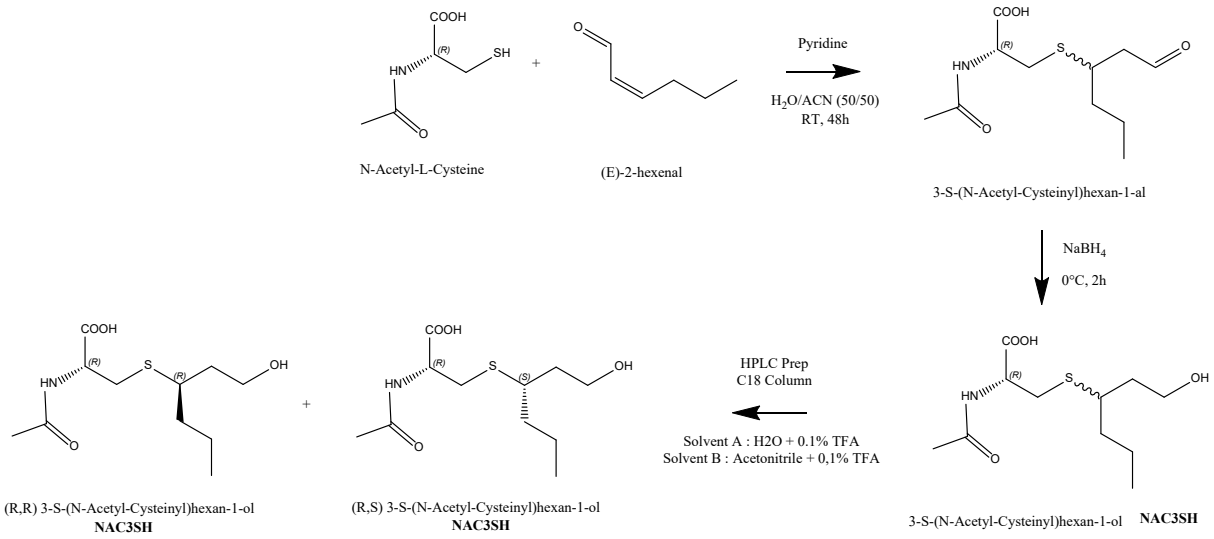


Figure 1: Synthesis and purification step for NAC3SH

ii. NMR characterization and diastereomer assignation

The structure determination of both compounds was performed from 2D $^{1}H/^{13}C$ HSQC and HMBC correlation spectra (Figure S1 to S4) and all protons and carbons were attributed (Figure 2a, 2b). These two compounds were found to have the same expected structure, making them isomers. Significant differences in some chemical shifts were observed in particular NH proton was 0.16 ppm higher for compound 2 compared to compared 1. Were also observed significant shift for the β, 1, 3 and 7 carbons with 0.58, 0.33, -0.3, -0.34 ppm respectively for compound 2 compared to compound 1.

A combination of ROESY spectra analysis and molecular modelling was used to attempt to assign *(R,S)* and *(R,R)* conformations to the two compounds. Analysis of the ROESY spectra revealed significant differences between the two compounds in the correlations involving the NH proton (Figure 2c):

- A ROE correlation was observed between the NH of compound (1) and the protons of methyl 6, it was not the case of compound (2).
- Inversely, the ROESY spectrum of compound (2) showed a correlation between NH and one proton of the methylene 1 which was not present in the spectrum of compound (1).

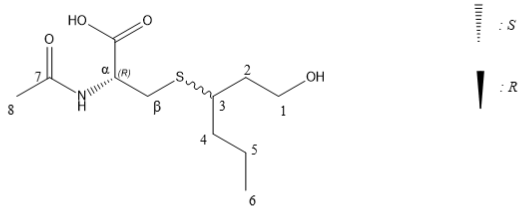
The distances between the NH and methylene 1 protons of the latter correlation were measured for both modelled diastereomers (Figure 2d). It was found that the *(R,S)* conformation exhibited only one of the two distances between these protons consistent with a ROESY correlation (~4.8Å and 5.2Å) whereas the (*R,R*) conformation exhibited none (~7.5Å and 7.8Å). It can therefore be assumed that compounds (1) and (2) are the *(R,S)* and *(R,R)* diastereomers respectively.

In addition, it has been shown in previous work that the *(R,S)* diastereomers of thiol precursors elute before the *(R,R)* ones (Capone, et al., 2011; Capone, et al., 2010). From these results it can be assumed that compound (1) eluted first is *(R,S)* and compound 2 is *(R,R)*.

All together, NMR/modelling and elution order supports the hypothesis of the attribution of compound 1 to the *(R,S)* form and compound 2 to *(R,R)* one. Although only circular dichroism would validate this hypothesis.

Additionally, qNMR was used to determine both the quantity of products and their purity. It was found that the purity for both compounds was about 99% and an overall synthesis yield for the sum of the two diastereomers of 7.6%.

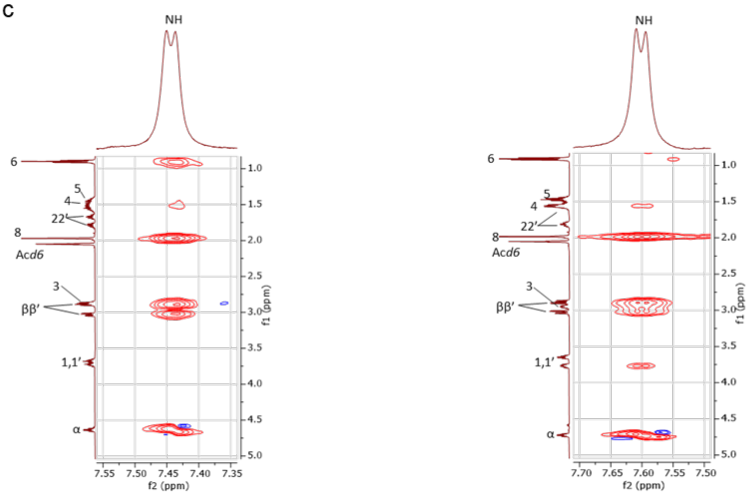
a



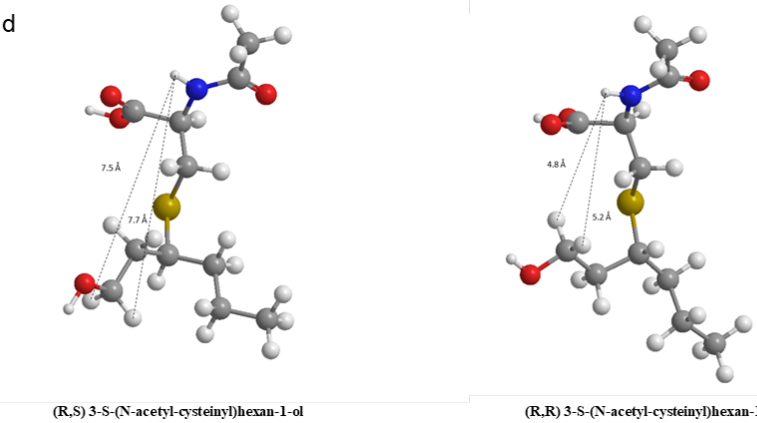
b

position	Compound 1		Compound 2	
	δ ^{1}H (ppm), m, J_{HH} (Hz), integration	*δ ^{13}C*	*δ ^{1}H (ppm), m, J_{HH} (Hz), integration*	*δ ^{13}C*
Cysteine				
α	4.64 , td, J = 7.4, 5.4, 1H	53.31	4.72 , td, J = 7.5, 4.6 , 1H	53.09
ββ'	3.03 , dd, J = 13.5, 5.2 , 1H; 2.88 , dd, J = 13.5, 7.0 , 1H	32.63	3.02 , dd, J = 13.8, 4.6 , 1H; 2.89 , dd, J = 13.8, 7.3 , 1H	33.21
COOH		172.34		172.20
NH	7.44 , d, J = 6.9 , 1H		7.60 , d, J = 7.5 , 1H	
Hexanol				
11'	3.76 – 3.64 , m, 2H	59.85	3.77 , m, 1H; 3.65 ,m, 1H	59.55
22'	1.78 , m, 1H; 1.67 ,m, 1H	38.85	1.81 , m, 1H; 1.56 ,m, 1H	39.03
3	2.89 , m, 1H	43.58	2.95 , dq, J = 11.3, 6.3 , 1H	43.24
4	1.57 , m, 2H	38.34	1.56 , m, 2H	38.55
5	1.48 , m, 2H	20.56	1.47 , m, 2H	20.43
6	0.90 , t, J = 7.2 , 3H	14.21	0.91 , t, J = 7.3 , 3H	14.26
Acetic				
7		170.42		170.75
8	1.97 , s, 3H	22.61	1.98 , s, 3H	22.64

c



d



(R,S) 3-S-(N-acetyl-cysteinyl)hexan-1-ol (R,R) 3-S-(N-acetyl-cysteinyl)hexan-1-ol

Figure 2: NMR characterization of the two compounds (a) annotated chemical structure (b) 1H and 13C NMR chemical shifts. (c) Region of the ROESY spectra showing the correlations involving NH proton (d) 3D modeling of both diastereomers reported distance between NH and 1,1' protons

b. Development of analytical methods to quantify NAC3SH in grapes, musts and wine by SIDA-UPLC-MS/MS

i. Optimization of detection parameters by tandem mass-spectrometry

Although many methods have been reported in literature that deal with thiols precursors in enological matrices (Peña-Gallego, et al., 2012), to our knowledge, there is no data about analytical methods dealing with NAC3SH in grapes/juices or wines. Consequently, we decided to implement the previously established precursors analysis method based upon SIDA-UPLC-MS/MS (Dournes, et al., 2022). For that purpose, detection parameters were first optimized considering that the mass spectrometer was an ion trap. In practice, we infused a pure solution of each NAC3SH diastereomer to obtain the corresponding MS/MS spectra under CID (Collision Induced Dissociation) mode. Both compounds have similar MS/MS spectra (data not shown) and we tentatively tried to assign the fragmentation pattern to probable structures (Figure 3).

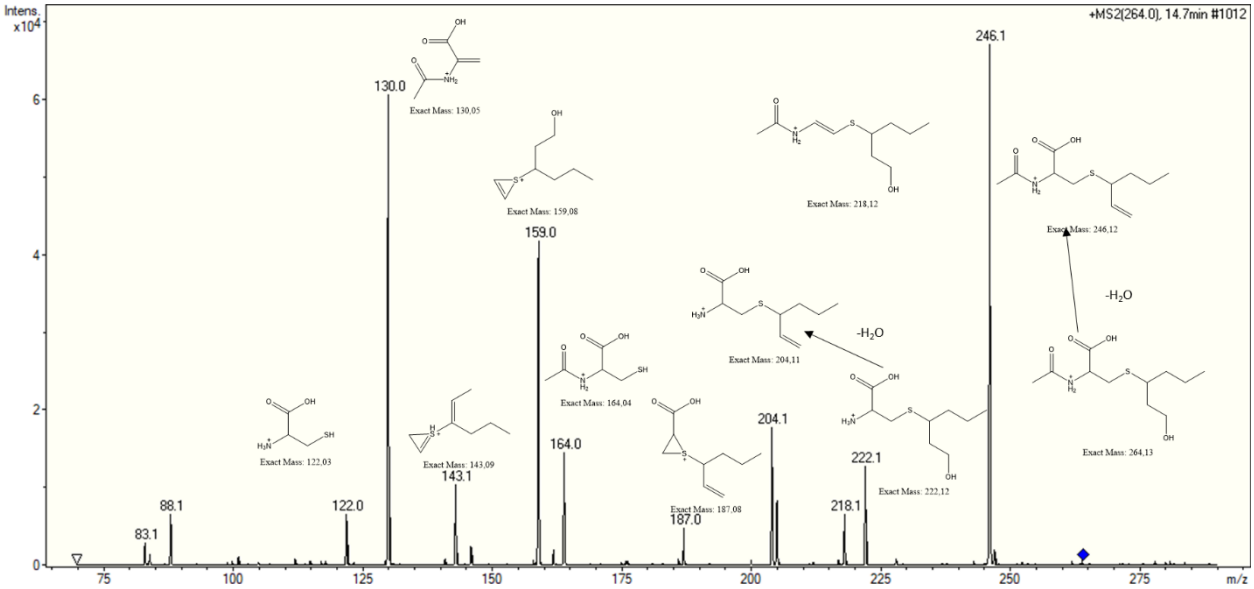


Figure 3: Hypothetical fragmentation pattern of NAC3SH in MS/MS (Ion Trap)

The most intense fragment (m/z = 246 Da) was consistent with a water loss from the $[M+H]^+$ parent ion (m/z = 264 Da). Compared to other precursors such as CysGly3SH, the neutral loss of NH_3 (Capone, et al., 2011) is impossible in this compound as it is N-substituted by an acetyl group. The loss of the acetyl moiety (m/z = -42 Da) generated the m/z = 222 Da ion that is the equivalent to the protonated Cys3SH precursor. This ion also underwent water loss to generate the m/z = 204 Da fragment. Cyclic fragments structures assignations correspond to tentative attributions.

Following this MS/MS spectra, we considered the m/z = 264 as $[M+H]^+$ parent ion and the m/z = 246 as the quantifier ion for NAC3SH for the rest of the experiment.

ii. Tentative chromatographic separation of NAC3SH diastereomer

Both isomers were analyzed individually to try to separate and quantify them even if their retention times were similar in the original chromatographic method: 14.60 min for *(R,S)*-NAC3SH and 14.64 min for *(R,R)*-NAC3SH. Optimization of the mobile phases, flow rate and gradient on the Hypersyl Gold column did not allow a satisfactory isomer separation while keeping a convenient runtime and resolution of others analytes (data not shown). As the complete separation of isomers was not possible without using another analytical column, the calibration (Figure 4b) was made with an equimolar mix with a retention time of 14.62 min for NAC3SH. In accordance with the literature on *S*-adducts from mercapturate pathway in human plasma (Fu et al. 2019), NAC3SH eluted after G3SH using a reverse C18 analytical column. For calibration, the linear model was adequate up to 1000 $\mu g.L^{-1}$ (Figure 4c) and that allowed the covering of a large range of concentrations.

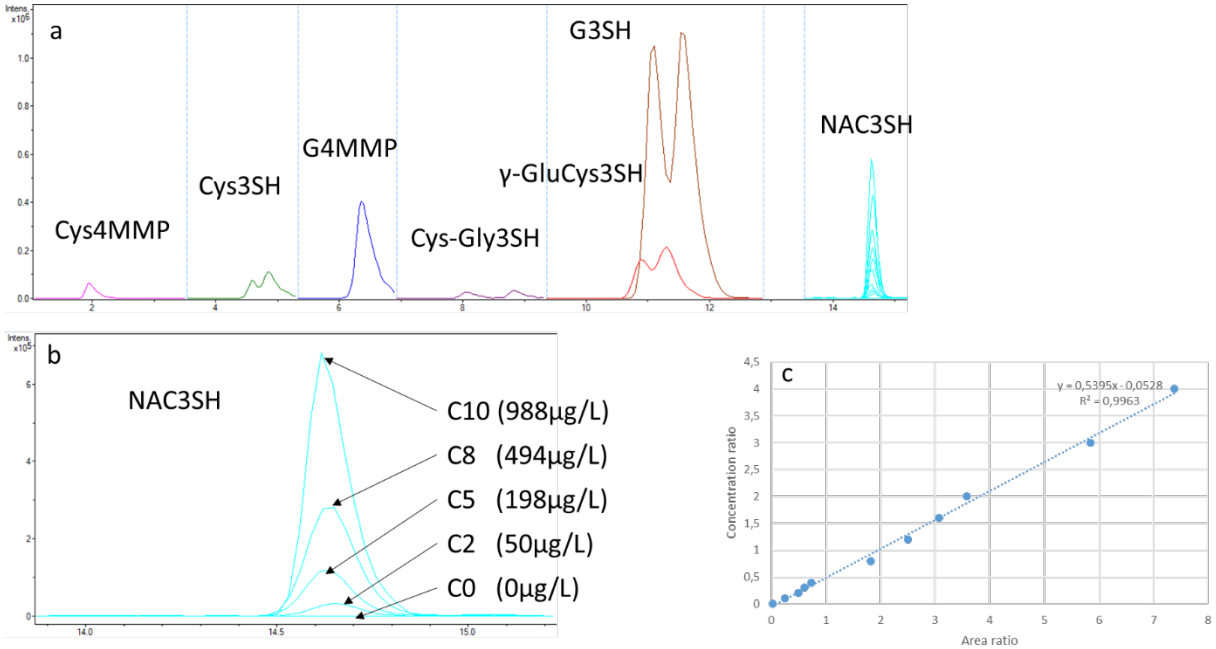


Figure 4: Analysis of thiol precursors by UPLC-MSMS and focus on the NAC3SH; (a) complete chromatogram of the method including NAC3SH; (b) chromatograms extract of the NAC3SH annotated with their concentration levels; (c) linear regression for the NAC3SH calibration including the equation and r^2

iii. Method validation

To have reliable results, we decided to validate the analytical method according to OIV recommendations in different matrices: synthetic must and wine, grapes/juices and wines of Colombard and Gros Manseng. Analytical performances in terms of linearity, accuracy (recovery), repeatability and limits of detection and quantification (LOD/ LOQ) are reported in Table 1. Recovery after addition of 99 µg/L or 198 µg/L NAC3SH reached 100 % in average for both natural and synthetic matrices. Repeatability expressed as Residual Standard Deviation (RSD %) ranged from 5.5 to 16 % in both synthetic and natural musts and from 17 to 22 % in synthetic wines. In terms of sensitivity, LOD ranged from 4 to 16 µg/L in all studied matrices and were higher than those reported in literature using a triple quadrupole as mass spectrometer (Bonnaffoux, et al., 2017; Capone, et al., 2011).

Table 1: Method validation results

Matrix	Linearity		Accuracy		Repetability		LOD	LOQ
	range µg/L	R^2	99 µg/L	198 µg/L	99 µg/L	198 µg/L	(µg/L)	(µg/L)
				Grape				
Model must	0-1000	0,992	95%	102%	16%	7%	5	15
Colombard grape	/	/	100%	/	3%		7	25
GM grape	/	/	99%	/	8%		9	30
				Wine				
Model wine	0-1000	0,982	105%	104%	22%	17%	4	14
Wine	/	/	97%	/		/	16	53

c. Screening of NAC3SH in grapes and musts samples

3-sulfanyl-hexan-1-ol is found in grapes under different precursors forms such as G3SH (aldehyde version also), Cys3SH, γ-GluCys3SH or CysGly3SH; the concentration of these thiol precursors varies during grape ripening (Cerreti, et al., 2015), the most abundant being glutathione derivatives (alcohol and aldehyde) (Peña-Gallego, et al., 2012). All of these precursors are closely related structurally as, for the most part, they originate from the degradation of G3SH itself. A similar pathway termed glutathione-mediated detoxification has been reported for others compounds that can be generalized as GS-X. This pathway allows any kind of xenobiotic to be metabolized into less toxic intermediates, such as the sulfanyl (i.e. thiol) adduct, that can be generalized as X-SH, or into the corresponding mercapturate (i.e. N-acetyl-Cysteine adduct) (Hanna, et al., 2019). The latter is commonly found in animal urine after exposition to xenobiotics and is therefore used as a biomarker. Following this metabolic route, we tried to identify NAC3SH in enological matrices as a possible endpoint of the precursor pathway by analogy with the glutathione-mediated detoxification pathway that shares important similitudes (Habig, et al., 1974). Using the method described above, we analyzed grapes at different ripening stages and grape musts (n=110) from Colombard and Gros Manseng from the Côtes de Gascogne region in France. In these samples, no NAC3SH was

detected (LOD = 7µg/L) (data not shown). As aforementioned, NAC3SH is commonly found in animal metabolism but has rarely been identified in plant metabolism, which is consistent with our results (Onisko, et al., 1994; Uhlig, et al., 2016). This underlines the fact that NAC3SH should not be considered as a new precursor from grapes but as a possible endpoint of precursors in yeast metabolism during vinification.

We completed our screening by the analysis of samples of on-going fermentations, end of fermentations and wines (n=100) from Colombard and Gros Manseng from the same region. As in unfermented samples, no NAC3SH was detected. The degradation of thiol precursors being intracellular and even, intravacuolar (Cordente, et al., 2015), it is not surprising not to detect the compound in the extracellular medium.

Considering these observations, was decided to further scrutinize the role of NAC3SH by exploring the potential production of NAC3SH through the glutathione-mediated detoxification pathway under copper stress during alcoholic fermentation while studying the potential role of NAC3SH as a 3SH precursor under synthetic conditions.

d. Identification of NAC3SH as a new 3SH derivative during alcoholic fermentation

During fermentation, a poor correlation between precursors consumption by yeast and produced varietal thiols was reported (Pinu, et al., 2012). This observation can be interpreted as the fact that precursors consumption can take place through several pathways and is not only oriented towards the production of thiols. A question that can be asked is what happens to the thiol precursors absorbed by yeast but not cleaved into thiols and usual co-products?

Indeed, NAC3SH can be seen as a good candidate in the fate of absorbed precursors as yeast can be considered as a unicellular animal. Therefore, we could hypothesize that thiol precursors could enter the detoxification pathway in yeast metabolism, leading to the formation of *N*-acetyl-cysteine conjugates, and that under different conditions, these conjugates could play a role as 3SH precursors. The following paragraphs will try to bring new elements in this direction.

i. Copper stress during alcoholic fermentation and NAC3SH production

To investigate the potential production of NAC3SH *via* precursors degradation, a matrix simplifying chemical analyses and still mimicking natural conditions was needed. To that effect, a synthetic grape must supplemented with copper was chosen as described in Set 1 Mat&Met. Copper can induce at high concentration an abiotic stress and alter yeast metabolism (Yasokawa, et al., 2008), which can shed light on underlying mechanisms. In addition, copper has an oenological interest as the development of organic viticulture will lead to an increase in its concentration in both grapes and wines (Darriet, et al., 2001; Dournes, et al., 2022).

In terms of results, fermentation kinetics impairment was observed under copper stress starting at 0.625 to 2.5 mg/L (Figure S5). Observing an impact of copper on fermentation at these low concentrations appears surprising, compared to previously published data where fermentation impairment was only visible at 9.6 mg/L (Sun, et al., 2016). Nevertheless, these experiments were performed with an important gap between control (0 mg/L of copper) and the first copper concentration (9.6 mg/L) and for a different yeast strain, which could explain such differences with our results.

As to thiol precursors, no precursor was detected in control experiments whatever the level of copper, eliminating any potential *in vivo* production by yeast or involvement of the C6 pathway (Harsch, et al., 2013; Schneider, et al., 2006). For trials supplemented with G3SH, residual G3SH was detected for all copper conditions, meaning that G3SH was not completely consumed by yeast as already mentioned (Concejero, et al., 2016). Residual G3SH was significantly lower for conditions inferior or equal to 0.625 mg/L copper compared to fermentations with the two highest concentrations, highlighting an impairment of yeast during the fermentation for the consumption of thiol precursors.

No Cys3SH was detected at the end of fermentation, which is consistent with a previous work where this precursor was produced from G3SH during fermentation but completely metabolized by the end of an alcoholic fermentation (AF) using VIN13 and Esperide yeast strains (Bonnaffoux, et al., 2018).

For high levels of copper (1.25 and 2.5 mg/L), significant productions of both γ-GluCys3SH (respectively close to 21 and 29 µg/L) and NAC3SH (close to 123 and 130 µg/L) were measured. The presence of NAC3SH in such fermentations points to the ability of yeast to produce this compound from the sole degradation of G3SH, placing this new derivative well in the precursors catabolism pathway.

The detection method used to quantify 3SH derivatives is based on extracellular medium analysis. Because there was no particular cell lysis during sample preparation, it can be considered that either NAC3SH was actively excreted from the cell at high copper concentration or that this copper concentration increased cell lysis at the end of fermentation. Indeed, copper is an interesting trace element as its homeostasis is important for proper cell function. Exposure to high copper concentrations generates a stress response in cells and, to an extent, some membrane permeation that can lead to cell death (Avery, et al., 1996). This also points out an interesting questioning: although NAC3SH was not detected during fermentation under low copper conditions, it does not necessarily mean that this compound was not produced in the cells. Based on its structure and analogy with the mercapturate pathway, this compound could probably originate from Cys3SH or CysGly3SH acetylation followed by enzymatic cleavage of the glycine residue (Lamoureux, et al., 1975). Consequently, NAC3SH could be located at the end of the precursor catabolism and as possible end-product for precursors during fermentation under abiotic stress.

ii. NAC3SH and 3SH production during alcoholic fermentation

Even if the NAC3SH derivative was not identified in grape or natural must, its role as possible thiol precursor needed to be elucidated to fully understand its position in the precursors pathway and its potential involvement in 3SH release. To that effect, fermentations following the conditions described in Set 2 Mat & Met were carried out without copper to avoid any negative interaction with the formed thiols. Both NAC3SH diastereomer, i.e. *(R,S)* and *(R,R)*, were added separately to a triplicate fermentation at 1156 and 1323 µg/L respectively. A third modality with no NAC3SH precursor was conducted as control experiment to evaluate a possible yeast production of either NAC3Sh or 3SH from synthetic grape juice. At the end of

fermentation, there was no trace of NAC3SH or 3SH in the control experiment, ruling out *in vivo* production by yeast. In spiked fermenters, no other precursor than residual NAC3SH was observed at the end of AF and there was no isomeric interconversion for each compound. In terms of 3SH concentrations, *(R,S)*-NAC3SH lead to the production of 468 ng/L of 3SH (n=3) while the *(R,R)*-NAC3SH permitted the production of 777 ng/L 3SH (n=3) corresponding to conversion yields of 0.6 and 0.5% respectively. This is higher than previously reported conversion yields in synthetic media for G3SH (0.085%) (Bonnaffoux, et al., 2018) or Cys3SH (0.29-0.41%), lower than for G3SH in natural medium (4.5%) and perfectly in the range for Cys3SH in natural conditions (0.48-0.81%) (Roland, et al., 2011). Nevertheless, it is important to keep in mind that different yeast strains have been studied in these different works, which could considerably modulate conversion yields. The release of thiols during alcoholic fermentation and the absence of detection of any other precursors suggest a direct conversion of NAC3SH to 3SH. This is surprising as previous work (Wakabayashi, et al., 2004) on *in-vitro* bacterial β-lyase assay showed that NAC3SH was not degradable by the enzymes until the addition of a deacetylase to produce Cys3SH *in-situ*. As in this work the degradation was done by a complete organism it cannot be excluded that in yeast a deacetylation step occurred to produce Cys3SH that would not have been detectable at the end of the fermentation as previously shown (Bonnaffoux, et al., 2018).

NAC3SH quantification at the end of the fermentation evidenced a consumption of 148 µg/L and 286 µg/L for *(R,S)* and the *(R,R)*-NAC3SH respectively. This difference in precursor consumption points towards a preferential utilization of one isomer over the other, which has previously been established in engineered yeast, especially for G3SH (Grant-Preece, et al., 2010). The preferred consumption of *(R,R)*-NAC3SH is surprising considering the literature had pointed out that the *(R,S)*-diastereomer is more abundant in grape and must (Capone, et al., 2011; Capone, et al., 2010).

Considering the very low precursors consumption, two hypotheses can be formulated: first of all, it cannot be excluded that the detected free 3SH results from chemical degradation

of the compounds during the process as no chemical stability study were conducted on this molecule.

Secondly, NAC3SH seems to potentially be produced only under abiotic stresses (copper for instance) as an alternative end point of the precursors degradation pathway. Its subsequent degradation by yeast into thiol residues could be only accidental considering its similitude with Cys3SH.

Finally, the proportion of NAC3SH produced from G3SH degradation versus 3SH production from NAC3SH have to be carefully investigated to determine the actual involvement of each pathway and to understand the parameters influencing them.

All these elements permitted the construction of a completed scheme for the precursors degradation pathway in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation (Figure 5).

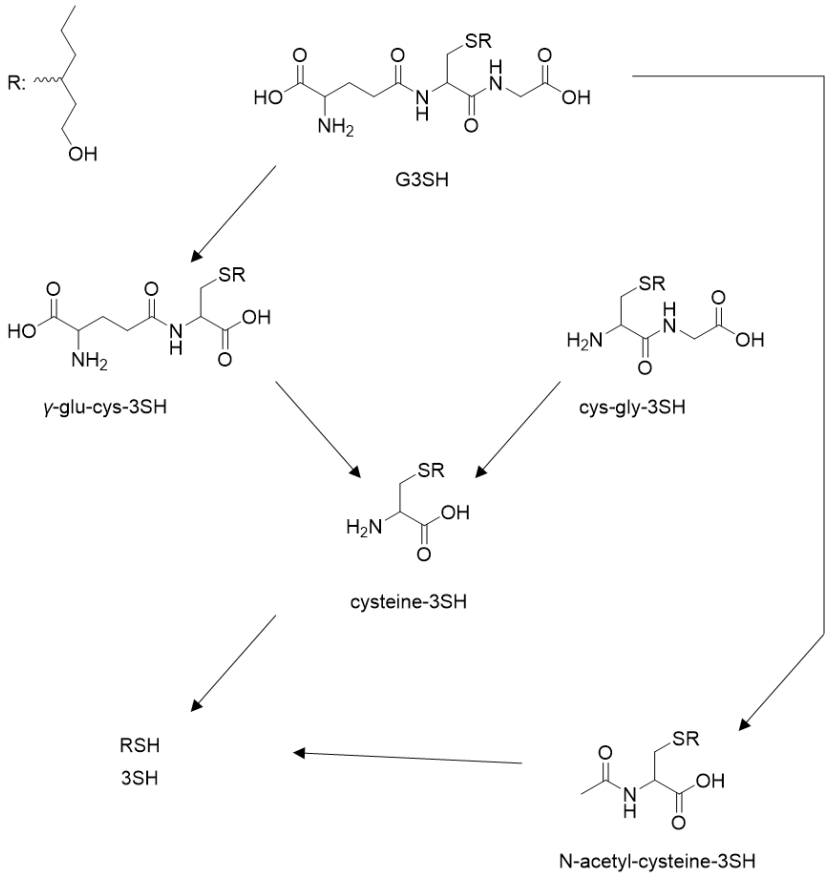


Figure 5: Precursors degradation pathway in Saccharomyces cerevisiae including NAC3SH production and degradation.

Conclusion

A new 3SH derivative has been identified that complements our knowledge of the thiol precursor degradation pathway. NAC3SH, structurally identical to a mercapturate derivative, draws the precursor pathway a little closer to the xenobiotic detoxification pathway with which it shares many similarities in terms of metabolic intermediates. NAC3SH is little consumed by yeast and releases 3SH during fermentation. Its identification during fermentation in the presence of high concentrations of copper is of great importance for viticulture, which is now in transition towards organic culture that will increase the copper content of must before fermentation.

Acknowledgements

We acknowledge both the Occitanie Region and Syndicat des Côtes de Gascogne for funding this project. Winemakers from Côtes de Gascogne are also thanked for allowing their vine plots to be sampled.

Table S1: MS/MS conditions for the detection of thiol precursors

Acronyms	Internal standard	Elution time window (min)	Parent ion for CID (m/z)	Scan range (m/z)	Daughter ion for quantification (m/z)
Cys4MSP	Cys4MSP-d_6	1-3.3 min	220	90-240	122 (-hexanol)
Cys4MSP-d_6		1-3.3 min	226	90-240	122 (-hexanol)
Cys3SH	Cys3SH-d_2	3.5 – 5.3 min	222	70-240	205 (-NH_3)
Cys3SH-d_2		3.5 – 5.3 min	224	70-240	207 (NH_3)
G4MSP	G4MSP-d_7	5.3 – 6.9 min	406	90-450	259 (-Glu-H_2O)
G4MSP-d_7		5.3 – 6.9 min	413	90-450	266 (-Glu-H_2O)
CysGly3SH	CysGly3SH-d2	6.9 – 9.3 min	279	90-300	262 (NH3)
CysGly3SH-d2		6.9 – 9.3 min	280	90-300	264 (NH3)
G3SH	G3SH-d_2	9.3-13 min	408	90-430	262 (-Glu, Z_2 ion)
G3SH-d_2		9.3-13 min	410	90-430	264 (-Glu, Z_2 ion)
γ-GluCys3SH	γ-GluCys3SH-d_2	9.3-13 min	351	70-290	205 (-Glu- NH_3)
γ-GluCys3SH-d_2		9.3-13 min	353	70-290	207 (-Glu- NH_3)
NAC3SH	Cys3SH-d_2	14.3-15 min	264	70-290	246 (-H_2O)

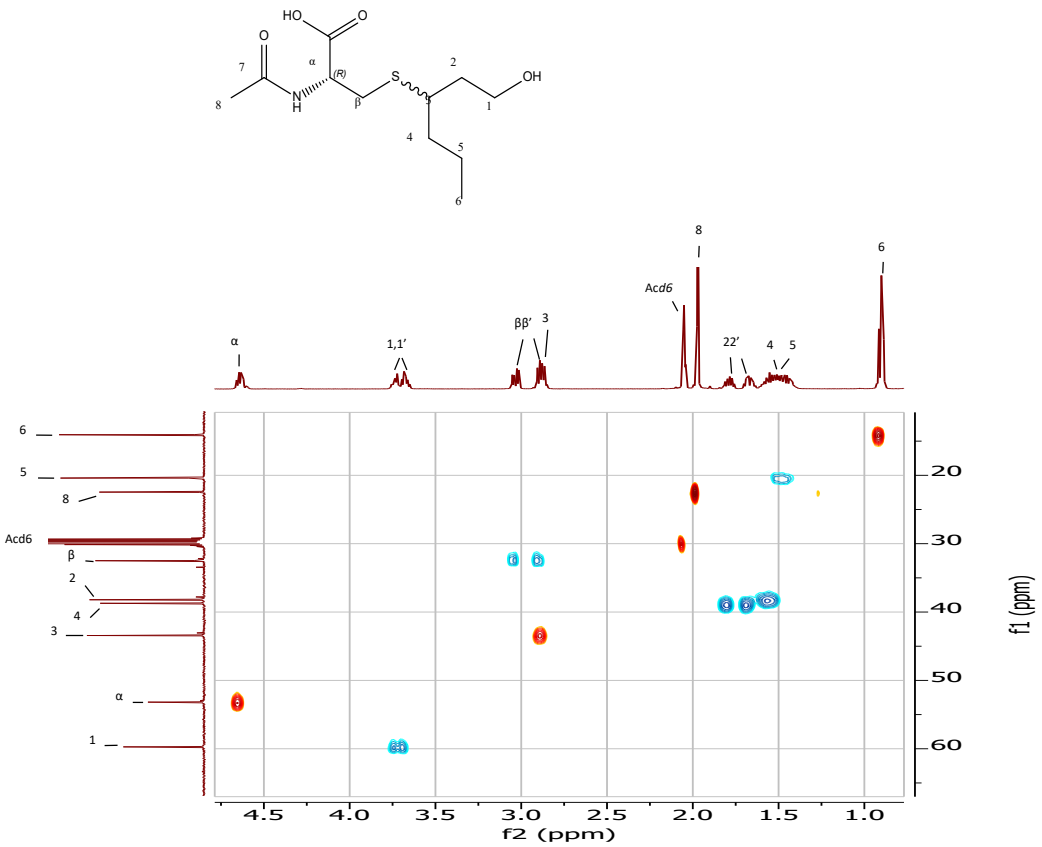


Figure S1: HSQC spectra of compound 1

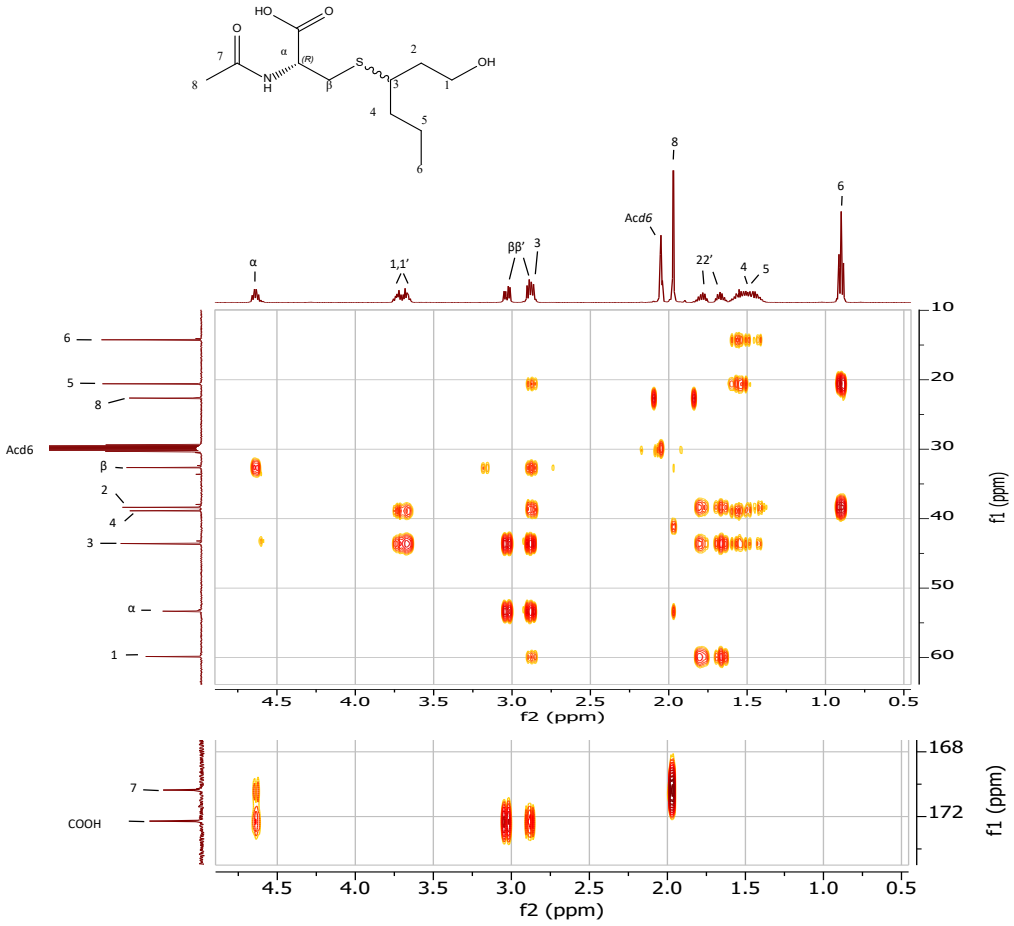


Figure S2: HMBC of compound 1

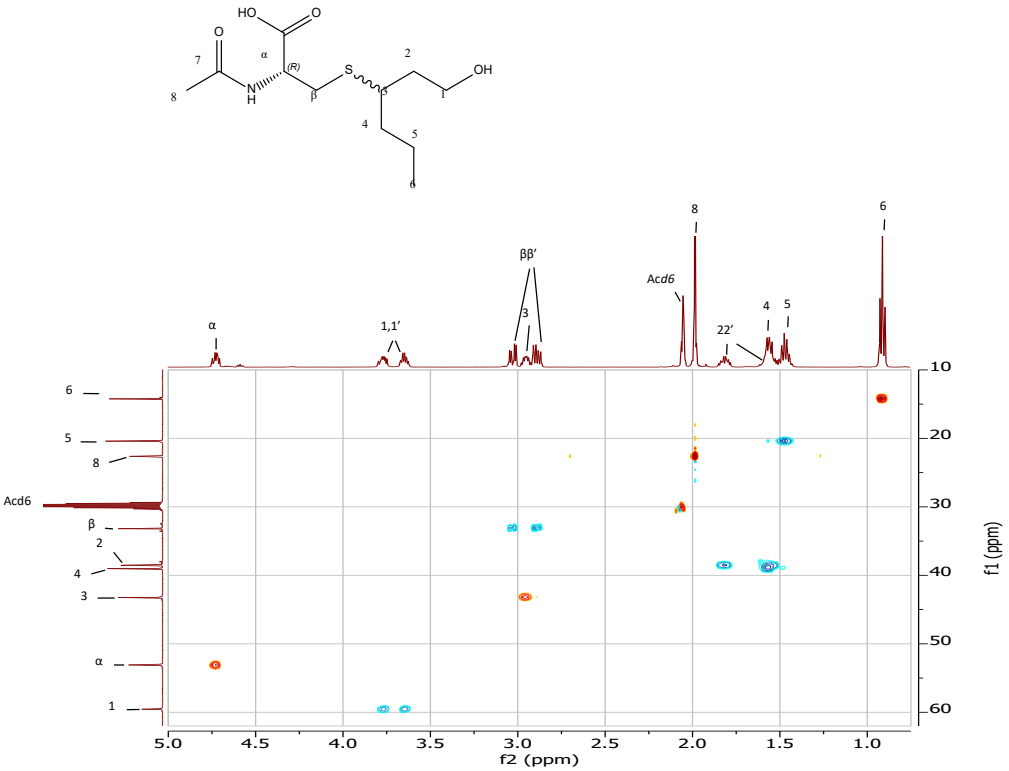


Figure S3: HSQC spectra of compound 2

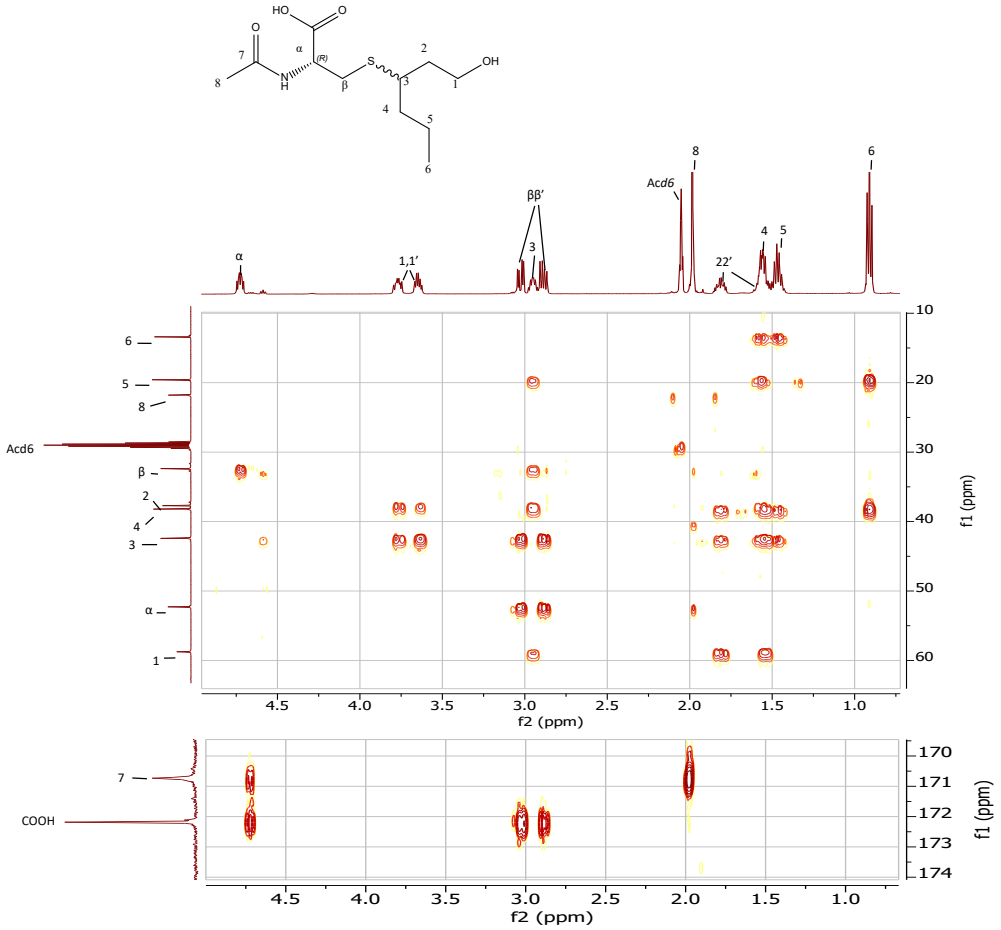


Figure S2: HMBC spectra of compound 2

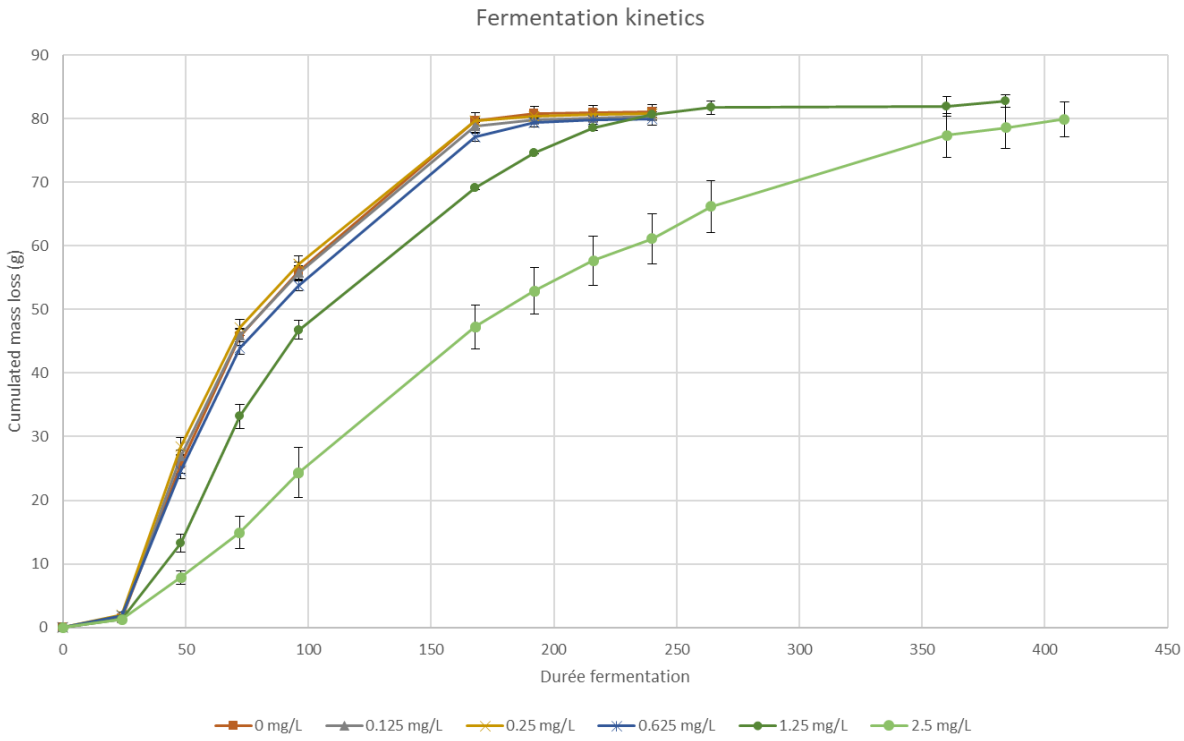


Figure S5: Fermentation kinetics with different copper levels. Plots are mean values of fermentation in triplicate, errors bars are standard error.

4. References

Avery, S. V., Howlett, N. G., & Radice, S. (1996). Copper toxicity towards Saccharomyces cerevisiae: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology, 62*(11), 3960-3966.

Bonnaffoux, H., Delpech, S., Remond, E., Schneider, R., Roland, A., & Cavelier, F. (2018). Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chemistry, 268*, 126-133.

Bonnaffoux, H., Roland, A., Remond, E., Delpech, S., Schneider, R., & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)-gamma-glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. *Food Chemistry, 237*, 877-886.

Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011). Identification and quantitation of 3-S-cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(20), 11204-11210.

Capone, D. L., Sefton, M. A., Hayasaka, Y., & Jeffery, D. W. (2010). Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS: resolution and quantitation of diastereomers of 3-S-cysteinylhexan-1-ol and 3-S-glutathionylhexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(3), 1390-1395.

Cerreti, M., Esti, M., Benucci, I., Liburdi, K., de Simone, C., & Ferranti, P. (2015). Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during grape ripening of Vitis vinifera L. cvs Grechetto, Malvasia del Lazio and Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research, 21*(3), 411-416.

Concejero, B., Hernandez-Orte, P., Astrain, J., Lacau, B., Baron, C., & Ferreira, V. (2016). Evolution of polyfunctional mercaptans and their precursors during Merlot alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology, 65*, 770-776.

Cordente, A. G., Capone, D. L., & Curtin, C. D. (2015). Unravelling glutathione conjugate catabolism in Saccharomyces cerevisiae: the role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*(22), 9709-9722.

Darriet, P., Bouchilloux, P., Poupot, C., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Sauris, P., Medina, B., & Dubourdieu, D. (2001). Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *Vitis: Journal of Grapevine Research, 40*(2), 93-99.

Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N., & Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of Vitis vinifera L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal, 10*(6), 385-392.

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

Fedrizzi, B., Guella, G., Perenzoni, D., Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2012). Identification of intermediates involved in the biosynthetic pathway of 3-mercaptohexan-1-ol conjugates in yellow passion fruit (Passiflora edulis f. flavicarpa). *Phytochemistry, 77*, 287-293.

Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(3), 991-995.

Ferreira-Lima, N., Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Mazauric, J.-P., Sommerer, N., Bordignon-Luiz, M. T., Cheynier, V., & Le Guernevé, C. (2016). Synthesis, Identification, and Structure Elucidation of Adducts Formed by Reactions of Hydroxycinnamic Acids with Glutathione or Cysteinylglycine. *Journal of Natural Products, 79*(9), 2211-2222.

Grant-Preece, P. A., Pardon, K. H., Capone, D. L., Cordente, A. G., Sefton, M. A., Jeffery, D. W., & Elsey, G. M. (2010). Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(3), 1383-1389.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry, 249*(22), 7130-7139.

Hanna, P. E., & Anders, M. W. (2019). The mercapturic acid pathway. *Critical Reviews in Toxicology, 49*(10), 819-929.

Harsch, M. J., Benkwitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R. C., & Salmon, J. M. (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*(15), 3703-3713.

Hinchman, C. A., Matsumoto, H., Simmons, T. W., & Ballatori, N. (1991). Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J Biol Chem, 266*(33), 22179-22185.

Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S., & Konno, T. (2010). Analysis of S-3-(Hexan-1-ol)-Glutathione and S-3-(Hexan-1-ol)-L-Cysteine in Vitis vinifera L. cv. Koshu for Aromatic Wines. *American Journal of Enology and Viticulture, 61*(2), 176-185.

Kobayashi, H., Takase, H., Suzuki, Y., Tanzawa, F., Takata, R., Fujita, K., Kohno, M., Mochizuki, M., Suzuki, S., & Konno, T. (2011). Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *Journal of Experimental Botany, 62*(3), 1325-1336.

Lamoureux, G. L., & Davison, K. L. (1975). Mercapturic acid formation in the metabolism of propachlor, CDAA, and fluorodifen in the rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 5*(6), 497-506.

Mouret, J. R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., & Sablayrolles, J. M. (2014). Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Research International, 62*, 1-10.

Onisko, B. C., Barnes, J. P., Staub, R. E., Walker, F. H., & Kerlinger, N. (1994). Metabolism of cycloate in radish leaf: Metabolite identification by packed capillary flow fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry, 23*(10), 626-636.

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

Peyrot Des Gachons, C., Tominaga, T., & 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.

Pinu, F. R., Jouanneau, S., Nicolau, L., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2012). Concentrations of the Volatile Thiol 3-Mercaptohexanol in Sauvignon blanc Wines: No Correlation with Juice Precursors. *American Journal of Enology and Viticulture, 63*(3), 407-412.

Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Ducasse, M. A., Cavelier, F., & Schneider, R. (2016). Innovative analysis of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexylacetate and their corresponding disulfides in wine by stable isotope dilution assay and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1468*, 154-163.

Roland, A., Schneider, R., Le Guernevé, C., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010). Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry, 121*(3), 847-855.

Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., & Cavelier, F. (2011). Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. *Chemical Reviews, 111*(11), 7355-7376.

Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guerneve, C., & Cavelier, F. (2010). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(19), 10684-10689.

Schneider, R., Charrier, F., 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), 58-64.

Sun, X. Y., Liu, L., Zhao, Y., Ma, T., Zhao, F., Huang, W., & Zhan, J. (2016). Effect of copper stress on growth characteristics and fermentation properties of Saccharomyces cerevisiae and the pathway of copper adsorption during wine fermentation. *Food Chemistry, 192*, 43-52.

Thibon, C., Bocker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2016). Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chemistry, 199*, 711-719.

Thibon, C., Cluzet, S., Merillon, J. M., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2011). 3-Sulfanylhexanol precursor biogenesis in grapevine cells: the stimulating effect of Botrytis cinerea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(4), 1344-1351.

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., Peyrot des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (1998). A new type of flavor precursors in Vitis vinifera L. cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*(12), 5215-5219.

Uhlig, S., Stanic, A., Hofgaard, I. S., Kluger, B., Schuhmacher, R., & Miles, C. O. (2016). Glutathione-Conjugates of Deoxynivalenol in Naturally Contaminated Grain Are Primarily Linked via the Epoxide Group. *Toxins, 8*(11), 329.

Wakabayashi, H., Wakabayashi, M., Eisenreich, W., & Engel, K.-H. (2004). Stereochemical Course of the Generation of 3-Mercaptohexanal and 3-Mercaptohexanol by β-Lyase-Catalyzed Cleavage of Cysteine Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(1), 110-116.

Yasokawa, D., Murata, S., Kitagawa, E., Iwahashi, Y., Nakagawa, R., Hashido, T., & Iwahashi, H. (2008). Mechanisms of copper toxicity in Saccharomyces cerevisiae determined by microarray analysis. *Environmental Toxicology, 23*(5), 599-606.

Discussion générale & conclusion

La première partie de notre travail s'est concentrée sur le possible effet viticole du cuivre. Étant peu étudiés, le Colombard et le Gros Manseng ont tout d'abord nécessité une description précise de leur composition en précurseurs de thiols. La définition du potentiel thiol de ces deux cépages nous a permis de mieux appréhender l'effet du cuivre sur ce dernier lors de la maturation mais aussi à la vendange. Ces résultats ont été présentés sous la forme d'un article pour les données des vendanges 2019. Dans la seconde partie du chapitre 1, ces données ont été complétées avec des données des millésimes 2020 et 2021.

Globalement, ces deux cépages présentent des concentrations élevées en précurseurs avec une moyenne en G3SH de 363 µg/L pour le Colombard et de 425 µg/L pour le Gros Manseng. Ce potentiel thiol est équivalent à celui rencontré dans le Sauvignon blanc. En revanche, alors que le Sauvignon blanc présente un ratio de précurseurs (G3SH/Cys3SH) de 75/25, le Colombard et le Gros Manseng se démarquent par un profil atypique de 97/3. Les cinétiques d'accumulation des précurseurs pour ces deux cépages semblent être relativement précoces, notamment pour le Colombard qui ne présente plus d'accumulation de précurseurs deux semaines avant la vendange. Si l'on considère la concentration massique des précurseurs (µg de G3SH/kg de vendange), les deux variétés sont strictement équivalentes (250 µg/kg de moyenne) ce qui est cohérent avec leur utilisation comme source de thiols lors de la vinification.

Nous avons montré par la suite que cette similitude entre les deux cépages à la parcelle l'est également dans leur comportement vis-à-vis du cuivre. Ainsi sur les trois millésimes, nous avons montré que ces variétés présentent un niveau de précurseurs globalement plus faible (25 %) en culture biologique qu'en culture conventionnelle, à l'exception de l'année 2020 pour les deux variétés où l'effet du mode de culture semble être inexistant. Cette absence d'effet intervient sur un millésime qui pourtant a vu les doses de cuivre résiduelles sur la vendange augmenter pour le Colombard et un niveau constant pour le Gros Manseng. Enfin il a été possible de définir des parcelles au comportement intermédiaire, entre la culture biologique et conventionnelle, issues de l'utilisation de cuivre dans un contexte de culture conventionnelle. Plusieurs informations clés peuvent être tirées de ce constat :

- L'effet négatif de la culture biologique semble être réversible avec un retour au niveau conventionnel pour les parcelles biologiques en 2020, que ce soit pour le Colombard ou pour le Gros Manseng.
- L'effet de la culture biologique sur le niveau de précurseurs n'est donc pas seulement un effet de quantité de cuivre mais bien d'interaction entre l'utilisation de ce métal et le millésime.

- Cet effet millésime souligne parfaitement la nécessité de conduire des essais sur plusieurs années afin de s'affranchir le plus possible de la variabilité météorologique. Dans notre cas, l'année 2019 aurait conclu quant à un effet cépage sur le Gros Manseng uniquement. A l'inverse, pour les millésimes 2020 et 2021, cet effet cépage est absent.

Pour finir, l'important réseau de parcelles et la répétition sur trois années de vendanges nous a donné la possibilité d'identifier un indicateur du mode de culture, défini ci-dessous.

$$Indicateur\ du\ mode\ de\ culture = \frac{Azote}{Sucre * Cuivre}$$

Cet indicateur basé sur la concentration en azote assimilable, sucre et cuivre (données facilement accessible pour les viticulteurs) permet d'identifier avec une bonne fiabilité le mode de culture (biologique et conventionnel) des parcelles de cette étude quel que soit le cépage et le millésime. Il s'agit d'un premier élément vers la création d'indicateurs technologiques d'aide à la décision permettant un meilleur pilotage de la révélation aromatique de ces cépages.

Une fois ce travail terminé sur l'aspect viticole, nous nous sommes intéressés à la suite des étapes de vinifications, correspondant aux étapes préfermentaires réalisées au chai et dans un second temps, à la fermentation alcoolique en elle-même. Pour cela, la vinification complète de 12 parcelles de 2019 correspondant aux deux cépages ainsi qu'aux deux modes de culture de notre étude a été réalisée, soit 3 parcelles pour chaque modalité. Nous avons suivi l'évolution des précurseurs de thiols au cours des différentes étapes pré-fermentaires et du cuivre tout au long de la vinification.

Nous avons ainsi montré qu'il n'y a aucune différence de comportement entre des raisins biologiques et conventionnels lors de ces étapes pré-fermentaires et ce quel que soit le cépage. L'absence de différence de comportement lors de ces étapes n'est possible que si le mode de culture n'a pas affecté la morphologie de la baie de raisin.

L'extraction des précurseurs entre le raisin et la sortie pressurage est respectivement de 50-75 % et 30-40 % pour le Colombard et le Gros Manseng. En comparaison, le Sauvignon blanc atteint 100 % dans des conditions comparables (Capone & Jeffery, 2011). Cette différence entre les cépages est très surprenante et traduit des différences physiologiques importantes entre les raisins de ces trois cépages. La plus faible extraction des précurseurs à la fin du pressurage pour les deux cépages de notre étude pourrait être due à la répartition des précurseurs dans la baie. Pour le Sauvignon blanc, plus de la moitié du G3SH se trouve dans la pellicule (Roland *et al.*, 2011). Pour le Colombard et le Gros Manseng, la répartition pourrait être encore plus en faveur de la fraction pelliculaire ce qui expliquerait une extraction plus difficile. Par conséquent, les étapes préfermentaires visant à extraire les précurseurs doivent être repensées pour ces deux

cépages car elles ne sont pas suffisantes pour extraire la totalité des précurseurs contenus dans les raisins. Cela est d'autant plus nécessaire et important pour exprimer au mieux le potentiel aromatique du Gros Manseng dont seulement 41% des précurseurs sont extraits.

De plus, nous avons observé une faible évolution de la teneur en cuivre lors des étapes pré-fermentaires résultant dans un transfert quasi-total de ce métal dans le moût pour la fermentation. En revanche, lors de la fermentation alcoolique, la concentration en cuivre chute drastiquement jusqu'à être non détectable avec des méthodes d'analyse colorimétrique. Ce passage au travers des étapes pré-fermentaires et cette diminution en fermentation soulèvent deux points importants. Est-il possible de mettre en place des pratiques comme la bioprotection par des levures non-saccharomyces ou encore un collage sur moût spécifique visant à réduire la concentration de cet élément avant la fermentation ? Et quels sont les effets du cuivre sur la levure lors de la fermentation ?

Suite à ce constat, nous avons décidé de mettre en place des essais de fermentation non pas sur des matrices issues de la vigne mais « construites » au chai. Ainsi elles ont été réalisées pour chaque cépage avec une large gamme de cuivre (0,2-3,8mg/L) permise par l'utilisation d'une base de moût conventionnel.

Lors de ces fermentations, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la consommation des précurseurs de thiols par la levure. Ainsi, nous avons constaté que ces derniers étaient significativement plus consommés lors de la fermentation en présence de la plus haute concentration en cuivre. Ce phénomène présent dans les deux cépages traduit un mécanisme dépendant de la levure et non de la matrice. Cela est tout à fait surprenant car cela implique un lien entre la résistance au cuivre et la consommation des précurseurs chez la levure. On sait que la résistance de la levure passe par la production de métallothionéines comme Cup1p. Ces protéines riches en cystéine entraînent une augmentation de l'assimilation du soufre dont la totalité du flux est orientée vers la production de cet acide aminé (Yasokawa *et al.*, 2008). Dans ce contexte, cela signifierait que la consommation plus importante des précurseurs serait induite par le besoin en soufre pour la production de cystéine. Cela soulève également la question de la voie de dégradation empruntée par ces précurseurs consommés. En effet, si la production de cystéine est la finalité, ils ne peuvent pas être dégradés par une β-lyase.

L'analyse détaillée de chaque précurseur a permis de mettre en évidence un schéma d'interconversion des précurseurs spécifiques pour chaque cépage. Ainsi dans une matrice Colombard, la levure semble consommer le G3SH, le Cys3SH et le CysGly3SH jusqu'à 6 jours après le début de la fermentation. A ce point, seul le précurseur glutathionylé n'a pas été totalement consommé. Contrairement aux travaux de Bonnaffoux et al (2018), la

consommation de CysGly3SH n'a pas entrainé de production de Cys3SH. De même, le γ-GluCys3SH n'a pas été détecté tout au long de cette fermentation. Cela indique l'existence d'une autre voie de dégradation pour le G3SH pour la souche X5 dans une idée de mécanismes souche-dépendant. Il est également possible d'imaginer l'existence plus générale de cette voie dans le monde du vivant.

A l'opposé, dans la fermentation du Gros Manseng, les précurseurs ont été consommés tout au long de la fermentation. On y observe une augmentation du γ-GluCys3SH et Cys3SH concomitante avec la consommation de G3SH. Ce résultat soutient la démonstration de cette voie de dégradation dans le Sauvignon blanc (Bonnaffoux *et al.*, 2018). Etonnamment, nous avons également mesuré une production de CysGly3SH tout au long de la fermentation. La production du γ-GluCys3SH uniquement dans ce cépage et non dans le Colombard pourrait montrer que cette dégradation n'est active que lorsque celle du CysGly est saturée. Cela rapprocherait la voie d'interconversion des précurseurs avec la voie de dégradation des xénobiotiques qui utilise les deux dipeptides comme voies d'interconversion. Une deuxième hypothèse serait l'existence dans le Gros Manseng de précurseurs non-identifiés, dont l'interconversion amènerait à la production de CysGly ou à une modification des voies connues. Suite à l'identification récente du G3SHal dans le moût de raisin et de sa forte concentration (Thibon *et al.*, 2016), la première possibilité serait l'existence d'une forme aldéhydique de tous les précurseurs connus. D'autres précurseurs peuvent être envisagés en se basant sur les différents thiols de faibles poids moléculaires présents dans les plantes (Figure 37), il est possible de concevoir :

- Un précurseur basé sur l'homocystéine, un acide aminé présent dans tous les organismes vivants.
- Des précurseurs basés sur des analogues du glutathion, nommé homoglutathion (hGSH) et hydroxyméthylglutathion (hmGSH) identifiés respectivement dans l'ordre des *Fabales* (Klapheck *et al.*, 1988) et dans l'ordre des *Poaceae* (Klapheck *et al.*, 1992).
- Des précurseurs basés sur l'acide lipoïque ou les phytochelatines de par leurs nombreuses fonctions thiols.
- Suite à l'identification du dérivé NAC3SH présenté dans le Chapitre 3, il est également possible en se basant sur la voie des xénobiotiques de postuler l'existence d'un autre précurseur de thiols dérivé de la cystéine. Il s'agit du dérivé N-malonylcystéine (NMC), équivalent du N-acétylcystéine dans les plantes (Lamoureux & Rusness, 1983).

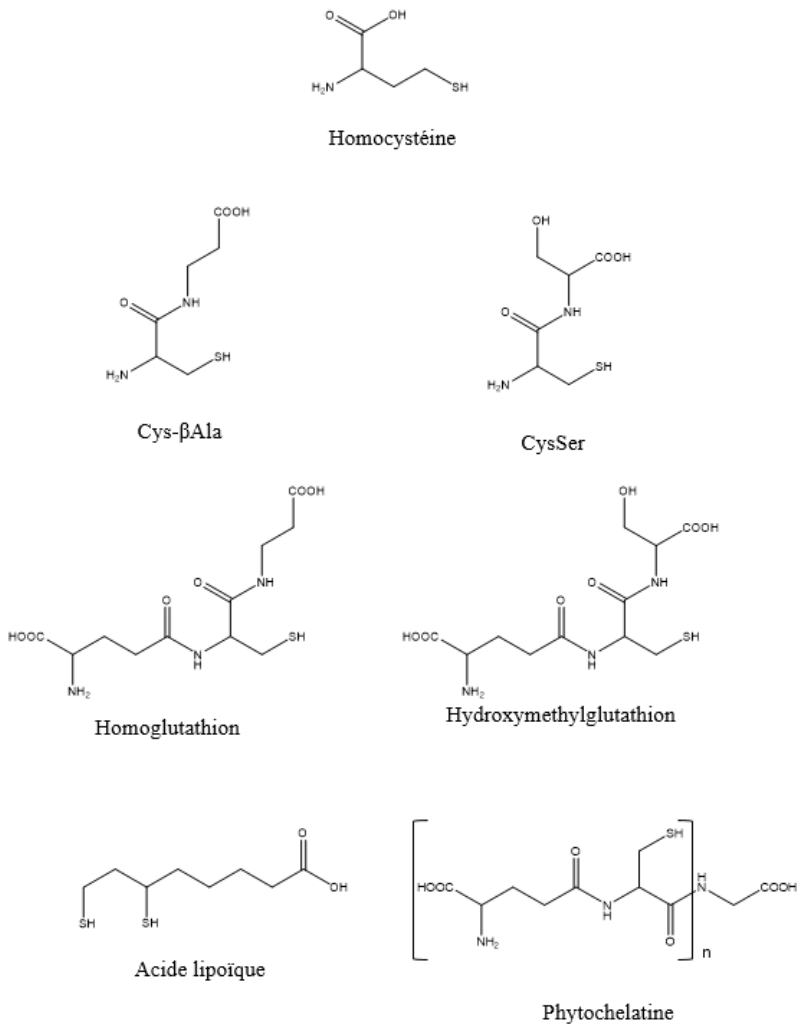


Figure 37: Thiols de faible poids moléculaire présente dans les plantes. Adapté de Pivato et al. 2014

Dans un but de caractérisation, la conversion des précurseurs en thiols a été réalisée par le dosage des formes réduites et oxydées des thiols variétaux. D'un intérêt principalement technologique, les formes réduites correspondent à la fraction odorante de la production. Les thiols totaux (formes réduites et oxydées) rendent compte de la production globale de la levure, cette information est d'intérêt mécanistique bien que toujours pertinente pour la filière.

Dans une matrice Colombard, l'augmentation du cuivre est corrélée à une diminution de la fraction réduite des thiols. Ces résultats corroborent les données établies sur la baisse des thiols variétaux (réduits) dans les vins de parcelles traitées avec du cuivre (Darriet *et al.*, 2001; Dufourcq *et al.*, 2008). Dans ce travail, cette diminution était attribuée à une interaction des thiols avec le cuivre lors de la fermentation (oxydation et formation de complexe). L'analyse des thiols totaux (réduits+oxydés) réalisés dans cette thèse a mis en évidence une production équivalente dans toutes les conditions. Ces données confirment donc le caractère oxydant du cuivre sur les thiols pendant la fermentation, longtemps considéré comme un milieu réducteur.

Dans une matrice Gros Manseng, les effets du cuivre sont multiples. De manière analogique au Colombard, il est responsable d'une diminution de la fraction réduite des thiols dans le vin fini. En revanche, il est également responsable d'une forte augmentation de la production de thiols totaux. Dans cette matrice, le cuivre a donc un effet positif avec l'augmentation de la conversion des précurseurs en thiols mais aussi négatif avec la diminution de la part réduite (odorante) des thiols. Cette hausse de production totale est intéressante car elle soulève des questionnements quant à l'origine de ces thiols. En effet, nous avons vu dans le chapitre 1 que les deux cépages présentent une concentration en précurseurs sensiblement équivalente. Cela sous-entend que ce gain de production ne peut pas venir de précurseurs conventionnels car on la retrouverait également dans le Colombard. Il est donc possible que le Gros Manseng ait des précurseurs inconnus dont la conversion serait activée par le cuivre. Une seconde possibilité serait la présence dans le moût de Gros Manseng de métabolites entraînant un comportement différent de la levure vis-à-vis du cuivre lors de la fermentation. Par exemple, une présence plus importante de polyphénols dans ce cépage que dans le Colombard a été montrée (Cheynier *et al.*, 1990). Un profil particulier en vitamines pourrait aussi expliquer ce changement de comportement de la levure (Duc *et al.*, 2020; Evers *et al.*, 2023).

Pour les deux cépages, les proportions de thiols oxydés pour chaque dose de cuivre sont équivalentes et ce malgré une production totale jusqu'à deux fois plus importantes pour le Gros Manseng que pour le Colombard. Ceci nous indique qu'il existe un équilibre entre les deux fractions des thiols et la proportion de cuivre. Technologiquement, on est donc amené à considérer plusieurs réponses quant à la présence de cuivre dans le moût.

Pour du Colombard, nous voyons que l'effet est seulement négatif avec une oxydation importante du cuivre. Il est donc nécessaire de retirer du milieu cet élément chimique au travers d'une adaptation des pratiques pré-fermentaires. Le cuivre excédentaire se trouvant essentiellement sur la pellicule, il serait possible de mettre en place un lavage de la vendange. Cependant, la vendange en Côtes de Gascogne étant essentiellement mécanique, ce procédé semble compliqué à mettre place. Pour les mêmes raisons, il serait intéressant de suivre la concentration en cuivre dans le jus d'écoulement et au fil du pressurage. Si les concentrations évoluent et notamment si les premiers jus sont plus concentrés en cuivre, il serait possible de ne pas les récupérer et ainsi gagner en capacité de production de thiols réduits. Il est également possible de considérer des pratiques comme la bioprotection avec des *non-saccharomyces* qui pourrait permettre de diminuer la concentration en cuivre dans le moût (Capece *et al.*, 2017). Cette pratique en plein essor a également été mise en évidence comme pouvant améliorer le caractère thiolé des vins (Belda *et al.*, 2016). Enfin, un collage spécifique pour retirer le cuivre pourrait être considéré. De récents travaux (Rakshit *et al.*, 2018) ont développé un chélateur spécifique des ion Cu^{2+} permettant de retirer l'effet oxydant du cuivre *in-vivo* tout en

maintenant des fonctions biologiques normales. Néanmoins, à ce jour, aucune colle ou aucun autre produit pour ce genre d'application n'est autorisé dans un contexte œnologique.

Pour du Gros Manseng, le raisonnement est similaire si l'on veut éviter le problème d'oxydation des thiols. Cependant, nos résultats montrent également que retirer le cuivre du milieu empêcherait d'accéder à la part de thiol révélée uniquement en présence de ce métal. Cela permettrait donc une production de thiols réduits plus importante mais plus faible que le potentiel du moût. Ce dernier point, spécifique au Gros Manseng, est un véritable challenge. En effet cette production plus importante de thiols n'est possible qu'en présence de cuivre mais à cause de ce dernier cette fraction sera presque entièrement oxydée.

Ainsi, l'application du cuivre associée à la culture biologique génère, par rapport à la culture conventionnelle, une baisse des précurseurs de thiols dans les raisins et une oxydation importante des thiols lors de la fermentation.

Pour donner suite aux résultats mis en évidence dans ce travail, il serait intéressant d'approfondir les conditions de l'absence d'effet du cuivre lors du millésime 2020. Ceci permettrait de mieux appréhender les pratiques viticoles et peut être de limiter les effets négatifs du mode de culture biologique. Parallèlement, un travail sur la fermentation et sur l'augmentation de la production totale en thiol en présence de cuivre semble nécessaire. Pour ce faire, l'utilisation de moût synthétique est obligatoire pour comprendre au mieux les facteurs influençant cette révélation.

Liste des figures

Figure 1: Processus simplifié de la vinification en blanc
Figure 2: Exemple d'arômes variétaux et de formes de précurseurs
Figure 3: Exemple de suivi cinétique d'une fermentation avec les phases cellulaire associés
Figure 4: Schéma simplifié de la synthèse des arômes fermentaires par la levure. Encart bleu : bactérie.
Figure 5: Dégradation de l'acide linolénique en (E)-hex-2-enal chez Vitis vinifera. Adapté de (Podolyan et al., 2010) et (Zhu et al., 2012)
Figure 6: Structures chimique de G3SH, de ses deux diastéréoisomères et du G3SHal
Figure 7: Structure chimique des diastéréoisomères du γ-GluCys3SH et du CysGly3SH
Figure 8: Structure chimique du Cys3SH
Figure 9 : Comparaison entre la voie de production des précurseurs de thiols chez Vitis vinifera (A) et la voie de dégradation des xénobiotiques (B). Le schéma (A) est adapté de a : (Kobayashi et al., 2011 ; Sivilotti et al., 2017) ; b : (Philips et al., 2019).
Figure 10: Catabolisme du G3SH et G3SHal chez Saccharomyces cerevisiae. En bleu les précurseurs glutathionylés, en rouge les précurseurs dipeptidiques, en jaune le précurseur cystéinylé, en vert les deux thiols variétaux. Adapté de (Cordente et al. 2015)
Figure 11: Exemple de produit issus d'une réaction du 3SH, à gauche avec l'acétaldéhyde, à droite avec un second 3SH
Figure 12: Système de régulation MAC1 chez Saccharomyces cerevisiae en présence d'une faible (≤1µM) (gauche) et forte concentration en cuivre (≥10µM) (droite).
Figure 13: système de régulation CUP1/CUP2 chez Saccharomyces cerevisiae faible (≤25 µM) (gauche) et forte concentration en cuivre (>25 µM) (droite)
Figure 14: Schéma des activation et inhibition associées au cuivre et appliquées au contexte des thiols variétaux. Sur la gauche la voie impliquant Ptr2p et Irc7p. Sur la droite la voie impliquant Irc7p et Cup1p
Figure 15: (E)-hex-2-enal-d_2
Figure 16: G3SH
Figure 17: G3SH-d_2
Figure 18: Cys3SH
Figure 19: Cys3SH-d_2
Figure 20: G4MSP
Figure 21: G4MSP-d_{10}
Figure 22: Cys4MSP
Figure 23: Cys4MSP-d_{10}
Figure 24: CysGly3SH

Figure 25: CysGly3SH-d_2
Figure 26: GluCys3SH
Figure 27: GluCys3SH-d_2
Figure 28: NAC3SH
Figure 29: 3SH-d_2
Figure 30: 3SHA-d_3
*Figure 31: Concentration en G3SH dans les raisins de Colombard et Gros Manseng en fonction des différents millésimes. Les p-value ont été calculées avec un test de student à 95%. Significativité : * ≤ 10%, **≤ 5%, *** ≤ 1 %.*
*Figure 32: Représentation de la concentration en G3SH selon les millésimes en fonction du cépage et le mode de culture. Les p-value ont été calculées avec un test de student à 95%. Significativité : * ≤ 10%, **≤ 5%, *** ≤ 1 %.*
Figure 33: Représentation de l'indicateur du mode de culture en fonction de la modalité de culture pour le Colombard, Gros Manseng. Les p-value ont été calculées avec un test de student à 95%. N=86
Figure 34: Représentation des valeurs d'indicateur du mode de culture pour chaque parcelle de l'étude. Les deux limites à 0,88 et 1,69 représente respectivement la limite supérieure pour du biologique et la limite inférieure pour du conventionnel
Figure 35: Rapport de concentration en P3SH (%) pour le Colombard et le Gros Manseng, « macération+pressurage » : rapport entre la sortie pressurage et le raisin, « débourbage » : rapport entre fin de débourbage et sortie pressurage, « global » : ratio entre fin débourbage et raisin.
Figure 36: Evolution de la concentration en cuivre au cours de la vinification du Colombard et du Gros Manseng selon deux modes de cultures. « Pressurage », « Débourbage » et « Fin de fermentation » : prélèvement à la fin des étapes du même nom ; « Début de fermentation » : prélèvement trois jours après inoculation.
Figure 37: Thiols de faible poids moléculaire présente dans les plantes. Adapté de Pivato et al. 2014

Liste des tableaux

Tableau 1: Exemple d'occurrence des précurseurs de thiols au sein de différents cépages (classement alphabétique)
Tableau 2 : Exemple de rendement de conversion des précurseurs en thiols selon la méthode de calcul utilisée.
Tableau 3: Réseau de parcelles dans l'appellation Côtes de Gascogne
Tableau 4: Composition générale du moût synthétique
Tableau 5: Composition de la solution mère d'acide aminé
Tableau 6: Composition de la solution mère de vitamines
Tableau 7 : Composition de la solution mère d'acide gras ou facteur anaérobies
Tableau 8 : Composition de la solution de fer
Tableau 9: Composition de la solution mère de minéraux
Tableau 10: Transition MRM pour l'analyse des précurseurs de thiols en triple quadripôle
Tableau 11: Transitions MS2 pour l'analyse des précurseurs de thiols en trappe ionique
Tableau 12: Transition MRM pour l'analyse des précurseurs de thiols en triple quadripôle
Tableau 13: Transition MRM pour l'analyse des thiols avec dérivatisation au NPM en triple quadripôle

Liste des équations

Équation 1: Calcul selon la méthode "A" du rendement de conversion des précurseurs en thiols. Avec « Thiol réduits » la concentration des thiols réduits en µmol/L et « Précurseurs initiaux » la somme des précurseurs initiaux en µmol/L.
Équation 2: Calcul selon la méthode "B" du rendement de conversion des précurseurs en thiols. Avec « Thiol réduits » la concentration des thiols réduits en µmol/L et « Précurseurs consommés » la somme des précurseurs consommés en µmol/L.
Équation 3: Calcul selon la méthode "C" du rendement de conversion des précurseurs en thiols. Avec « Thiol totaux » la concentration des thiols totaux en µmol/L et « Précurseurs initiaux » la somme des précurseurs initiaux en µmol/L
Équation 4: Calcul selon la méthode "D" du rendement de conversion des précurseurs en thiols. Avec « Thiol totaux » la concentration des thiols totaux en µmol/L et « Précurseurs consommés » la somme des précurseurs consommés en µmol/L.

Bibliographie

Augustyn, O. P. H., Rapp, A., & van Wyk, C. J. (1982). Some Volatile Aroma Components of Vitis Vinifera L. cv. Sauvignon blanc. *South African Journal of Enology and Viticulture, 3*(2).

Belda, I., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016). Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β-lyase activity. *International Journal of Food Microbiology, 225*, 1-8.

Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990). Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. *American Journal of Enology and Viticulture, 41*(4), 319.

Bencomo-Rodriguez, J. J. J., Gambetta, J., Rigou, P., Canelo, N., Roland, A., Salmon, J.-M., & Bouvier, N. (2012). Quantitative determination of varietal disulfides in wine and their behavior during alcoholic fermentation. In *9e Symposium international d'œnologie de Bordeaux-Oeno 2011*). Bordeaux, France: Dunod.

Bonnaffoux, H., Charrier, F., & Roy, A. (2020). Valorisation du potentiel aromatique de type thiol de la vendange: Partie 2/2: Impact des opérations préfermentaires. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle, 47*(176), 47-50.

Bonnaffoux, H., Delpech, S., Remond, E., Schneider, R., Roland, A., & Cavelier, F. (2018). Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chemistry, 268*, 126-133.

Bonnaffoux, H., Roland, A., Remond, E., Delpech, S., Schneider, R., & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)-gamma-glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. *Food Chemistry, 237*, 877-886.

Butt, T. R., Sternberg, E. J., Gorman, J. A., Clark, P., Hamer, D., Rosenberg, M., & Crooke, S. T. (1984). Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 81*(11), 3332-3336.

Byrd, C., Turner, G. C., & Varshavsky, A. (1998). The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor. *The EMBO Journal, 17*(1), 269-277.

Capaldi, R. A., Malatesta, F., & Darley-Usmar, V. M. (1983). Structure of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics, 726*(2), 135-148.

Capece, A., Romaniello, R., Scrano, L., Siesto, G., & Romano, P. (2017). Yeast Starter as a Biotechnological Tool for Reducing Copper Content in Wine. *Frontiers in Microbiology, 8*, 2632.

Capone, D. L., & Jeffery, D. W. (2011). Effects of transporting and processing Sauvignon blanc grapes on 3-mercaptohexan-1-ol precursor concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(9), 4659-4667.

Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011a). Identification and quantitation of 3-S-cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc

grape juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(20), 11204-11210.

Capone, D. L., Sefton, M. A., & Jeffery, D. W. (2011b). Application of a modified method for 3-mercaptohexan-1-ol determination to investigate the relationship between free thiol and related conjugates in grape juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(9), 4649-4658.

Cataldo, E., Salvi, L., & Mattii, G. B. (2021). Effects of irrigation on ecophysiology, sugar content and thiol precursors (3-S-cysteinylhexan-1-ol and 3-S-glutathionylhexan-1-ol) on Vitis vinifera cv. Sauvignon Blanc. *Plant Physiology and Biochemistry, 164*, 247-259.

Cerreti, M., Ferranti, P., Benucci, I., Liburdi, K., De Simone, C., & Esti, M. (2016). Thiol precursors in Grechetto grape juice and aromatic expression in wine. *European Food Research and Technology, 243*(5), 753-760.

Chaignon, V., Sanchez-Neira, I., Herrmann, P., Jaillard, B., & Hinsinger, P. (2003). Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution, 123*(2), 229-238.

Chen, L., Capone, D. L., & Jeffery, D. W. (2018). Identification and Quantitative Analysis of 2-Methyl-4-propyl-1,3-oxathiane in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66*(41), 10808-10815.

Chenot, C., Robiette, R., & Collin, S. (2022). First evidence of the glutathione S-conjugate of 3-sulfanylheptanol in green malt: discrepancy with the ubiquitous 5- and 6-C analogues. *Journal of the Institute of Brewing, 128*(2), 43-51.

Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J.-M., Duprat, F., & Moutounet, M. (1990). Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture, 41*(4), 346.

Choné, X., Lavigne-Cruège, V., Tominaga, T., Van Leeuwen, C., Castagnède, C., Saucier, C., & Dubourdieu, D. (2006). Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: Flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc grape juice. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 40*(1), 1-6.

Clark, A. C., Wilkes, E. N., & Scollary, G. R. (2015). Chemistry of copper in white wine: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research, 21*(3), 339-350.

Concejero, B., Hernandez-Orte, P., Astrain, J., Lacau, B., Baron, C., & Ferreira, V. (2016). Evolution of polyfunctional mercaptans and their precursors during Merlot alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology, 65*, 770-776.

Cordente, A. G., Borneman, A. R., Bartel, C., Capone, D., Solomon, M., Roach, M., & Curtin, C. D. (2019). Inactivating Mutations in Irc7p Are Common in Wine Yeasts, Attenuating Carbon-Sulfur beta-Lyase Activity and Volatile Sulfur Compound Production. *Applied and Environmental Microbiology, 85*(6), e02684-02618.

Cordente, A. G., Capone, D. L., & Curtin, C. D. (2015). Unravelling glutathione conjugate catabolism in Saccharomyces cerevisiae: the role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*(22), 9709-9722.

Culotta, V. C., Howard, W. R., & Liu, X. F. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry, 269*(41), 25295-25302.

Dagan, L. (2006). *Potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne.* Ph.D, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montellier.

Darriet, P., Bouchilloux, P., Poupot, C., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Sauris, P., Medina, B., & Dubourdieu, D. (2001). Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *Vitis: Journal of Grapevine Research, 40*(2), 93-99.

Darriet, P., Tominaga, T., Demole, E., & Dubourdieu, D. (1993). Mise en évidence dans le raisin de Vitis vinifera var. Sauvignon d'un précurseur de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. In).

Deroite, A., Legras, J. L., Rigou, P., Ortiz-Julien, A., & Dequin, S. (2018). Lipids modulate acetic acid and thiol final concentrations in wine during fermentation by Saccharomyces cerevisiae × Saccharomyces kudriavzevii hybrids. *AMB Express, 8*(1), 130.

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

Drawert, F. (1974). The chemistry of winemaking as a biological-technological sequence. 37 31-10.

Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Blondin, B., & Tesniere, C. (2020). Specific gene regulations of unusual micronutrient starvations leading to cell death during wine fermentation. *OENO One, 54*(2), 359 - 371.

Dufourcq, T., Bonneau, F., Desprats, A., & Serrano, E. (2008). Contribution des facteurs viticoles et œnologiques au potentiel aromatique des vins blancs de Colombard en Gascogne. In H. Fraga (Ed.), *7th International Terroir Congress*, (pp. 530-535). Nyon, Switzerland: Agroscope Changins-Wädenswil.

Etchebarne, F., Ojeda, H., & Deloire, A. (2009). Grape Berry Mineral Composition in Relation to Vine Water Status & Leaf Area/Fruit Ratio. In *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology* (pp. 53-72).

Evers, M. S., Alexandre, H., Morge, C., Sparrow, C., Gobert, A., & Roullier-Gall, C. (2023). Exploring the unexplored: A characterization of vitamins and vitamers in white grape musts by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry, 398*, 133860.

Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(3), 991-995.

Fracassetti, D., Stuknytė, M., La Rosa, C., Gabrielli, M., De Noni, I., & Tirelli, A. (2018). Thiol precursors in Catarratto Bianco Comune and Grillo grapes and effect of clarification conditions on the release of varietal thiols in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research, 24*(1), 125-133.

Franco-Luesma, E., & Ferreira, V. (2014). Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compouds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. *Journal of Chromatography A, 1359*, 8-15.

Grant-Preece, P. A., Pardon, K. H., Capone, D. L., Cordente, A. G., Sefton, M. A., Jeffery, D. W., & Elsey, G. M. (2010). Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(3), 1383-1389.

Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O., & Winge, D. R. (2000). Identification of the copper regulon in Saccharomyces cerevisiae by DNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry, 275*(41), 32310-32316.

Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A, 331*, 83-90.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry, 249*(22), 7130-7139.

Harbertson, J. F. (2009). A guide to the fining of wine. *WSU extension*.

Harsch, M. J., Benkwitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R. C., & Salmon, J. M. (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*(15), 3703-3713.

Hatzidimitriou, E., Bouchilloux, P., Darriet, P., Bugaret, Y., Clerjeau, M., Poupot, C., Médina, B., & Dubourdieu, D. (1996). Incidence of a vine protection using a commercial formula of Bordeaux mixture on the Sauvignon grapes maturity and the wines varietal aroma (results of a 3-year study). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 30*(3), 133-150.

Helwi, P., Guillaumie, S., Thibon, C., Keime, C., Habran, A., Hilbert, G., Gomes, E., Darriet, P., Delrot, S., & van Leeuwen, C. (2016). Vine nitrogen status and volatile thiols and their precursors from plot to transcriptome level. *BMC plant biology, 16*(1), 173-173.

Hodgins-Davis, A., Adomas, A. B., Warringer, J., & Townsend, J. P. (2012). Abundant gene-by-environment interactions in gene expression reaction norms to copper within Saccharomyces cerevisiae. *Genome biology and evolution, 4*(11), 1061-1079.

Holt, S., Cordente, A. G., Williams, S. J., Capone, D. L., Jitjaroen, W., Menz, I. R., Curtin, C., & Anderson, P. A. (2011). Engineering Saccharomyces cerevisiae to release 3-Mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an S. cerevisiae Gene, STR3, for improvement of wine aroma. *Appl Environ Microbiol, 77*(11), 3626-3632.

Howell, K. S., Klein, M., Swiegers, J. H., Hayasaka, Y., Elsey, G. M., Fleet, G. H., Hoj, P. B., Pretorius, I. S., & de Barros Lopes, M. A. (2005). Genetic determinants of volatile-thiol release by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(9), 5420-5426.

Jensen, L. T., Howard, W. R., Strain, J. J., Winge, D. R., & Culotta, V. C. (1996). Enhanced Effectiveness of Copper Ion Buffering by CUP1 Metallothionein Compared with CRS5 Metallothionein in Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry, 271*(31), 18514-18519.

Jungmann, J., Reins, H. A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D., & Jentsch, S. (1993). MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *The EMBO Journal, 12*(13), 5051-5056.

Klapheck, S., Chrost, B., Starke, J., & Zimmermann, H. (1992). γ-Glutamylcysteinylserine — A New Homologue of Glutathione in Plants of the Family Poaceae*. *Botanica Acta, 105*(3), 174-179.

Klapheck, S., Zopes, H., Levels, H. G., & Bergmann, L. (1988). Properties and localization of the homoglutathione synthetase from Phaseolus coccineus leaves. *Physiologia Plantarum, 74*(4), 733-739.

Knight, S. A., Tamai, K. T., Kosman, D. J., & Thiele, D. J. (1994). Identification and analysis of a Saccharomyces cerevisiae copper homeostasis gene encoding a homeodomain protein. *Molecular and Cellular Biology, 14*(12), 7792-7804.

Kobayashi, H., Matsuyama, S., Takase, H., Sasaki, K., Suzuki, S., Takata, R., & Saito, H. (2012). Impact of Harvest Timing on the Concentration of 3-Mercaptohexan-1-ol Precursors in Vitis vinifera Berries. *American Journal of Enology and Viticulture, 63*(4), 544.

Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S., & Konno, T. (2010). Analysis of S-3-(Hexan-1-ol)-Glutathione and S-3-(Hexan-1-ol)-L-Cysteine in Vitis vinifera L. cv. Koshu for Aromatic Wines. *American Journal of Enology and Viticulture, 61*(2), 176-185.

Kobayashi, H., Takase, H., Suzuki, Y., Tanzawa, F., Takata, R., Fujita, K., Kohno, M., Mochizuki, M., Suzuki, S., & Konno, T. (2011). Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *Journal of Experimental Botany, 62*(3), 1325-1336.

Kreitman, G. Y., Danilewicz, J. C., Jeffery, D. W., & Elias, R. J. (2016). Reaction mechanisms of metals with hydrogen sulfide and thiols in model wine. Part 1: copper-catalyzed oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64*(20), 4095-4104.

Lamoureux, G. L., & Rusness, D. G. (1981). Catabolism of Glutathione Conjugates of Pesticides in Higher Plants. In *Sulfur in Pesticide Action and Metabolism*, vol. 158 (pp. 133-164): AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.

Lamoureux, G. L., & Rusness, D. G. (1983). Malonylcysteine conjugates as end-products of glutathione conjugate metabolism in plants. In S. Matsunaka, D. H. Hutson & S. D. Murphy (Eds.),*Mode of Action, Metabolism and Toxicology*, (pp. 295-300): Pergamon.

Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C., & Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(25), 10281-10288.

Mattivi, F., Fedrizzi, B., Zenato, A., Tiefenthaler, P., Tempesta, S., Perenzoni, D., Cantarella, P., Simeoni, F., & Vrhovsek, U. (2012). Development of reliable analytical tools for evaluating the influence of reductive winemaking on the quality of Lugana wines. *Analytica Chimica Acta, 732*, 194-202.

Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A, 881*(1), 569-581.

Millardet, A. (1887). *Nouvelles recherches sur le développement et le traitement du mildiou et de l'anthracose*: G. Masson.

Miotto, A., Ceretta, C. A., Brunetto, G., Nicoloso, F. T., Girotto, E., Farias, J. G., Tiecher, T. L., De Conti, L., & Trentin, G. (2013). Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. *Plant and Soil, 374*(1-2), 593-610.

Mirlean, N., Roisenberg, A., & Chies, J. (2005). Copper-Based Fungicide Contamination and Metal Distribution in Brazilian Grape Products. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 75*, 968-974.

Momose, Y., & Iwahashi, H. (2001). Bioassay of cadmium using a DNA microarray: Genome-wide expression patterns of Saccharomyces cerevisiae response to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry, 20*(10), 2353-2360.

Murray, A. C., & Jeffrey, P. D. (1974). Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish Cherax destructor. Subunit heterogeneity. *Biochemistry, 13*(18), 3667-3671.

Neilsen, G. H., Neilsen, D., Bowen, P., Bogdanoff, C., & Usher, K. (2010). Effect of Timing, Rate, and Form of N Fertilization on Nutrition, Vigor, Yield, and Berry Yeast-Assimilable N of Grape. *American Journal of Enology and Viticulture, 61*(3), 327.

Nicolle, P., Gerzhova, A., Roland, A., Dagan, L., Delpech, S., Gagné, F., & Pedneault, K. (2022). Thiol precursors and amino acids profile of white interspecific hybrid Vitis varieties and impact of foliar urea and sulfur supplementation on the concentration of thiol precursors in Vitis sp. Vidal berries. *OENO One, 56*(3), 357-369.

Nikolantonaki, M., Jourdes, M., Shinoda, K., Teissedre, P.-L., Quideau, S., & Darriet, P. (2012). Identification of Adducts between an Odoriferous Volatile Thiol and Oxidized Grape Phenolic Compounds: Kinetic Study of Adduct Formation under Chemical and Enzymatic Oxidation Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(10), 2647-2656.

Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Aguera, E., Sablayrolles, J.-M., & Farines, V. (2020). Comprehensive study of the dynamic interaction between SO2 and acetaldehyde during alcoholic fermentation. *Food Research International, 136*, 109607.

Ono, B.-I., Kijima, K., Inoue, T., Miyoshi, S.-I., Matsuda, A., & Shinoda, S. (1994). Purification of properties of Saccharomyces cerevisiae cystathionine β-synthase. *Yeast, 10*(3), 333-339.

Ono, B.-I., Tanaka, K., Naito, K., Heike, C., Shinoda, S., Yamamoto, S., Ohmori, S., Oshima, T., & Toh-e, A. (1992). Cloning and characterization of the CYS3 (CYI1) gene of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Bacteriology, 174*(10), 3339-3347.

Ortega, P., Sánchez, E., Gil, E., & Matamoros, V. (2022). Use of cover crops in vineyards to prevent groundwater pollution by copper and organic fungicides. Soil column studies. *Chemosphere, 303*, 134975.

Pearson, R. G. (1963). Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society, 85*(22), 3533-&.

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

Pérez-Torrado, R., Carrasco, P., Aranda, A., Gimeno-Alcañiz, J., Pérez-Ortín, J. E., Matallana, E., & del Olmo, M. L. (2002). Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress-response genes as probes. *Syst Appl Microbiol, 25*(1), 153-161.

Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002a). Localization of S-Cysteine Conjugates in the Berry: Effect of Skin Contact on Aromatic Potential of Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc Must. *American Journal of Enology and Viticulture, 53*(2), 144.

Peyrot Des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002b). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(14), 4076-4079.

Philips, J. G., Dumin, W., & Winefield, C. (2019). Functional Characterization of the Grapevine γ-Glutamyl Transferase/Transpeptidase (E.C. 2.3.2.2) Gene Family Reveals a Single Functional Gene Whose Encoded Protein Product Is Not Located in Either the Vacuole or Apoplast. *Frontiers in Plant Science, 10*(1402).

Podolyan, A., White, J., Jordan, B., & Winefield, C. (2010). Identification of the lipoxygenase gene family from Vitis vinifera and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology, 37*(8), 767-784.

Prillieux, E. (1887). Les Maladies De La Vigne En 1887. *Bulletin de la Société Botanique de France, 34*(sup1), VII-XVIII.

Rakshit, A., Khatua, K., Shanbhag, V., Comba, P., & Datta, A. (2018). Cu(2+) selective chelators relieve copper-induced oxidative stress in vivo. *Chem Sci, 9*(41), 7916-7930.

Razungles, A., Gunata, Z., Pinatel, S., Baumes, R., & Bayonove, C. (1993). Quantitative studies on terpenes, norisoprenoides and their precursors in several varieties of grapes. *Sciences des Aliments, 13*(1), 59-72.

Reichman, S. (2002). *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc* (Vol. 7).

Ribereau-Gayon, P., Boidron, J. N., & Terrier, A. (1975). Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23*(6), 1042-1047.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* (Vol. 2).

Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Ducasse, M. A., Cavelier, F., & Schneider, R. (2016). Innovative analysis of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexylacetate and their corresponding disulfides in wine by stable isotope dilution assay and nano-liquid

chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1468*, 154-163.

Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M., & Razungles, A. (2011). Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chemistry, 125*(1), 139-144.

Roland, A., Schneider, R., Le Guernevé, C., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010a). Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry, 121*(3), 847-855.

Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guerneve, C., & Cavelier, F. (2010b). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(19), 10684-10689.

Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., & Schneider, R. (2010c). Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(7), 4406-4413.

Roman, T., Larcher, R., Slaghenaufi, D., Tonidandel, L., Moser, S., & Nicolini, G. (2016). Clarifying agents and 3-sulfanylhexanol precursors in grape juice. *Italian Journal of Food Science, 28*(4), 744-748.

Romeu-Moreno, A., & Mas, A. (1999). Effects of Copper Exposure in Tissue Cultured Vitis vinifera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(7), 2519-2522.

Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D. O., Moroney, S., Harsch, M. J., Lee, S. A., Richards, K. D., Nicolau, L., & Gardner, R. C. (2011). The yeast IRC7 gene encodes a beta-lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiology, 28*(5), 926-935.

Ruiz, J., de Celis, M., Martín-Santamaría, M., Benito-Vázquez, I., Pontes, A., Lanza, V. F., Sampaio, J. P., Santos, A., & Belda, I. (2021). Global distribution of IRC7 alleles in Saccharomyces cerevisiae populations: a genomic and phenotypic survey within the wine clade. *Environmental Microbiology, 23*(6), 3182-3195.

Santiago, M., & Gardner, R. C. (2015). Yeast genes required for conversion of grape precursors to varietal thiols in wine. *FEMS Yeast Research, 15*(5), fov034.

Schneider, R., Charrier, F., 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), 58-64.

Segurel, M. A., Razungles, A. J., Riou, C., Trigueiro, M. G., & Baumes, R. L. (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.

Serpe, M., Joshi, A., & Kosman, D. J. (1999). Structure-Function Analysis of the Protein-binding Domains of Mac1p, a Copper-dependent Transcriptional Activator of Copper Uptake in Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry, 274*(41), 29211-29219.

Sivilotti, P., Falchi, R., Herrera, J. C., Skvarc, B., Butinar, L., Sternad Lemut, M., Bubola, M., Sabbatini, P., Lisjak, K., & Vanzo, A. (2017). Combined effects of early season leaf

removal and climatic conditions on aroma precursors in Sauvignon Blanc grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65*(38), 8426-8434.

Spencer-Phillips, P. T. N., Gisi, U., & Lebeda, A. (2002). *Advances in Downy Mildew Research*.

Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J. M., & Degryse, E. (2008a). New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon Blanc wines: Cys-3MH and (E)-hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(19), 9230-9235.

Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J. M., & Degryse, E. (2008b). Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon Blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Research, 8*(5), 771-780.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research, 11*(2), 139-173.

Swiegers, J. H., Willmott, R., Hill-Ling, A., Capone, D. L., Pardon, K. H., Elsey, G. M., Howell, K. S., de Barros Lopes, M. A., Sefton, M. A., Lilly, M., & Pretorius, I. S. (2006). Modulation of volatile thiol and ester aromas by modified wine yeast. In W. L. P. Bredie & M. A. Petersen (Eds.),*Flavour science - recent advances and trends*, vol. 43 (pp. 113-116). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature, 306*(5940), 284-287.

Thibon, C., Bocker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2016). Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chemistry, 199*, 711-719.

Thibon, C., Dubourdieu, D., Darriet, P., & Tominaga, T. (2009). Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexanol content in Vitis vinifera L. cv Sauvignon blanc and Semillon grape juice. *Food Chemistry, 114*(4), 1359-1364.

Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D., & Tominaga, T. (2008a). Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation. *FEMS Yeast Research, 8*(7), 1076-1086.

Thibon, C., Shinkaruk, S., Tominaga, T., Bennetau, B., & Dubourdieu, D. (2008b). Analysis of the diastereoisomers of the cysteinylated aroma precursor of 3-sulfanylhexanol in Vitis vinifera grape must by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1183*(1-2), 150-157.

Thiele, D. J. (1988). ACE1 regulates expression of the Saccharomyces cerevisiae metallothionein gene. *Molecular and Cellular Biology, 8*(7), 2745-2752.

Thomas, D., & Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol Mol Biol Rev, 61*(4), 503-532.

Tirelli, A., De Noni, I., Stuknyté, M., Pica, V., & Fracassetti, D. (2021). Role of extraction procedures on the concentration of varietal thiol precursors in Grillo white grape must. *Australian Journal of Grape and Wine Research, n/a*(n/a).

Tominaga, T., Darriet, P., & Dubordieu, D. (1996). Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis: Journal of Grapevine Research, 35*(4), 207-210.

Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., & Dubourdieu, D. (1998a). Identification of new volatile thiols in the aroma of Vitis vinifera L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal, 13*(3), 159-162.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*(12), 5215-5219.

Tonidandel, L., Larcher, R., Barbero, A., Jelley, R. E., & Fedrizzi, B. (2021). A single run liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of varietal thiols and their precursors in wine. *Journal of Chromatography A, 1658*, 462603.

Toselli, M., Baldi, E., Marcolini, G., Malaguti, D., Quartieri, M., Sorrenti, G., & Marangoni, B. (2009). Response of potted grapevines to increasing soil copper concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research, 15*(1), 85-92.

Ugliano, M., Kwiatkowski, M., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J. B., Aagaard, O., & Waters, E. J. (2011). Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(6), 2564-2572.

Wakabayashi, H., Wakabayashi, M., Eisenreich, W., & Engel, K.-H. (2004). Stereochemical Course of the Generation of 3-Mercaptohexanal and 3-Mercaptohexanol by β-Lyase-Catalyzed Cleavage of Cysteine Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(1), 110-116.

Wang, X., Capone, D. L., Kang, W., Roland, A., & Jeffery, D. W. (2022). Impact of accentuated cut edges (ACE) technique on volatile and sensory profiles of Shiraz wines. *Food Chemistry, 372*, 131222.

Wang, X., Chen, L., Capone, D. L., Roland, A., & Jeffery, D. W. (2020). Evolution and Correlation of cis-2-Methyl-4-propyl-1,3-oxathiane, Varietal Thiols, and Acetaldehyde during Fermentation of Sauvignon blanc Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68*(32), 8676-8687.

Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F. A., Zia, A., Gjuvsland, A., Simpson, J. T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S. W., Louis, E. J., Liti, G., Moses, A., & Blomberg, A. (2011). Trait Variation in Yeast Is Defined by Population History. *PLOS Genetics, 7*(6), e1002111.

Winge, D. R., Nielson, K. B., Gray, W. R., & Hamer, D. H. (1985). Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem, 260*(27), 14464-14470.

Wu, J., Drappier, J., Hilbert, G., Guillaumie, S., Dai, Z., Geny, L., Delrot, S., Darriet, P., Thibon, C., & Pieri, P. (2019). The effects of a moderate grape temperature increase on berry secondary metabolites: This article is published in cooperation with the 21th GIESCO International Meeting, June 23-28 2019, Thessaloniki, Greece. Guests editors : Stefanos Koundouras and Laurent Torregrosa. *OENO One, 53*(2).

Yamada, T., Furukawa, K., Hara, S., & Mizoguchi, H. (2005). Isolation of copper-tolerant mutants of sake yeast with defective peptide uptake. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 100*(4), 460-465.

Yasokawa, D., Murata, S., Kitagawa, E., Iwahashi, Y., Nakagawa, R., Hashido, T., & Iwahashi, H. (2008). Mechanisms of copper toxicity in Saccharomyces cerevisiae determined by microarray analysis. *Environmental Toxicology, 23*(5), 599-606.

Zhu, B.-Q., Xu, X.-Q., Wu, Y.-W., Duan, C.-Q., & Pan, Q.-H. (2012). Isolation and characterization of two hydroperoxide lyase genes from grape berries. *Molecular Biology Reports, 39*(7), 7443-7455.

Zhu, Z., Labbé, S., Peña, M. M. O., & Thiele, D. J. (1998). Copper Differentially Regulates the Activity and Degradation of Yeast Mac1 Transcription Factor*. *Journal of Biological Chemistry, 273*(3), 1277-1280.

Abstract

Varietal thiols (3-sulfanylhexan-1-ol, 3SH and its acetate, 3SHA) are powerful aromas that give grapefruit and passion fruit notes to certain wines. These aromatic notes and their power make the typicality of Côtes de Gascogne wines. In this appellation, the evolution of practices towards organic viticulture has highlighted technical obstacles to the production of these aromas. This work aims to understand the effect of the growing method on the production of these thiols in the wines of two emblematic grape varieties of the region, Colombard and Gros Manseng. To do this, the effect of copper was studied through the different stages of the wine-making process, from the plot to the finished wine.

The monitoring of a network of plots within the appellation enabled us to characterize precisely the thiol-type aromatic potential of these grape varieties, thus enabling us to classify them among the most concentrated in thiol precursors, along with Sauvignon blanc. These observation data from the three vintages also showed a negative effect of organic practice on the concentration of thiol precursors in the grapes of both varieties, with Gros Manseng appearing to be the most impacted.

The cellar study did not reveal any particular behavior of the organic matrices compared to the conventional ones. Regardless of the management method and the type of grape variety, the extraction of thiol precursors was lower than that of Sauvignon blanc, which raised the need to optimize the extraction steps for these two grape varieties. Copper was not affected by the pre-fermentation stages, whereas it decreased significantly during alcoholic fermentation. During this stage, we identified several effects of copper on the development of varietal thiols. Firstly, there was a significant oxidative effect, regardless of the grape variety. This oxidation considerably reduced the fraction of reduced (odorous) thiols in the finished wine. Secondly, and only for Gros Manseng, there was an increase in total thiol production during fermentation. However, this increase did not compensate for the losses due to copper-related oxidation.

Finally, we identified a new *S*-conjugated and *N*-acetylated intermediate in the interconversion of precursors during fermentation, *N*-acetyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cysteine (NAC3SH). This compound produced only by the yeast in the presence of copper during fermentation completed our knowledge of this degradation pathway and brought it a little closer to the detoxification pathway of xenobiotics. NAC3SH, when produced by yeast, also acted as a precursor and allowed the release of 3SH and 3SHA in synthetic matrix. Similar to the other precursors the release of NAC3SH to 3SH appeared to be diastereomer dependent, with the (*R,S*) isomer being converted more efficiently than the (*R,R*) by X5 yeast.

Keywords: varietal thiols, thiol precursors, copper, organic viticulture, Colombard and Gros Manseng

Résumé

Les thiols variétaux (3-sulfanylhexan-1-ol, 3SH et son acétate, 3SHA) sont des arômes puissants qui donnent des notes de pamplemousse et de fruits de la passion à certains vins. Ces notes aromatiques et leurs puissances font la typicité des vins des Côtes de Gascogne. Dans cette appellation, l'évolution des pratiques vers la viticulture biologique met en évidence des verrous techniques quant à la production de ces arômes. Ce travail vise à comprendre l'effet du mode de culture sur la production de ces thiols dans les vins des deux cépages emblématiques de la région, le Colombard et le Gros Manseng. Pour cela, l'effet du cuivre a été étudié au travers des différentes étapes de la vinification, de la parcelle au vin fini.

Le suivi d'un réseau de parcelles au sein de l'appellation nous a permis de caractériser précisément le potentiel aromatique de type thiol de ces cépages, permettant ainsi de les classer parmi les plus concentrés en précurseurs de thiols, avec le Sauvignon blanc. Ces données d'observation sur les trois millésimes ont également montré un effet négatif de la pratique biologique sur la concentration en précurseurs de thiols dans les raisins des deux variétés, le Gros Manseng semblant être le plus impacté.

L'étude au chai n'a pas révélé de comportement particulier des matrices biologiques par rapport aux conventionnelles. Quelle que soit le mode de conduite et le type de cépage, l'extraction des précurseurs de thiols est inférieure à celle du Sauvignon blanc, ce qui soulève la nécessité d'optimiser les étapes d'extraction pour ces deux cépages. Le cuivre n'est pas affecté par les étapes pré-fermentaires alors qu'il diminue de manière significative au cours de la fermentation alcoolique. Au cours de cette étape, nous avons identifié plusieurs effets du cuivre sur le développement des thiols variétaux. Tout d'abord, un effet oxydatif important, quel que soit le cépage. Cette oxydation diminue considérablement la fraction des thiols réduits (odorants) dans le vin fini. Ensuite, et uniquement pour le Gros Manseng, il y a une augmentation de la production de thiols totaux au cours de la fermentation. Cependant, cette augmentation ne permet pas de compenser les pertes dues à l'oxydation liée au cuivre.

Enfin, nous avons identifié un nouvel intermédiaire *S*-conjugué et *N*-acétylé dans l'interconversion des précurseurs durant la fermentation, le *N*-acétyl-*S*-(1-hydroxyhexan-3-yl)-cystéine (NAC3SH). Ce composé produit uniquement par la levure en présence de cuivre lors de la fermentation complète notre connaissance de cette voie de dégradation et la rapproche un peu plus de la voie de détoxification des xénobiotiques. Le NAC3SH, lorsqu'il est produit par la levure, joue également le rôle de précurseur et permet la libération de 3SH et 3SHA en matrice synthétique. Similairement aux autres précurseurs, la révélation du NAC3SH en 3SH semble être diastéréoisomère dépendante, l'isomère (*R,S*) étant converti plus efficacement que le (*R,R*) par la levure X5.

Mots-clés : thiols variétaux, précurseurs de thiols, cuivre, viticulture biologique, Colombard et Gros Manseng