

“Là où il y a une volonté, il y a un chemin”

A. Wimper

*A Vincent,
A Bruno et mes parents*

Remerciements

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Véronique Cheynier, Directeur de recherche à l'INRA de Montpellier, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour la formation scientifique qu'elle m'a permis d'acquérir au cours de ce travail de thèse. Merci également pour ses conseils et critiques constructives.

J'adresse des remerciements tout particuliers à Hélène Fulcrand, Chargée de recherche à l'INRA, pour son encadrement et sa disponibilité au cours de ces trois années. Ses compétences scientifiques et sa créativité ont été un atout considérable.

J'aimerais exprimer ma gratitude à Mme Catherine Lapierre, Professeur à l'INA PG et M. Christian Rolando, Directeur de recherche CNRS Lille, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

J'adresse de chaleureux remerciements à Marc-André Delsuc, Directeur de recherche CNRS, Nicolas Sommerer, Ingénieur de recherche INRA, et Céline Malien-Aubert (ChrHansen) pour leurs collaborations à ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

J'aimerais également remercier Sylvain Guyot et Michel Moutounet pour avoir participé aux comités de pilotage de cette thèse pendant ces trois années ainsi que pour leurs conseils avisés.

Je remercie le Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne et la société Moët & Chandon pour avoir financé cette recherche, et toutes les personnes qui ont été directement impliquées dans ce travail : en particulier merci à Michel Valade, Isabelle Tribaut-Sohier, Bertrand Robillard, Bruno Duteurtre et Vincent Chaperon.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance envers toutes les personnes de l'UMR SPO que j'ai souvent sollicitées. Les recherches diverses et variées menées dans les différents étages du bâtiment, même si parfois infructueuses, m'auront permis de rencontrer des personnes très accueillantes que je n'oublierai pas.

Mes remerciements s'adressent également à Sacha Baudoin et Selene Hernandez pour les travaux qu'ils ont effectués respectivement au cours de leurs stages de DEA et dans le cadre d'une bourse Erasmus. Des rencontres très agréables. Bonne continuation à ces deux futurs thésards.

Un remerciement particulier à Emmanuelle, Jean-Marc et Jean-Paul pour leur réactivité de tous les instants et leur gentillesse. Je pense également aux adeptes du « café de 8h » qui ont égayé mes journées.

Merci à tous mes compagnons de route pour leur soutien scientifique, leur convivialité et leur amitié.

J'aimerais remercier tous les amis qui m'ont accompagnée pendant ces années parce qu'une pause détente est toujours la bienvenue. Merci à Jérôme, Nicolas, Pascale, Claire, Anysia et Marie-Agnès pour leur présence, leur aide, leurs conseils et leur amitié très

précieuse. Plein de succès à Anysia qui connaîtra dans quelques mois les joies d'être docteur et courage à Marie-Agnès pour poursuivre sa thèse toujours dans le sourire et la bonne humeur. Je souhaite également beaucoup de succès à Jérôme et Nicolas dans leur entreprise, ainsi qu'à Claire dans la réalisation de ses projets et de ses rêves. Quant à Pascale, que lui souhaiter à part le meilleur. Surtout ne change pas !

Plein de bonheur à toutes et tous.

Merci également à mes parents qui m'ont laissé libre de choisir ma voie et m'ont aidée dans cette entreprise, à Bruno, qui s'inquiète toujours pour sa grande sœur. A toute la famille de la Métropole à la Réunion qui m'a entourée, d'un bout à l'autre de ce voyage de trois ans, j'adresse un merci général et sincère. Votre soutien et votre confiance en moi ont été essentiels. Merci aux anges qui veillent sur moi...

Enfin, un grand merci à Vincent qui m'accompagne. Pendant ces trois années, où qu'il soit dans le monde, il a partagé les moments de joie et m'a soutenue sans relâche dans les moments plus difficiles. Ton ciel est magique.

Sommaire

<i>Sommaire</i>	6
<i>Valorisation des travaux de recherche</i>	14
<i>Liste des abréviations</i>	16
<i>Position du sujet de thèse</i>	17

BIBLIOGRAPHIE

<i>Chapitre I : De la baie de raisin au Champagne</i>	21
<i>I. Terroir et Cépages</i>	21
<i>II. Elaboration du Champagne</i>	22
A. Vendanges	23
B. Pressurage et extraction des moûts.....	23
C. Vinification.....	24
1. Fermentation alcoolique.....	24
2. Fermentation malolactique.....	24
D. Première maturation.....	24
1. L'assemblage	24
2. Les vins de réserve.....	25
3. Préparation des vins et stabilisation par le froid.....	25
E. Prise de mousse.....	26
F. Maturation sur lies	26
G. Remuage, dégorgement, et dosage	27
<i>III. Composition du Champagne</i>	28
A. Acides organiques et matière minérale	28
B. Levures	29
C. Constituants azotés.....	29
D. Polyphénols	29
E. Polysaccharides.....	30
F. Composés volatils	30
<i>Chapitre II: Oxydation des vins blancs et contribution des polyphénols</i>	31
<i>I. Dégradation du potentiel aromatique des vins</i>	31
<i>II. Les polyphénols du raisin</i>	32
A. Les composés non flavonoïdes	32
1. Les acides phénols	32
2. Les stilbènes.....	34
B. Les flavonoïdes.....	34
1. Les anthocyanes	35

2.	Les flavanols	36
3.	Les flavonols	38
4.	Les flavanonols	39
III.	<i>Réactivité des polyphénols</i>⁵²	39
A.	Réactivité des différents types de noyaux aromatiques rencontrés dans les polyphénols	39
B.	Oxydation	41
1.	Voies d'obtention des formes oxydées (<i>o</i> -semiquinone, <i>o</i> -quinone)	41
2.	Principales réactions des formes oxydées	43
3.	Polycondensation via une addition électrophile	45
IV.	<i>Vinification et oxydation des polyphénols</i>	47
A.	Oxydation dans les moûts de raisin	47
1.	Principale réaction d'addition	47
2.	Influence du rapport acides hydroxycinnamiques/glutathion	48
3.	Protection des moûts par les antioxydants	48
4.	Hyperoxygénation	49
B.	Schéma récapitulatif	49
C.	Oxydation dans les vins blancs	50
1.	Corrélation brunissement/flavanols dans les vins	50
2.	Corrélation brunissement/acides phénols	50
V.	<i>Méthodes d'analyse des polyphénols</i>	51
A.	Caractérisation des polyphénols de faible masse molaire	51
B.	Caractérisation des polymères	53
C.	Dosage des polyphénols par réaction chimique et détection UV-visible	54

MATERIEL ET METHODES

I.	<i>Matériel</i>	57
A.	Raisins	57
1.	Cépages	57
2.	Prélèvements	57
3.	Conservation des baies de raisin	57
B.	Vins blancs champenois	58
1.	Vins tranquilles	58
2.	Vins champagnisés	58
C.	Fractions de tanins	59
1.	Tanins condensés	60
2.	Tanins hydrolysables	60
II.	<i>Préparation des baies et des vins</i>	60
A.	Extraction des polyphénols à partir des baies de raisin champenois	60
1.	Description générale et solvants	60
2.	Expériences préliminaires : rapports solide/liquide utilisés	61
3.	Plan d'expériences et traitement des données	62
B.	Obtention des jus à partir du Mourvèdre	62
C.	Fractionnement des vins blancs	63
III.	<i>Vieillessement modèle des vins Champenois</i>	64
A.	Vieillessement accéléré à haute température	64
1.	Stratégie d'expérimentation	64

2.	Conditionnement des échantillons	64
B.	Oxydation chimique de vins champenois	65
IV.	<i>Etude des phénomènes oxydants en solution modèle</i>	66
A.	Autoxydation accélérée par élévation du pH et influence de la présence d'acide protocatéchique	66
1.	Solutions modèles	66
2.	Réaction d'oxydation	66
B.	Autoxydation accélérée par élévation de la température et influence des acides protocatéchique et caféique	66
1.	Milieux modèles et polyphénols étudiés	66
2.	Réaction d'oxydation	67
C.	Oxydation chimique	67
1.	Conditions de réaction	67
2.	Inhibition de l'oxydation	68
D.	Plan de mélanges en autoxydation ou oxydation chimique	68
V.	<i>Analyse de la couleur</i>	69
A.	Spectrophotométrie UV-Visible	69
1.	Appareillage	69
2.	Analyse des vins	69
3.	Analyse des solutions modèles	70
B.	Colorimétrie	70
1.	Appareillage	70
2.	Calibration	71
3.	Mode d'analyse	71
VI.	<i>Purification de produits de vieillissement et d'oxydation par CLHP semi-préparative 71</i>	
A.	Appareillage	71
B.	Conditions d'analyse	72
1.	Solvants	72
2.	Gradients d'élution	72
3.	Détection UV-Visible	72
VII.	<i>Caractérisation de la composition polyphénolique</i>	73
A.	Dosage global des polyphénols	73
1.	Indice de Folin-Ciocalteu	73
2.	Test au DMAC	73
3.	Bate Smith	74
4.	Décomplexation par le sodium dodécyl sulfate (SDS)	74
B.	Caractérisation structurale	74
1.	Séparation par CLHP	74
2.	Analyse CLHP-SM	76
3.	Analyse des tanins par phloroglucinolyse	76
4.	Caractérisation des polyphénols par Résonance Magnétique Nucléaire	78
VIII.	<i>Distribution en masse des tanins par MALDI-TOF</i>	80
A.	Gamme de protéines	80
B.	Complexation	80
C.	Analyse MALDI-TOF	81
1.	Matrices	81
2.	Appareillage	81

D. Traitement mathématique des données.....	81
PARTIE 1 : CARACTERISATION DES CEPAGES ET VINS BLANCS CHAMPENOIS	

Chapitre I: Caractérisation de la composition polyphénolique des cépages champenois; Optimisation de l'extraction des acides phénols, anthocyanes et flavanols de raisin à partir d'un plan d'expérience..... 83

I. Evaluation préliminaire de l'influence de quelques paramètres..... 85

A. Effet du rapport solide/liquide 85

B. Comparaison extraction simple/extraction multiple..... 86

II. Optimisation simultanée de la nature du solvant d'extraction, du rapport solide/liquide, et de la durée d'extraction : approche par un plan d'expérience de Doehlert
89

A. Définition du domaine expérimental 89

B. Analyse des modèles d'extraction 90

1. Considérations générales..... 91

2. Effets principaux..... 91

3. Interactions entre les facteurs..... 92

C. Validation des modèles..... 95

III. Distribution et caractérisation des polyphénols contenus dans les différents compartiments des baies de Pinot noir, Pinot meunier, et Chardonnay..... 95

A. Composition et distribution globale..... 96

B. Pépins 97

C. Pellicule 97

D. Pulpe 98

IV. Passage des tanins dans le jus 99

V. Conclusion..... 100

Chapitre II: Caractérisation de vins blancs de Champagne et Recherche de marqueurs d'oxydation par les méthodes classiques..... 102

I. Caractérisation de vins blancs tranquilles de Champagne..... 103

A. Analyse de la couleur des vins blancs de Champagne par spectrophotométrie UV-visible
103

B. Identification et dosage des polyphénols par CLHP-DAD-ESI/TI 104

1. Acides Phénols..... 106

2. Composés incolores 107

3. Pigments jaunes 109

4. Autres composés 109

5. Flavanols..... 110

C. Fractionnement colorimétrique du vin tranquille de Champagne et analyse HPLC-DAD-ESI/TI..... 110

1. Travaux antérieurs 110

2. Optimisation de la gamme de solvants d'élution 111

3. Fractionnement colorimétrique final..... 113

D.	Analyse des tanins du vin par phloroglucinolyse	121
E.	Dosage des composés phénoliques par réaction chimique.....	122
1.	Dosage des polyphénols totaux : Indice de Folin –Ciocalteu.....	122
2.	Teneur en flavanols : test au DMAC.....	124
3.	Teneur en tanins natifs : Test de Bate-Smith	125
4.	Conclusion des différents dosages	126
II.	<i>Recherche de marqueurs d'oxydation dans des vins champagnisé âgés présentant un différentiel de caractère oxydé.....</i>	126
A.	Caractère oxydé et couleur des vins	127
1.	Analyse par spectrophotométrie UV-visible.....	127
2.	Colorimétrie	128
B.	Caractère oxydé et composition polyphénolique.....	130
1.	Injection directe	130
2.	Recherche avancée de molécules marqueurs par fractionnement colorimétrique.....	132
3.	Extension à la sélection Moët & Chandon 1998.....	133
C.	Autres méthodes testées.....	134
D.	Corrélation avec l'analyse sensorielle.....	134
III.	<i>Bilan « de la baie de raisin au vin blanc ».....</i>	135

PARTIE 2 : ETUDE DES PHENOMENES OXYDANTS EN SYSTEMES MODELES

Chapitre I: Vieillissement et oxydation modèles d'un vin blanc tranquille de Champagne (Assemblage 2003).....

I.	<i>Justification des modèles d'évolution des vins.....</i>	137
II.	<i>Evolution de la couleur des vins dans les différentes modalités : suivi par spectrophotométrie UV-visible.....</i>	138
A.	Stabilité du vin vieilli en conditions « cave ».....	138
B.	Vieillissement accéléré non oxydatif.....	139
C.	Influence de la présence d'oxygène sur le vieillissement accéléré.....	140
D.	Conclusion et retour sur les vins vieillis naturellement	142
III.	<i>Evolution des composés du vin</i>	143
A.	Mise en évidence de différents types de marqueurs.....	143
B.	Précurseurs sensibles à l'oxydation	145
1.	Caractérisation structurale.....	145
2.	Evolution des marqueurs d'oxydation dans les différents modes de vieillissement.....	145
3.	Cinétiques de disparition des précurseurs majeurs.....	146
C.	Marqueurs de vieillissement thermique.....	148
1.	Formation des marqueurs en conditions non oxydatives	148
2.	Cinétique d'évolution des marqueurs au cours du vieillissement et influence de l'oxygène	148
3.	Caractérisation des marqueurs de vieillissement thermique	150
IV.	<i>Corrélation évolution de la couleur/évolution des composés</i>	156
V.	<i>Comparaison avec une oxydation chimique par le periodate.....</i>	156
A.	Mécanisme d'oxydation par le periodate de sodium.....	156

B.	Evolution de la couleur	157
C.	Evolution des composés	158
VI.	<i>Recherche des marqueurs et précurseurs dans les vins oxydés naturellement</i>	<i>159</i>
	Chapitre II: Oxydation des polyphénols En milieu modèle et test prédictif	162
I.	<i>Influence de la composition polyphénolique sur le brunissement</i>	<i>163</i>
A.	Evolution de la couleur	163
1.	Influence de la présence d'un acide phénol	163
2.	Influence de la proportion d'acide protocatéchuque	164
B.	Autoxydation de la solution témoin de catéchine à pH 6,5	165
1.	Caractérisation des produits d'oxydation par CLHP-ESI-TI	165
2.	Structure du produit I'	167
3.	Cinétique d'autoxydation	172
C.	Influence de l'acide protocatéchuque à pH 6,5 sur l'autoxydation de la catéchine.....	175
D.	Conclusion.....	179
II.	<i>Autoxydation de la catéchine par chauffage à pH 3.....</i>	<i>179</i>
A.	Autoxydation de la catéchine en milieu « acétate d'ammonium » à pH 3.....	179
1.	Mise en évidence de produits spécifiques	179
2.	Caractérisation des pigments jaunes	180
B.	Autoxydation en milieu modèle vin à pH 3	183
C.	Conclusion.....	184
III.	<i>Oxydation chimique de la catéchine.....</i>	<i>184</i>
A.	Evolution de la couleur	185
B.	Evolution de la composition polyphénolique	185
C.	Conclusion.....	188
IV.	<i>Test systématique d'étude du brunissement</i>	<i>188</i>
A.	Choix des polyphénols modèles.....	189
B.	Oxydation chimique simultanée des polyphénols : Test prédictif accéléré.....	189
1.	Influence de la présence de plusieurs polyphénols sur leurs oxydations respectives.....	189
2.	Impact de la composition globale sur le brunissement par oxydation.....	194
V.	Conclusion.....	196

PARTIE 3 : ETUDE DES TANINS DE HAUT DEGRE DE POLYMERISATION ET SUIVI D'OXYDATION : DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES

	<i>Chapitre 1: Caractérisation de la distribution en masses de fractions de tanins par analyse MALDI-TOF de complexes protéine-tanin.....</i>	<i>197</i>
I.	<i>Analyse directe des fractions de tanins par MALDI-TOF.....</i>	<i>198</i>
A.	Fraction de tanins hydrolysables	199
B.	Fractions de tanins condensés	200
1.	OPC.....	201
2.	Tanins de pomme	202

C.	Conclusion.....	203
II.	Analyse des complexes protéine-tanin par MALDI-TOF.....	204
A.	Mise au point des conditions d'analyse	204
1.	Sélection de la protéine.....	204
2.	Sélection de la matrice et de la technique de dépôt.....	205
3.	Limite de l'essai en présence d'un excès de tanins.....	206
B.	Optimisation du ratio protéine : tanin	206
1.	Affinement des conditions d'analyse : Etude sur la fraction de DP 9,2.....	206
2.	Validation avec les autres fractions tanniques	209
III.	Développement d'une méthode de traitement du signal et modélisation de la distribution en masses	210
IV.	Conclusion.....	214
	Chapitre II: Suivi d'oxydation des polyphénols et étude des tanins de haut DP par Résonance Magnétique Nucléaire.....	216
I.	Suivi d'oxydation par RMN du proton : Apport et limites.....	217
A.	Caractéristiques spectrales des deux molécules modèles par RMN du proton	217
1.	Catéchine	217
2.	Acide caféique	219
B.	Cinétique d'oxydation de polyphénols modèles.....	221
1.	Oxydation de la catéchine.....	221
2.	Application à l'oxydation de l'acide caféique.....	226
C.	Limites de l'analyse RMN 1D1H	232
II.	Inhibition de l'oxydation.....	232
A.	Evaluation préliminaire de l'efficacité	233
B.	Vérification par RMN.....	234
III.	Principe de l'expérience Diffusion Ordered SpectroscopY (DOSY).....	235
IV.	Diffusion translationnelle de petites molécules	235
V.	Calibration de la gamme de coefficients de diffusion translationnelle.....	236
A.	Droite de calibration	236
B.	Application à la fraction de tanins extraits de pomme DPm 9,2.....	238
VI.	Caractérisation des produits d'oxydation par RMN DOSY.....	239
A.	Produits d'oxydation de la catéchine.....	239
1.	Empreinte massique.....	240
2.	Mise en évidence des liaisons covalentes	242
B.	Produits d'oxydation de l'acide caféique	242
VII.	Application de la RMN à la mise en évidence d'un phénomène oxydatif dans les vins blancs de Champagne	244
A.	Approche par analyse monodimensionnelle 1H	245
1.	Caractéristiques globales du spectre 1D ¹ H du Pinot noir.....	245
2.	Oxydation et évolution du spectre 1D ¹ H.....	245
B.	Apport de l'analyse DOSY du vin.....	247
VIII.	Conclusion	248

PARTIE 4 : CARACTERE OXYDE ET SENSIBILITE A L'OXYDATION DE VINS BLANCS DE CHAMPAGNE JEUNES

I.	<i>Définition du caractère oxydé des vins par analyse sensorielle</i>	249
A.	Protocole de dégustation	249
B.	Analyse des résultats	249
II.	<i>Influence relative du cépage et du millésime par rapport au caractère oxydé</i>	251
A.	Colorimétrie	251
1.	Interprétation des axes	252
2.	Typologie des vins	253
B.	Analyse par CLHP-SM	254
1.	Composés majeurs de teneurs variables	254
2.	Influence des différents facteurs	255
C.	Approche RMN 1D¹H et DOSY	258
III.	<i>Sensibilité des cépages à l'oxydation</i>	261
A.	Sensibilité à l'oxydation et approche colorimétrique	261
1.	Structure du fichier de données colorimétriques	261
2.	Interprétation des axes	261
3.	Typologie des vins	263
B.	Sensibilité à l'oxydation et composition polyphénolique	264
IV.	<i>Conclusion</i>	267
	<i>Conclusion et Perspectives</i>	269
	<i>Références</i>	273
	<i>Annexes</i>	284

Valorisation des travaux de recherche

Publications

C. Mané, N. Sommerer, T. Yalcin, V. Cheynier, R.B. Cole, H. Fulcrand. Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of tannin-protein complexes, *Analytical Chemistry*, 2007, 79(6), 2239-2248

C. Mané, J.M. Souquet, F. Véran, G. Mazerolles, V. Cheynier, H. Fulcrand, Optimisation of simultaneous flavanol, phenolic acid and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design ; Application to the characterisation of Champagne grape varieties, soumis à *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

H. Fulcrand, S. Preys, C. Mané, G. Mazerolles, C. Bouchut, J.P. Mazauric, J.M. Souquet, E. Meudec, V. Cheynier, Mass spectrometry to characterize polyphenol composition of complex samples, soumis à *Phytochemistry*.

Participation à des congrès internationaux

C. Mané, M.A Delsuc., V. Cheynier, H. Fulcrand, A Nuclear Magnetic Resonance approach to design polyphenol oxidation in Champagne wines, *Macrowine*, Reims (France), 2006. Communication orale.

C. Mané, M.A. Delsuc, V. Cheynier, H. Fulcrand, Monitoring of polyphenol oxidation by NMR approaches, 5th tannin conference, San Francisco (USA), 2006. Poster.

C. Mané, J.M. Souquet, F. Véran, V. Cheynier, H. Fulcrand, Flavanol distribution of the three major champenois varieties : optimisation of extraction using an experimental design, *Oeno 2007*, Bordeaux (France), 2007. Poster.

C. Mané, S. Hernandez, V. Cheynier, H. Fulcrand, Quality of white wines and influence of phenolic acids on browning susceptibility, *In Vino*, Melbourne (Australie), 2007. Communication orale.

H. Fulcrand, C. Morel-Salmi, C. Mané, C. Poncet-Legrand, A. Vernhet, V. Cheynier, Tannins : from reactions to complex supramolecular structures, ASVO seminar "Advances in tannin and tannin management", Adélaïde (Australia) , 2005. Communication orale, texte publié dans le compte-rendu du congrès.

H. Fulcrand, G. Mazerolles, C. Bouchut, S. Preys, C. Mané, V. Cheynier, Mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples, 5th tannin conference, San Francisco (USA), 2006. Communication orale.

J.M. Souquet, F. Véran, C. Mané, V. Cheynier, Optimization of extraction conditions for analysing flavonoids from the different parts of grape cluster. Application to six grape varieties, XXIII International conference on polyphenols, Winnipeg (Canada), 2006. Poster.

Intervention réunions transversales INRA

S. Baudoin, C. Mané, Cheynier V., H. Fulcrand, Etude de l'autoxydation de la catéchine en solution modèle, journées polyphénols-micronutriments, Avignon (France), 2004. Communication orale.

C. Mané, V. Cheynier, H. Fulcrand, Vins de Champagne et oxydation des polyphénols, journées polyphénols-micronutriments, Rennes (France), 2005. Communication orale.

Liste des abréviations

AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
CIVC	Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne
1D	monodimensionnel
¹ H	proton
2D	bidimensionnel
ACP	Analyse en Composante Principale
ATR	Attenuated Total Reflexion
<i>cis</i>	isomérisation Z
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPG	Chromatographie par Perméation de Gel
DGm	Degré de Galloylation Moyen
DMAC	4-DiMethyl-Amino-Cinnamaldéhyde
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DOSY	Diffusion Ordered SpectroscopY
DP	Degré de polymérisation
DPm	Degré de Polymérisation Moyen
EAG	Equivalent Acide Gallique
EGCG	EpiGalloCatéchine Gallate
ESI	Ionisation ElectroSpray
GRP	Grape Reaction Product
GSH	Glutathion
HMBC	Heteronuclear Multi-Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IRTF	spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mM	millimole par litre
p.f.	Poids Frais
PPO	PolyPhénolOxydase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY
SM	Spectrométrie de Masse
TFA	acide trifluoroacétique
TI	Trappe Ionique
TOCSY	Total Correlation SpectroscopY
<i>trans</i>	isomérisation E
uma	unité de masse
UV	UltraViolet

Position du sujet de thèse

L'oxydation, processus touchant certains composés organiques en présence d'oxygène, peut avoir des conséquences aussi bien bénéfiques que néfastes sur la qualité finale d'un vin. Elle contribue en effet à la formation d'arômes complexes appréciés, mais est à l'origine dans certains cas de l'apparition d'un « caractère oxydé », associé à une dépréciation du vin. Cette dégradation oxydative des vins, encore mal connue, est un problème rencontré par les producteurs de vin de toutes les régions du monde et peut avoir des incidences économiques non négligeables.

Les vins de Champagne sont élaborés dans des conditions favorables à des oxydations qui ne sont ni excessives, ni brutales ; les vendanges sont manuelles, la vinification et la maturation sont une succession d'étapes, généralement à basse température, où l'oxydation est lente et progressive. Pourtant, même si leur fréquence reste très faible, les problèmes de défaut lié au « caractère oxydé » n'épargnent pas les vins de cette région.

L'objectif des producteurs de Champagne est donc de comprendre les phénomènes d'oxydation afin de pouvoir les maîtriser durant la vinification et le stockage des bouteilles, et favoriser ainsi le développement positif des vins.

La couleur constitue un critère important pour l'appréciation du « caractère oxydé ». Elle varie du jaune ou vert pâle à des nuances ambrées, reflétant généralement l'état d'oxydation du vin. Ainsi dans les vins blancs secs, et en particulier dans les vins de Champagne, une couleur soutenue est généralement perçue comme l'indice d'une oxydation excessive qui peut se traduire par ailleurs par une dépréciation de l'arôme.

D'un point de vue chimique, les polyphénols sont susceptibles d'être impliqués dans ce phénomène d'oxydation, et seraient les précurseurs des pigments formés lors du brunissement. Les apports en oxygène subis par le vin lors de son élaboration et sa conservation jouent un rôle important dans ces évolutions. Cependant, ils ne permettent pas d'en expliquer le caractère aléatoire. L'objectif de la thèse est donc de mieux comprendre la contribution des polyphénols dans le « caractère oxydé » des vins blancs défectueux.

Cette étude a été co-financée par le Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne et la société Moët & Chandon pour tenter de répondre aux attentes des professionnels.

Réalisé au sein de l'équipe « Systèmes Supramoléculaires Impliquant les Polyphénols » de l'UMR Sciences Pour l'Oenologie, ce travail s'intègre dans la thématique développée par l'équipe qui vise à acquérir des connaissances sur la structure chimique des composés polyphénoliques du raisin et du vin, les mécanismes réactionnels qui les génèrent, les phénomènes physico-chimiques impliquant ces composés dans les vins, leurs incidences sur la qualité et la typicité des vins et leur modulation par les procédés technologiques.

Après un état des connaissances sur l'élaboration des vins de Champagne, leurs constituants et les apports d'oxygène, ainsi que sur l'oxydation des polyphénols, l'étude s'articule autour de quatre axes de recherche :

Axe 1 : Analyse de la composition polyphénolique des raisins et vins blancs de Champagne

Jusqu'à aujourd'hui, très peu de travaux portant sur la composition polyphénolique des vins de Champagne sont disponibles dans la littérature. Il convient donc dans un premier temps de caractériser les polyphénols de vins blancs champenois tant d'un point de vue structural que quantitatif. L'investigation de ces composés met en œuvre des méthodes analytiques variées qui, après un éventuel développement, ont été appliquées à la recherche de marqueurs dans des vins effervescents plus ou moins oxydés.

En amont, la composition polyphénolique des cépages champenois ainsi que la distribution dans les différents compartiments de la baie de raisin a été étudiée, l'objectif étant de proposer des hypothèses concernant la potentialité d'un vin à bien ou mal vieillir.

Axe 2 : Modélisation de l'oxydation des polyphénols

Suite à l'analyse du matériel champenois, un axe de recherche s'est orienté vers un travail en systèmes modèles, d'une part sur la conduite de vieillissements accélérés d'un vin blanc de Champagne en conditions oxydatives ou non, d'autre part sur l'oxydation de polyphénols avec en particulier la recherche d'un test prédictif du brunissement et l'effet des proportions en différentes classes de composés polyphénoliques. Il est important de souligner que le vieillissement inclut à la fois des phénomènes oxydants impliquant l'oxygène et non

oxydants (hydrolyse, réaction de Maillard,...). Par conséquent, les réactions d'oxydation conduisent à des changements de couleur et de saveurs différents de ceux obtenus durant un phénomène exclusivement non oxydant.

Axe 3 : Développement de méthodologies innovantes pour l'étude des tanins de haut degré de polymérisation et autres produits d'oxydation

Ce troisième thème de recherche, né des conclusions de l'analyse du matériel champenois, concerne le développement de méthodes d'analyse des produits d'oxydation des polyphénols et tanins de haut degré de polymérisation.

Axe 4 : Etude du caractère oxydé et de la sensibilité des cépages à l'oxydation à partir de vins monovariétaux de Champagne

Ce dernier axe de recherche a pour objectif de vérifier si les méthodes mises en œuvre dans l'axe 3 et qui ont atteint un stade de développement permettant leur application aux vins sont capables de différencier les modalités oxydée et non oxydée d'un même vin. Par ailleurs, l'étude a été élargie à la recherche de corrélations entre la sensibilité à l'oxydation des cépages évaluée au moyen de tests sensoriels et les indices de couleurs ou la composition polyphénolique.

Chapitre I

De la baie de raisin au Champagne

De par ses qualités et sa notoriété, le Champagne est le vin effervescent de référence pour les autres vins effervescents de France et du monde entier. Sa production, commencée au XVIII^e siècle, est proche de 300 millions de bouteilles par an aujourd'hui, soit 7 % du marché mondial des mousseux, la concurrence venant de l'Espagne, de la Californie, de l'Australie, et de la Nouvelle-Zélande.

I. Terroir et Cépages

La zone d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) « Champagne » s'étend sur les départements de l'Aisne, la Marne, la Seine-et-Marne, l'Aube et la Haute-Marne, et couvre 34000 hectares. Sa particularité est de se découper en deux zones géographiques distinctes : la Montagne de Reims, la vallée de la Marne, la côte de Sézanne et la côte des Blancs d'une part, le Bar Sequanais de l'autre (Figure 1).



Figure 1: Carte du vignoble champenois (www.champagne-de-france.com)

L'AOC Champagne autorise trois cépages majeurs dans l'élaboration des vins : un blanc, le Chardonnay, et deux rouges, le Pinot noir et le Pinot meunier, qui représentent, de façon quasi égale, à eux trois plus de 99 % du vignoble.

Le Pinot noir est décrit comme apportant aux vins puissance, structure et arômes de fruits rouges, tandis que le Pinot meunier leur apporte fruité, souplesse et rondeur, et le Chardonnay fraîcheur et finesse.

II. Elaboration du Champagne

L'élaboration du Champagne est composée de sept temps forts dont les règles sont fixées dans le cadre de l'AOC Champagne (Figure 2). Au cours de ce procédé, les moûts et vins évoluent en conditions plus ou moins oxydatives et les apports d'oxygène ne sont pas réguliers.

Ce paragraphe est donc dédié à la description des différentes étapes de l'élaboration (principe, objectif, caractéristiques), avec en particulier des précisions quant à l'apport de l'oxygène et les mesures de prévention mises en œuvre contre les phénomènes d'oxydation.

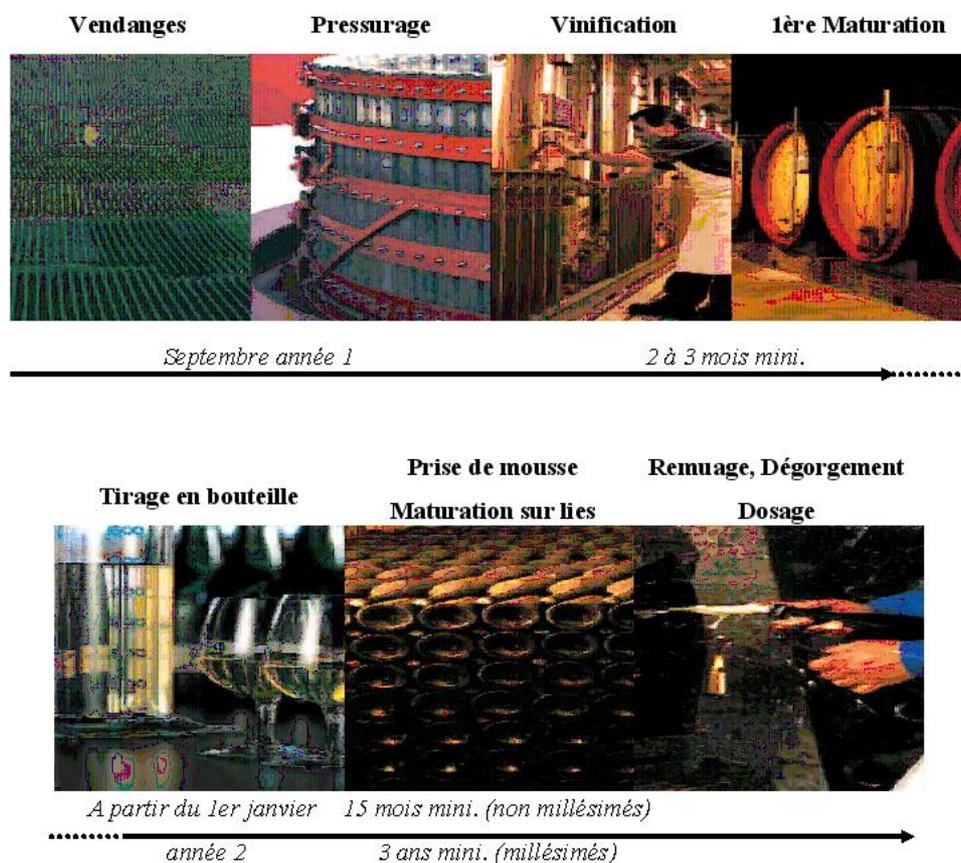


Figure 2 : Temps forts de l'élaboration du Champagne

A. Vendanges

Chaque année, un arrêté préfectoral fixe la date d'ouverture des vendanges en fonction du degré de maturité des raisins, ainsi que le rendement à l'hectare autorisé pour l'Appellation Champagne sur proposition du Comité Interprofessionnel de Vins de Champagne.

Pour conserver l'intégrité de la baie de raisin, l'AOC Champagne déconseille l'utilisation de machine à vendanger et les vendanges se déroulent donc manuellement. De plus, toujours dans le souci d'éviter l'écrasement des raisins et de réduire les contacts des jus avec les pellicules et les rafles, les grappes sont récoltées dans des paniers larges et peu profonds, percés de trous destinés à éliminer le jus éventuellement apparu.

B. Pressurage et extraction des moûts

La nécessité de ne pas extraire la couleur des raisins de cépages rouges que sont le Pinot meunier et le Pinot noir implique que l'extraction des jus soit réalisée de façon douce et progressive.

De plus, l'appellation impose un fractionnement des jus à l'origine d'une sélectivité supplémentaire : un marc de 4 tonnes de raisin doit produire 20,5 hL de cuvée et 5 hL de taille. Le premier jus, ou cuvée, est obtenu par trois presses successives et discontinues. Il est composé de jus issus du centre des baies de raisin, est plus acide, et se caractérise par des arômes subtils, discrets dans les vins jeunes mais qui permettront de révéler des arômes tertiaires lors de la maturation sur lies. Après la troisième retroussée, opération qui consiste à retourner le contenu du pressoir entre deux pressurages, est extraite la taille, jus plus fruité, moins acide, et plus riche en polyphénols.

Afin de limiter l'oxydation du moût au contact de l'air, le vinificateur procède généralement à une étape de sulfitage goutte à goutte (5 à 10 g.hL⁻¹) en sortie de pressoir tout au long du pressurage. Cependant certaines maisons de Champagne préfèrent un sulfitage en fin de pressurage seulement, laissant ainsi place à une forte oxydation des moûts. Après débouillage, étape de sédimentation naturelle, et décantation des particules, les moûts sont soutirés et acheminés en cuverie.

C. Vinification

1. Fermentation alcoolique

Lors de cette fermentation, les moûts évoluent en vins sous l'action des levures qui consomment les sucres, produisant ainsi de l'alcool et des arômes floraux et fruités caractéristiques des vins jeunes. Pendant cette phase qui se déroule à une température comprise entre 16 et 20°C, le vin est protégé de l'oxydation dans la mesure où l'oxygène contenu initialement dans la cuve pour empêcher un arrêt intempestif de la fermentation est consommé par les levures. Si la teneur du moût en alcool n'est pas suffisamment élevée, une étape de chaptalisation, soit une addition de sucre, précède la fermentation alcoolique.

2. Fermentation malolactique

Une deuxième évolution en cuves, la fermentation malolactique, transforme l'acide malique en acide lactique, et apporte au vin des notes aromatiques briochées et beurrées.

La fermentation malolactique est généralement recherchée en Champagne, même si certains élaborateurs l'empêchent totalement ou la conduisent sur une partie de leurs vins seulement. Elle modifie en effet la typicité des vins dans la mesure où l'acide lactique confère une acidité plus douce que l'acide malique à l'acidité type fruit vert, et produit des composés responsables des notes lactées qui évoluent au fil du temps.

Auparavant, cette fermentation était déclenchée par une hausse de la température pendant quelques mois qui s'avérait préjudiciable à la conservation des vins. Aujourd'hui l'utilisation de bactéries sélectionnées permet un démarrage rapide de cette fermentation qui est conduite à une température comprise entre 18 et 20°C.

D. Première maturation

1. L'assemblage

La technique d'assemblage est au cœur de la stratégie en Champagne. Elle combine les crus, les cépages, les cuvées, les tailles et les vins de réserve pour créer un style propre à chaque maison de Champagne par anticipation de l'évolution des vins en cave et la date

probable à laquelle il atteindra le style recherché. Aucune analyse chimique n'est à ce jour disponible pour orienter l'élaborateur dans cet exercice de création.

2. Les vins de réserve

En Champagne, les vins de réserve sont utilisés dans la plupart des assemblages à l'exception des cuvées millésimées qui portent la date de leur récolte. Gardés chaque année pour leur « bon potentiel d'évolution », leur rôle est d'abord de pérenniser le style de chaque cuvée d'une année sur l'autre. Ils sont conservés environ 2 à 3 ans, parfois sur lies fines, généralement dans des cuves à température basse (12 à 13°C) à l'abri de l'oxygène.

Mais ils apportent aussi une assise à l'assemblage par leur caractère de vins évolués et dans ce cadre, les vins sont maintenus en cuve sur des durées plus longues pouvant aller jusqu'à 10 ans.

Le pourcentage des vins de réserve peut atteindre jusqu'à 40 % dans un assemblage, d'où la difficulté d'attribuer un âge précis à ces Champagnes non millésimés.

3. Préparation des vins et stabilisation par le froid

A l'issue des fermentations et éventuellement après assemblage, les vins sont clarifiés par collage, filtration sur kieselguhr ou centrifugation. Ces opérations dynamiques du procédé, qui se déroulent sur plusieurs mois, engendrent des contacts avec l'oxygène lors de chaque transfert du vin, participant ainsi à son évolution. Les apports d'oxygène lors d'étapes de filtration ou centrifugation sont estimés en moyenne à $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$.¹

Au cours de cette période, le stockage des vins est réalisé le plus souvent à température basse en cuves parfaitement ouillées (= remise à niveau du vin), permettant ainsi de protéger le vin du contact avec l'oxygène. Quelques élaborateurs au contraire, privilégient le stockage dans des fûts ou des foudres en chêne, de façon à favoriser une oxydation ménagée qui apporte au vin de la rondeur et du gras.

La stabilisation à froid consiste à refroidir les cuves à $-4,5^\circ\text{C}$ pendant 8 à 10 jours afin d'obtenir la limpidité et la stabilité du futur vin par précipitation du bitartrate de potassium. L'apport d'oxygène est évalué en moyenne à $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ pendant cette étape.¹

De l'assemblage jusqu'à la mise en bouteilles, l'apport d'oxygène est généralement compris entre 3 et 5 mg.L⁻¹, mais peut être multiplié par deux ou trois dans les cas extrêmes, si aucune précaution n'est prise, particulièrement lors des phases critiques de soutirage des cuves par pompage et éventuellement de transport des vins clarifiés.¹

E. Prise de mousse

Le phénomène de la prise de mousse est aujourd'hui maîtrisé grâce à une double fermentation instaurée par les Champenois.

Au moment du tirage en bouteilles, sucre et levures sont ajoutés ce qui permet la production d'alcool, gaz carbonique, alcools supérieurs et esters. Le gaz carbonique formé provoque une montée de la pression à l'intérieur de la bouteille. La réussite de cette deuxième fermentation tient à la bonne multiplication des levures et à leur activité, de sorte que le sucre soit totalement consommé et la pression désirée atteinte. De plus, les bouteilles sont couchées dans des caves thermostatées à 12°C ce qui permet d'avoir une surface du dépôt de levures suffisante pour faciliter leur multiplication.

A l'embouteillage, l'oxygène présent dans une bouteille a trois origines : l'oxygène initialement dissout dans le vin suite aux opérations précédentes, celui apporté par l'opération d'embouteillage elle-même, et enfin l'oxygène présent dans l'espace de tête et qui se dissout progressivement dans le vin. La teneur des vins en oxygène dissout à la mise en bouteille est comprise entre 2 et 7 mg.L⁻¹ en moyenne et l'espace de tête représente un apport potentiel de 9,8 mg.L⁻¹ au maximum.² Les levures consomment l'oxygène présent dans la bouteille au tirage en quelques jours, assurant une protection du vin contre l'oxydation.

F. Maturation sur lies

Les lies sont constituées essentiellement par des levures qui se sont multipliées dans la bouteille et forment le dépôt. A l'issue de la prise de mousse, les levures meurent progressivement et s'autolysent. Leur contenu cellulaire se dégrade et libère des molécules qui interagissent avec celles du vin et subissent de lentes transformations. Parallèlement à

l'autolyse, une quantité infime d'oxygène pénètre dans la bouteille au travers du bouchage de tirage tandis que du dioxyde de carbone s'échappe. L'étanchéité n'est pas absolue et le choix du bouchage est essentiel selon que l'on cherche une évolution rapide ou non. L'apport d'oxygène dans les vins est comprise entre 0,4 et 1,7 mg par an suivant la capsule utilisée.²

En Champagne, la législation fixe une durée minimale de quinze mois de maturation sur lies, mais la durée moyenne observée est de 2 à 3 ans pour les cuvées non millésimées et de 4 à 10 ans pour la plupart des millésimes.

G. Remuage, dégorgement, et dosage

Pour éliminer le trouble généré par les levures dans la bouteille, la maturation est suivie d'une étape de remuage. Celui-ci consiste à faire descendre progressivement le dépôt de levures dans le col de la bouteille pour pouvoir l'expulser, après congélation du col dans une saumure à -25°C, lors du dégorgement. Pendant ces quelques secondes d'ouverture de la bouteille, l'oxygène entre brutalement en contact avec le vin favorisant les réactions d'oxydation. La teneur moyenne en oxygène dissout après cette opération est en moyenne de 1 mg.L⁻¹ mais peut atteindre jusqu'à 5 mg.L⁻¹ en fonction du procédé de remise à niveau du vin après dosage, et les quantités d'oxygène disponibles pour le vin en incluant l'espace de tête est estimée entre 1,4 et 10 mg.L⁻¹.²

Le dosage est la dernière touche apportée au vin avant bouchage final. Son but est d'arrondir le vin dépourvu de sucre en fin de fermentation par l'ajout de liqueur de dosage (vins vieux, sucres). La quantité de sucre ainsi introduite détermine une gamme de vins allant de l'extra brut au doux (Tableau 1).

	Sucre ajouté (g.L⁻¹)
<i>Extra Brut</i>	0-6
<i>Brut</i>	6 - 15
<i>Extra Dry</i>	12 - 22
<i>Sec</i>	17 - 35
<i>Demi Sec</i>	33 - 50
<i>Doux</i>	50 - 100

Tableau 1 : Liqueur d'expédition et type de Champagne

III. Composition du Champagne

La composition précise des Champagne varie avec les terroirs et les années, mais de façon générale, elle est semblable à celle des vins blancs, avec un degré alcoolique de 12 à 13 après ajout de liqueur, de fortes concentrations en acides organiques, glycérol, et sucres, et de plus faibles teneurs en macromolécules (polysaccharides, protéines), polyphénols, acides aminés, et composés volatils.

Outre l'oxygène, directement impliqué dans l'oxydation des polyphénols, les familles de composés citées ci-dessus sont susceptibles d'influencer ce phénomène ou de contribuer au « caractère oxydé ». Ainsi, les paragraphes suivants les décrivent succinctement dans le cadre des vins de Champagne.

A. Acides organiques et matière minérale

De nombreux acides organiques, issus de la pulpe ou formés au cours des phénomènes de fermentation, sont présents en quantités notables dans les vins, les principaux acides rencontrés étant les acides tartrique, malique, et lactique (Tableau 2). La teneur en acide tartrique est généralement de 1 à 5 g.L⁻¹ de vin, tandis que la teneur en acide malique est plus faible et comprise entre 0 et 1,5 g.L⁻¹.³

	Teneur (g.L ⁻¹)
<i>acide tartrique</i>	2,4
<i>acide malique</i>	0,3
<i>acide gluconique</i>	0,06
<i>acide lactique</i>	3,9

Tableau 2: Teneur en acides organiques d'un Champagne brut non millésimé commercialisé en 2006

Les acides organiques sont localisés essentiellement dans la pulpe des baies de raisin et leur concentration est nulle dans le pépin.

La teneur en substances minérales, issues des baies de raisin, dépend de la nature du sol, de la méthode de culture, des conditions climatiques, mais trois sont présentes

majoritairement dans les vins : le potassium, le calcium et le magnésium, dans cet ordre. A côté de celles-ci, on retrouve de nombreux oligoéléments tels que fer, cuivre, bore, silicium, aluminium, manganèse, zinc, nickel, ou encore chrome, qui sont susceptibles de catalyser les réactions d'oxydation.

B. Levures

La technique de remuage puis dégorgement ne permet pas l'élimination totale des levures dans le vin. La population levurienne résiduelle s'élève entre $0,16 \cdot 10^3$ et $4,8 \cdot 10^3$ cellules par millilitre.⁴

C. Constituants azotés

Les vins de Champagne sont particulièrement riches en composés azotés, ce qui constitue un paramètre majeur influençant la fermentation et les propriétés moussantes du vin telle que la stabilité.⁵

Plus précisément, la teneur en azote total d'un vin de Champagne varie de 150 à 600 mg.L⁻¹,⁶ l'azote aminé libre représentant 20 à 32 % de l'azote total,⁷ et la teneur en protéines varie de 10 à 30 mg.L⁻¹ en équivalent BSA.⁸

Le vin renferme aussi des glycoprotéines issues du raisin et des levures. Cette famille de protéines, essentiellement constituée par l'invertase de raisin, représente 9 à 14 % de la teneur totale en protéines dans les vins blancs de Champagne.⁹

D. Polyphénols

Les polyphénols apparaissent également comme des constituants mineurs des vins. Leur teneur a été évaluée par méthode colorimétrique entre 176 et 195 mg.L⁻¹ équivalent acide gallique (EAG) dans des vins de Champagne monovariétaux de Chardonnay et Pinot noir.¹⁰ Les acides hydroxycinnamiques sont les représentants majeurs des polyphénols dans ces vins.¹⁰

E. Polysaccharides

Au cours de la transformation du raisin, les polysaccharides contenus dans les parois cellulaires végétales sont libérés par dégradation et hydrolyse enzymatique des parois. Ils se retrouvent ainsi dans les vins sous forme de polymères linéaires ou ramifiés, et peuvent être liés à une protéine. Leur teneur varie de 10 à 120 mg.L⁻¹.⁸ Toutefois, la source majeure de polysaccharides provient des levures. Celles-ci provoquent, dès le début de la fermentation alcoolique un enrichissement du vin en polysaccharides riches en mannose, qui se poursuit avec l'élevage sur lies dans les bouteilles de champagne.¹¹

Les monosaccharides les plus rencontrés dans le vin sont le glucose, le galactose, le mannose, le fructose, et l'acide galacturonique.

F. Composés volatils

Les composés volatils contenus dans les vins de Champagne sont issus de la fermentation et interviennent dans l'arôme des vins. Les vins de Champagne se caractérisent par une très faible teneur en méthanol, alcools supérieurs, propanol, butyrate d'éthyle et acétate d'isoamyle qui ont un effet négatif sur l'arôme.¹² Au contraire le lactate et le caprate d'éthyle issus de la fermentation malolactique sont abondants.¹² Le premier apporte de la rondeur au vin tandis que le second confère une odeur de poire.

Chapitre II

Oxydation des vins blancs et contribution des polyphénols

I. Dégradation du potentiel aromatique des vins

Une étude sur le Riesling a montré que la distinction entre les phénomènes de vieillissement et d'oxydation est reflétée à la fois par des considérations sur les arômes et sur la couleur¹³ : les vins de Riesling vieillissés en conditions oxydatives sont en effet caractérisés par des notes noisettes, sherry et fruit cuit accompagnées d'un brunissement, qui apparaissent aux dépens de notes florales et citronnées définissant le vin jeune non oxydé ; au contraire, le même Riesling jeune conservé dans des conditions non oxydatives perd ces notes au profit de notes grillées et de citron cuit, et la couleur évolue vers des nuances dorées. Plus précisément, des études menées sur des vins portugais définis sensoriellement comme étant oxydés montrent que la présence de méthional, eugénol, phenylacétaldéhyde, 1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphtalène, sotolon et 3-méthylthiopropionaldéhyde est corrélée au caractère oxydé de ces vins.¹⁴⁻¹⁶

Par ailleurs, la concentration en acétaldéhyde, produit par le métabolisme des levures mais aussi formé par oxydation de l'éthanol en présence de polyphénols,¹⁷ ne serait a priori pas associée à l'apparition d'un caractère oxydé.¹⁴

Enfin, outre leur implication dans l'évolution de la couleur sur laquelle nous reviendrons par la suite, les polyphénols peuvent intervenir dans l'évolution aromatique dépréciative des vins par des voies autres que l'oxydation. La dégradation des acides hydroxycinnamiques par l'activité cinnamate décarboxylase des levures de vinification conduit en effet à la formation de phénols volatils responsables de défauts olfactifs¹⁸ et dont le seuil de détection est très bas (Figure 3). Les vinyl phénols ainsi obtenus, tels que le vinyl-4-guaïacol et le vinyl-4-phénol issus de la dégradation des acides férulique et p-coumarique, peuvent être réduits en ethyl phénols lors de la fermentation malolactique (lactobacilles) ou

l'élevage des vins (*Brettanomyces*). Ces composés sont associés à des odeurs de « pharmacie », de cuir, ou à des odeurs de fumé, boisé, poivré non souhaitables.

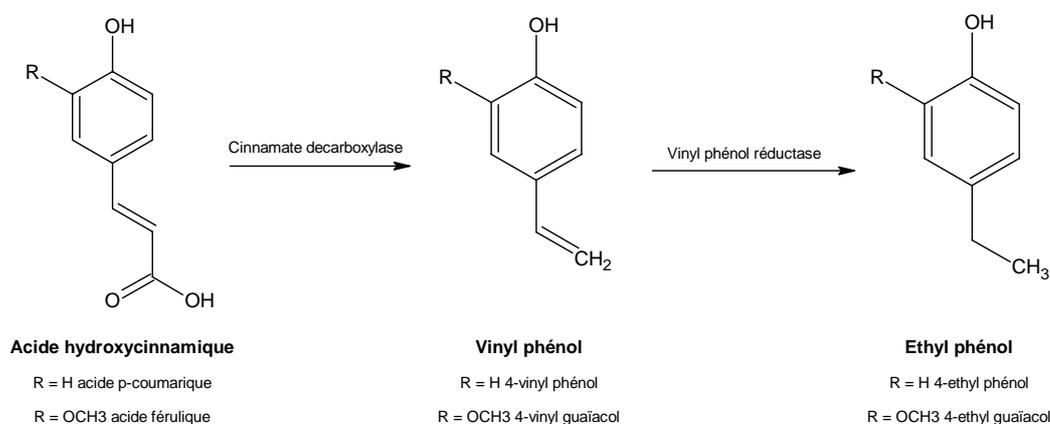


Figure 3 : Formation de phénols volatils par dégradation d'acides hydroxycinnamiques

II. Les polyphénols du raisin

D'un point de vue chimique, les composés phénoliques sont caractérisés par un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles pouvant être acylés ou glycosylés. Leur classification est basée sur la distinction entre composés non flavonoïdes et flavonoïdes.

A. *Les composés non flavonoïdes*

Cette dénomination recouvre principalement dans le raisin, d'une part, les acides phénols, divisés en acides hydroxycinnamiques porteurs d'une chaîne latérale insaturée et acides hydroxybenzoïques, d'autre part, les stilbènes.

1. Les acides phénols

a) *Les acides hydroxycinnamiques*

Dans le raisin, les acides phénols sont principalement des acides hydroxycinnamiques contenus dans les vacuoles des cellules de la pulpe et de la pellicule.¹⁹ Les molécules de base de la série d'acides hydroxycinnamiques sont les acides caféique, coumarique, et férulique dont le squelette carboné est de type C6-C3. Contrairement à la plupart des autres fruits, le

raisin se caractérise par l'existence d'esters tartriques, dont les principaux représentants sont rassemblés dans la Figure 4, et l'absence d'esters quiniques.

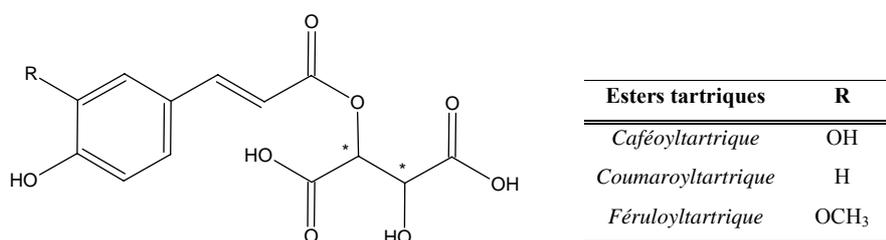


Figure 4 : Structures des principaux esters hydroxycinnamiques dans le raisin

A maturité des baies, les esters tartriques d'acides hydroxycinnamiques sont plus concentrés dans la pellicule, mais la pulpe de par sa proportion dans la baie en contient une plus grande quantité. La teneur globale varie entre 50 et 400 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ selon le cépage.^{20, 21}

Ces acides phénols sont d'autant plus importants qu'ils ont un rôle moteur dans les phénomènes d'oxydation enzymatique conduisant au brunissement des moûts.^{22, 23}

b) Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont constitués d'un squelette à sept carbonés (C6-C1), et hormis l'acide gallique (Figure 5), aucune preuve formelle dans la littérature n'atteste de leur présence dans les baies de raisin. Quant à l'acide gallique, il est repéré à l'état libre, sous forme de glucoside,²⁴ ou plus généralement lié par une liaison ester aux flavanols.

Les formes libres des autres acides éventuellement repérées seraient des artefacts d'extraction ou de préparation d'échantillon.

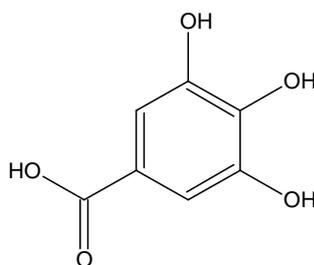


Figure 5 : Structure de l'acide gallique

2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant ainsi un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande stabilité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol,²⁵ et son dérivé glucoside, le picéide²⁶ (Figure 6), accumulés principalement dans la pellicule mais aussi dans les rafles d'où ils peuvent être extraits surtout en cas de macération après pressurage de grappes entières.

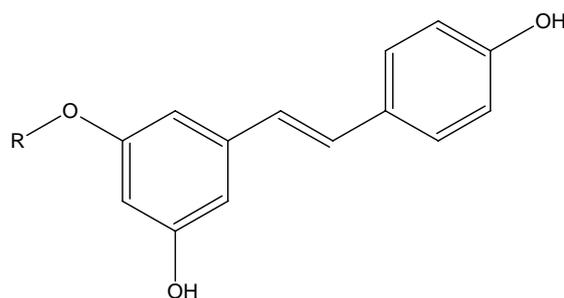


Figure 6 : Structures du resvératrol (R = H) et du picéide (R = glucose)

B. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) de type 2-phényl-benzopyrone (Figure 7). Ce groupe comprend plusieurs familles qui diffèrent par le degré d'oxydation de leur noyau pyranique central (cycle C). Dans le raisin, deux familles de composés sont principalement représentées, les anthocyanes et les flavanols, auxquelles s'ajoutent les familles des flavonols et flavanonols (= dihydroflavonols) présentes à l'état de trace.

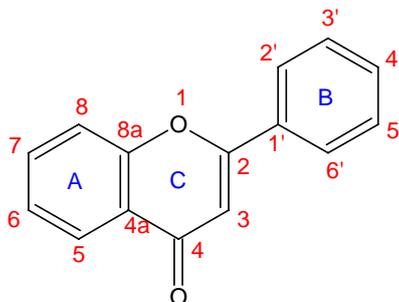
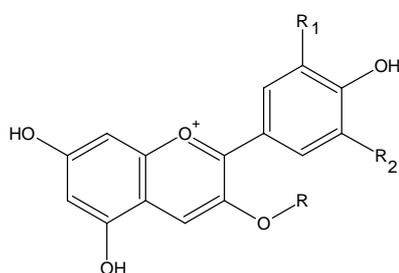


Figure 7 : Structure du noyau 2-phényl benzopyrone

1. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont responsables de la coloration des raisins rouges. Leur structure de base est caractérisée par un noyau flavylum glycosylé en position C-3 (Figure 8). Elles se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, ainsi que par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.



Anthocyanidines	R1	R2
R=H		
<i>Malvidine</i>	OCH ₃	OCH ₃
<i>Péonidine</i>	OCH ₃	H
<i>Delphinidine</i>	OH	OH
<i>Pétudinine</i>	OCH ₃	OH
<i>Cyanidine</i>	OH	H

Forme monoglucoside R=Glucose

Figure 8 : Structures chimiques d'anthocyanidines sous forme de cation flavylum

On distingue cinq anthocyanidines chez *Vitis vinifera* auquel appartiennent les trois cépages champenois : la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine, et la malvidine. Les différentes possibilités d'acylation sur l'ose en position 3 (estérification avec l'acide acétique, l'acide p-coumarique, et l'acide caféique) conduisent à vingt formes détectées.²⁷⁻²⁹ Le dérivé 3,5-diglucoside de la malvidine a également été repéré en spectrométrie de masse dans des extraits pelliculaires de raisin.²⁹ Selon les cépages, la composition en anthocyanes diffère, et le Pinot noir en particulier contient uniquement les formes glycosylées simples. La teneur globale en anthocyanes dans les raisins varie de 0,5 à 3 g.kg⁻¹, et le fait que le taux de chacune d'elles varie avec le cépage est un critère de base pour une classification taxonomique.³⁰

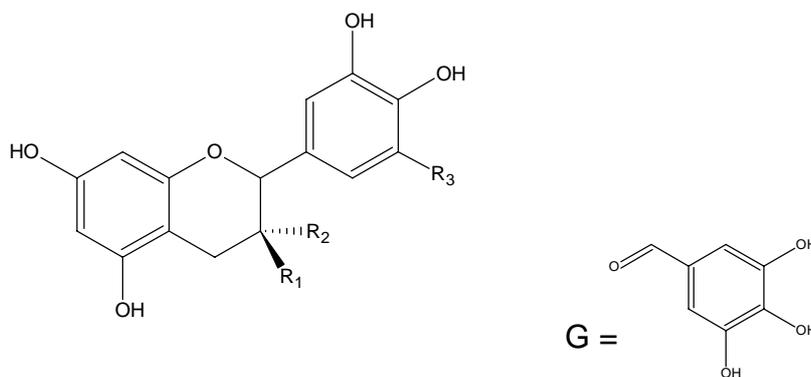
2. Les flavanols

Les flavanols regroupent les monomères et les tanins, nom commun donné aux oligomères et polymères de flavanols qui, du fait de leur affinité avec les protéines, ont des propriétés tannantes.

Les flavanols, et plus particulièrement leurs formes polymères jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques des vins, notamment dans la sensation d'astringence. La pellicule, les pépins, et les rafles sont les zones de concentration de cette famille de composés.

a) Les unités monomériques

Les formes naturelles monomériques des flavanols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3, la présence de substituants galloylés, ainsi que par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Figure 9). On distingue ainsi les formes dihydroxylées (famille des catéchines, $R_3=H$) des formes trihydroxylées (famille des gallocatéchines, $R_3=OH$). Ces dernières n'ont pas été identifiées dans le raisin sous leurs formes monomériques, mais leur présence dans les formes polymériques, notamment dans les pellicules de *Vitis vinifera*, suggère leur existence sous forme de monomère.³¹



Monomères	R1	R2	R3
<i>Catéchine</i>	H	OH	H
<i>Epicatéchine</i>	OH	H	H
<i>Epigallocatechine</i>	OH	H	OH
<i>Epicatéchine gallate</i>	OG	H	H

Figure 9 : Structure des unités monomériques constitutives des tanins condensés

b) Les tanins condensés

Les oligomères ou polymères de flavanols (Figure 10) qui ont la propriété de libérer des anthocyanidines en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique³² sont appelés proanthocyanidines ou encore tanins condensés. Dans la baie de raisin, on distingue deux types de proanthocyanidines en mélange dans les oligomères et polymères suivant la nature de l'anthocyanidine libérée : d'une part, les procyanidines, polymères de catéchine, épicatechine, et épicatechine gallate qui libèrent de la cyanidine ; d'autre part, les prodelphinidines, polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine qui libèrent de la delphinidine. Dans les pépins, seuls les procyanidines sont présentes,³³ alors que la pellicule³¹ et les tiges³⁴ contiennent à la fois des procyanidines et des prodelphinidines.

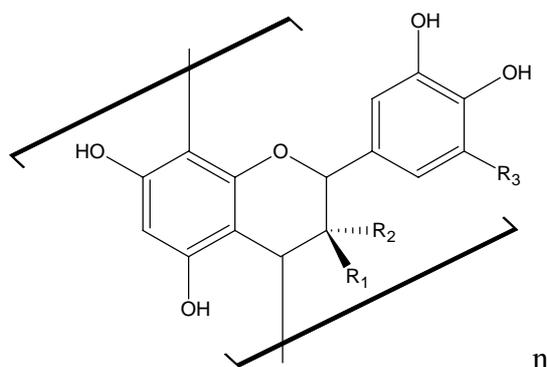


Figure 10 : Structure des tanins condensés

Outre la nature des unités constitutives, les tanins condensés se différencient par le nombre d'unités monomériques, appelé degré de polymérisation (DP), ainsi que par le type et la position des liaisons intermonomériques. Les proanthocyanidines de type B se caractérisent par une liaison intermonomérique entre le C4 de l'unité supérieure et le C6 ou le C8 de l'unité inférieure, de configuration *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C3. Les proanthocyanidines de type A présentent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C2 de l'unité supérieure et l'un des groupements hydroxyles en position 5 ou 7 du noyau A inférieure.

Les études sur les pépins,³³ les rafles³⁵ et la pellicule³¹ ont mis en évidence des tanins de degré de polymérisation moyen (DPM) largement supérieur dans le cas des pellicules

(environ 30 unités). D'un point de vue structural, une trentaine de proanthocyanidines dimériques, trimériques et tétramériques ont déjà été identifiées dans le raisin.^{36, 37} Il est à noter que l'existence de proanthocyanidines de type A n'est pas confirmée dans le raisin mais seulement supposée à partir de la comparaison des caractéristiques chromatographiques.^{38, 39}

Dans la pulpe, la présence de monomères et oligomères de flavanols est connue depuis longtemps, et des teneurs de ces composés sont disponibles.^{40, 41} Au contraire, la mise en évidence de tanins de plus haut degré de polymérisation dans ce compartiment de la baie est très récente. Ceux-ci sont caractérisés par une composition proche de celle de la pellicule.⁴²

D'un point de vue quantitatif, la pellicule peut contenir entre 20 et 100 milligrammes de dimères par kilogramme de baies alors que les pépins peuvent en contenir de 60 à 600 milligrammes par kilogramme selon les cépages.^{41, 43} La teneur globale en polymères peut atteindre quelques grammes par kilogramme de baies dans la pellicule et dans le pépin, et quelques centaines de milligrammes par kilogramme de baies dans la pulpe.⁴²

3. Les flavonols

Les flavonols, pigments de couleur jaune, sont présents dans les pellicules des baies de raisin majoritairement sous forme de glucosides en position 3,⁴⁴⁻⁴⁶ même si les formes glucuronides ont été trouvées en quantités importantes. Les aglycones correspondants, en faible quantité dans le raisin, sont rassemblés dans la Figure 11. L'ensoleillement⁴⁷ et le cépage⁴⁶ dans une moindre mesure ont une influence sur la teneur globale en flavonols, qui varie de 10 à 100 mg.kg⁻¹ de baies.

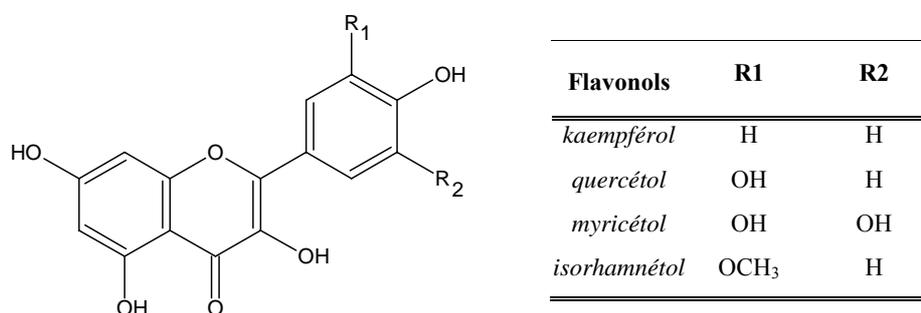


Figure 11 : Structure aglycone des flavonols du raisin

La famille des flavonols est également représentée dans les feuilles,⁴⁸ alors qu'aucun travail ne rapporte leur existence dans la pulpe ou les pépins.

4. Les flavanonols

L'astilbine et l'engeletine sont les représentants de la famille des flavanonols dans le raisin (Figure 12). Ils ont été identifiés pour la première fois dans la pellicule des baies de cépages blanc de Sémillon, Chenin blanc, Thompson sans pépin et French Colombard,⁴⁹ où leurs concentrations sont de l'ordre de 9 mg.kg^{-1} pour l'astilbine et $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$.⁵⁰ Par la suite, la présence de cette famille de composés a été attestée dans les marcs de Chardonnay,²⁴ et les rafles de Merlot par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.⁵¹

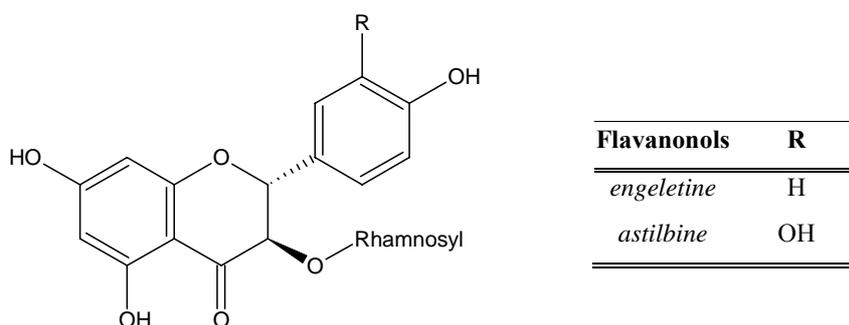


Figure 12 : Structure des flavanonols

III. Réactivité des polyphénols⁵²

A. Réactivité des différents types de noyaux aromatiques rencontrés dans les polyphénols

La réactivité des composés phénoliques est fondamentalement basée sur la réactivité des noyaux aromatiques qu'ils portent. Cependant, la modification de ces noyaux par des substituants à effet mésomère donneur d'électrons, tel le groupement hydroxyle, ou attracteurs, comme le groupement carboxyle, module largement la réactivité par extension du système de conjugaison.

Si l'on considère un cycle aromatique portant un seul groupement hydroxyle, ce dernier renforce, par délocalisation, la charge électronique sur les positions *ortho* et *para* du cycle faisant apparaître des sites nucléophiles (Figure 13). Cette propriété est à l'origine de l'implication des phénols dans les réactions de substitution électrophiles aromatiques.

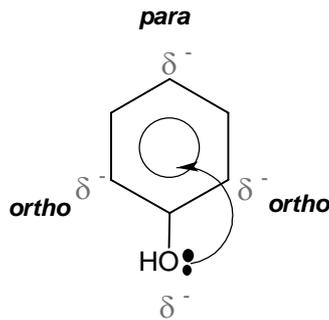


Figure 13 : Activation électronique des sites

Par ailleurs, l'affaiblissement de la densité électronique autour de l'atome d'oxygène augmente l'acidité du groupement hydroxyle, facilitant ainsi la perte du proton. L'anion phénolate obtenu est très réactif.

Dans le cas plus complexe de substitutions multiples du noyau aromatique par des groupements hydroxyles, l'activation des sites nucléophiles dépend non seulement du nombre, mais également des positions relatives des groupes.

La plus forte activation électronique est obtenue lorsque trois groupes hydroxyles sont distribués régulièrement autour du noyau aromatique. Ce noyau appelé aussi « noyau phloroglucinol » est constitutif des composés flavonoïdes où il correspond au noyau A (Figure 14).

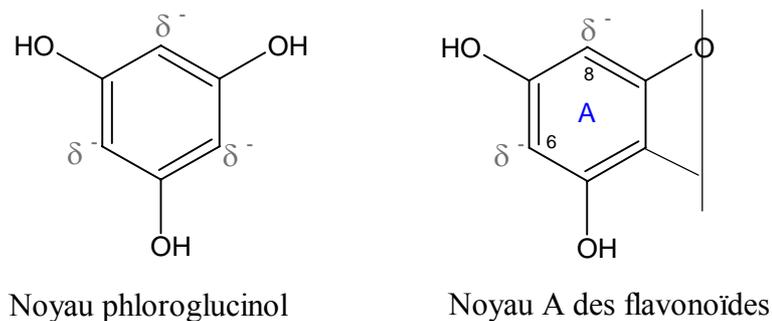


Figure 14 : Structures de type résorcinol

Dans le cas des *ortho*-diphénols, le positionnement des groupements hydroxyles sur deux carbones adjacents du noyau aromatique fait que le système s'oxyde facilement en *o*-quinone.

De la même façon que le noyau phloroglucinol, ce noyau catéchol se retrouve dans la structure des composés flavonoïdes, où il est dénommé « noyau B », ainsi que dans celle des acides phénols majeurs.

B. Oxydation

En conditions naturelles, les polyphénols subissent deux types d'oxydation : l'oxydation enzymatique et l'autoxydation. Cependant, une approche par voie chimique peut être également utilisée, afin de reproduire ces phénomènes naturels en solutions modèles.

1. Voies d'obtention des formes oxydées (*o*-semiquinone, *o*-quinone)

Selon le système oxydant, l'oxydation se déroule par succession de transferts mono-électroniques avec formation d'intermédiaires radicalaires (autoxydation catalysée par les cations métalliques), ou par oxydation bi-électronique (voies enzymatique et chimique) (Figure 15).

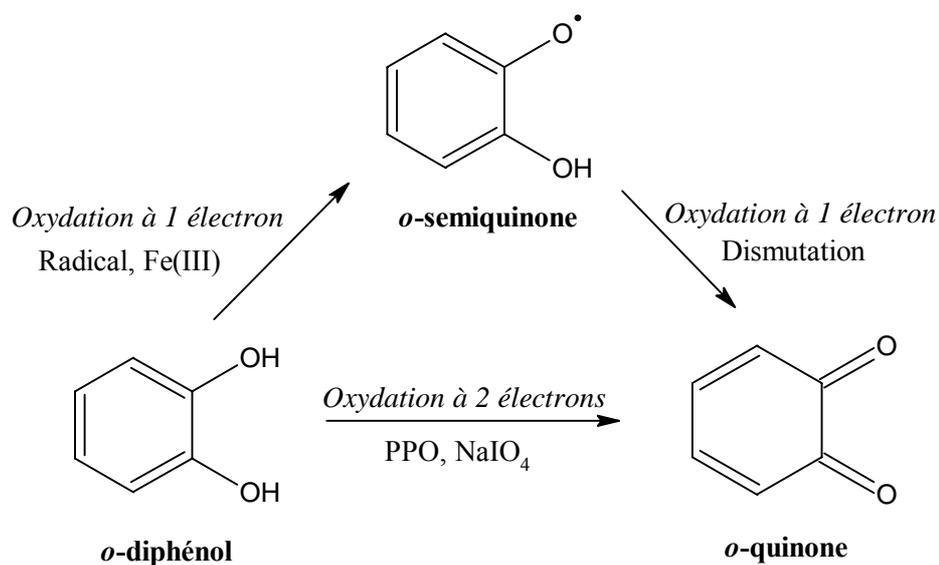


Figure 15 : Principe de l'oxydation des polyphénols avec un noyau catéchol

a) Autoxydation

La réactivité des phénols avec le dioxygène de l'air conduit à une réaction appelée communément « autoxydation ». Cette réaction implique, outre les polyphénols, des ions

métalliques et génère des radicaux superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et hydroxyle OH^{\cdot} , espèces réactives portant un électron célibataire contrairement à l'oxygène natif. Le radical superoxyde réagit principalement par dismutation pour former du peroxyde d'hydrogène, alors que les voies réactionnelles issues du radical hydroxyles sont plus diversifiées.

La réactivité de ces radicaux vis-à-vis des polyphénols en particulier se traduit par des transferts d'électrons, des réactions d'hydroxylation, la perte d'atome d'hydrogène, ou encore des additions sur les liaisons Π des cycles aromatiques. L'autoxydation des polyphénols est favorisée pour des pH proches de la neutralité, les formes phénolates étant plus facilement oxydables que les phénols eux-mêmes.

En l'absence d'initiateurs tels que la lumière et le rayonnement ultraviolet en particulier, ou bien des cations métalliques comme le Fe(II), l'autoxydation est malgré tout peu favorable.

b) Oxydation enzymatique

La catécholoxydase, encore appelée polyphénoloxydase (PPO), est la principale enzyme impliquée dans la dégradation des polyphénols contenus dans les moûts. Elle catalyse, sous l'effet conjoint d'un co-substrat, le dioxygène, l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols, et l'oxydation de ceux-ci en *o*-quinone⁵³ (Figure 16).

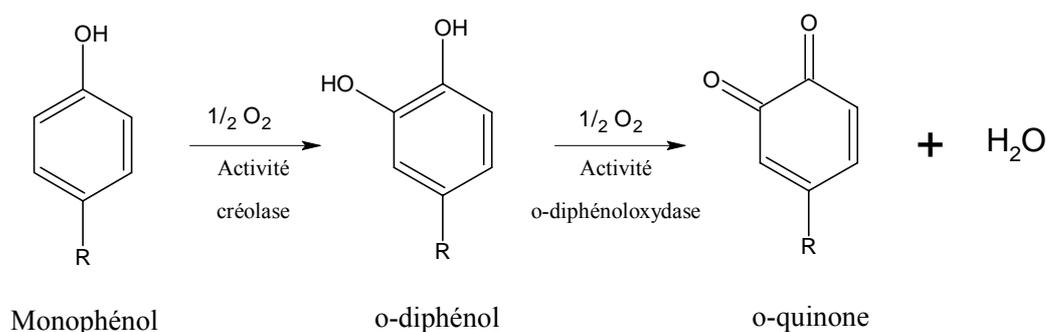


Figure 16 : Activité de la PPO

Parmi les composés phénoliques du raisin, l'acide caftarique (caféoyltartrique) est le substrat préférentiel de la PPO.⁵⁴ Dans une moindre mesure, la catéchine est également substrat de cette enzyme.

Les *o*-quinones ainsi formées sont de couleurs diverses (jaune, brun, rouge brique) et sont très instables, puisqu'à la fois oxydants et fortement électrophiles.

c) Oxydation chimique

Diverses molécules sont utilisées pour leurs propriétés oxydantes en chimie organique. Parmi elles, l'*o*-chloranile, le nitrate de cérium ammoniacal, et le periodate de sodium ont été testés pour oxyder l'acide caféique, et le periodate est apparu comme étant l'oxydant mimant au plus près le processus naturel d'oxydation enzymatique des polyphénols.⁵⁵

2. Principales réactions des formes oxydées

Liés à la réactivité des noyaux aromatiques composant les polyphénols, deux mécanismes réactionnels sont en compétition : les réactions d'oxydo-réduction qui impliquent des réducteurs tels que d'autres *o*-diphénols, l'acide ascorbique ou des sulfites, et les additions nucléophiles qui peuvent avoir lieu en présence de nucléophiles tels que des thiols ou des phénols (Figure 17). A cela s'ajoute la possibilité de couplage radicalaire à partir des semiquinones générées par dismutation inverse à partir d'un *o*-diphénol et d'une *o*-quinone.

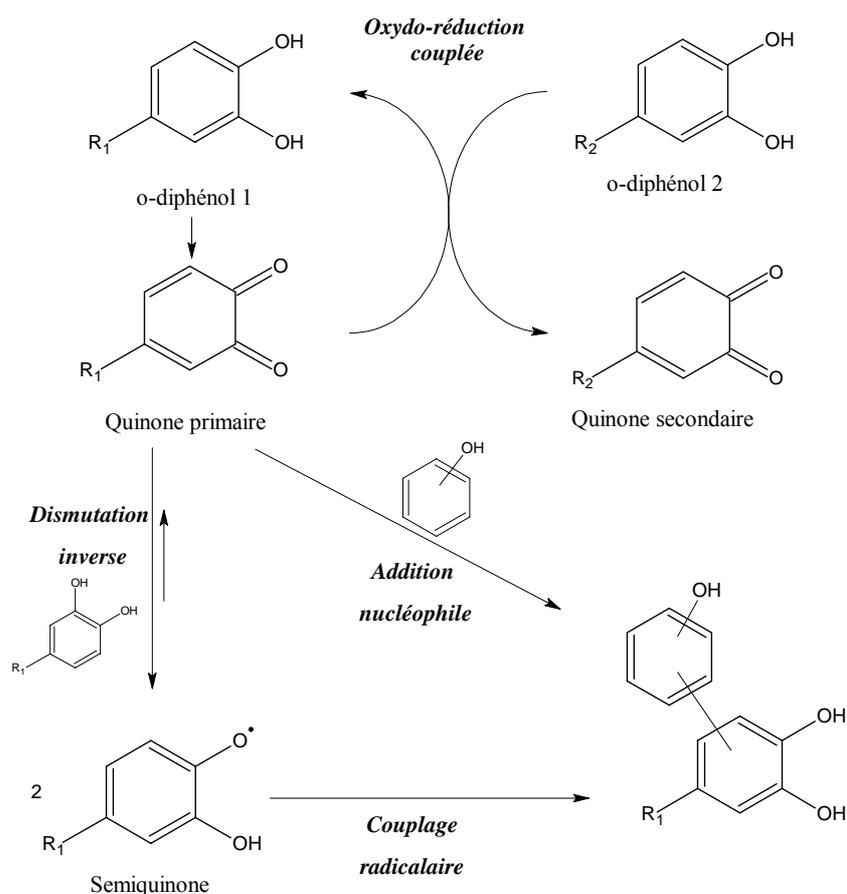


Figure 17 : Mécanismes réactionnels impliquant les *o*-quinones

La polymérisation des polyphénols qui résulte d'additions nucléophiles ou de couplages radicalaires apparaît comme prépondérante dans le cas de la catéchine comme montré dans de nombreuses études.⁵⁶⁻⁵⁸ L'oxydation enzymatique de la catéchine, en particulier, conduit à la formation de dimères incolores de (+)-catéchine de type biphényle et biphényl-éther (Figure 18) au pH des vins blancs (pH = 3).

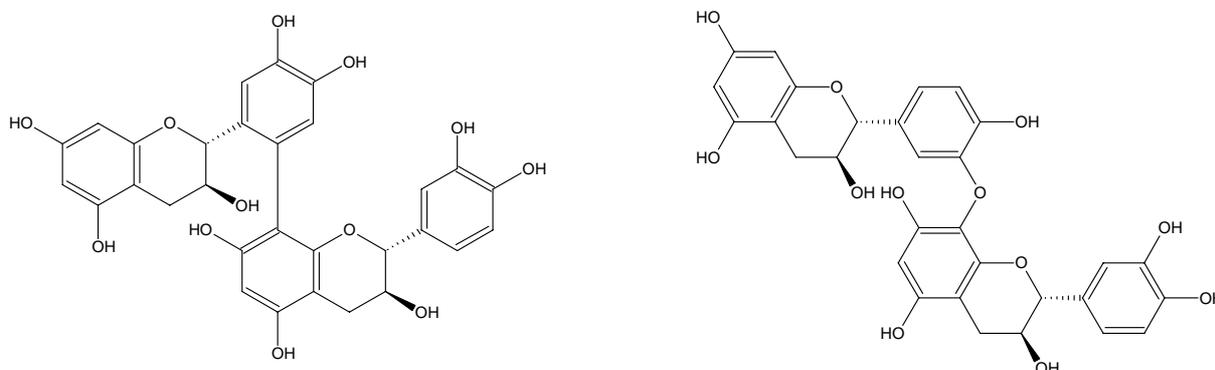


Figure 18 : Produits intermédiaires d'oxydation enzymatique de la (+)-catéchine

Le dimère à liaison de type biphényle peut continuer à évoluer selon différentes voies. Suivant les conditions, soit il réagit sur une *o*-quinone de (+)-catéchine pour former une déhydro-tricatéchine, soit il s'oxyde pour former la déhydro-dicatéchine A en équilibre avec sa méthylènequinone, qui sont des pigments jaunes (Figure 19).

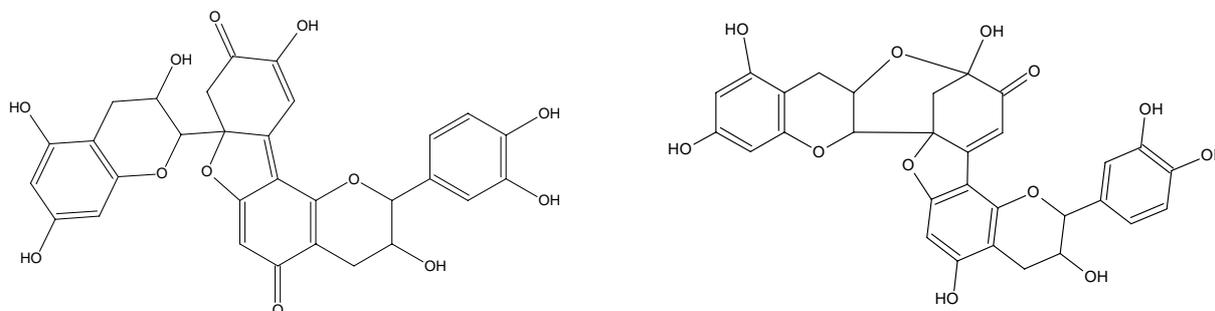


Figure 19 : Pigments jaunes issus de l'oxydation enzymatique de la (+)-catéchine à pH = 6 (⁵⁶)

De la même façon, l'acide caféique évolue par oxydation vers des formes oligomères de l'acide. L'autoxydation de l'acide caféique, étudiée en milieu alcalin (pH = 8)⁵⁹ conduit à la formation de produits d'oxydation, identifiés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse (SM) comme étant des dimères et trimères d'acide caféique impliquant en particulier les chaînes latérales des molécules. L'oxydation chimique de l'acide caféique par le periodate de sodium conduit à la formation de dimères.^{60, 61}

3. Polycondensation via une addition électrophile

Les aldéhydes, tels que l'acétaldéhyde, l'acide glyoxalique, le furfural ou encore l'hydroxyméthyl furfural (HMF), sont capables de participer à des réactions de polycondensation avec les flavanols et les formes hydratées des anthocyanes.⁶² Ils réagissent selon la réaction de Friedel-Crafts de la façon suivante (Figure 20) : dans une première étape, l'aldéhyde, activé par un proton du milieu acide, est additionné en position C6/C8 d'une structure flavonoïde ; l'adduit réagit alors, après déshydratation, avec une seconde molécule nucléophile, conduisant à la formation d'un dimère. Etant lui-même réactif, ce dernier peut alors évoluer selon deux voies réactionnelles. Ses propriétés nucléophiles lui confèrent la capacité de participer à une réaction de Friedel et Crafts identique et ainsi de suite jusqu'à l'obtention d'un copolymère (voie (1)), mais il peut également subir des réarrangements tels un clivage à l'origine de la formation de vinyl-flavanols (voie (2)), ou une étape de déshydratation/oxydation formant les sels de xanthylum (voie (3)).

Les premiers pigments formés à travers de tels mécanismes ont été obtenus à partir de la réaction entre l'acide glyoxalique ($R = \text{COOH}$) et deux catéchines. La première étape impliquant la (+)-catéchine est une réaction de dimérisation par l'intermédiaire d'un pont carboxylméthine formé par fixation de l'acide glyoxalique. Les produits formés par cette réaction, dimères dont la liaison interflavanique est en positions 8-8, 6-8 ou 8-6 sont incolores⁶³. Ils évoluent par déshydratation pour donner une série de pigments plus foncés ($\lambda_{\text{max}} = 440-460 \text{ nm}$) que ceux résultant de l'oxydation enzymatique ($\lambda_{\text{max}} = 385-412 \text{ nm}$). Ces pigments jaunes qui sont des sels de xanthylum peuvent se présenter sous forme estérifiée. La présence de catalyseurs métalliques tels que le fer ou le cuivre favorise l'apparition de ces sels de xanthylum.^{64, 65}

Des études antérieures avaient montré que l'acétaldéhyde, issu du métabolisme des levures et de l'oxydation de l'éthanol, est susceptible de réagir de la même façon que l'acide glyoxalique avec les flavonoïdes, et en particulier la (+)-catéchine. Les unités constituant le dimère sont dans ce cas reliées entre elles par un pont méthylméthine, et sont susceptibles d'évoluer également vers le sel de xanthylum même si cela n'a pas été démontré.

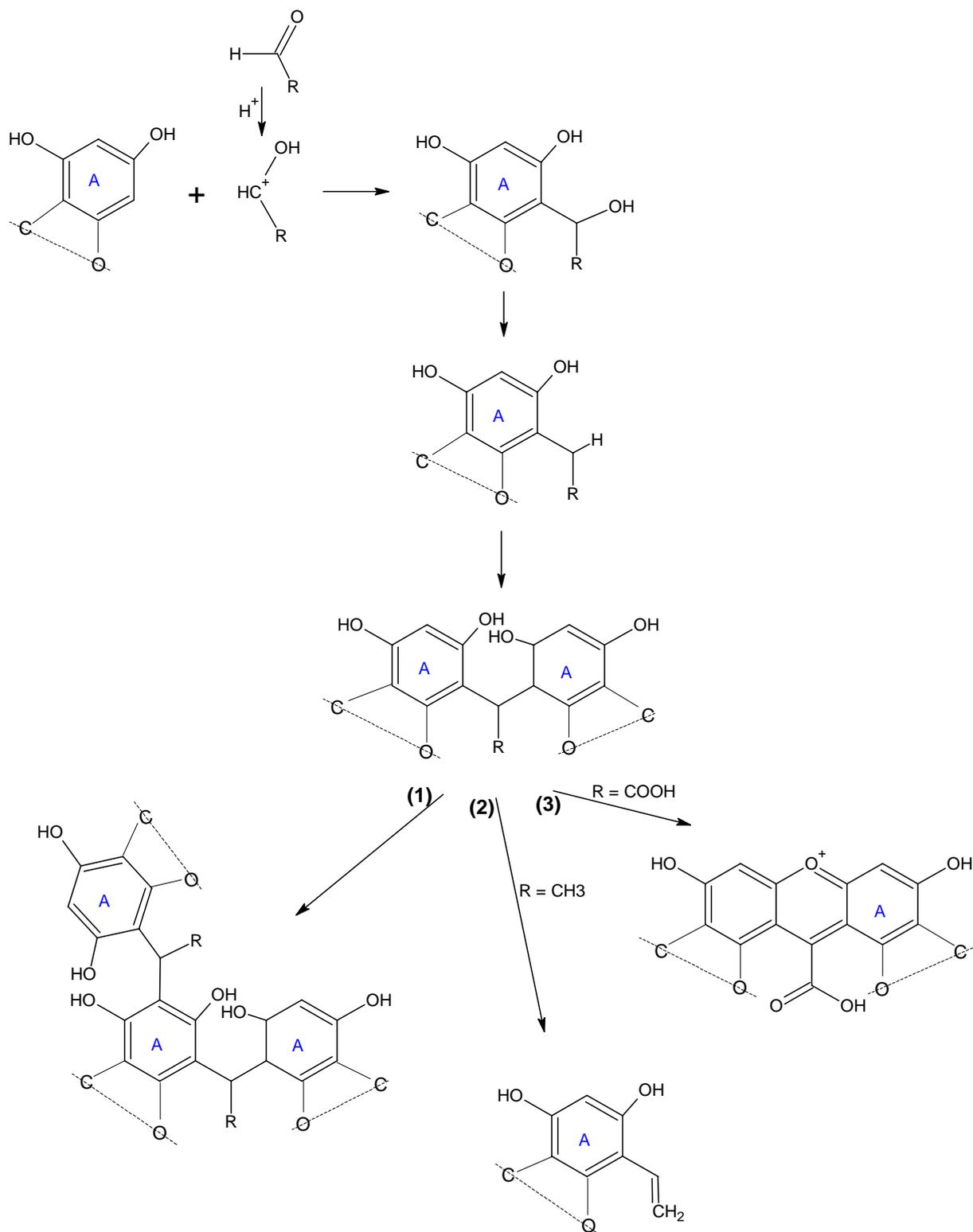


Figure 20 : Mécanismes de polycondensation

IV. Vinification et oxydation des polyphénols

Dans la cellule végétale, les composés polyphénoliques et les enzymes sont compartimentés, excluant tout contact entre ces deux familles de composés. Lors des opérations de broyage, foulage, et pressurage des baies de raisin, une rupture de cette compartimentation est provoquée, à l'origine de la mise en présence des composés polyphénoliques avec les enzymes. Bien que tous les types d'oxydation puissent avoir lieu simultanément, les réactions enzymatiques et d'autoxydation prédominent en début de vinification, c'est-à-dire dans les moûts, tandis que les phénomènes chimiques deviennent prépondérants au cours de l'élevage et du vieillissement du vin. L'inhibition de la PPO par les sulfites et l'élimination des systèmes enzymatiques au moment du débouillage et de la filtration, expliquent cette évolution.

A. *Oxydation dans les moûts de raisin*

1. Principale réaction d'addition

Lors du foulage des baies de raisin, l'acide caftarique, principal substrat de la PPO, est majoritairement converti en l'acide 2-S-glutathionylcaféoyltartrique appelé plus communément Grape Reaction Product (GRP)^{66, 67} (Figure 21). Ce produit incolore résulte de l'addition nucléophile du glutathion, tripeptide abondant dans la baie de raisin et notamment dans la pulpe,²¹ sur la quinone de l'acide caftarique générée par oxydation enzymatique de ce dernier.

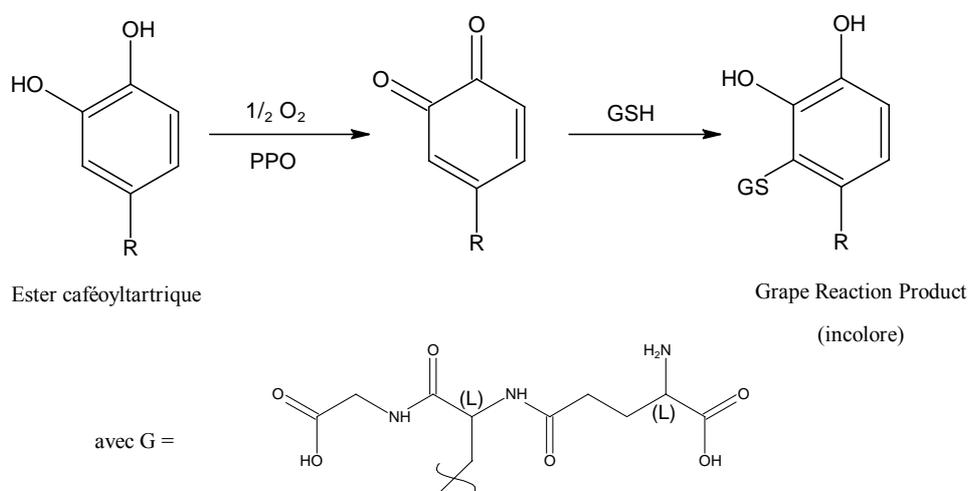


Figure 21 : Réaction de formation du GRP

2. Influence du rapport acides hydroxycinnamiques/glutathion

Dans les moûts, la réaction de formation du GRP est en compétition avec des co-oxydations, dont l'oxydation du GRP lui-même, conduisant à la formation de pigments bruns. Les proportions relatives de glutathion et d'acides hydroxycinnamiques apparaissent donc comme étant au cœur du problème de brunissement enzymatique.

Une analyse de la teneur en acides hydroxycinnamiques (acide caftarique, acide p-coutarique, GRP, et quinones dérivées) contenus dans des moûts blancs associée à la mesure de la couleur de ces moûts oxydés permet d'établir une échelle classant les moûts des moins aux plus sensibles au brunissement. Les moûts les moins altérés présentent les acides hydroxycinnamiques et le glutathion en quantité quasi équivalentes ($[\text{acides}]/[\text{glutathion}] \sim 1$), tandis que les plus sensibles au brunissement contiennent des acides hydroxycinnamiques en large excès par rapport à la quantité de glutathion ($[\text{acides}]/[\text{glutathion}] > 3$).⁶⁸

3. Protection des moûts par les antioxydants

Cependant, à proportions relatives identiques entre acides hydroxycinnamiques et glutathion, des moûts et solutions modèles correspondantes peuvent avoir des cinétiques d'oxydation différentes.⁶⁹ Cette observation peut être corrélée à l'acide ascorbique, naturellement présent dans le raisin, qui confère une protection transitoire des moûts contre le brunissement, durant laquelle l'*o*-quinone dérivée de l'acide caftarique oxyde ce réducteur.

D'après des études menées en solutions modèles, l'acide ascorbique est versatile, présentant des propriétés anti-oxydantes dans un premier temps, et pro-oxydantes par la suite,⁷⁰ son oxydation conduisant à la formation d'espèces oxygénées réactives (EOR). Le sulfitage des moûts est donc préconisé dans l'objectif de protection des moûts vis-à-vis du brunissement. L'inconvénient majeur de la méthode de cette protection par sulfitage réside en la toxicité du produit qui impose de travailler avec des doses faibles (5 à 10g.hL⁻¹ en Champagne). Par ailleurs, elle est à l'origine de la conservation du potentiel de molécules oxydables qui se retrouvent donc dans les vins, et sont susceptibles de subir par la suite une oxydation chimique.

4. Hydroxygénation

Contrairement au sulfitage, l'hydroxygénation a pour objectif de favoriser la formation des pigments bruns par insufflation d'oxygène dans les moûts avant fermentation. Les produits sont aisément éliminés lors de l'étape suivante de clarification, permettant ainsi d'abaisser la concentration en composés phénoliques résiduels. Il est à noter cependant que cette technique perturbe le développement des arômes, et n'est efficace que dans le cas de moûts pauvres en glutathion qui dans le cas contraire bloque la formation des pigments.⁷¹

L'hydroxygénation n'est généralement pas pratiquée en Champagne, mais le fait de différer le sulfitage d'un jus qui s'écoule lentement dans une goulotte produit un effet similaire.

B. Schéma récapitulatif

L'état des connaissances sur les voies réactionnelles impliquées dans le brunissement enzymatique des moûts est résumé dans la Figure 22.

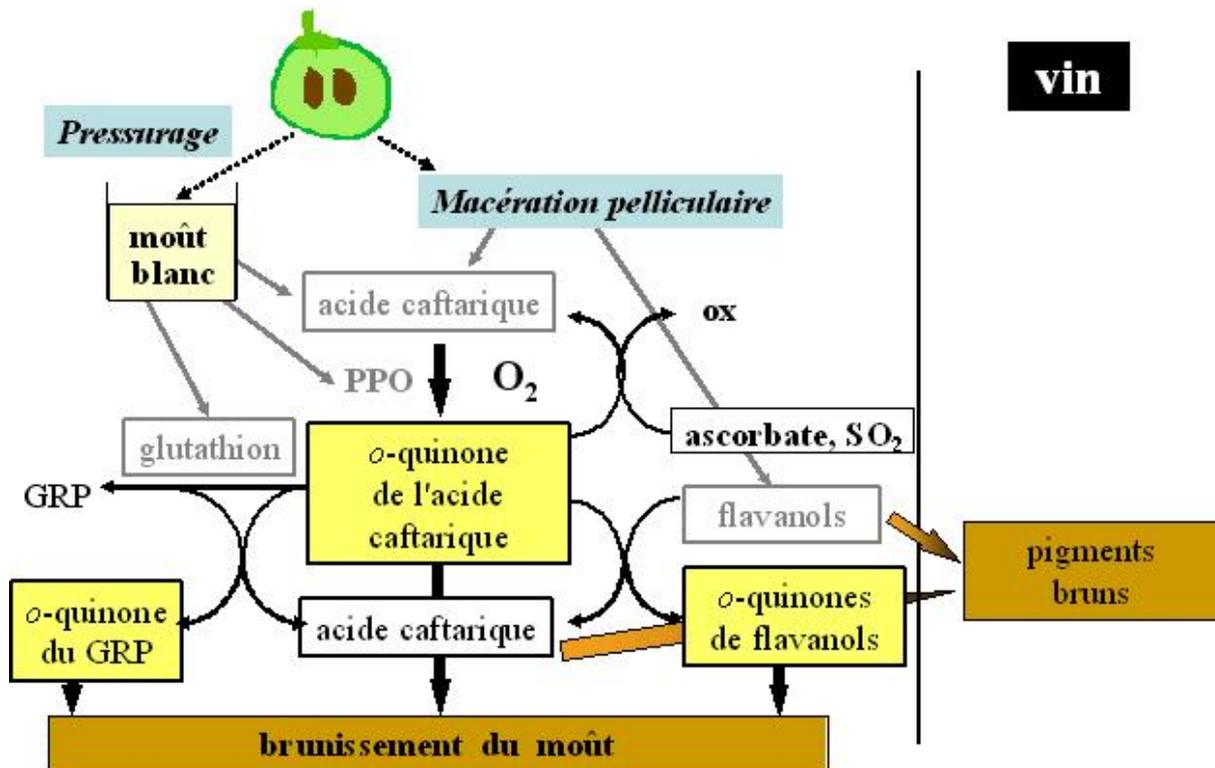


Figure 22 : Voies réactionnelles impliquées dans le brunissement

L'oxydation enzymatique de l'acide *t*-caftarique essentiellement et de l'acide coutarique dans une plus faible mesure est à l'origine du brunissement des moûts. La présence naturelle de glutathion (GSH), ainsi que l'ajout de réducteurs tels que l'acide ascorbique ou les sulfites limitent temporairement ce processus. Les composés phénoliques extraits des raisins, à savoir les acides hydroxycinnamiques, le GRP, et les flavanols dans le cas où une macération pelliculaire précède le pressurage, sont ainsi maintenus intacts dans les moûts, et sont susceptibles de s'oxyder par la suite dans les vins.

C. Oxydation dans les vins blancs

Au contraire de l'oxydation enzymatique des moûts de raisin qui a été largement étudiée et est relativement bien connue, les études portant sur l'autoxydation sont peu nombreuses.

Ce type d'oxydation est rencontré principalement lors du vieillissement des vins. Le vin étant une matrice complexe, les études sont généralement réalisées sur des solutions modèles.

1. Corrélation brunissement/flavanols dans les vins

Plusieurs études sur les vins blancs ont mis en évidence une corrélation entre la teneur en flavanols contenus dans un vin blanc et le brunissement de celui-ci.^{71, 72}

Dans l'étude de Simpson,⁷² le brunissement du vin blanc est obtenu soit à température ambiante (30 semaines), soit à 50°C (3 semaines). Traduit par l'augmentation de l'absorbance à 420 nm, le brunissement a été corrélé, dans les deux tests, aux valeurs des absorbances à 280 et 320 nm et aux teneurs en catéchine, épicatechine dimères de flavanols et esters hydroxycinnamiques. Le test de brunissement accéléré mené par Cheynier⁷¹ confirme la corrélation avec les concentrations en catéchine, épicatechine et dimères de flavanols. Néanmoins, il est nécessaire de noter que, dans ces deux travaux faite entre les phénomènes de vieillissement de type oxydant (= oxydation) et ceux de type non oxydant, ce, aucune distinction n'est qui ne permet pas de définir la contribution de chacun sur le brunissement.

2. Corrélation brunissement/acides phénols

Alors que des analyses de vins blancs réalisées par chromatographie en phase liquide ont montré que la nature et la composition en esters hydroxycinnamiques varient

considérablement durant la fermentation des vins, la composition est très peu altérée au cours du vieillissement.⁷³ Les acides hydroxycinnamiques libres correspondants n'étant pas détectés, une évolution par simple hydrolyse de l'ester est exclue, et des phénomènes d'oxydation sont donc susceptibles d'intervenir dans ces modifications.

Une étude sur l'oxydation modèle à 23,5°C de vins blancs produits à partir des cépages blancs Chardonnay, Colombard et Thompson, a été conduite en ajoutant régulièrement de l'oxygène au cours des 3 ans d'expérience, de façon à obtenir au final des vins ayant eu des apports d'oxygène de 0 à 80 mL par litre.⁷⁴ Il ressort de cette étude que le brunissement est corrélé à l'augmentation de l'absorbance à 320 nm, caractéristique des composés non flavonoïdes, alors qu'il n'est pas corrélé à l'augmentation d'absorbance relevée à 270 nm.

Des corrélations entre acides hydroxycinnamiques et brunissement ont également été obtenues dans l'unique étude disponible sur l'oxydation des polyphénols dans des vins blancs effervescents, et qui concerne l'appellation Cava.⁷⁵ Ce vin, issu du vignoble espagnol, peut être produit à partir de nombreux cépages, dont le Maccabeu, le Chardonnay et le Pinot noir. Il est d'intérêt pour notre travail puisque issu d'une vinification analogue à la méthode champenoise : il subit en particulier deux fermentations et vieillit sur lies. Concernant l'évolution de la composition phénolique, les résultats montrent que le brunissement du Cava mesuré par l'absorbance à 420 nm, est corrélé à la perte de l'acide gallique et d'esters tartriques d'acides hydroxycinnamiques, principalement les acides *cis*- et *trans*-caftarique et le GRP. Il s'accompagne, d'autre part, de la conversion de l'acide *trans*-coutarique en acide *cis*-coutarique, qui serait liée à une activité isomérase des levures.

V. Méthodes d'analyse des polyphénols

A. Caractérisation des polyphénols de faible masse molaire

La spectrophotométrie UV-visible est une des premières techniques utilisées pour caractériser les différentes classes de polyphénols dans la mesure où elles présentent chacune un maximum d'absorbance spécifique qui les caractérise : 320 nm pour les acides hydroxycinnamiques, 360 nm pour les flavonols, 390 nm et 440 nm pour des pigments jaunes issus de processus d'oxydation, et enfin 520 nm pour les anthocyanes. En outre, les polyphénols absorbent tous dans l'UV autour de 280 nm du fait de leur caractère aromatique.

Pour caractériser plus précisément la composition au sein de chaque classe, il est nécessaire d'adjoindre à la détection UV-visible une technique de séparation, généralement la chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse. L'ordre d'élution, lié à la polarité des molécules, apporte en effet un complément d'information en vue de l'identification de leur structure.

Cependant, la technique CLHP-DAD ne permet pas de caractériser la composition d'une des classes majeures de polyphénols que sont les flavanols. Compte tenu de l'existence de nombreux isomères (régio- et stéréo-isomères) dont le nombre s'accroît avec le degré de polymérisation, il n'y a plus de séparation au-delà du trimère de flavanol de telle sorte que cette classe de composés apparaît sous forme d'un massif non résolu qui émerge plus ou moins de la ligne de base.

La chromatographie liquide avec une détection UV-visible ne permet pas non plus d'identifier une nouvelle structure au delà de sa classe d'appartenance ; le couplage avec la spectrométrie de masse est alors essentiel. L'équipement couramment utilisé aujourd'hui est un spectromètre de masse constitué d'une source d'ionisation douce comme l'électrospray (ESI) ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et d'un analyseur de type trappe ionique (TI) puisqu'il donne non seulement accès à la masse molaire, mais apporte aussi des informations sur la structure de la molécule grâce à la possibilité de faire des fragmentations successives (MS^n).^{76, 77} Les autres sources d'ionisation sont très peu voire pas utilisées parce qu'elles nécessitent le vide au niveau de la source ce qui rend le couplage difficile (Fast Atom Bombardment, Impact Electronique), ou parce qu'elles demandent un chauffage fort, inadapté aux polyphénols qui sont thermo-sensibles et non volatils (Ionisation Chimique, Impact Electronique). Le mode d'ionisation négatif est généralement préféré pour les flavanols,^{34, 78} leurs produits dérivés⁷⁹⁻⁸¹ et les flavonols,⁷⁶ alors que les anthocyanes sont plus aisément détectées en mode positif⁸² du fait de la présence d'une charge positive sur les formes flavylum.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) reste la technique la plus performante en terme d'identification formelle des molécules. L'utilisation des expériences bi-dimensionnelles permet notamment de déterminer la position et la nature des liaisons interflavoniques dans des oligomères de flavanols.^{56, 83, 84}

B. Caractérisation des polymères

La séparation des polyphénols par CLHP reste réservée à des molécules de faibles masses molaires, et l'analyse des polymères de flavanols en particulier devient d'autant plus délicate que le degré de polymérisation est élevé, à cause des multiples structures envisageables, des faibles teneurs de chaque composé, et de la faible résolution des profils chromatographiques.

L'analyse directe en spectrométrie de masse avec sources d'ionisation électrospray ou Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) permet d'étudier les polyphénols de masses molaires plus élevées. Avec l'ESI, les monomères et oligomères sont détectés sous forme d'ions monochargés, tandis que les polymères de plus haut degré de polymérisation apparaissent sous forme d'ions multichargés dans la limite de la gamme de m/z du spectromètre de masse.^{85, 86} Des polymères contenant jusqu'à 22 unités ont ainsi pu être mis en évidence dans le litchi.⁸⁷ De même, la source d'ionisation MALDI associée à un analyseur à temps de vol (TOF) permet l'analyse de polymères de flavanols jusqu'au DP 11 détectés dans ce cas sous forme d'ions monochargés grâce à la large gamme de m/z accessible uniquement sur un TOF.⁸⁸

S'il est difficile de caractériser les tanins dans leur intégrité, une approche alternative consiste à les dépolymériser pour établir une composition moyenne. Les méthodes de dépolymérisation les plus utilisées aujourd'hui sont la thiolyse^{31, 33} et la phloroglucinolyse.⁸⁹ Le principe consiste en un chauffage en milieu acide qui engendre la rupture des liaisons interflavaniques constituant les polymères. Les unités terminales sont libérées sous forme de molécules neutres, alors que les unités intermédiaires et supérieures le sont sous forme de carbocations capables de réagir avec une molécule de phloroglucinol (phloroglucinolyse) ou de toluène- α -thiol (thiolyse), utilisée comme agent nucléophile. Pour les proanthocyanidines, ces méthodes donnent accès non seulement à la teneur en polymères et au degré de polymérisation moyen de la fraction, mais aussi aux proportions des différentes unités constitutives notamment aux taux de galloylation (groupement gallate) et de trihydroxylation (gallocatéchine). Au contraire, il est à noter que, les polymères dérivés peuvent contenir des liaisons plus ou moins résistantes à l'acidolyse. C'est le cas en particulier pour les adduits flavanols-anthocyanes.⁹⁰

C. Dosage des polyphénols par réaction chimique et détection UV-visible

Plusieurs tests spécifiques de certaines familles de composés phénoliques ou plus globaux sont employés à des fins de caractérisation et quantification.

La quantification globale des structures phénoliques d'un échantillon est basée sur l'oxydation des groupements hydroxyles portés par les phénolates en milieu basique, avec le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange d'acide molybdique et acide tungsténique) qui est réduit en oxydes de molybdène et de tungstène de couleur bleu azur.⁹¹ Dans ce protocole, la molécule de référence utilisée pour la calibration est l'acide gallique.

Les monomères de flavanols et unités supérieures des tanins, caractérisés par des positions C6 et C8 libres, sont dosés par des réactions spécifiques avec les aldéhydes tels que la vanilline ou le diméthyl-amino-cinnamaldéhyde (DMAC). En milieu acide, l'aldéhyde réagit sur les positions 6 ou 8 du noyau A des flavanols par substitution électrophile aromatique.⁹² L'exemple du DMAC avec lequel un adduit de couleur verte est obtenu est illustré sur la Figure 23.

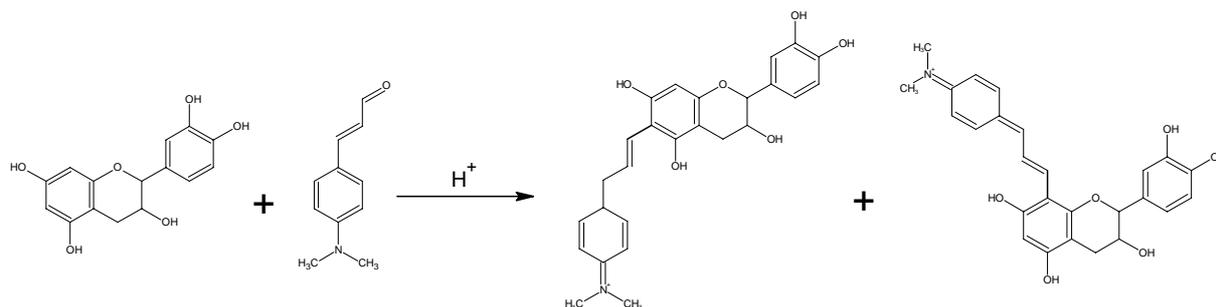


Figure 23 : Réaction d'un flavanol avec le 4-diméthyl-amino-cinnamaldéhyde

Enfin, les proanthocyanidines sont dosées par le test de Bate-Smith qui consiste à rompre les liaisons interflavoniques dans un milieu alcoolique chauffé et en présence d'acide fort (Figure 24). Les unités terminales sont alors libérées sous forme de molécules neutres, et les unités d'extension sous forme de carbocations en position C4 instables et qui évoluent rapidement vers les formes anthocyanidines de couleur rouge dosables par spectrophotométrie UV-visible.

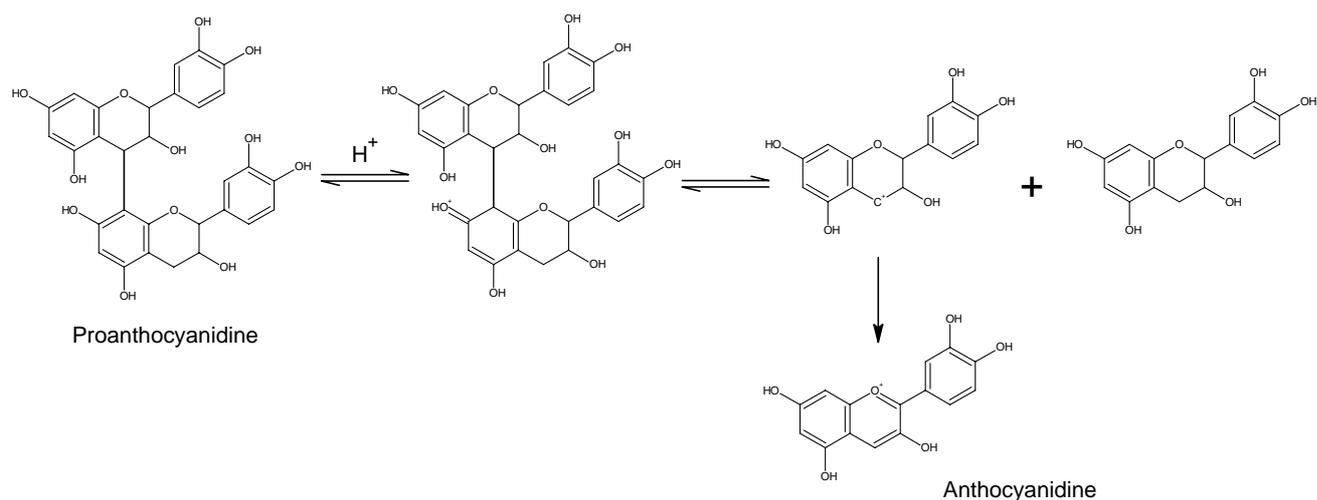


Figure 24 : Réaction de Bate-Smith

La comparaison des teneurs en unités d'extension (test de Bate-Smith) et en unités supérieures (test au DMAC diminué de la contribution des monomères évaluée par CLHP-DAD ou fluorimètre), permet d'évaluer le degré de polymérisation des tanins, même si ces méthodes dont la réponse change avec le degré de polymérisation restent imprécises.⁹³

Matériel et Méthodes

I. Matériel

A. Raisins

1. Cépages

L'étude s'est intéressée aux trois cépages majeurs cultivés dans le vignoble champenois. Deux d'entre eux sont des cépages rouges, le Pinot noir et le Pinot meunier ; le troisième est blanc, le Chardonnay.

Une étude complémentaire sur le passage des tanins dans les jus obtenus par un pressurage modéré a été réalisée sur le cépage rouge Mourvèdre.

2. Prélèvements

Les raisins champenois ont été récoltés à maturité lors des vendanges 2005 par les services techniques du Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne. Pour chaque cépage, des lots de 50 baies saines et conservées avec leur pédicelle ont été réalisés à partir de grappes prélevées arbitrairement.

Les baies de Mourvèdre ont été récoltées lors des vendanges 2005 par le personnel du laboratoire.

3. Conservation des baies de raisin

Pour chaque cépage, des lots de 50 baies ont été préparés, pesés puis congelés à -80°C pendant deux semaines en attente du broyage.

Les baies, encore gelées, ont alors été pelées à l'aide d'un scalpel, et les trois compartiments de la baie, à savoir la pellicule, la pulpe et les pépins, ont été placés séparément dans trois vases Dewar remplis d'azote liquide. Chaque lot a ensuite été broyé au Dangoumau sous azote liquide, pesé, puis conservé au congélateur à -80°C en attente des analyses.

Une partie des baies de Mourvèdre récoltées a été préparée de la même façon, tandis qu'une autre a été utilisée immédiatement pour obtenir un jus (cf II.B).

B. Vins blancs champenois

Les vins ont été conservés à l'obscurité dans une cave thermostatée à 12°C jusqu'à utilisation.

1. Vins tranquilles

Les raisins de Pinot noir, Pinot meunier, et Chardonnay, récoltés lors de la campagne 2003, ont été vinifiés séparément par le CIVC selon des conditions standard pour élaborer des vins monovariétaux millésime 2003.

En plus de ces trois vins, nous avons disposé de l'Assemblage 2003 du CIVC, qui est un assemblage des trois vins monovariétaux 2003 et de l'Assemblage 2002 à hauteur de 25% chacun.

2. Vins champagnisés

a) Vins âgés

Chaque gamme de vin sélectionnée a été constituée de 4 ou 5 bouteilles fermées avec des capsules plus ou moins étanches, en particulier au passage de l'oxygène. Ce choix est en accord avec les conclusions d'expériences de vieillissement accéléré conduites pendant cinq ans sur des Riesling et Chardonnay qui montrent qu'une plus large variabilité du degré d'oxydation est obtenue en faisant varier la nature du bouchon plutôt que les conditions de stockage.⁹⁴

Ces vins ont été notés lors de séances d'analyse sensorielle suivant le critère « caractère oxydé »/ « caractère réduit ».

Sélection CIVC millésime 1995

Les raisins à partir desquels le vin de base a été produit sont issus de la récolte 1994 du CIVC. Après tirage en bouteille début 1995, le vin a été vieilli sur lies sous différentes conditions de diffusion d'oxygène à travers les capsules jusqu'au début 2005, date à laquelle il a été procédé aux étapes de remuage puis dégorgement. Les bouteilles ont alors été inertées, rebidulées et recapsulées sans ajout de liqueur d'expédition.

Nous disposons d'une sélection réalisée par le CIVC et composée de quatre modalités d'oxydation du vin :

- 1995BO : capsule BO
- 1995LIEGE : capsule LIEGE (encore appelée TEMOIN)
- 1995SCEL+ : capsule SCEL+
- 1995SCEL++ : capsule SCEL++

Sélection Moët & Chandon millésime 1998

Cinq modalités de ce vin sont disponibles obtenues avec des capsulages différents :

- 1998-11 (Ref 298026-11)
- 1998-15 (Ref 298026-15)
- 1998-16 (Ref 298026-16)
- 1998-21 (Ref 298026-21)
- 1998-23 (Ref 298026-23)

Aucune information supplémentaire sur ces vins n'a été fournie quant à la composition à partir des différents cépages.

b) Vins jeunes

Les raisins de Pinot noir, Pinot meunier, et Chardonnay ont été récoltés manuellement lors des campagnes 2002, 2003, et 2004, puis vinifiés séparément par le CIVC selon des conditions standard pour élaborer des vins monovariétaux millésimes 2002, 2003, et 2004. Notons que les échantillons millésimes 2003 sont les vins effervescents correspondant aux vins tranquilles cités dans le paragraphe I.B.1.

c) Dégazage des vins

Le dégazage du vin a été réalisé par passage aux ultrasons d'échantillons de 30 mL environ. La forte effervescence des échantillons nécessite de travailler par pulses durant les premières minutes pour contrôler les montées de mousse dans le flacon. Lorsque l'activité est plus faible, les échantillons sont ultrasoniqués le temps nécessaire.

Cette étape est un préliminaire à toutes les analyses réalisées sur les vins, excepté la colorimétrie pour laquelle des essais ont montré qu'elle n'était pas nécessaire.

C. Fractions de tanins

Quatre fractions de tanins ont été utilisées au cours des différents travaux.

1. Tanins condensés

Fraction DPm 2,6

Il s'agit d'une fraction oligomérique de procyanidines issues de pépins de raisin fournie par Berkem (Gardonne, France). La thiolyse de cette fraction montre qu'elle contient 17,5 % de galloylation et que le degré de polymérisation moyen est de 2,6. Le rendement de thiolyse est de 56 %.

Fractions DPm 9,2 et DPm 27,8

Ces fractions, fournies par l'Unité de Recherches Cidricoles de Rennes (INRA), sont issues de la pomme. Constituées de polymères d'épicatéchine principalement, elles sont caractérisées par des degrés de polymérisation moyen de 9,2 et 27,8 respectivement évalués par thiolyse. Par ailleurs, la fraction DPm 9,2 a un rendement de thiolyse de 76 %, et la phloridzine est un contaminant de la fraction.

2. Tanins hydrolysables

Une fraction de Tara tanins a été sélectionnée pour représenter la famille des tanins hydrolysables. Il s'agit d'un mélange de gallotanins caractérisé par un spectre de masse obtenu avec une source électrospray. La fraction est plus précisément décrite dans la Partie 4 du travail.

II. Préparation des baies et des vins

A. Extraction des polyphénols à partir des baies de raisin champenois

1. Description générale et solvants

Toutes les extractions ont été conduites sur un agitateur mécanique à température ambiante.

Le méthylparabène a été utilisé comme étalon interne, et ajouté aux solvants d'extraction à hauteur de 200 mg.mL⁻¹ et 100 mg.mL⁻¹ respectivement pour l'extraction à partir de la pellicule et des pépins d'une part, de la pulpe d'autre part.

L'optimisation du protocole d'extraction a été réalisée sur le cépage Pinot noir.

Les expériences préliminaires, réalisées en triple, ont consisté en des extractions de 2 heures, en une ou plusieurs étapes, avec un mélange acétone/eau (60 :40) acidifié avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) à hauteur de 0,05 %. Dans le cas d'une extraction unique, le surnageant a été prélevé après centrifugation à 10000g pendant 10 minutes. Pour l'extraction multiple, il a été procédé à une centrifugation à 10000g pendant 10 minutes après 30 minutes d'extraction. Le surnageant a alors été prélevé et du solvant frais a été ajouté au résidu solide. L'opération a été répétée trois fois.

L'étape d'optimisation suivante a été conduite à travers un plan d'expériences de Doehlert (cf II.A.3), dans lequel ont été utilisés des mélanges de méthanol et d'acétone/eau (60 :40, v :v) acidifiés avec de l'acide trifluoroacétique 0,05 % dans des proportions variables (de 0 :100 à 30 :70, v :v).

Pour les essais utilisant du méthanol, le résidu solide a dans un premier temps été dissout dans un volume défini de méthanol, puis mélangé pendant deux minutes avant d'ajuster le volume au volume final avec le mélange acétone/eau.

2. Expériences préliminaires : rapports solide/liquide utilisés

a) Extraction unique

Pour chacun des deux compartiments, pellicule et pépins, un lot de 100 mg de poudre et deux autres de 50 mg environ exactement ont été pesés, sur lesquels nous avons procédé à une extraction des polyphénols respectivement par 2, 2 et 4 mL de solvant acétone/eau/TFA pendant deux heures. A partir des trois essais, ont été prélevés 200 μ L pour la phloroglucinyse, et 100 μ L pour l'injection directe en CLHP.

Dans le cas de la pulpe, un lot de 200 mg et deux autres de 100 mg environ exactement ont été préparés, sur lesquels nous avons procédé à une extraction des polyphénols respectivement par 2, 2 et 4 mL de solvant acétone/eau/TFA pendant deux heures. A partir des trois essais, ont été prélevés 0,75 mL pour les essais 100 mg.mL⁻¹ et 50 mg.mL⁻¹, et 1,5 mL pour le dernier à destination de l'analyse par phloroglucinyse, et la même chose pour l'injection directe.

Tous les échantillons ont été portés à sec par passage à l'évaporateur rotatif sous vide Genevac (New-York, NY) à 35°C.

b) Extraction multiple

Des lots de 50 mg p.f. environ exactement de pellicules ou de pépins, et de 100 mg environ exactement de pulpe ont été préparés, sur lesquels nous avons procédé à quatre extractions successives par 500 μ L de solvant acétone/eau/TFA pendant 30 minutes chacune. A chaque prélèvement de surnageant, deux aliquots de 200 μ L ont été préparés en vue de la phloroglucinyse et de l'injection directe.

Tous les échantillons sont portés à sec par évaporation au Genevac à 35°C.

3. Plan d'expériences et traitement des données

A la suite des expériences préliminaires, l'optimisation de l'extraction a été poursuivie par l'étude de surfaces de réponses.

Un plan d'expériences de Doehlert a été construit pour déterminer les conditions expérimentales qui permettent d'obtenir la plus forte réponse. Trois facteurs ont été considérés dans ce plan, et étudiés à 7, 5, et 3 niveaux respectivement. Le plan est donc composé de 15 essais, dont trois répétitions au centre du domaine expérimental. Les trois facteurs sélectionnés ont été le temps d'extraction, le volume de solvant, et le taux de méthanol, la masse d'échantillon analysé ayant été fixée à environ exactement 50 mg pour la pellicule et les pépins, et 100 mg dans le cas de la pulpe.

Le modèle proposé est un modèle polynomial du second ordre, caractérisé par l'équation suivante :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$$

Où Y est la teneur de composés extraits par gramme de matériel

a_i sont les coefficients de régression

X_1 , X_2 , et X_3 sont les facteurs expérimentaux

Les intervalles de confiance ont été évalués avec le coefficient de Student $T_{95\%,3}$.

B. Obtention des jus à partir du Mourvèdre

La méthode décrite par Rigaud a été utilisée pour obtenir, par pressurage sous vide, un moût de raisin exempt de toute oxydation.⁹⁵ Le dispositif expérimental est présenté dans la Figure 25.

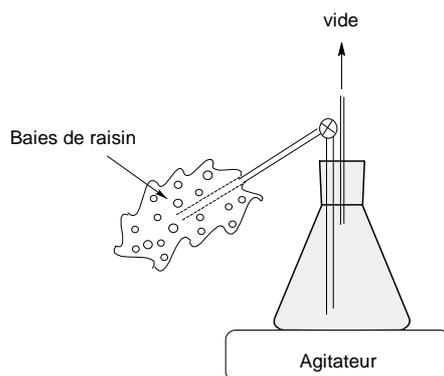


Figure 25 : Dispositif expérimental d'obtention des moûts

Les baies fraîches ont été placées dans un sac plastique étanche. Après avoir créé le vide dans la fiole et le sac, le raisin est écrasé à la main.

Deux expériences ont été réalisées : la première sans SO₂ dans la fiole, et la seconde avec du SO₂ initialement dans le fond de la fiole et sous agitation. Il est à noter que le SO₂ a été ajouté sous forme de métabisulfite de sodium en large excès par rapport aux doses œnologiques.

C. Fractionnement des vins blancs

Le fractionnement des vins mis au point dans notre étude est décrit ci-dessous.

Un volume de 30 mL de vin a été réduit à quelques millilitres par passage à l'évaporateur rotatif. Ce concentré a alors été déposé sur une cartouche Sep-Pack C18 de 1g, préalablement conditionnée avec du méthanol et de l'eau acidifiée pH 2.

Les éluations successives ont été réalisées avec 2mL de chacun des solvants suivants : eau acidifiée avec de l'acide acétique pH 2, solution aqueuse de méthanol 80 %, et enfin méthanol ammoniacal (0,1 %). Quatre fractions ont été récupérées correspondant aux volumes de : 1/dépôt, 2/lavage à l'eau acidifiée, 3/Méthanol 80 %, 4/Méthanol ammoniacal 0,1 %. Ces fractions ont finalement été portées à sec, et reprises dans 200 µL (fractions 2/, 3/, et 4/) ou 385µL (fraction 1/) d'une solution aqueuse de méthanol 50 % acidifiée avec 0,1 % d'acide formique.

III. Vieillissement modèle des vins Champenois

A. *Vieillissement accéléré à haute température*

1. Stratégie d'expérimentation

Le vieillissement modèle proposé a été adapté de celui de Singleton et al..⁹⁶ Appliqué à un vin blanc tranquille de Champagne et suivi sur une période de 40 jours, il a consisté en une conservation du vin à haute température (47°C) en présence ou non d'oxygène afin de mettre en évidence l'influence de celui-ci. Parallèlement, un vieillissement témoin du même vin en condition dite « cave », soit une conservation à 12°C, a été mené avec ou sans oxygène.

En résumé, quatre modes de vieillissement ont donc été définis et dénommés comme suit :

	12°C	47°C
<i>Sans oxygène</i>	12AN	47AN
<i>Avec oxygène</i>	12AE	47AE

Chaque modalité a été préparée en triple.

Les analyses ont été réalisées après 0, 20, et 40 jours d'incubation sur des échantillons sacrifiés.

2. Conditionnement des échantillons

a) *Conditions stériles*

Afin de limiter la contamination des échantillons par les microorganismes durant le vieillissement, la verrerie utilisée pour conditionner les échantillons (entonnoir, ballon), ainsi que les flacons, septums et bouchons ont été autoclavés pendant 15 minutes à 120°C.

De même, le vin a été filtré frontalement sur filtre de 0,22 µm de diamètre de pore en vue d'une stabilisation microbiologique.

Toutes les opérations ont été réalisées sous hotte à flux laminaire.

b) Incubation en conditions oxydantes

18 flacons de 30 mL ont été remplis avec 10 mL de vin filtré et agités vigoureusement pendant 5 minutes.

La moitié de ces flacons a été mise en cave à 12°C, l'autre moitié dans une étuve à 47°C.

c) Incubation en conditions non oxydantes

(1) Désoxygénation du vin

L'Assemblage a été filtré sur filtre 0,22 µm directement dans un ballon tricol sur lequel ont été adaptés une arrivée d'argon, une sortie pour le vide, ainsi qu'un bouchon à jupe en vue des prélèvements.

Les robinets d'arrivée du vide et de l'argon ont été ouverts alternativement pendant des périodes de quelques minutes pour déplacer l'oxygène et le remplacer par l'argon. La séquence tirage sous vide/mise sous argon a été répétée trois fois.

(2) Prélèvement des échantillons

L'aiguille constituant le système d'arrivée d'argon a été trempée dans le vin filtré de façon à pousser, par bullage, le vin vers les flacons de conditionnement. Les flacons ont été remplis à ras bord puis sertis.

La moitié des flacons a été mise en cave à 12°C, l'autre moitié dans une étuve à 47°C.

B. Oxydation chimique de vins champenois

Le vin (Assemblage 2003) a été oxydé pendant quelques heures sous agitation à température ambiante par action du periodate de sodium additionné à hauteur de 1 mg.mL⁻¹.

IV. Etude des phénomènes oxydants en solution modèle

A. Autoxydation accélérée par élévation du pH et influence de la présence d'acide protocatéchique

1. Solutions modèles

Des solutions standards de catéchine 2 mM, acide protocatéchique 2 mM, et un mélange catéchine-acide protocatéchique tel que la concentration finale en chacun des polyphénols soit de 2 mM sont préparées en milieu modèle acétate d'ammonium 50 mM dont le pH est mesuré à 6,5 (pH-mètre calibré avec deux solutions à pH 4 et pH 7).

Chacune des solutions a été préparée en triple.

2. Réaction d'oxydation

Seize prélèvements de 100 μ L ont été effectués pour chacun des 3 réplicats, et aliquotés en conditions stériles (cf vieillissement modèle des vins) dans des tubes à thiolyse de contenance 300 μ L sertis. Les échantillons ainsi préparés ont été incubés à l'obscurité dans une enceinte thermostatée à 25°C durant 1 à 35 jours. Pour chaque point de la cinétique, les échantillons ont été sacrifiés et les analyses CLHP et/ou CLHP-SM sont réalisées directement à partir du tube à thiolyse.

B. Autoxydation accélérée par élévation de la température et influence des acides protocatéchique et caféique

1. Milieux modèles et polyphénols étudiés

a) Modèle acétate ammonium

La préparation de ce milieu est analogue à celle décrite dans le paragraphe IV.A.1., avec une étape supplémentaire d'ajustement du pH à 3 par ajout de l'acide correspondant à l'acétate d'ammonium : l'acide acétique.

b) Modèle vin

Le milieu modèle vin utilisé est celui décrit par Bradshaw⁷⁰.

Il s'agit d'une solution aqueuse d'éthanol à 12 % à laquelle ont été ajoutés de l'hydrogène-tartrate de potassium et de l'hydroxyde de potassium à hauteur de 2 g.L⁻¹ et 0,8 g.L⁻¹ respectivement. Le pH a été ajusté à 3 par addition d'acide sulfurique.

c) Solutions polyphénoliques

Une gamme de solutions standards de catéchine, acide protocatéchique, caféique dans chacun des deux milieux modèles, complétée par deux mélanges binaires de catéchine-acide protocatéchique et catéchine-acide caféique en milieu modèle vin, a été préparée de façon à avoir une concentration de 2 mM pour chaque constituant.

2. Réaction d'oxydation

Des flacons de 30 mL de contenance sont remplis avec environ exactement 12 mL des solutions à oxyder. L'incubation est conduite à l'obscurité dans une étuve à 47°C, et les flacons ont été ouverts et agités quotidiennement pendant 10 jours. Les volumes ont été contrôlés avant chaque analyse.

C. Oxydation chimique

1. Conditions de réaction

Des solutions de catéchine 5 mM (1,45 g.L⁻¹) et acide caféique 2 mM sont préparées dans de l'eau acidifiée à pH3 avec de l'acide trifluoroacétique (TFA). L'oxydation a été conduite sous faible agitation magnétique pendant une heure en présence de periodate de sodium, tel que le polyphénol soit initialement en large excès, soit 500 µL de solution polyphénolique pour 67 µL de solution de periodate de sodium à 1mg.mL⁻¹ dans le même solvant.

Quelques dizaines de microlitres de la solution réactionnelle ont été prélevés toutes les 10 minutes pour analyse en spectrophotométrie UV-Visible et, selon les besoins, des volumes de 200 µL destinés à l'analyse CLHP-ESI/TL.

Pour l'analyse des mêmes échantillons par RMN, 67 µL de periodate de sodium à 1mg.mL⁻¹ dans D₂O ont été ajoutés à 500 µL des solutions.

2. Inhibition de l'oxydation

L'analyse des solutions a nécessité une étape de stabilisation du milieu par réduction.

Après étude, la meilleure inhibition est obtenue en ajoutant de l'acide sulfureux (solution aqueuse à 5 % en volume prête à l'emploi) à hauteur de 20 μ L par millilitre de solution réactionnelle.

D. Plan de mélanges en autoxydation ou oxydation chimique

Des solutions témoins à 1 mM d'épicatéchine, acide protocatéchique, acide gallique, acide caféique, et 0,5 mM de dimère B2 (soit 1 mM d'unités phénols également) ont été préparées dans le tampon modèle vin (cf IV.B.1.b).

	Epicatéchine 1 mM	B2 0,5 mM	Acide protocatéchique 1 mM	Acide gallique 1 mM	Acide caféique 1 mM
S1	1	0	0	0	0
S2	0	1	0	0	0
S3	0	0	1	0	0
S4	0	0	0	1	0
S5	0	0	0	0	1
S6	0,5	0,5	0	0	0
S7	0,5	0	0,5	0	0
S8	0,5	0	0	0,5	0
S9	0,5	0	0	0	0,5
S10	0	0,5	0,5	0	0
S11	0	0,5	0	0,5	0
S12	0	0,5	0	0	0,5
S13	0	0	0,5	0,5	0
S14	0	0	0,5	0	0,5
S15	0	0	0	0,5	0,5
S16	0,3333	0,3333	0,3333	0	0
S17	0,3333	0,3333	0	0,3333	0
S18	0,3333	0,3333	0	0	0,3333
S19	0,3333	0	0,3333	0,3333	0
S20	0,3333	0	0,3333	0	0,3333
S21	0,3333	0	0	0,3333	0,3333
S22	0	0,3333	0,3333	0,3333	0
S23	0	0,3333	0,3333	0	0,3333
S24	0	0,3333	0	0,3333	0,3333
S25	0	0	0,3333	0,3333	0,3333
S26	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
S27	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
S28	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Tableau 3 : Proportions volumiques des différentes solutions mères en mélange dans chaque essai du plan de mélanges

Ces solutions ont été mélangées dans les proportions indiquées dans le plan de mélange (Tableau 3), donnant accès à 28 modalités de teneur en unités phénols constante oxydés chimiquement par le periodate de sodium pendant 24 heures (67 μL de solution à 0,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour 500 μL de solution polyphénolique), ou maintenues en conditions d'autoxydation à 30°C pendant une période adéquate.

Afin de pouvoir comparer les premiers résultats sans utiliser les surfaces de réponses, les solutions standards diluées par 2, 3 et 5 ont été préparées. Les concentrations en épicatechine ou dimère B2 de ces solutions sont rassemblées dans le Tableau 4

	Epicatechine 1 mM	B2 0,5 mM	Acide protocatechique 1 mM	Acide gallique 1 mM	Acide caféique 1 mM
S29	0,5	0	0	0	0
S30	0,33	0	0	0	0
S31	0,2	0	0	0	0
S32	0	0,25	0	0	0
S33	0	0,167	0	0	0
S34	0	0,1	0	0	0

Tableau 4 : Concentrations en épicatechine ou dimère B2 dans les mélanges complémentaires

Les solutions ont été étudiées par CLHP-ESI/TI en mode négatif.

V. Analyse de la couleur

A. Spectrophotométrie UV-Visible

1. Appareillage

Le spectrophotomètre utilisé est un SAFAS UV mc².

2. Analyse des vins

Les spectres UV-Visible ont été enregistrés sur une gamme de longueurs d'onde s'étendant de l'Ultra-Violet (275 nm) au visible (560 nm) à partir d'échantillons transférés dans des cuves en quartz de 1 mm de trajet optique.

3. Analyse des solutions modèles

a) Autoxydation

Chaque solution modèle a été diluée au cinquième dans le méthanol dans des cuves en quartz de 5 mm de trajet optique de façon à dissoudre les éventuels précipités et obtenir des valeurs d'absorbance dans le visible dans la gamme de linéarité de la loi de Beer-Lambert.

Les spectres ont été enregistrés sur une gamme de longueurs d'onde allant de l'UV (240 nm) au visible (560 nm).

b) Oxydation chimique

Les analyses UV-visible sont réalisées à température ambiante (23°C) sur les solutions diluées 20 fois dans le méthanol et placées dans des cuves en quartz de 5 mm de trajet optique

B. Colorimétrie

La colorimétrie définit une couleur par ses paramètres tristimulaires dans un référentiel orthonormé, l'un des référentiels les plus couramment utilisés étant le référentiel CIE L*a*b*. Plus précisément, l'axe (-a*, +a*) décrit l'évolution de la teinte du vert au rouge, l'axe (-b*, +b*) décrit l'évolution de la teinte du bleu au jaune, tandis que le troisième axe représente la clarté L*.

Les mesures de colorimétrie ont été réalisées en collaboration avec Céline Malien Aubert à l'antenne du groupe ChrisHansen basée à Prades-le-Lez (France).

1. Appareillage

Les mesures des coordonnées tristimulaires ont été réalisées avec un spectrophotomètre Datacolor SpectraFlash SF 450. L'ouverture utilisée pour faire les mesures est l'ouverture LAV. Le logiciel de traitement des données associé a permis d'accéder en plus de ces valeurs, à un paramètre utilisé communément par les industriels en contrôle qualité, le $\Delta E(\text{CMC})$, combinaison complexe de ces trois coordonnées.

2. Calibration

La calibration a été réalisée à partir du piège de lumière Datacolor, de la plaque blanche de calibration (N° 451 Datacolor), et de la plaque verte (N° 451 Datacolor) dont les coordonnées tristimulaires ont été fournies.

3. Mode d'analyse

Les analyses ont été réalisées en réflexion dans des flacons en matière plastique. L'eau distillée a été utilisée comme référence.

VI. Purification de produits de vieillissement et d'oxydation par CLHP semi-préparative

Les deux marqueurs de vieillissement (5-hydroxyméthylfurfural et produit non identifié) ont été isolés à partir de l'Assemblage 2003 vieilli à 47°C. Une analyse de ce vin en chromatographie en phase liquide a en effet montré que les marqueurs y étaient présents en plus grande quantité que dans les vins de Champagne dont nous disposons.

La déhydro-dicatéchine B4 a été isolée à partir d'une solution de catéchine autoxydée pendant 6 jours dans l'acétate d'ammonium à pH = 3.

A. Appareillage

La purification des marqueurs a été conduite sur une chaîne CLHP semi-préparative équipée des éléments suivants : deux pompes haute pression Gilson (modèles 305 et 306), une vanne d'injection Rhéodyne et une boucle d'injection de 2 mL, un mélangeur de phases mobiles, une colonne C18 phase inverse, un détecteur UV-Visible Jasco 875, et enfin une table traçante.

B. Conditions d'analyse

1. Solvants

La séparation a été réalisée à partir d'un système de solvants binaire, où le solvant A était une solution aqueuse d'acide acétique à 1 %, et le solvant B un mélange contenant 80 % d'acétonitrile et 1 % d'acide acétique.

2. Gradients d'élution

Le débit de solvant a été fixé à $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et le volume d'échantillon injecté était de 1 à 2 mL. Les gradients d'élution utilisés pour chacune des purifications sont rassemblés dans le Tableau 5. Il sont caractérisés par les variables « temps » et « pourcentage de solvant B ».

Temps (min)	Marqueurs de vieillissement	Déhydro-dicatéchine B4
0	10	14
10	16	
12		14,5
14	16	
15		15
16	50	
18	50	
20	10	50
22	10	14
26		14

Tableau 5: Gradients d'élution

3. Détection UV-Visible

Le déroulement de l'élution a été suivi par détection UV-Visible à 280 nm.

VII. Caractérisation de la composition polyphénolique

A. Dosage global des polyphénols

1. Indice de Folin-Ciocalteu

a) Mode opératoire

Un échantillon de 50 μL de vin blanc de Champagne a été prélevé, puis filtré à travers une membrane Millipore 0,2 μm . Il a alors été additionné de 450 μL d'eau millipore et 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au cinquième. Enfin 2 mL d'une solution de carbonate de sodium saturée (75 g.L^{-1}) ont été ajoutés, et la solution a été agitée.

Après deux heures dans une étuve thermostatée à 25 °C, l'absorbance de la solution a été mesurée par spectrophotométrie UV-visible. L'échantillon a été analysé dans une cuve en quartz de 2 mL et de chemin optique 5 mm.

Dans un même temps, le blanc a été préparé selon le même mode opératoire, en remplaçant l'échantillon de vin par de l'eau Millipore.

b) Etalonnage avec l'acide gallique

La quantification des polyphénols totaux contenus dans les vins blancs a nécessité un étalonnage préalable réalisé avec une gamme de solutions d'acide gallique à 50, 100, 150, 200, 250, 300, et 400 mg.L^{-1} préparées selon le même mode opératoire que le vin. Ces solutions ont été préparées en triple.

2. Test au DMAC

a) Calibration

La calibration a été établie à partir de solutions de catéchine dans le méthanol de concentrations 0, 5, 10, 15 et 20 mg.L^{-1} . Un volume de 1 mL de DMAC à 0,2 mg.L^{-1} dans le méthanol/ H_2SO_4 (75:25, v:v) a été ajouté à 200 μL de solution de catéchine. Après incubation à température ambiante pendant 9 minutes, l'absorbance a été relevée à 640 nm. Chaque point de la courbe de calibration est triplé. La solution à 0 mg.L^{-1} a été utilisée comme référence.

b) Application aux vins

Les vins ont été préparés de façon similaire en ajoutant, à 200 µL de l'échantillon, 1 mL de méthanol/H₂SO₄ (75:25, v:v), et ont subi le même traitement.

3. Bate Smith

Le mode opératoire a été adapté de la méthode proposée par Porter et al.⁹⁷.

a) Calibration

La calibration a été établie à partir de solutions de chlorure de cyanidine dans le butanol/HCl (95:5, v:v) de concentrations 0, 5, 10, et 15 mg.L⁻¹. Des volumes de 2 mL de butanol/HCl (95:5, v:v), et 100 µL de NH₄Fe(SO₄)₂ · 12 H₂O à 2 % dans HCl 2M (sel de Mohr) ont été additionnés à 100 µL de solution de chlorure de cyanidine. Après incubation à 90°C pendant 40 minutes, puis refroidissement à température ambiante, l'absorbance a été relevée à 540 nm. Chaque point de la courbe de calibration a été triplé et la solution à 0 mg.L⁻¹ a été utilisée comme référence.

b) Application aux vins

Les vins ont été préparés de façon similaire en ajoutant, à 100 µL de l'échantillon, 2 mL de butanol/HCl (95:5, v:v), et 100 µL de sel de Mohr.

4. Décomplexation par le sodium dodécyl sulfate (SDS)

Un échantillon de 1 mL de vin a été additionné de 20 µL de SDS 10 %, puis chauffé pendant 5 min à 90°C. Le refroidissement jusqu'à température ambiante a été mené sous eau tiède.

B. Caractérisation structurale

1. Séparation par CLHP

a) Appareillage

Les analyses ont été réalisées sur une chaîne Waters Alliance constituée d'un module de séparation 2690 incluant le système de pompage, l'injecteur automatique et le four de

colonne, couplé à un détecteur à barrettes de diodes DAD 996. L'automatisation des injections ainsi que l'enregistrement des spectres UV-visible est assuré par le logiciel Millennium.

La séparation des composés a été obtenue sur une colonne de phase inverse Lichrospher 100RP-18 (5 μ m, 250X2mm, Merck, Darmstadt, Allemagne), protégée par une précolonne aux caractéristiques identiques.

b) Analyse des vins et solutions modèles

Les conditions d'élution ont été les suivantes : débit de 0,25 mL.min⁻¹, température du four à 30°C, volume d'injection de 5 μ L.

Le système de solvants utilisé était constitué d'un solvant aqueux A (0,1 % acide formique, 99,9 % eau millipore) et d'un solvant organique B (80 % acétonitrile, 19,9 % eau, 0,1 % TFA), et le programme d'élution est présenté dans le Tableau 6.

Temps (min)	Débit (mL.min ⁻¹)	%A	%B
0	0,25	98	2
7	0,25	98	2
22	0,25	80	20
30	0,25	70	30
40	0,25	60	40
45	0,25	50	50
50	0,25	20	80
55	0,25	98	2

Tableau 6 : Gradient d'élution CLHP des vins et solutions modèles

c) Analyse des monomères de flavanols, acides phénols et anthocyanes contenus dans les baies

Les conditions de débit, température de four et volume d'injection étaient identiques à celles décrites précédemment.

Le système de solvants était constitué de solvants similaires contenant dans ce cas 5% d'acide formique, et le programme d'élution est présenté dans le Tableau 7.

Temps (min)	Débit (mL.min ⁻¹)	%A	%B
0	0,25	100	0
15	0,25	98	2
30	0,25	90	10
40	0,25	80	20
45	0,25	70	30
50	0,25	60	40
55	0,25	50	50
60	0,25	20	80
65	0,25	100	0

Tableau 7 : Gradient d'élution CLHP des extraits polyphénoliques de raisin en injection directe

2. Analyse CLHP-SM

Les analyses de masse et expériences de fragmentations ont été réalisées avec un spectromètre de masse ThermoFinnigan LCQ Advantage (San Jose, CA), équipé d'une source électrospray ou APCI, et d'une trappe ionique contrôlées par le logiciel de navigation LCQ. L'appareil a été utilisé en mode positif ou négatif selon les besoins, et sur une gamme de masse de $m/z = 100$ à 2000 Th. Les conditions d'analyses telles que la tension en source, la température du capillaire, ou l'énergie de collision pour la fragmentation, ont été ajustées selon les échantillons.

3. Analyse des tanins par phloroglucinolyse

Les modes opératoires suivis sont ceux utilisés au laboratoire, en particulier celui pour la phloroglucinolyse du vin qui a été optimisé sur les vins rouges.

a) Solution de phloroglucinol

Des masses de 250 mg de phloroglucinol et 50 mg d'acide ascorbique ont été pesées puis mises en solution dans 5 mL de HCl 0,2N dans le méthanol.

b) Acidolyse

(1) Cas des extraits polyphénoliques

Chaque extrait sec a été repris dans 100 μL de la solution de phloroglucinol préparée précédemment, puis ultrasoniqué pendant quelques minutes. L'acidolyse a alors été réalisée par immersion des flacons dans un bain thermostaté à 50°C pendant 20 minutes, puis stoppée par ajout de 100 μL d'acétate de sodium 200 mM.

(2) Cas des vins et du jus

Un volume de 4 mL de vin a été évaporé à sec sous vide (Genevac en mode CLHP fraction sous une température de 35°C). Le culot a alors été remis en suspension dans 200 μL d'eau MilliQ acidifiée (1 % acide acétique (v:v)), puis homogénéisé par passage au vortex et aux ultrasons.

Après conditionnement d'une cartouche de Sep-Pack (500 mg, tC18) avec 4 mL de méthanol puis 3 mL d'eau acidifiée, l'échantillon de vin préparé précédemment a été déposé. La cartouche a alors été lavée avec 5 mL d'eau acidifiée, et les composés polyphénoliques ont été élués dans un second temps avec 8 mL de méthanol. Cette dernière fraction, à laquelle ont été ajoutés 100 μL d'une solution d'étalon interne à 0,4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (methylparabène), a été portée à sec par passage à l'évaporateur rotatif sous vide (Genevac).

Concernant le jus, 1 mL d'échantillon obtenu par pressurage sous vide a été déposé sur la cartouche, et le mode d'éluion est identique à celui utilisé pour les vins.

L'acidolyse des extraits a alors été réalisée par 100 μL de solution de phloroglucinol additionnée sur le résidu sec dans un bain thermostaté à 50°C pendant 20 minutes, puis stoppée par ajout de 100 μL d'acétate de sodium 200 mM.

c) Analyse CLHP-DAD/fluorimètre

L'analyse CLHP a été réalisée sur un système de chromatographie liquide (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD), et d'un spectrofluorimètre.

Les échantillons (volume d'injection de 10 μL) ont été injectés sur une colonne phase inverse Atlantis dC18 (garniture 5 μm , 250x4.6 mm ; Waters, Milford MA) protégée par une

pré-colonne (20x4.6 mm ; Waters, Milford MA), et maintenue à 30°C dans un four. Un système binaire de solvants est utilisé avec un débit de 1 mL.min⁻¹, le solvant A étant de l'eau acidifiée à 2% d'acide formique, et le solvant B un mélange acétonitrile/eau/acide formique (80:18:2, v:v:v). Le gradient d'élution était le suivant : 0-5 min, isocratique à 0% de B ; 5-65 min, linéaire 0-20% de B ; 65-70 min, linéaire 20-100% de B ; 70-75 min, linéaire 100-0% de B. Les concentrations ont été calculées en utilisant les aires de pics calibrées à partir de standards externes, soit commerciaux ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (-)-épigallocatechine, (-)-épicatéchine-3-gallate pour la quantification des flavanols, et malvidine-3-O-glucoside pour la quantification des anthocyanes), soit purifiés au laboratoire (dérivés phloroglucinol pour la quantification des flavanols, et acide caftarique pour celle des acides hydroxycinnamiques). Ces teneurs ont été déterminées avec le détecteur à barrette de diodes à 280, 320, et 520 nm, respectivement pour les flavanols, les acides phénols et les anthocyanes, ou avec le spectrofluorimètre (émission à 275 nm et détection à 322 nm) pour les unités de flavanols non galloylées. La variabilité éventuelle liée aux erreurs de dilution ou de volume d'injection est compensée en prenant en compte l'aire du pic de l'étalon interne (méthylparabène). La concentration en tanins a été calculée comme étant la somme des concentrations des différentes unités constitutives, les unités terminales étant détectées sous forme de monomères de flavanols, et les unités d'extension sous forme des adduits phloroglucinol correspondants.

Le degré de polymérisation moyen (DPM) a été calculé à partir des proportions des différentes unités constitutives par la formule :

$$DPM = \frac{\Sigma_{\text{terminal+extension}}}{\Sigma_{\text{terminal}}}$$

4. Caractérisation des polyphénols par Résonance Magnétique Nucléaire

L'acquisition des spectres RMN 1D¹H a été réalisée sur un spectromètre 600 MHz de la firme Bruker Advance avec une sonde cryo inverse de 5mm de diamètre. La température a été fixée à 277 K, et le pulse 90° calibré pour chaque échantillon, avec des valeurs comprises entre 9,5 et 10,5 µsec. Les mesures ont été faites dans l'eau avec rajout de 5 à 10 % D₂O ou dans le DMSO pour permettre de "locker" le spectromètre.

La suppression du signal de l'eau a été faite avec la technique « excitation sculpting ». ⁹⁸ Les impulsions de gradient utilisées sont de 1 msec, les intensités de gradients de 31 % et 11 % pour le premier et le deuxième écho de gradient, les impulsions 180 sélectives sont des sinc(x), définies sur 1000 points, de 1 msec de durée et de 24,5 db.

Les cinétiques ont été mesurées en mélangeant rapidement les différents produits directement dans le tube RMN, et en introduisant rapidement le tube dans le spectromètre. L'expérience étant directement lancée sans accord de sonde ni réglage de l'homogénéité du champ, un temps mort de 40 à 80 secondes était observé entre le mélange et la première mesure utile. Les expériences de cinétiques ont été enregistrées en répétant l'expérience de 1D. Chaque 1D a été mesurée sur 8 passages, pour un temps de mesure de 12 secondes. Les 1D ont été accumulées dans une pseudo expérience 2D. Dans tous les cas, les spectres obtenus dans les premières minutes d'acquisition ont dû être décalés en fréquence pour éliminer les effets de stabilisation de température. Dans certains cas, une moyenne locale le long de l'axe cinétique a été faite pour améliorer le rapport signal/bruit.

La mesure DOSY a été réalisée grâce à une séquence « échos stimulés » de type LED⁹⁹ présentée sur la Figure 26.

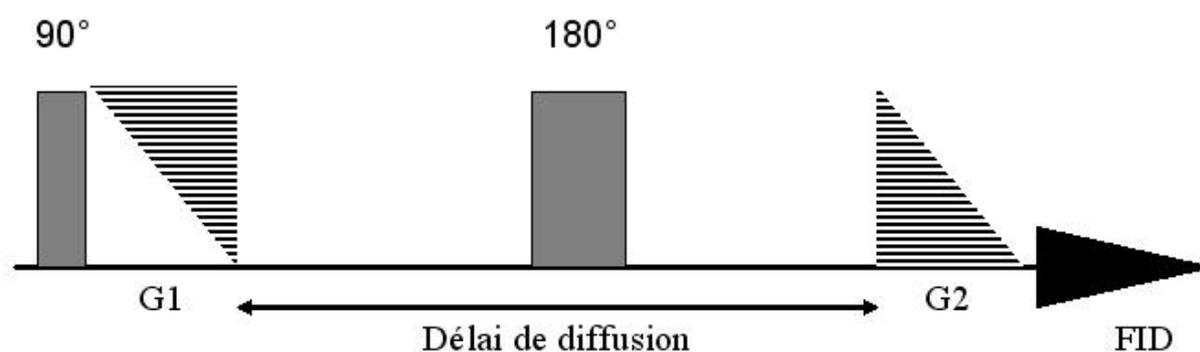


Figure 26 : Séquence "spin echo"

Les gradients sont de type bipolaire, chaque onde est de forme trapézoïdale d'une durée de 1 à 1,5 msec avec des fronts de montée et de descente de 150 µsec. Le délai de récupération après gradient est de 250 µsec. Le délai de diffusion était compris entre 100 et 250 msec.

Pour chaque expérience DOSY, les paramètres de la séquence ont été choisis de façon à annuler l'intensité des signaux à 95 % du gradient de champ. Cinquante (ou 40) expériences ont été acquises au cours de l'évolution linéaire de l'intensité du gradient de 2 à 95 %. Chaque expérience a été réalisée avec un nombre d'accumulation compris entre 64 et 256 scans. Le temps d'acquisition total pour une expérience DOSY a varié de 2h à 5h selon qu'il s'agit de molécules pures ou de mélanges de produits issus de réactions d'oxydation.

a) Traitement des données

Toutes les données ont été traitées en utilisant, soit le logiciel Gifa 5.2 de NMRtec SAS,¹⁰⁰ soit le logiciel NPK.¹⁰¹ Les coefficients de diffusion ont été déterminés par la méthode « transformée de Laplace Inverse ».¹⁰²

Les spectres DOSY sont présentés avec les déplacements chimiques des protons sur l'axe horizontal, et les coefficients de diffusion sur l'axe vertical. L'axe de diffusion a une échelle logarithmique et les coefficients sont exprimés en $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

VIII. Distribution en masse des tanins par MALDI-TOF

A. Gamme de protéines

Serum albumine bovine (BSA) (fraction V, $M_w \sim 66700$), β -caséine ($M_w \sim 24000$), myoglobine équine ($M_w \sim 17000$) et β -lactoglobuline bovine ($M_w \sim 18400$) ont été fournies par Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, MO).

B. Complexation

Des solutions de protéines à 2 mg.mL^{-1} et 20 mg.mL^{-1} (soit respectivement 30 et 300 μM pour la BSA) ont été préparées dans l'acide acétique 1 % dans l'eau, ainsi que des solutions de tanins à 9 mM. Il est à noter que la masse molaire prise en compte pour le calcul des concentrations molaires des tanins condensés est la masse molaire moyenne déterminée à partir des résultats de thiolyse. Dans le cas des tanins hydrolysables, elle a été estimée à partir de l'analyse directe de la fraction par MALDI-TOF.

Les solutions de protéines et tanins ont été mélangées selon quatre rapports protéine-tanins (10:1, 1:1, 1:10, 1:300), puis agitées pendant 30 minutes sur agitateur mécanique. Les mélanges 1:1, 1:10, et 1:300 ont alors été soumis à une étape supplémentaire de séparation des tanins sous forme libre du mélange complexes protéine-tanin et protéine seule, via le passage sur membrane centricon 10kD et centrifugation à 5000g et 5°C pendant 55 minutes.

Sauf indication contraire, les mélanges ont été redilués de façon à ajuster la concentration en protéine à environ 1 mg.mL^{-1} avant analyse MALDI-TOF.

Les expériences ont été doublées.

C. Analyse MALDI-TOF

1. Matrices

Le choix de la matrice a été fait à partir des résultats d'essais utilisant l'acide dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide *trans*-indolacétique (t-IAA), l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique, l'acide 3-5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique, et l'acide *trans*-3-5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique 98 %.

Les solutions de matrice ont été préparées à une concentration de 10 mg.mL⁻¹, dans une solution aqueuse d'acétonitrile à 50 % acidifiée avec 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA), puis additionnées aux solutions contenant les complexes tanin-protéine (50 %, v:v). Après un bref mélange de l'analyte et de la matrice, 1 µL a été déposé sur la cible et laissé sécher à l'air ambiant. Une calibration de masse externe a été utilisée. Dans cette étude, 700 tirs ont été sommés pour obtenir le spectre final.

2. Appareillage

Les analyses ont été réalisées sur un MALDI-TOF BiFlex III (Bruker Daltonics). Les spectres de masses ont été acquis en mode linéaire sur une gamme de masse de 60 à 120 kDa ou en mode reflectron sur une gamme de masse de 500 à 5000 Da, en utilisant une puissance d'accélération ajustée.

D. Traitement mathématique des données

Les distributions en masse des différentes fractions de tanins ont été caractérisées par les paramètres classiques utilisés pour les polymères, soit la masse moyenne en nombre (M_n), la masse moyenne en poids (M_w), et l'indice de polydispersité (PI) dont les formules sont données ci-dessous.

$$M_n = \frac{\sum (m/z)_i * I_i}{\sum I_i}, \text{ où } I \text{ est l'intensité absolue}$$

$$M_w = \frac{\sum (m/z)_i^2 * I_i}{\sum (m/z)_i * I_i}$$

$$PI = \frac{M_w}{M_n}$$

Chapitre I

Caractérisation de la composition polyphénolique des cépages champenois

Optimisation de l'extraction des acides phénols, anthocyanes et flavanols de raisin à partir d'un plan d'expérience

Ce chapitre fait l'objet d'une publication soumise dans Journal of Agricultural and Food Chemistry (annexe 1).

Une des particularités de la vinification champenoise est de procéder à un pressurage doux et progressif, dans le but de limiter la coloration liée à l'extraction des anthocyanes contenues dans la pellicule. La majeure partie des composés polyphénoliques présents dans les jus et vins de Champagne provient donc de la pulpe, la contribution des pépins et de la pellicule étant largement plus faible.

Les acides phénols contenus dans la pulpe et les moûts de raisin ont déjà fait l'objet d'études,^{20, 68} et plus particulièrement dans le contexte champenois avec un travail sur l'oxydation des moûts de Pinot noir et Chardonnay.¹⁰³ Au contraire, jusqu'à maintenant, il n'est fait aucune référence à d'éventuels tanins contenus dans la pulpe de ces cépages champenois.

Pourtant, alors que le brunissement enzymatique est corrélé à la teneur en acides hydroxycinnamiques, le brunissement des vins blancs est généralement corrélé à la teneur en flavanols.⁷²

L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier la composition phénolique des trois cépages majeurs impliqués dans l'élaboration des champagnes et de déterminer la distribution de ces composés, à savoir plus précisément les flavanols, les acides phénols et les anthocyanes, dans la pulpe, la pellicule et les pépins. Les conclusions de ce travail sont essentielles pour confirmer ou infirmer l'éventuelle implication des tanins dans le brunissement des vins de Champagne, et savoir si les cépages champenois se différencient entre eux par la teneur ou la proportion de cette classe de polyphénols.

Dans cet objectif, l'extraction des trois classes de polyphénols doit être optimisée pour chacun des compartiments. L'extraction des polyphénols dépend de leur diffusion dans le solvant d'extraction,¹⁰⁴ diffusion déterminée à la fois par leur structure et par leurs interactions avec d'autres composés du fruit. Ainsi la littérature donne accès à diverses méthodes d'extraction, variant par la nature du solvant, la durée ou encore le volume de liquide, selon l'accessibilité des polyphénols dans les différentes matrices. Par ailleurs, conséquence de la labilité des liaisons interflavaniques des tanins et de l'oxydabilité des polyphénols, une méthode valide doit permettre d'extraire le pool polyphénolique tout en limitant leur dégradation.¹⁰⁵ Eau acidifiée, solutions hydroalcooliques de méthanol¹⁰⁶ ou d'éthanol¹⁰⁷, ainsi que mélanges acétone/eau¹⁰⁸ sont communément utilisés pour extraire les polyphénols à partir des baies de raisin. On note en particulier que les polyphénols de faible masse molaire, que sont les acides phénols, les anthocyanes, et les monomères et oligomères de flavanols, sont correctement extraits avec du méthanol, alors que les flavanols de hautes masses molaires sont mieux extraits avec un mélange acétone/eau qu'avec le méthanol.¹⁰⁹⁻¹¹²

L'ajustement des conditions d'extraction est généralement réalisé en optimisant successivement les paramètres principaux influençant l'efficacité sans prendre en compte les éventuelles interactions existant entre eux.¹¹³ Dans notre étude, une méthodologie basée sur les surfaces de réponse et utilisant un plan d'expérience de Doehlert est proposée. Cette approche permet non seulement de minimiser le nombre d'expériences, mais surtout d'évaluer simultanément l'effet de chacun des paramètres et de leurs interactions sur l'efficacité de l'extraction. La contribution de chaque facteur est donc déterminée avec une meilleure précision qu'elle ne l'aurait été à partir de l'optimisation successive des différents paramètres. Une telle méthodologie a été récemment utilisée pour déterminer les paramètres majeurs influençant l'extraction de composés phénoliques et acides organiques d'un raisin blanc du cépage Vinho Verde.¹¹⁴ Cependant, aucune précision n'a été donnée concernant le compartiment étudié. Par ailleurs, l'efficacité de l'extraction a été évaluée sur quatre flavonols et un flavanol monomère (épicatechine), connus pour être des polyphénols mineurs du raisin, tandis que les composés majoritaires que sont les acides phénols, les anthocyanes et les tanins, n'ont pas été considérés.

I. Evaluation préliminaire de l'influence de quelques paramètres

A. Effet du rapport solide/liquide

Une première étude a été réalisée sur chacun des trois compartiments de la baie de Pinot noir, avec pour objectif de définir la gamme de valeurs du rapport solide/liquide la plus appropriée à considérer par la suite. La masse de résidu solide étant fixée dans le plan d'expérience ultérieur, cela équivaudra au choix d'une gamme de volumes d'extraction. Trois rapports solide/liquide ont été testés pour chaque compartiment, soit 100 mg dans 2 mL de solvant acétone/eauTFA (60/40 + 0,05%), 50 mg dans 2mL et 50 mg dans 4 mL pour la pellicule et les pépins, 200 mg dans 2 mL, 100 mg dans 2 mL, et 100 mg dans 4 mL pour la pulpe, ce qui permet de couvrir des domaines de 12,5 à 50 mg.mL⁻¹, et 25 à 100 mg.mL⁻¹ respectivement.

L'influence du rapport solide/liquide sur la concentration et les caractéristiques des flavanols, anthocyanes et acides phénols extraits des différents compartiments de la baie de Pinot noir est illustrée sur la Figure 27.

Le rendement d'extraction des anthocyanes à partir de la pellicule est identique pour les trois rapports testés. Au contraire, ceux des flavanols et acides phénols sont significativement plus faibles avec le plus haut rapport solide/liquide qu'avec les deux autres rapports, quel que soit le compartiment. Une poursuite de l'abaissement du rapport solide/liquide n'induit pas d'augmentation significative du rendement d'extraction des acides hydroxycinnamiques à partir de la pulpe, ni de celui des flavanols à partir de la pellicule ou de la pulpe, ce qui indique que la saturation du solvant n'a lieu qu'avec le plus haut rapport solide/liquide. C'est pourquoi les conditions d'extraction sélectionnées pour la suite des expériences utiliseront des rapports solide/liquide inférieurs à 25 mg.mL⁻¹ dans le cas de la pellicule et des pépins, et 50 mg.mL⁻¹ lorsqu'il s'agit d'étudier la pulpe. Au contraire, le rendement d'extraction des flavanols à partir des pépins, et des acides phénols à partir de la pellicule augmente significativement à chaque étape de diminution du rapport solide/liquide, ce qui ne permet pas d'exclure un phénomène de saturation dans la gamme testée. Par conséquent, des rapports plus faibles seront testés dans les étapes d'optimisation suivantes.

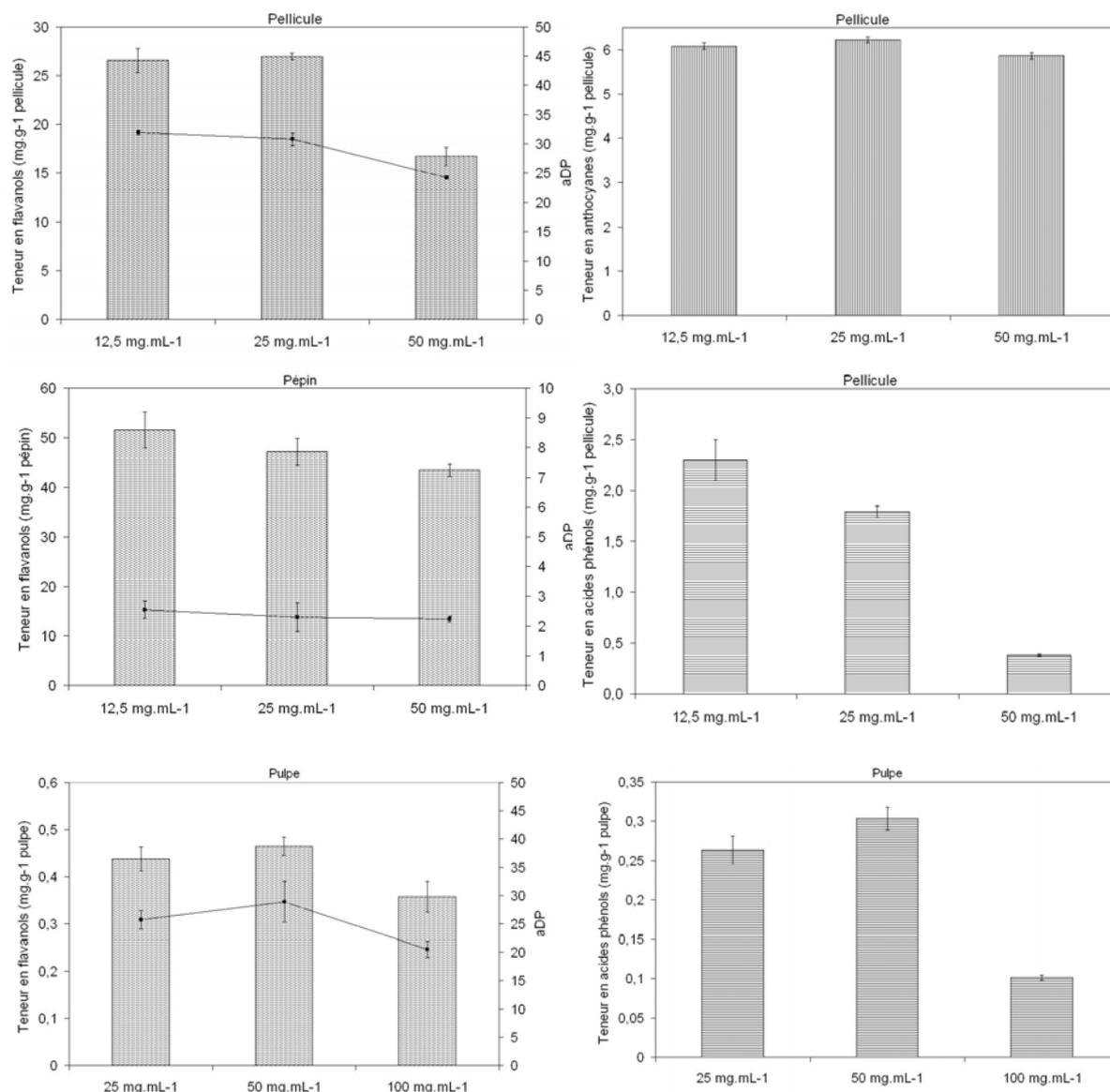


Figure 27 : Influence du rapport solide/liquide sur l'extraction par un solvant acétone/eau/TFA (60/40 + 0,05%) des flavanols, acides phénols et anthocyanes à partir de la pellicule, du pépin et de la pulpe. Histogramme : teneur ; ■ : Degré de polymérisation moyen des polymères de flavanols. Les barres d'erreurs correspondent à 3 répétitions

B. Comparaison extraction simple/extraction multiple

Une série d'expériences basées sur des extractions à volume total et durée d'extraction constants est envisagée, soit une extraction simple de deux heures contre quatre extractions successives de 30 minutes avec un quart du volume total à chaque extraction, dans le but de déterminer si l'augmentation du nombre d'extractions améliore l'efficacité globale. La littérature rassemble en effet des travaux décrivant des expériences basées sur une extraction

multiple avec un solvant unique,^{113, 115} alors que d'autres utilisent plutôt une extraction unique.¹¹⁶

Les teneurs en flavanols, acides phénols, et anthocyanes extraits par extraction unique et extraction multiple sont présentées dans la Figure 28.

Dans le cas des extractions multiples réalisées sur les trois compartiments de la baie de raisin, la majeure partie des composés phénoliques est extraite dans la première étape d'extraction, et de moins en moins sont extraits dans les étapes suivantes. Ce résultat était attendu puisque la méthode d'optimisation d'extraction par épuisement est ancrée sur cette observation. Si l'on s'intéresse aux pépins et à la pulpe, les quantités de flavanols obtenues avec les méthodes d'extraction multiple et unique ne sont pas significativement différentes. De la même façon, l'extraction des anthocyanes à partir de la pellicule ne dépend pas du nombre d'étapes d'extraction. Au contraire, l'extraction des flavanols à partir de la pellicule et celle des acides phénols à partir de la pulpe ou de la pellicule sont significativement plus faibles avec la méthode d'extraction en 4 étapes qu'avec l'extraction unique correspondante. Les tanins de la pellicule, localisés dans les vacuoles et liés pour partie à la paroi cellulaire et à la membrane vacuolaire,^{117, 118} sont pourtant décrits comme étant assez facilement extraits lors de la vinification, comparés aux tanins des pépins.¹¹⁹ L'exposition à des solvants organiques pourrait être à l'origine d'une adsorption irréversible des tanins sur les parois cellulaires ou sur d'autres composés contenus dans les cellules, tels que les protéines et les polysaccharides, réduisant ainsi l'extractibilité dans les étapes d'extraction ultérieures. On peut également envisager que le faible volume de solvant utilisé dans chaque étape de l'extraction multiple soit insuffisant pour inhiber l'oxydation enzymatique qui se traduirait alors par une dégradation des flavanols et acides hydroxycinnamiques. Enfin, les résultats des expériences préliminaires montrent que l'extraction optimale est obtenue par une extraction unique de deux heures.

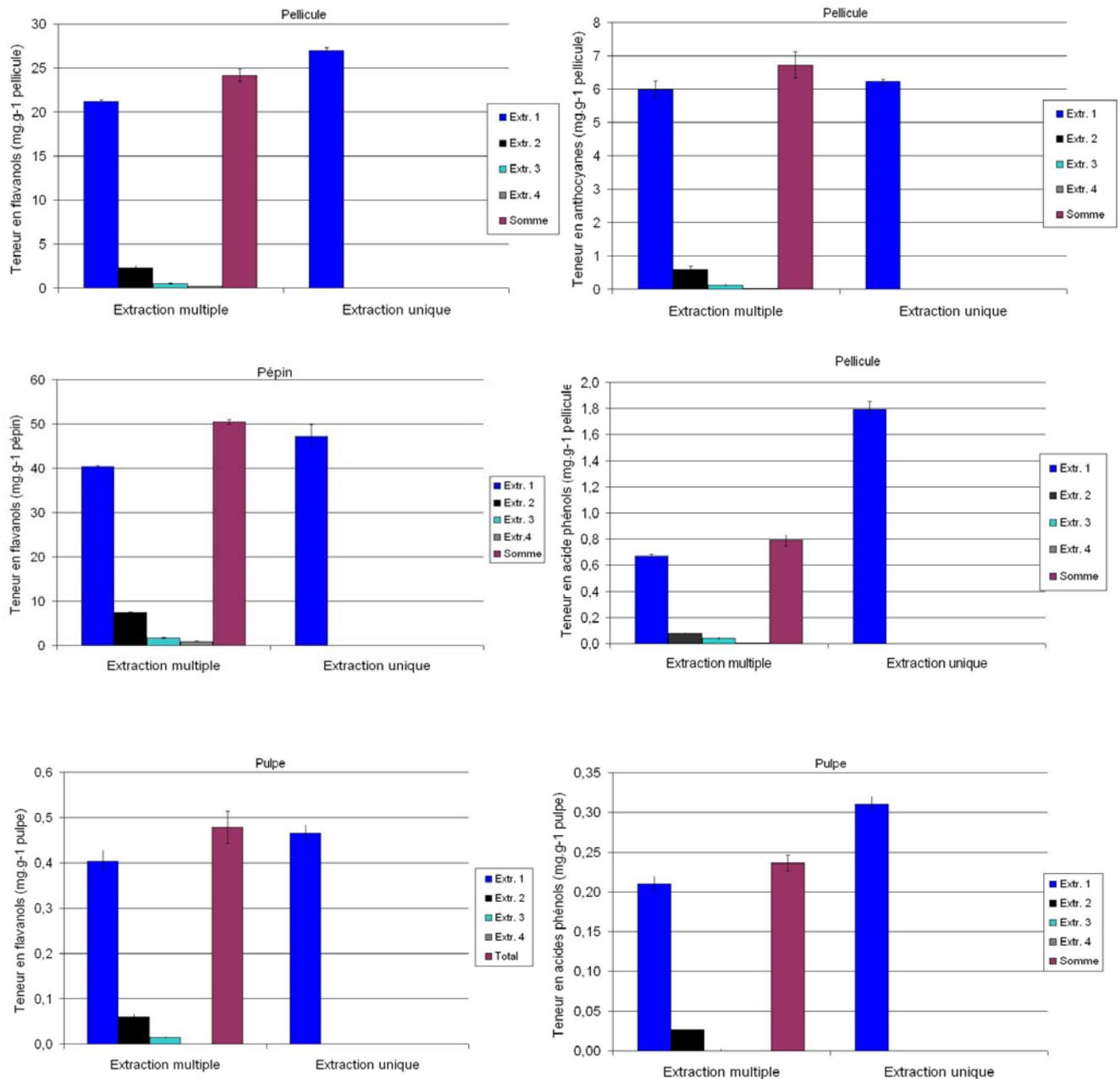


Figure 28 : Teneurs en flavanols, acides phénols, et anthocyanes, obtenues avec extraction multiple ou extraction unique par un solvant acétone/eau/TFA (60/40 + 0,05%). Les barres d'erreurs correspondent   3 répétitions

II. Optimisation simultanée de la nature du solvant d'extraction, du rapport solide/liquide, et de la durée d'extraction : approche par un plan d'expérience de Doehlert

Un plan d'expériences de Doehlert a été utilisé pour déterminer le poids de différents facteurs, que sont le volume de solvant, la durée d'extraction, et le taux de méthanol dans le solvant, sur l'efficacité de l'extraction, ainsi que celui des interactions existant entre ces facteurs.

A. Définition du domaine expérimental

A partir de là, la durée d'extraction est étudiée sur une gamme variant de 15 minutes à 2 heures. En effet, bien que l'on s'attende à obtenir des quantités de polyphénols plus importantes par allongement de la durée d'extraction, les longues durées sont susceptibles d'induire une dégradation des composés extraits. En particulier, des artefacts issus de réactions d'anthocyanes avec l'acétone ont déjà été rapportés.¹²⁰ Un des principaux objectifs de l'étude est donc de trouver un compromis qui permette une extraction correcte tout en minimisant la dégradation. Un second objectif est, si possible, de diminuer le temps d'extraction de façon à pouvoir envisager un haut débit d'expériences. Les expériences préliminaires ont montré que le rapport solide/liquide devait être suffisant pour éviter la saturation. Afin de modifier ce rapport, une gamme de volumes d'extraction est balayé, la quantité de compartiment étudié étant fixée à 50 mg pour la pellicule et les pépins, ou 100 mg pour la pulpe. Toutefois, les volumes faibles devraient être préférés dans un esprit de protection de l'environnement mais aussi de réduction des temps d'évaporation, pour autant qu'ils permettent d'obtenir des facteurs de concentration finaux appropriés. Le volume d'extraction est donc étudié entre 2 et 9 mL.

Par ailleurs, des études antérieures ont montré que l'extraction des anthocyanes et des flavanols de faibles masses molaires par du méthanol acidifié ou un mélange eau/méthanol était efficace,^{121, 122} tandis que l'utilisation d'un mélange acétone/eau était plus adapté à l'extraction des tanins de haut degré de polymérisation.^{109, 123} C'est pourquoi, l'évaluation de l'efficacité de l'extraction par des mélanges acétone/méthanol/eau en différentes proportions est envisagée. Un tel mélange (acétone/méthanol/eau 40 :40 :20, v :v :v) a été choisi par

Perret pour extraire les tannins à partir d'une poudre de raisin.¹²⁴ En outre, dans nos expériences, le méthanol acidifié avec le TFA 0,05% est ajouté seul dans un premier temps au résidu solide dans le but d'inhiber l'activité de la polyphénoloxydase. Celle-ci peut en effet provoquer l'oxydation des acides hydroxycinnamiques et l'oxydation couplée des flavanols²³ et anthocyanes.¹²⁵ Le taux de méthanol dans le solvant d'extraction est donc étudié dans la gamme qui s'étend de 0 à 30 %.

Sept, cinq et trois niveaux d'étude sont attribués respectivement au volume de solvant, au temps d'extraction, et au taux de méthanol (Tableau 8).

N° Exp.	Temps (min)		Volume de solvant (mL)		Methanol (%)	
1	120	[1]	5,5	[0]	15	[0]
2	93,75	[0,5]	8,53	[0,866]	15	[0]
3	41,25	[-0,5]	8,53	[0,866]	15	[0]
4	15	[-1]	5,5	[0]	15	[0]
5	41,25	[-0,5]	2,47	[-0,866]	15	[0]
6	93,75	[0,5]	2,47	[-0,866]	15	[0]
7	93,75	[0,5]	6,51	[0,289]	27,24	[0,816]
8	41,25	[-0,5]	6,51	[0,289]	27,24	[0,816]
9	67,5	[0]	3,48	[-0,577]	27,24	[0,816]
10	93,75	[0,5]	4,49	[-0,289]	2,76	[-0,816]
11	41,25	[-0,5]	4,49	[-0,289]	2,76	[-0,816]
12	67,5	[0]	7,52	[0,577]	2,76	[-0,816]
13	67,5	[0]	5,5	[0]	15	[0]
14	67,5	[0]	5,5	[0]	15	[0]
15	67,5	[0]	5,5	[0]	15	[0]

Tableau 8 : Plan d'expérience de Doehlert à 3 variables

B. Analyse des modèles d'extraction

Les modèles construits à partir de tous les essais du plan d'expérience, représentent les quantités de flavanols, anthocyanes et acides phénols extraites à partir de chacun des compartiments comme une fonction des trois facteurs sélectionnés (Tableau 9).

Le modèle proposé est un modèle polynomial du second ordre, caractérisé par l'équation suivante :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$$

Où Y est la teneur de composés extraits par gramme de matériel

a_i sont les coefficients de régression

$X_1, X_2,$ et X_3 sont les facteurs expérimentaux

	Pellicule			Pulpe		Pépin
	Flavanols	Anthocyanes	Acides Phénols	Flavanols	Acides Phénols	Flavanols
<i>Effets principaux</i>						
T	-0,53	-0,25	-0,04	-0,01	-0,01	3,42
V	3,86	0,06	0,08	0,01	-0,04	2,81
%MeOH	-1,44	-0,10	-0,05	0,04	0,01	-1,88
<i>Interactions</i>						
TxV	0,3	-0,09	-0,07	0	-0,01	-4,1
Tx%MeOH	3,04	0,46	0,46	0,09	-0,01	3,96
Vx%MeOH	0,01	0,26	0,27	0,01	0,02	-1,16
<i>Termes quadratiques</i>						
T ²	-2,84	-0,44	-0,38	-0,05	0,00	-3,61
V ²	-3,95	-0,01	-0,27	-0,09	-0,02	-7,74
%MeOH ²	-1,58	-0,23	-0,37	-0,06	-0,05	-3,3
<i>Variance des coefficients</i>	0,51	0,02	0,06	0,04	0,02	0,2

T : Temps d'extraction

V : Volume de solvant

% MeOH : Taux de méthanol

Les termes significatifs sont en gras

Tableau 9 : Coefficients de régression des modèles

1. Considérations générales

Les termes quadratiques étant tous négatifs, des conditions d'extraction optimale des flavanols, anthocyanes et acides phénols peuvent être trouvées dans le domaine expérimental considéré.

D'autre part, et pour chaque modèle, seuls les termes supérieurs à la variance des coefficients sont significatifs (Tableau 9).

2. Effets principaux

L'extraction des flavanols à partir de la pellicule est principalement affectée par le volume de solvant et, dans une moindre mesure, par le taux de méthanol en sens inverse, tandis que l'impact du temps d'extraction est beaucoup plus faible dans la gamme considérée (Tableau 9 et Figure 29). Plus précisément, la quantité extraite augmente lorsque le volume total d'extraction augmente et lorsque le temps d'extraction ou le taux de méthanol diminue. Leur extraction à partir des pépins est significativement affectée par les trois facteurs, positivement par le temps et le volume d'extraction, et négativement par le taux de méthanol. L'effet négatif du méthanol est en accord avec les travaux démontrant que les flavanols de hautes masses molaires sont mieux extraits avec une solution aqueuse d'acétone qu'avec le

méthanol.¹⁰⁹⁻¹¹² Enfin, aucun des effets principaux n'est significatif dans le cas de l'extraction des flavanols de la pulpe.

La quantité d'anthocyanes extraite est plus faible avec des temps longs et de forts taux de méthanol, mais est augmentée lorsque des volumes de solvant plus grands sont employés.

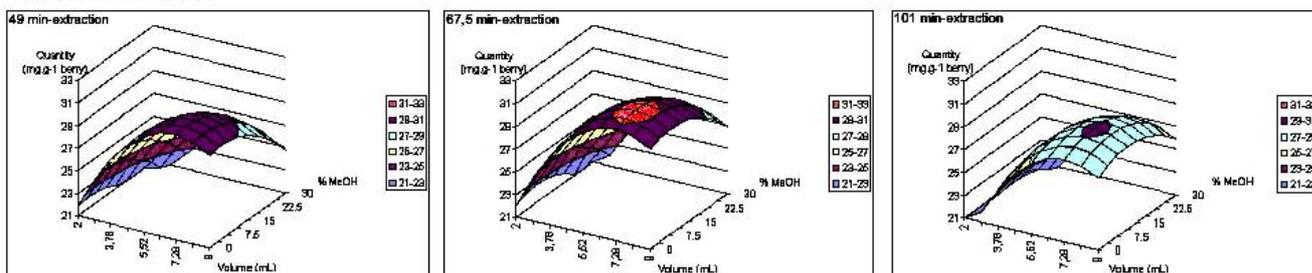
Quant aux acides phénols, leur extraction à partir de la pellicule et de la pulpe dépend uniquement du volume de solvant.

3. Interactions entre les facteurs

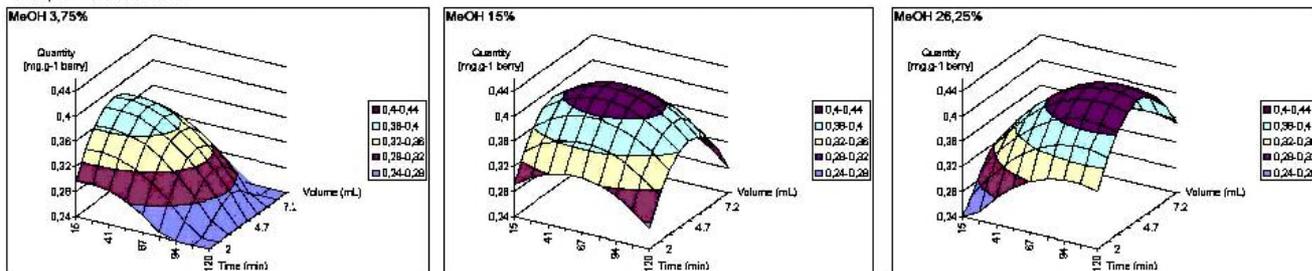
Les interactions entre temps et volume d'extraction sont significatives seulement dans le cas de l'extraction des flavanols à partir des pépins, et de celle des anthocyanes et acides phénols contenus dans la pellicule. Leurs valeurs négatives indiquent que de meilleures extractions sont obtenues soit avec des temps longs associés à de faibles volumes, soit avec des temps plus courts et des volumes plus grands. Des interactions positives significatives entre le temps d'extraction et le taux de méthanol sont observées pour toutes les classes de composés et tous les compartiments, excepté pour les acides phénoliques de la pulpe. Cela indique que l'extraction est largement favorisée dans deux cas : un temps d'extraction long en présence d'un fort taux de méthanol, et un temps court associé à un faible taux de méthanol. Néanmoins, ces résultats sont modulés par l'influence des effets principaux et le dernier terme d'interaction (Volume x %MeOH) qui est significatif pour les anthocyanes et acides phénols de la pellicule (positivement), et les flavanols des pépins (négativement).

L'examen des surfaces de réponse permet de déterminer les conditions optimales d'extraction des différentes classes de polyphénols pour chaque compartiment, et confirme que le maximum d'extraction est atteint dans le domaine d'étude. Ainsi les conditions optimales sont obtenues avec des valeurs intermédiaires de volume de solvant, temps d'extraction, et de pourcentage de méthanol. Ces résultats indiquent qu'un volume minimum est nécessaire pour éviter le phénomène de saturation qui limite l'extraction des tanins, et que le solvant n'est pas saturé lorsque des volumes plus grands sont employés. De plus, une compétition existe entre extraction et dégradation, la dégradation devenant prépondérante sur l'extraction lorsque la durée de l'expérience augmente. Lorsqu'un plus fort taux de méthanol est utilisé, la quantité de flavanols extraite est légèrement plus faible, et le degré de polymérisation moyen des tanins est plus bas également, confirmant ainsi que ce solvant n'est pas adapté à l'extraction des flavanols de haute masse.

Pellicule - Flavanols



Pulpe - Flavanols



Pépin - Flavanols

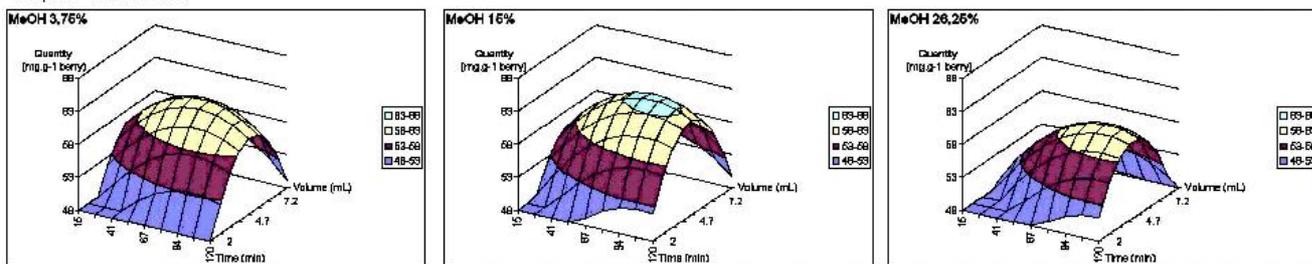
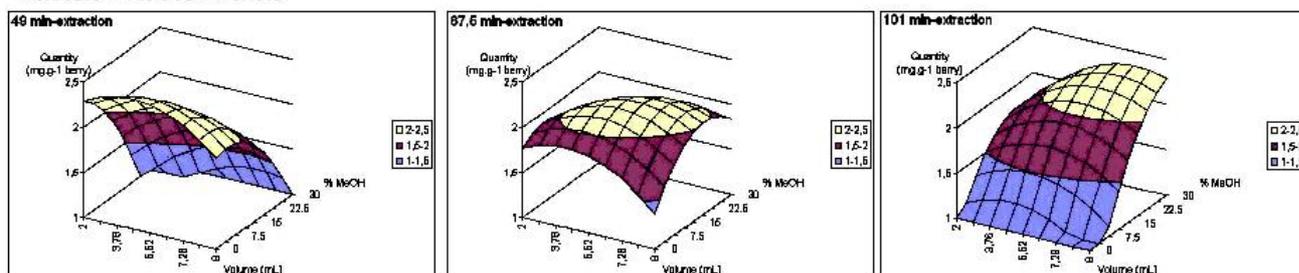
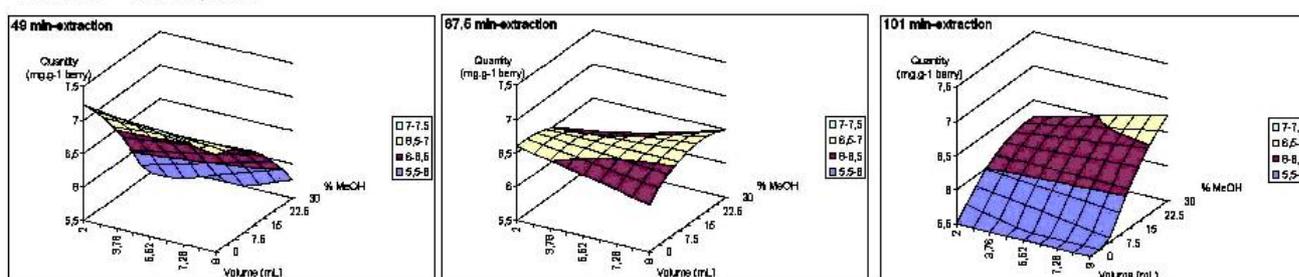


Figure 29 : Surfaces de réponse à faible, moyen et haut niveau de durée d'extraction ou taux de méthanol (selon le facteur qui a l'impact le plus fort vis-à-vis de l'extraction des flavanols), pour les extractions à partir de la pellicule, de la pulpe et des pépins.

Pellicule – Acides Phénols



Pellicule - Anthocyanes



Pulpe – Acides Phénols

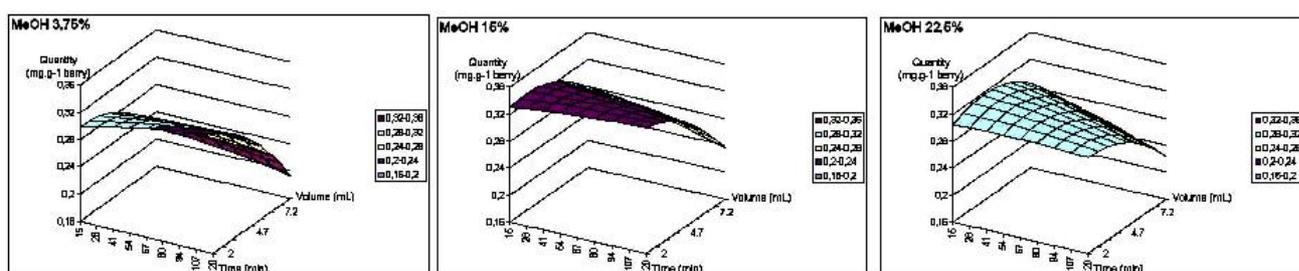


Figure 29 : Surfaces de réponse à faible, moyen et haut niveau de durée d'extraction ou taux de méthanol (selon le facteur qui a l'impact le plus fort vis-à-vis de l'extraction des flavanols), pour les extractions à partir de la pellicule, de la pulpe et des pépins.

Le maximum d'extraction des acides phénols à partir de la pellicule est obtenu en utilisant des conditions d'extraction identiques. Les surfaces correspondant au maximum d'extraction des anthocyanes à partir de la pellicule et des acides phénols à partir de la pulpe sont plus étendues, ce qui suggère que les trois facteurs considérés ont moins d'influence que sur l'extraction des flavanols.

Ainsi, pour chaque compartiment, les conditions optimisées déterminées sur la base de l'extraction des flavanols paraissent être un bon compromis pour les autres classes de polyphénols. Cet optimum est atteint en utilisant un mélange acétone/eau/méthanol (51 :34 :15, v :v :v) acidifié avec 0,05 % TFA, et en procédant à une extraction de 67 minutes avec 7mL (pellicule) ou 5 mL (pulpe) de ce solvant, ou une extraction de 90 minutes avec 5,5mL dans le cas des pépins.

C. Validation des modèles

Une extraction des polyphénols à partir de chacun des compartiments de la baie de raisin a été réalisée en triplet dans les conditions optimum décrites ci-dessus.

Les résultats sont reportés dans le Tableau 10, et comparés aux valeurs prédictives données par les modèles. Pour tous les compartiments, les teneurs de polyphénols estimées à partir des équations décrivant les modèles sont en accord avec les valeurs expérimentales, aucune des différences entre les deux valeurs n'étant significative.

	Pellicule			Pulpe		Pépin
	Flavanols	Anthocyanes	Acides phénols	Flavanols	Acides phénols	Flavanols
<i>Modèles</i>	31±2	6,55±0,01	2,16±0,05	0,42±0,08	0,33±0,02	75±1
<i>Expériences</i>	30±1	6,3±0,2	2,1±0,2	0,45±0,03	0,34±0,01	75,1±0,5

Tableau 10 : Teneurs en polyphénols extraits dans les conditions optimales comparées aux valeurs estimées par les modèles (les résultats sont exprimés en mg.g⁻¹ p.f. de compartiment)

III. Distribution et caractérisation des polyphénols contenus dans les différents compartiments des baies de Pinot noir, Pinot meunier, et Chardonnay

Les teneurs de flavanols, anthocyanes, et acides phénols dans le Pinot meunier et le Chardonnay ont été déterminées en utilisant le même protocole d'extraction et comparées à celles du Pinot noir (Tableau 11).

	Pinot noir			Pinot meunier			Chardonnay		
	Pellicule	Pulpe	Pépin	Pellicule	Pulpe	Pépin	Pellicule	Pulpe	Pépin
<i>Flavanols</i> (mg.g ⁻¹ p.f. compartiment)	30±1	0,45±0,03	75,1±0,5	24,0±0,7	0,26±0,06	101±1	21±1	0,36±0,03	57,6±0,6
<i>Acides phénols</i> (mg.g ⁻¹ p.f. compartiment)	2,1±0,2	0,34±0,01	-	1,14±0,05	0,17±0,01	-	1,65±0,04	0,21±0,03	-
<i>Anthocyanes</i> (mg.g ⁻¹ p.f. compartiment)	6,3±0,2	ε	-	3,3±0,3	ε	-	-	-	-
<i>Pourcentage relatif pondéral des compartiments (%)</i>	10	81,7	6,4	18,2	74,4	6,4	11,4	83,6	4
<i>Flavanols</i> (mg.kg ⁻¹ p.f. baies)	3000±100	370±20	4840±30	4400±100	210±40	6400±100	2400±100	320±30	2300±30
<i>D_{Pm}</i>	39±2	21±1	2,9±0,7	37±2	18±2	3,65±0,07	23±1	18,3±0,7	4,24±0,01
<i>%galloylation</i>	1,13±0,08	5,2±0,1	9,5±0,1	1,46±0,08	4,3±0,4	13,2±0,1	1,8±0,1	3,2±0,5	12,7±0,1
<i>%εgc</i>	14,5±0,6	1,7±0,2	0	13,2±0,5	1,9±0,2	0	9,6±0,3	4,3±0,8	0
<i>Monomères flavanols</i> (mg.kg ⁻¹ p.f. baies)	ε	ε	1800	ε	ε	1100	ε	ε	250
<i>Acides phénols</i> (mg.kg ⁻¹ p.f. baies)	211±20	276±6	-	208±9	127±15	-	190±4	174±2	-
<i>Anthocyanes</i> (mg.kg ⁻¹ p.f. baies)	632±20	ε	-	602±20	ε	-	-	-	-

Tableau 11 : Distribution et caractéristiques des flavanols, acides phénols et anthocyanes dans les trois cépages champenois majeurs Obtenues par extraction avec un mélange acétone/eau/méthanol (51 :34 :15, v :v :v) acidifié avec 0,05 % TFA, et en procédant à une extraction de 67 minutes avec 7mL (pellicule) ou 5 mL (pulpe) de ce solvant, ou une extraction de 90 minutes avec 5,5mL dans le cas des pépins. D_{Pm} : Degré de polymérisation moyen ; % εgc : % d'unités epigallocatechine (trihydroxylation)

A. Composition et distribution globale

Dans les trois cépages, 90 % du contenu polyphénolique des baies sont des flavanols, seuls polyphénols trouvés dans les pépins, mais aussi composés majeurs des autres compartiments, représentant de 78 à 93 % des polyphénols des pellicules et environ 60 % des polyphénols issus des pulpes. Le Pinot meunier contient une plus forte teneur en flavanols, et donc en polyphénols, que le Pinot noir, lui-même plus riche que le Chardonnay. Cependant, il contient de plus faibles teneurs en acides phénols et anthocyanes que le Pinot noir, tandis que le Chardonnay présente des teneurs intermédiaires en acides phénols et ne contient pas d'anthocyanes. Les teneurs et proportions relatives en flavanols et acides phénols sont différentes pour chaque cépage, ce qui pourrait expliquer la plus ou moins grande susceptibilité au brunissement. La majeure partie des flavanols est localisée dans les pépins, quelle que soit le cépage, tandis que les acides phénols sont distribués presque de façon égale

entre les pellicules et les pulpes. Les concentrations de ces derniers sont en effet plus fortes dans la pellicule que dans la pulpe pour les trois cépages considérés, mais compte tenu des contributions de ces deux compartiments à la masse totale de la baie, pellicule et pulpe fournissent finalement ces composés en quantités similaires.

B. Pépins

La plus forte de teneur de flavanols dans les pépins est relevée pour le Pinot meunier avec 6400 mg.kg^{-1} de baies, suivi par le Pinot noir (4840 mg.kg^{-1} de baies), tandis que le Chardonnay présente de loin la plus faible teneur avec 2300 mg.kg^{-1} de baies. Une partie de ces flavanols correspond à des monomères de flavanols qui représentent 17, 37 et 11% de la teneur totale en flavanols, respectivement dans le Pinot meunier, le Pinot noir et le Chardonnay. Les tanins contenus dans les pépins de Chardonnay sont caractérisés par un degré de polymérisation de 4,2, légèrement supérieur à ceux du Pinot meunier ($\text{DPm} = 3,7$) et du Pinot noir ($\text{DPm} = 2,9$). Ces valeurs, faibles comparées à celles données dans la littérature ($\text{DPm} \sim 10$), peuvent s'expliquer par la perte d'oligomères (dimères, trimères) dans les procédures d'extraction ou de fractionnement proposées dans les travaux antérieurs.^{33, 126, 127} L'absence d'unités épigallocatechine et des taux de galloylation variant de 9,5 % pour le Pinot noir à 13,2 % pour le Pinot meunier sont en accord avec ceux déterminés pour d'autres cépages⁴².

C. Pellicule

Les teneurs en flavanols dans les pellicules sont respectivement évaluées à 3000, 2400, et 2100 mg.kg^{-1} de baies pour le Pinot noir, le Pinot meunier et le Chardonnay, mais la proportion de pellicules variant d'un cépage à l'autre, le Pinot meunier contient la plus forte teneur en flavanols de pellicules, suivi par le Pinot noir, et finalement le Chardonnay.

Par ailleurs, les flavanols issus des pellicules de cépages rouges se différencient de ceux de la pellicule du cépage blanc par un plus haut degré de polymérisation moyen ($\text{DPm} = 38$ et $\text{DPm} = 36$ pour le Pinot noir et le Pinot meunier contre $\text{DPm} = 23$ pour le Chardonnay), et une plus forte proportion d'unités épigallocatechine. Ces teneurs et DPm sont similaires aux résultats obtenus pour d'autres cépages rouges et blancs,⁴² ainsi que dans une étude précédente sur les cépages Chardonnay et Pinot noir récoltés dans un vignoble différent.¹²⁸

Enfin, les tanins issus des pellicules des cépages champenois ont un taux de galloylation compris entre 1,1 et 1,8 % et une proportion d'unités épigallocatechine (de 9,6 à 14,5 %) en accord avec ce qui est communément décrit pour les tannins de pellicules.⁴²

La pellicule de Pinot noir contient une plus forte teneur en acides phénols et anthocyanes que le Pinot meunier ; la concentration en acides phénols dans le Chardonnay est quant à elle intermédiaire. Cependant, l'épaisseur de pellicule étant variable d'un cépage à l'autre, les pellicules des trois cépages champenois fournissent des acides phénols en quantités quasi-équivalentes, et les deux rouges les mêmes teneurs en anthocyanes, soit environ 200 et 600 mg.kg⁻¹ de baies respectivement pour les acides phénols et les anthocyanes.

D. Pulpe

Les caractéristiques des tanins de pulpe des trois cépages champenois sont globalement similaires, même si de légères différences peuvent être soulignées. Les degrés de polymérisation moyens sont équivalents avec des valeurs variant de 18 pour le Pinot meunier à 21 pour le Pinot noir. Ils sont plus faibles que les degrés de polymérisation moyens évalués dans les pellicules correspondantes, mais restent élevés comparés à ceux des tanins de pépins. Un résultat similaire est obtenu pour le cépage blanc Maccabeu avec des degrés de polymérisations moyens de tanins trouvés à 51 et 32 dans la pellicule et la pulpe respectivement, alors que pour les autres cépages étudiés, les degrés de polymérisation moyens sont équivalents voire plus hauts dans la pulpe que dans la pellicule.⁴² Les proportions d'unités galloylées et d'épigallocatechine dans les tanins de pulpe sont intermédiaires entre celles déterminées pour les tanins de pellicules et de pépins, et la principale différence entre les trois cépages est le taux d'unités d'épigallocatechine (1,7 et 1,9 pour les cépages rouges contre 4,3 % pour le cépage blanc). Les teneurs en tanins dans la pulpe sont assez variables, soit de 26 mg.kg⁻¹ de pulpe pour le Pinot meunier à 45 mg.kg⁻¹ de pulpe pour le Pinot noir. Malgré le pourcentage massique élevé de la pulpe, sa contribution à la teneur totale en tanins dans la baie est faible (4 %, 2 %, et 6 % pour le Pinot noir, le Pinot meunier, et le Chardonnay respectivement). Ces contributions sont beaucoup plus faibles que celles évaluées pour six autres cépages : entre 8 et 15 %.⁴² Les plus faibles teneurs et degrés de polymérisation calculés pour les tanins de pulpe, comparés aux valeurs obtenues pour les

tanins de pellicules, pourraient suggérer que la présence de tanins dans la pulpe est un artefact de manipulation et résulte de la diffusion de tanins à partir de la pellicule. Cependant des études antérieures ont montré que peu de cellules de la pellicule contenant des tanins sont localisées dans les couches proches de la pulpe.¹¹⁸ Par ailleurs, la composition particulière des tanins de pulpe (plus fort taux de galloylation et plus faible proportion d'unités épigallocatechine que dans la pellicule), permet d'écarter définitivement cette hypothèse, puisque la galloylation décroît la solubilité des tanins, tandis que l'hydroxylation l'augmente.

Enfin, le Pinot noir est de loin le cépage champenois présentant la plus forte teneur en acides phénols dans la pulpe avec 276 mg.kg⁻¹ de baies contre 174 mg.kg⁻¹ de baies pour le Chardonnay, et 127 mg.kg⁻¹ de baies pour le Pinot meunier.

IV. Passage des tanins dans le jus

La présence de tanins de hauts degrés de polymérisation dans les pulpes a été relevée également dans les pulpes d'autres cépages blancs et rouges étudiés au laboratoire.

Afin de vérifier le passage de tanins dans des jus obtenus par un pressurage doux comparable à celui obtenu dans un pressoir pneumatique, des expériences ont été réalisées sur un cépage rouge disponible au moment de la mise en place des manipulations : le Mourvèdre.

Deux pressurages ont été conduits en parallèle, l'un en présence de SO₂ dans la fiole de récupération du moût, l'autre sans SO₂. La dose de SO₂ utilisée dans ces expériences (4,5 g.L⁻¹) est largement supérieure aux doses œnologiques (5 à 10 g.hL⁻¹) de sorte d'inhiber toute oxydation enzymatique.

Les comparaisons des teneurs en tanins et DPm dans la pulpe et dans les jus correspondants sont rassemblées dans le Tableau 12. Il est à noter que les caractéristiques des tanins (DPm et teneurs) de Mourvèdre sont proches de celles associées aux cépages rouges champenois.

	Mourvèdre		
	Pulpe	Jus avec SO₂	Jus sans SO₂
<i>DPm</i>	37,8	9,0	7,7
<i>Teneur (mg.kg⁻¹ baies)</i>	349	38,2	12,8

Tableau 12 : Teneurs en tanins natifs et DPm des pulpes et jus de Mourvèdre

Quelle que soit l'expérience de pressurage, des tanins natifs ont été dosés dans les jus de Mourvèdre. Néanmoins, la faible teneur relevée en l'absence de SO₂ dans la fiole de récupération des jus montre que les tanins sont très rapidement oxydés en présence d'oxygène (dès l'ouverture de la fiole), et ne sont donc plus dosables par la méthode standard utilisée (phloroglucinolyse).

Par ailleurs, environ 10 % des tanins dosés dans la pulpe de Mourvèdre ont été retrouvés dans le jus sulfité correspondant. La grande différence observée entre les teneurs dans la pulpe et dans le jus peut s'expliquer par l'extraction plus poussée des pulpes réalisée en présence d'acétone, solvant qui favorise l'extraction des polymères à longues chaînes adsorbés sur les parois végétales¹²⁹ et se traduit également par un DPM plus haut de la fraction de tanins.

V. Conclusion

L'objectif du travail était de caractériser les cépages champenois, afin de mettre en évidence d'éventuelles spécificités d'un point de vue polyphénolique.

Pour cela, nous avons étudié l'effet de plusieurs paramètres sur l'extraction simultanée des classes majeurs de polyphénols (*i.e.* flavanols, acides phénols et anthocyanes) à partir de la pellicule, de la pulpe et des pépins de raisin. La considération du rapport solide/liquide apparaît comme essentielle dans l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques, et tout particulièrement celle des tanins. Par ailleurs, un processus d'extraction simple s'est avéré être plus efficace que l'extraction multiple correspondante (au final, mêmes rapports solide/liquide et temps d'extraction) pour extraire les flavanols de la pellicule, et les acides phénols contenus dans la pulpe et la pellicule. La suite de l'optimisation, réalisée à travers l'étude d'un plan d'expériences de Doehlert, a permis de conclure que la meilleure extraction des trois classes de composés phénoliques à partir des trois compartiments est obtenue en utilisant comme solvant un mélange acétone/eau/méthanol (51:34:15, v:v:v) acidifié avec du TFA à hauteur de 0,05 % en volume. Au contraire temps d'extraction et rapports solide/liquide ont été fixés en fonction du compartiment : extraction de 67 minutes avec 7 mL de solvant pour la pellicule (50 mg poids frais) et 5 mL pour la pulpe (100 mg poids frais), ou extraction de 90 minutes pour les pépins (50 mg poids frais).

L'analyse de la composition phénolique des trois cépages champenois majeurs a montré que les tanins étaient les composés phénoliques majeurs non seulement des pépins, mais aussi de la pellicule et de la pulpe. La teneur globale en tanins dans la baie de raisin est

la plus élevée dans le Pinot meunier et la plus faible dans le Chardonnay, mais si l'on ne s'intéresse qu'à la pulpe, le Pinot meunier est, parmi les trois cépages, celui qui présente les plus faibles teneurs en tanins et en acides phénols.

D'autre part, l'étude a montré qu'une faible quantité de tanins est extraite en conditions de pressurage doux. Ceux-ci sont par ailleurs caractérisés par des degrés de polymérisation relativement faibles (même si nous n'avons pas accès à la distribution en masses), et sont en grande partie oxydés. Le fait que ces familles de polyphénols soient impliquées dans les phénomènes oxydants suggère que les proportions des différents cépages choisies pour élaborer un vin peuvent avoir une influence sur la susceptibilité de ce vin au brunissement.

Chapitre II

Caractérisation de vins blancs de Champagne et Recherche de marqueurs d'oxydation par les méthodes classiques

Les vins blancs tranquilles de Champagne sont les vins non effervescents qui, dans le processus de vinification champenoise, subissent une deuxième fermentation en bouteille (prise de mousse) par adjonction de sucre et de levures.

La première partie de ce chapitre est consacrée à la caractérisation des polyphénols de vins blancs tranquilles non oxydés par différentes techniques d'analyse classiques dédiées à l'étude de la couleur et des polyphénols, et susceptibles de rendre compte de phénomènes d'oxydation dans les vins définis comme oxydés. L'objectif n'est pas tant de définir de façon exhaustive la composition phénolique de ces vins, mais plutôt de repérer des pigments et des familles de molécules qui serviront de support à l'élaboration de modèles pertinents dans la suite du travail, et de développer des méthodologies d'analyse. Les méthodes classiques disponibles pour caractériser les polyphénols sont basées sur des dosages globaux^{10, 130, 131} ou sur l'analyse chromatographique avec détection UV-visible utilisée en couplage avec la spectrométrie de masse pour séparer, identifier et doser les composés,^{10, 132, 133} soit directement, soit après acidolyse en présence d'un agent nucléophile pour la caractérisation des polymères de flavanols.^{86, 127} Des vins tranquilles du millésime 2003 issus pour partie ou en totalité de cépages rouges (Pinot noir, Pinot meunier ou vin d'assemblage des trois cépages Pinot noir, Pinot meunier et Chardonnay suivant la disponibilité) font l'objet de cette étude, l'éventail des familles de polyphénols représentées y étant plus large que dans un vin issu d'un cépage blanc.

Dans une seconde partie, la recherche de marqueurs d'oxydation dans des vins de Champagne plus ou moins oxydés est envisagée par ces mêmes méthodes d'analyse classiques de la couleur et des polyphénols. L'étude est réalisée sur deux gammes de vins champagnisés âgés de 10 (CIVC) et 7 ans (Moët & Chandon) au moment des analyses, et présentant un différentiel de caractère oxydé obtenu par utilisation de capsules permettant une

exposition plus ou moins importante à l'air. Le caractère oxydé a été évalué par une analyse sensorielle conduite par le CIVC.

Il est important de noter que le travail d'analyse a été réalisé en aveugle, c'est-à-dire sans avoir connaissance des résultats d'analyse sensorielle ni de la perméabilité des capsules.

I. Caractérisation de vins blancs tranquilles de Champagne

A. Analyse de la couleur des vins blancs de Champagne par spectrophotométrie UV-visible

Le caractère oxydé des champagnes défini par les Champenois étant associé à un renforcement de la couleur, il est nécessaire de définir de façon précise cette caractéristique des vins. L'approche classique disponible pour mesurer la couleur est l'analyse par spectrophotométrie UV-visible qui permet aussi de distinguer les principales familles de composés phénoliques.¹³⁴

Sur la gamme de longueurs d'onde de 270 à 560 nm, l'Assemblage 2003 est caractérisé par un spectre d'absorption UV-visible présentant un maximum d'absorption à 274 nm suivi d'un épaulement vers 325 nm (Figure 30).

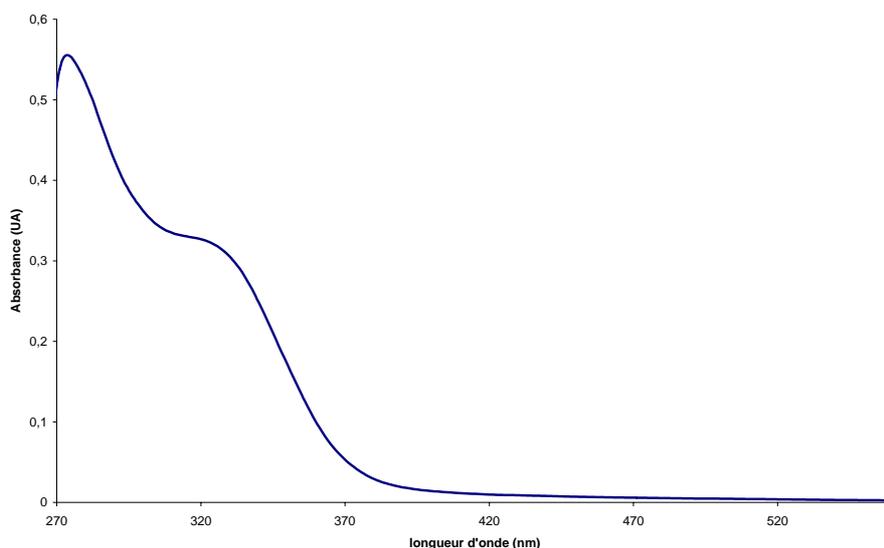


Figure 30 : Spectre UV-visible d'un vin blanc tranquille de Champagne obtenu sans dilution dans une cuve en quartz de 1 mm de trajet optique

L'absorbance à 280 nm est caractéristique des électrons π des noyaux aromatiques constituant les polyphénols et est ainsi considérée comme reflétant l'ensemble des polyphénols (appelé communément « polyphénols totaux »), même si les noyaux aromatiques de certains acides aminés tels que la phénylalanine, le tryptophane ou la tyrosine contribuent pour une faible part à cette absorbance. Les flavanols en particulier ont un maximum d'absorption proche de cette longueur d'onde. Ce maximum est déplacé vers les plus grandes longueurs d'onde par la présence de conjugaisons supplémentaires dans les molécules. C'est le cas des acides hydroxycinnamiques pour lesquels un motif propénoïque conjugué avec le noyau aromatique déplace le maximum d'absorption vers 320 nm. Sur le spectre de l'Assemblage 2003, la comparaison des absorbances à 280 et 320 nm suggère que les acides hydroxycinnamiques sont des composés majeurs dans le vin.

D'autre part, et bien que le vin apparaisse de couleur jaune à l'œil, l'absorption dans le visible, et particulièrement dans la zone des flavonols et autres pigments jaunes ne présente pas de maximum relatif et reste extrêmement faible. Cette observation est certainement liée à la diversité et la faible proportion de ces composés.

Les vins monovariétaux millésime 2003 issus de Pinot noir et Pinot meunier sont associés à des spectres UV-visible d'allures similaires, à partir desquels on relève des proportions d'acides hydroxycinnamiques équivalentes à celle relevée dans l'Assemblage 2003.

B. Identification et dosage des polyphénols par CLHP-DAD-ESI/MS

Les profils chromatographiques de l'Assemblage 2003 extraits à 280 et 320 nm sont rassemblés sur la Figure 31.

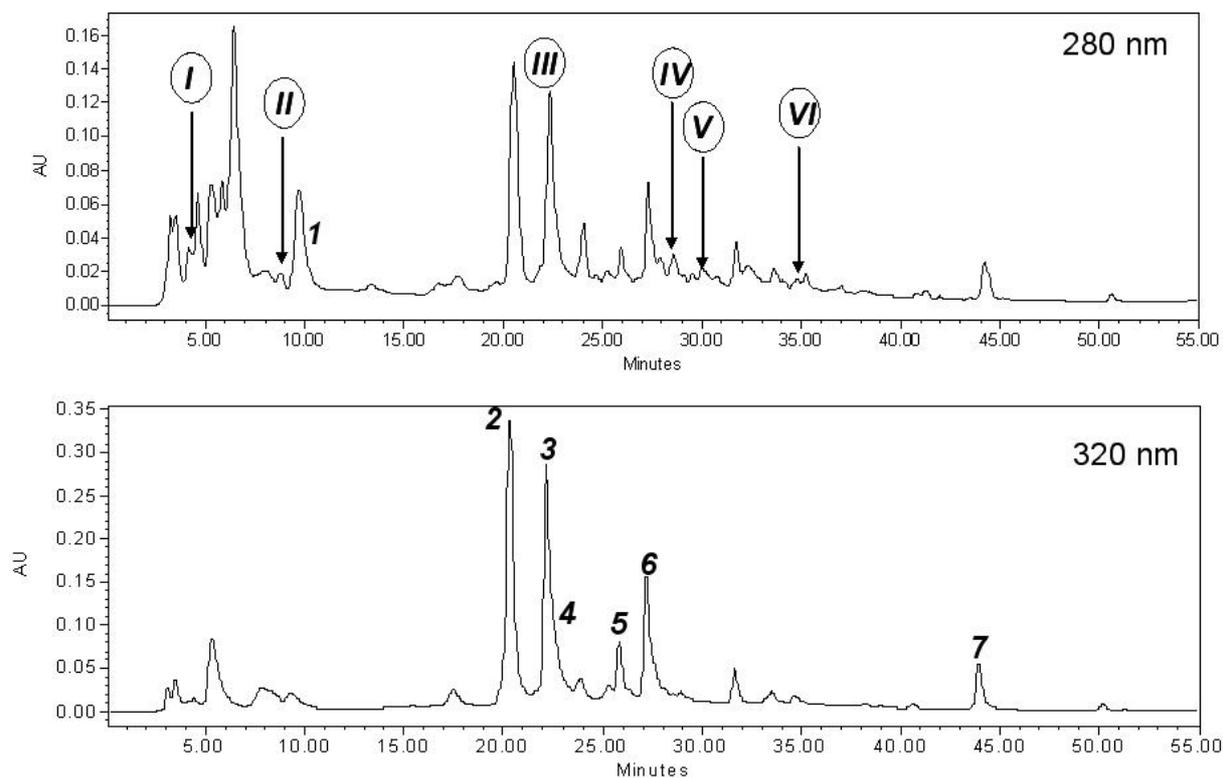


Figure 31 : Profils chromatographiques à (a) 280 nm et (b) 320 nm de l'Assemblage 2003 obtenus par élution sur colonne C18 avec un gradient de solvants A (eau :TFA, 99,9 :0,1) et B (acétonitrile :eau :TFA, 80 :19,9 :0,1). 1 : acide gallique, 2 : acide *t*-caftarique, 3 : GRP, 4 : acide *c*-coutarique, 5 : acide fertarique, 6 :acide caféique, 7 : caféate d'éthyle, I, II: dérivés d'acide ascorbique (hyp), III : tyrosol, IV : l'isolaricirésinol 6a-O-β-D-glucose et le laricirésinol 4-O-β-D-glucose (hyp), V : composé non identifié, VI : astilbine

La teneur en polyphénols totaux dans l'Assemblage 2003, quantifiée à partir des aires des chromatogrammes extraits à 280 nm de ce vin et d'une solution standard d'acide gallique, s'élève à 0,72 mM équivalent acide gallique (EAG) ou encore 0,39 mM équivalent acide caféique.

Notons que les formes dissymétriques des pics chromatographiques ainsi que leur multitude reflètent la diversité des composés phénoliques présents dans le vin blanc de Champagne. Les nombreuses coélutions et la faible absorbance générale rendent l'identification des polyphénols délicate.

1. Acides Phénols

a) Identification structurale

Les profils chromatographiques de l'Assemblage 2003 permettent de visualiser les acides phénols, et celui extrait à 320 nm notamment, rend compte de la présence d'acides hydroxycinnamiques dans les vins. Parmi les acides phénols annotés sur la Figure 31, l'injection de standards et/ou l'analyse des spectres UV-visible permet d'attribuer le pic 2 à l'acide *t*-caftarique, le pic 3 au GRP coélué avec un autre composé, le pic 5 à l'acide fertarique, et enfin le pic 6 à l'acide caféique.

La spectrométrie de masse en couplage (CLHP-ESI/TI SM) permet de confirmer l'identification des acides phénols cités précédemment, et de compléter la caractérisation en associant les acides gallique, *cis*-coutarique, et le caféate d'éthyle respectivement aux pics 1, 4, et 7.

Les temps de rétention, maximum d'absorption, et valeur de *m/z* sont regroupés dans le Tableau 13.

	Référence	Temps de rétention (min)	λ max (nm)	<i>m/z</i> mode négatif
<i>Acide gallique</i>	1	9,4-9,5	272	169
<i>Acide t-caftarique</i>	2	20,1-20,3	329	311
<i>GRP</i>	3	22,1-22,2	328	616
<i>Acide cis-coutarique</i>	4	22,6-22,7	310	295
<i>Acide trans-fertarique</i>	5	25,7-25,8	329	325
<i>Acide caféique</i>	6	27,0-27,1	325	179
<i>Caféate d'éthyle</i>	7	43,6-43,8	325	207

Tableau 13 : Acides phénols présents dans les vins blancs tranquilles de Champagne

Tous ces acides ont déjà été repérés dans les vins effervescents,¹³⁵ et en particulier dans les champagnes.¹⁰

b) Dosage des acides hydroxycinnamiques

(1) Calibration

La calibration a été réalisée à partir de la mesure de l'aire du pic chromatographique à 320 nm de solutions d'acide caféique dont la gamme de concentrations varie de 0 à 2 mM. La droite d'étalonnage obtenue est caractérisée par l'équation $A_{320}=1019974 \times \text{Conc}$ avec $R^2 = 0,9996$ et la concentration exprimée en millimolaires (mM).

(2) Teneur des principaux acides hydroxycinnamiques et dérivés

Sur la base de cette calibration, la teneur en acides hydroxycinnamiques de l'Assemblage 2003 est évaluée à partir de l'aire sous le profil chromatographique à 320 nm à 0,29 mM équivalent acide caféique, soit 74 % de la teneur globale en polyphénols.

Sur le même profil extrait à 320 nm, le relevé des aires des pics correspondant à l'acide t-caftarique, au GRP, à l'acide fertarique et l'acide caféique permet d'estimer les teneurs suivantes exprimées en équivalent acide caféique :

Acide *t*-caftarique : 0,08 mM

GRP : 0,13 mM

Acide fertarique : 0,01 mM

Acide caféique : 0,01 mM

Notons que l'acide gallique étant coélué avec un autre composé incolore également, son dosage est inaccessible.

2. Composés incolores

On note tout d'abord que tous les produits les plus polaires présentent des maxima d'absorption compris entre 255 et 295 nm ainsi que deux composés moins polaires non identifiés (références IV et V sur la Figure 31).

Deux pics chromatographiques correspondant à des composés polaires sont susceptibles d'être des produits d'oxydation de l'acide ascorbique. En effet, l'analyse CLHP-SM montre que le plus polaire, élué à $t_r = 3,7-3,8$ min (référence I), a une masse molaire de 192 g.mol^{-1} (ion moléculaire $m/z = 191$ en mode négatif), soit la masse de l'hémicétal bicyclique issu de l'oxydation de l'acide ascorbique.¹³⁶ Le deuxième composé, élué à $t_r = 9,8$

– 10 min (référence II), est caractérisé par un maximum d'absorption à $\lambda = 295$ nm. Les mêmes caractéristiques (temps de rétention et maximum d'absorption) sont attribuées au produit d'autoxydation majoritaire de l'acide ascorbique en milieu modèle vin (expérience non décrite), ce qui suggère qu'il s'agit du même composé.

Le tyrosol, référencé III sur le chromatogramme extrait à 280 nm, apparaît sous la forme d'un ion fragment à $m/z = 121$ en mode négatif et non sous forme de l'ion moléculaire $m/z = 137$ comme attendu (vérification par l'injection du standard).

Le composé élué à 28,7 min (référence IV sur Figure 31) est caractérisé par un maximum d'absorption à 282 nm et un ion moléculaire de $m/z = 521$ en mode négatif. Deux ions fragments sont associés à cette masse : $m/z = 359$ qui correspond à la perte de 162 amu, soit vraisemblablement un glucose, et $m/z = 344$. Des molécules présentant de telles caractéristiques ont été repérées dans des vins de Riesling et identifiées comme étant l'isolaricirésinol 6a-O- β -D-glucose et le laricirésinol 4-O- β -D-glucose¹³²(Figure 32).

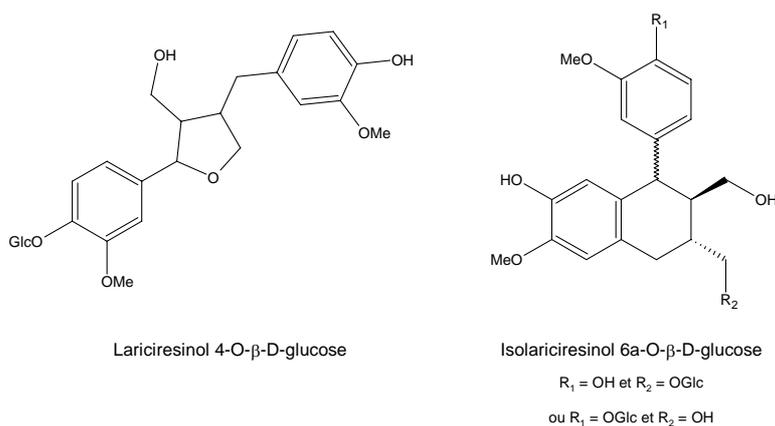


Figure 32 : Hypothèses de structures correspondant au composé IV

De même, le pic à $t_r = 30,2-30,3$ min (référence V sur Figure 31) présente un maximum d'absorption à 278 nm, et un ion moléculaire à $m/z = 471$ en mode négatif, mais n'est pas identifié.

Enfin, l'astilbine est repérée sur le profil chromatographique extrait à 280 nm à $T_r = 34,7$ min (référence VI). Le pic est associé à une masse molaire de 450 g.mol^{-1} et un spectre UV-visible dont le maximum d'absorption est à 291 nm. De plus, la fragmentation de l'ion moléculaire à $m/z = 449$ en mode négatif donne naissance à deux fragments $m/z = 303$ et $m/z = 285$ compatibles avec cette structure¹³⁷ (Figure 33).

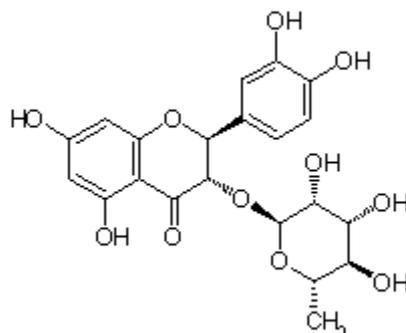


Figure 33 : Structure de l'astilbine

3. Pigments jaunes

Quoique la couleur jaune soit observée à l'œil, aucun pic chromatographique associé au spectre UV-visible d'un flavonol ou autre pigment jaune (chromophores isolés ou intégrés dans des structures de tanins) n'apparaît sur les chromatogrammes extraits à 360, 390, 420 et 440 nm, qui ne présentent pas de pic résolu mais seulement un massif de faible intensité. L'hypothèse d'une rétention de ces pigments sur la colonne chromatographique n'est pas confirmée par les résultats obtenus en spectrophotométrie UV-visible pour ce même vin. En effet, la valeur du rapport entre les absorbances à 280 nm et 390 nm relevées en spectrophotométrie est égale, à la valeur du rapport entre les aires des chromatogrammes extraits à 280 nm et 390 nm aux incertitudes de mesure près, ce qui exclut une rétention spécifique de certaines familles de polyphénols. Il est plus vraisemblable que la couleur jaune des vins soit le résultat de la présence de flavonols à l'état de traces et/ou pigments jaunes inclus dans des structures polydisperses.

4. Autres composés

Le vin contient une part non négligeable de composés de masses impaires, apparaissant sous forme d'ions moléculaires de rapport m/z pairs, qui n'ont pas fait l'objet d'une caractérisation formelle dans le cadre de cette étude. Toutefois, il a été vérifié qu'il s'agit bien d'ions monochargés et non d'ions dichargés grâce à l'analyse de l'intervalle $\Delta m/z = 1$ entre les ions isotopiques, et les fragmentations successives de certains d'entre eux conduisent à des pertes de masses non rencontrées dans la famille des polyphénols. Ces masses impaires laissent supposer soit la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote dans la structure, soit des espèces radicalaires formées en source.

5. Flavanols

La comparaison du profil chromatographique à 280 nm avec ceux obtenus pour les solutions de standards de flavanols (catéchine et épicatechine) ne permet pas d'attester de la présence de ces composés dans les vins blancs de Champagne.

L'analyse en spectrométrie de masse, et notamment l'extraction des ions moléculaires connus correspondant à des flavanols sous forme monomères et oligomères, ne permet pas de les mettre en évidence, même si les flavanols ont été repéré dans les baies de raisins, et notamment dans la pulpe (cf Partie I, chapitre I), et que la présence de catéchine a déjà été signalée dans des vins blancs de Champagne.¹⁰

L'absence de détection par spectrométrie de masse peut être le reflet d'une réelle absence de ces composés dans le vin, mais elle pourrait également être liée à la complexité de la matrice, à la diversité des produits et à leurs concentrations relatives, pouvant être à l'origine de phénomènes de compétition d'ions et/ou suppression du signal.

L'étude des flavanols est donc poursuivie en envisageant d'une part un fractionnement du vin préalable à l'analyse CLHP-DAD-ESI/TI, d'autre part une analyse des éventuels tanins natifs par phloroglucinolyse.

C. Fractionnement colorimétrique du vin tranquille de Champagne et analyse HPLC-DAD-ESI/TI

L'analyse directe des vins par CLHP-ESI/TI avec ou sans concentration préalable (résultats non montrés) ne permettant qu'une caractérisation partielle de la composition polyphénolique, il apparaît nécessaire de procéder à un fractionnement préalable des vins afin de mettre en évidence des pigments jaunes et d'éventuels flavanols. Prenant en compte les résultats de l'analyse sensorielle menée par le CIVC sur des vins plus ou moins oxydés quant à la corrélation de la couleur avec le caractère oxydé, le fractionnement est envisagé sous un aspect colorimétrique, c'est-à-dire avec pour objectif d'obtenir des fractions ayant des caractéristiques spectrales différentes.

1. Travaux antérieurs

Des travaux sur l'étude des flavonols dans la pellicule de Cinsault ont utilisé la polyamide comme support solide de fractionnement des polyphénols.⁴⁶ Ces derniers y sont séparés en deux fractions : la première élution réalisée par un gradient de solution aqueuse de

méthanol variant entre 20 et 100 % permet de collecter les anthocyanes, les flavones, et tous les flavonols exceptés les dérivés glucuronides ; une solution eau/méthanol (25 :75, v :v) avec 0,1 % NH₃ élue dans un second temps les flavonols glucuronides ainsi que les esters hydroxycinnamiques.

La polyamide permet également de séparer les monomères, oligomères et polymères de flavanols à partir de vin, pépin et pellicule de l'espèce *Vitis vinifera*.¹²⁷ Une élution avec du tampon phosphate pH=7 permet d'éliminer dans un premier temps les acides phénols. Les monomères et oligomères de flavanols sont respectivement et successivement élués avec l'acétate d'éthyle, puis le méthanol. Quant aux polymères, ils restent fixés sur la polyamide.

2. Optimisation de la gamme de solvants d'élution

Le premier essai de fractionnement de vin blanc tranquille champenois est construit à partir de protocoles relevés dans la littérature. Il a pour objectif de tester une gamme de solvants large afin d'évaluer leur efficacité de désorption, le choix des solvants étant affiné par la suite.

Après concentration d'un vin issu de Pinot noir d'un facteur deux, l'échantillon est déposé sur colonne de polyamide. Une étape de lavage par 1 mL d'eau acidifiée à pH=2 avec de l'acide acétique est réalisée avant de procéder aux éluions successives avec différents solvants. Au final, les composés sont récupérés en cinq fractions de 1 mL chacune : dépôt, lavage, méthanol 20 %, méthanol 60 %, méthanol 100 %.

Quant à la partie supérieure de la polyamide qui reste colorée, elle est prélevée, puis mise en suspension dans du méthanol ammoniacal 0,1 %.

a) Profils

Globalement, les spectres UV-visible des fractions de dépôt et lavage ont la même allure avec un maximum d'absorption autour de 276 nm et un épaulement vers 320 nm. L'élution au méthanol 20 % est extrêmement pauvre en composés polyphénoliques. Quant aux fractions méthanol 60 % et 100 %, elles sont caractérisées par un maximum d'absorption vers 290 nm, éventuellement accompagné d'un épaulement vers 320 nm.

La fraction récupérée avec le méthanol ammoniacal est d'une coloration jaune soutenue.

b) Mise en évidence d'anthocyanes

L'analyse CLHP-ESI-TI de la fraction de lavage issue du fractionnement initial en cinq éluions est réalisée en mode positif avec des solvants à 2 % (v :v) en acide formique. Le chromatogramme extrait à 520 nm met en évidence la présence de trois anthocyanes majeures dans le vin tranquille de Pinot Noir (Figure 34).

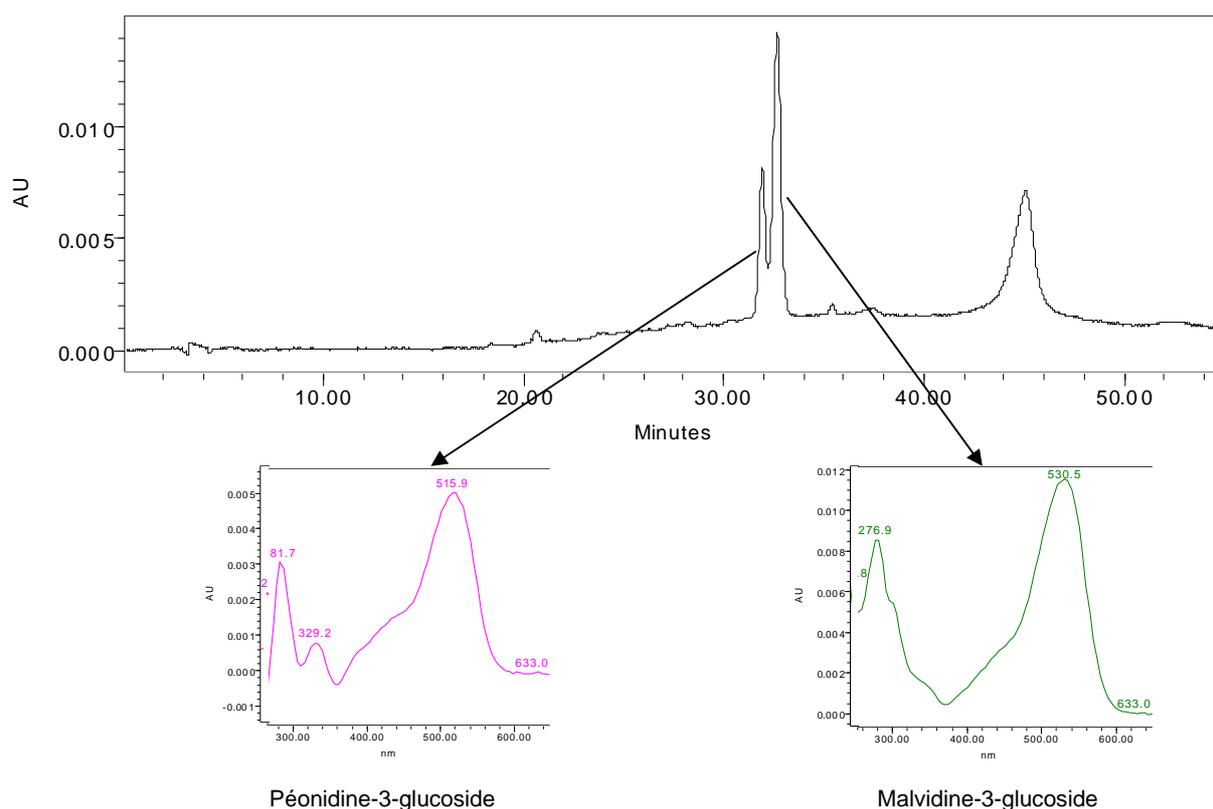


Figure 34 : Chromatogramme extrait à 520nm

Les spectres UV-visible des composés élués à 31,9 et 32,9 min présentent des maxima respectifs à 516 et 530 nm suggérant la présence de péonidine-3-glucoside et de malvidine-3-glucoside dans le vin. Les identifications sont confirmées par l'extraction des ions moléculaires de ces deux molécules : $m/z = 493$ et $m/z = 463$ pour la malvidine-3-glucoside et la péonidine-3-glucoside respectivement, en mode positif. Au vu de la composition des baies de Pinot noir, ces anthocyanes sont extraites de la pellicule lors des opérations de pressurage.

La présence de cette famille de pigments rouges dans les vins blancs de Champagne est d'importance, puisqu'elle participe alors à la couleur de ces vins. Ceci souligne la

nécessité d'évaluer, lors d'études de vins oxydés, le poids du brunissement lié à l'oxydation, et celui de la couleur brune liée à la composition du cépage.

c) Re-optimisation du fractionnement

Les chromatogrammes et spectres UV-visible montrent que le méthanol 20 % ne permet pas d'éluer davantage de composés que l'eau acidifiée, de même que l'acétone qui n'apporte pas de désorption complémentaire au méthanol 100 %. Ces deux solvants sont donc éliminés du protocole d'élution, et le volume de chaque élution restante est porté à 2 mL au lieu de 1 mL.

Finalement, le fractionnement des vins est réduit à quatre fractions correspondant aux volumes de :

- 1/ Dépôt
- 2/Lavage à l'eau acidifiée pH=2 avec l'acide acétique
- 3/Méthanol 80 %
- 4/Méthanol ammoniacal 0,1 %

De plus, les expériences suivantes seront menées avec un taux de concentration des vins supérieur, afin d'éviter un phénomène d'élution simultanée des composés due à l'importance du volume déposé.

3. Fractionnement colorimétrique final

a) Reproductibilité et recouvrement

Les spectres UV-visible obtenus pour les trois répliqués de fractionnement de Pinot noir sont superposables, et la variation à la moyenne est inférieure à 4 % sur la gamme de longueurs d'onde étudiée (260 à 560 nm).

L'évaluation du recouvrement est réalisée à partir de la comparaison des spectres UV-visible du vin non fractionné et du vin reconstitué après fractionnement par mélange des fractions (Figure 35). La plus grande variation entre ces spectres consécutive au fractionnement est observée dans la zone de longueur d'onde s'étendant de 310 à 350 nm, soit la zone d'absorption des acides hydroxycinnamiques.

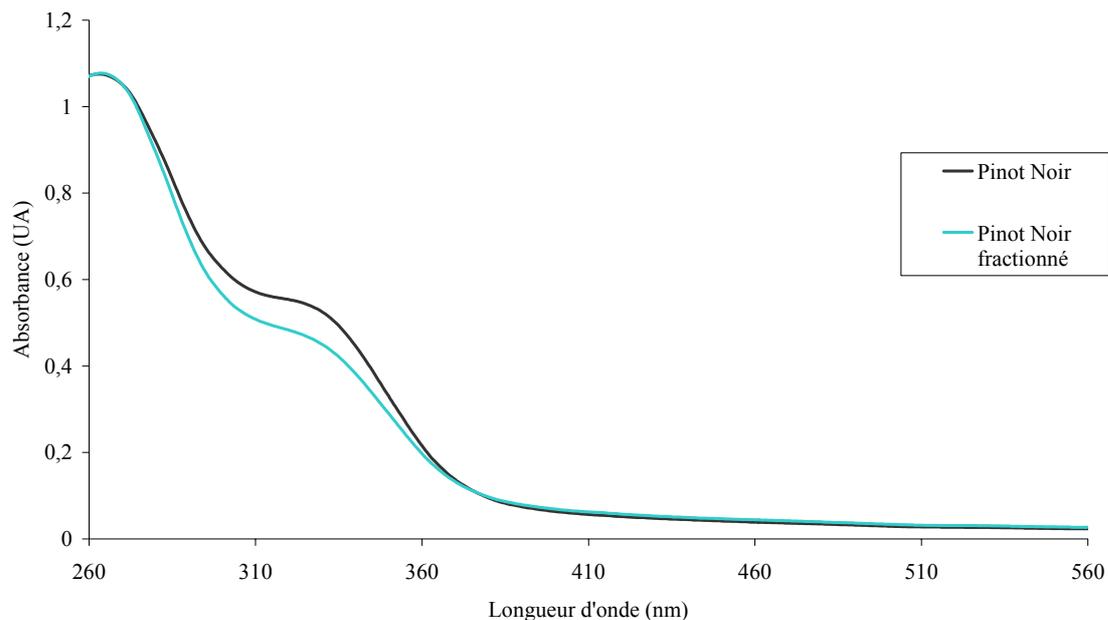


Figure 35 : Spectres UV-visible du vin de Pinot noir non fractionné et du même vin reconstitué par mélange des fractions

Plus précisément, le recouvrement est de 96 % à 280 nm, 86 % à 320 nm, 89 % à 360 nm, et 100 % à 420 nm (Figure 36). Deux hypothèses non exclusives sont envisagées pour expliquer le taux de recouvrement moindre des acides hydroxycinnamiques : ils ne seraient pas totalement désorbés de la colonne, et/ou seraient dégradés au cours de l'étape d'extraction (milieu basique).

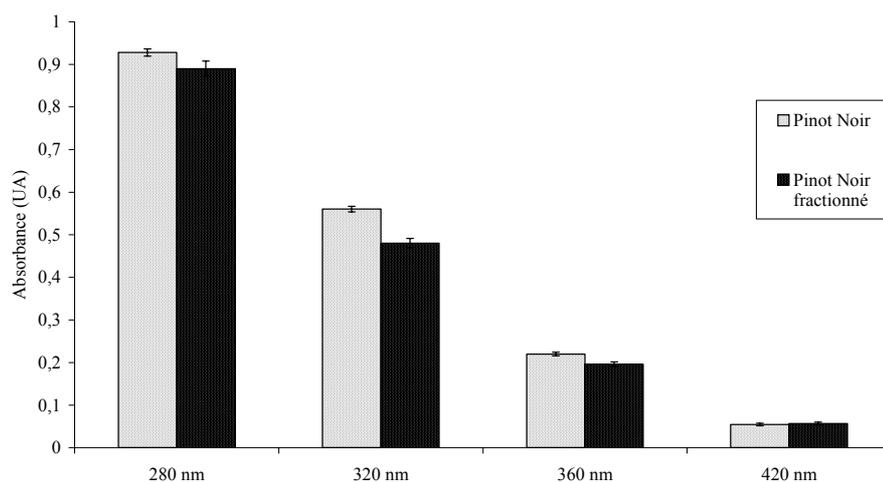


Figure 36 : Absorbances à 280 nm (polyphénols totaux), 320 nm (acides hydroxycinnamiques), 360 nm (flavonols), 420 nm (pigments jaunes dérivés) dans le Pinot noir avant et après fractionnement traduisant le recouvrement des différentes familles de polyphénols

La non-saturation de la colonne est vérifiée par le relevé des absorbances à quatre longueurs d'onde caractéristiques (Figure 37). On remarque tout d'abord que la répétabilité de l'élution est meilleure lorsque la quantité de matière déposée correspond à un volume initial de vin de 10 mL. De plus, le rapport entre les absorbances relevées pour un volume initial de 10 mL et de 5 mL est constant et légèrement supérieur à 2 quelle que soit la longueur d'onde ce qui suggère qu'il n'y a pas de phénomène de saturation de la colonne avec un volume initial de 10 mL de Pinot Noir.

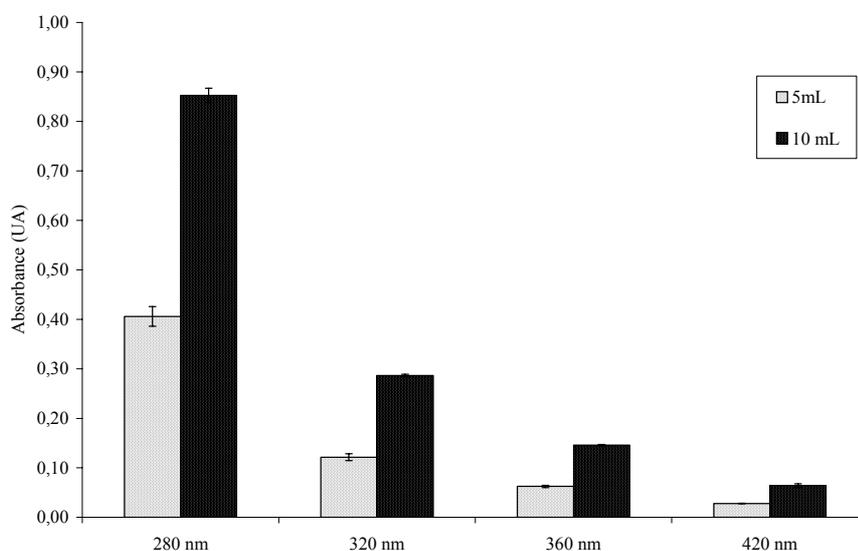


Figure 37 : Absorbances aux quatre longueurs d'onde spécifiques pour un dépôt de 5 ou 10 mL de vin

b) Analyse visuelle des différentes fractions

Ce fractionnement permet de récupérer quatre fractions de couleurs distinctes : à l'œil, les fractions de dépôt et de lavage à l'eau acidifiée sont jaunes, la fraction de méthanol 80 % est incolore tandis que la fraction de méthanol ammoniacal est à nouveau jaune.

Ces observations permettent de supposer que les pigments jaunes présents dans les deux premières fractions et dans le méthanol ammoniacal ne sont pas de même nature.

c) Caractéristiques spectrales des 4 fractions

Les spectres UV-visible des quatre fractions de vin issu de Pinot noir sont rassemblés dans la Figure 38. Les taux de dilution appliqués aux différentes fractions, afin d'obtenir des

valeurs d'absorbance dans la gamme de linéarité de la loi de Beer-Lambert, sont donnés entre parenthèses. Il apparaît que les fractions de dépôt et de lavage sont les plus riches en composés phénoliques tandis que la fraction méthanol 80 % présente l'absorbance la plus faible sur la gamme de 260 à 560 nm.

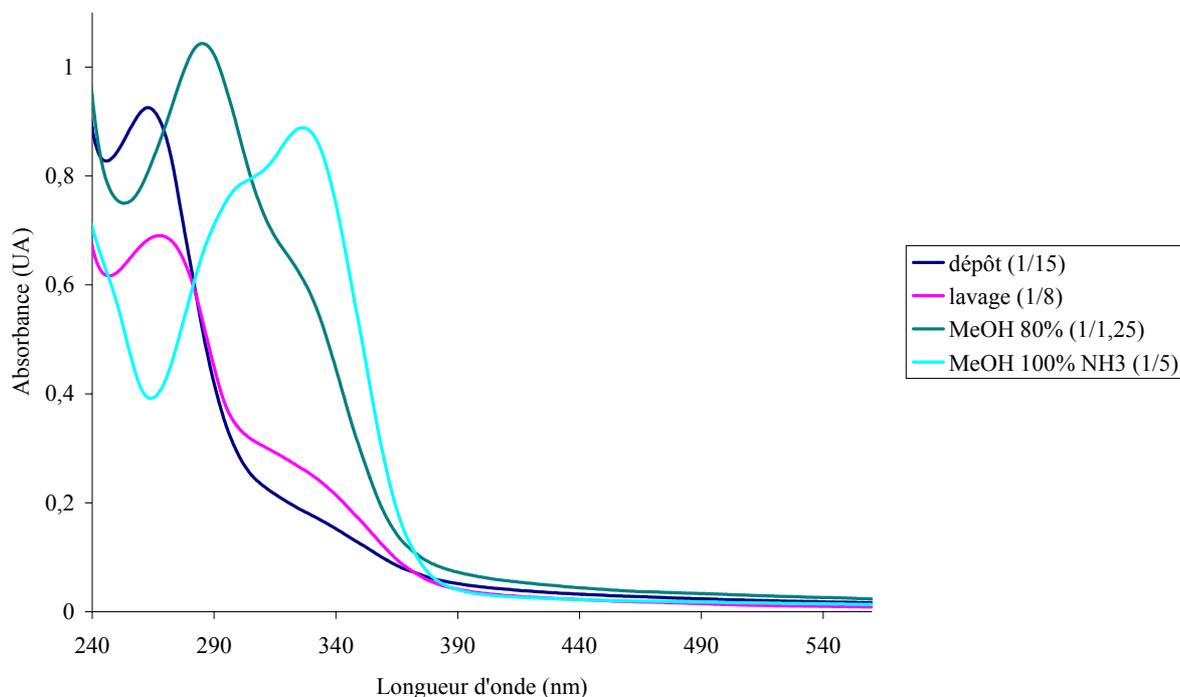


Figure 38 : Spectres UV-visible des quatre fractions de Pinot Noir

Les fractions correspondant au volume de dépôt et de lavage sont relativement similaires et présentent des maximums d'absorption à faible longueur d'onde, respectivement 265 et 270 nm. Elles diffèrent principalement au niveau de la zone 280-320 nm par une absorbance plus grande de la fraction de lavage.

La fraction méthanol 80% présente un maximum d'absorption à 286 nm ce qui préfigure la présence de composés type flavanol et/ou acide hydroxybenzoïque dans cette fraction.

d) Fractions et familles de polyphénols

(1) Fraction de dépôt

La fraction de dépôt, de couleur jaune, contient les composés les plus polaires, non retenus par la colonne de fractionnement (Figure 39). Par analyse CLHP-DAD-SM, on relève entre autres la présence d'acide tartrique, et à 9,8 min l'un des composés identifié comme

dérivé possible d'acide ascorbique déjà repéré dans l'analyse directe (cf I.B.2). Outre ces composés polaires, le fractionnement permet de mettre en évidence trois composés majeurs : le composé initialement coélué avec l'acide *t*-caftarique et caractérisé en mode négatif par $m/z = 175$ ($\lambda_{\max} = 267,5$ nm), le GRP et un ion moléculaire $m/z = 443$ associé à un composé non identifié de masse molaire 444 g.mol^{-1} ($\lambda_{\max} = 267,5$ nm).

L'ion moléculaire $m/z = 175$ correspond à un composé de masse molaire 176 g.mol^{-1} . La fragmentation MS^2 de cet ion donne naissance aux fragments $m/z = 157$ ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^-$), 129 ($[\text{M}-46]^-$), 115 ($[\text{M}-60]^-$), et 85 , et la fragmentation MS^3 de $m/z = 129$ aux fragments 101 et 85 . Mise à part la perte d'une molécule d'eau, les fragmentations constatées ne sont pas caractéristiques de la famille des polyphénols. La perte de 46 unités de masse est au contraire rencontrée couramment lors de la fragmentation d'acides aminés où elle correspond à une perte de $\text{CO}+\text{H}_2\text{O}$,¹³⁸ ce qui permet d'envisager que notre composé est constitué à partir de cette famille de molécules.

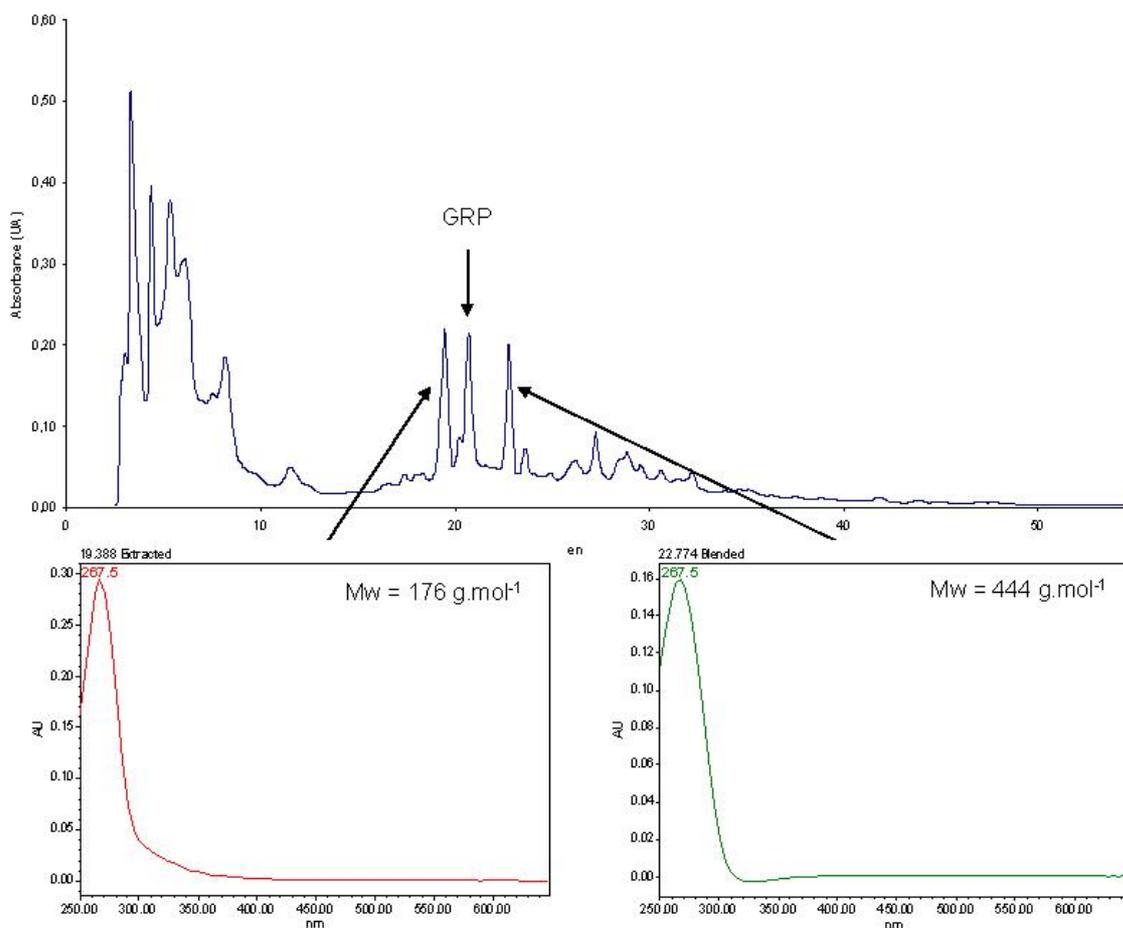


Figure 39 : Profil chromatographique à 280 nm de la fraction non retenue par la polyamide de Pinot Noir

(2) Fraction eau acidifiée pH=2

Les pics majeurs relevés dans cette fraction sont associés à des masses molaires inconnues, hormis le GRP résiduel qui, compte tenu des facteurs de dilution est moins concentré dans cette fraction (Figure 40).

Le fractionnement optimisé permet de mettre en évidence dans le vin de Pinot noir deux pigments jaunes élués dans la fraction de lavage.

Le pigment jaune PJ1 élué à 28,5 min présente en UV-Visible deux maxima d'absorption à 371 et 448 nm. L'analyse en spectrométrie de masse ESI-TI ou ESI-TOF couplée à la chromatographie en phase liquide ne permet pas d'associer une masse molaire à ce composé. Il serait cependant intéressant d'identifier ce pigment puisqu'il contribue à la couleur jaune des vins blancs, et qu'on le retrouve dans les vins blancs de Champagne âgés de 10 ans.

Le deuxième pigment PJ2 est élué à 33,5 min et son maximum d'absorption est situé vers 404,5 nm. L'ion moléculaire associé en mode négatif est de 686, suggérant la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote dans la structure de ce composé.

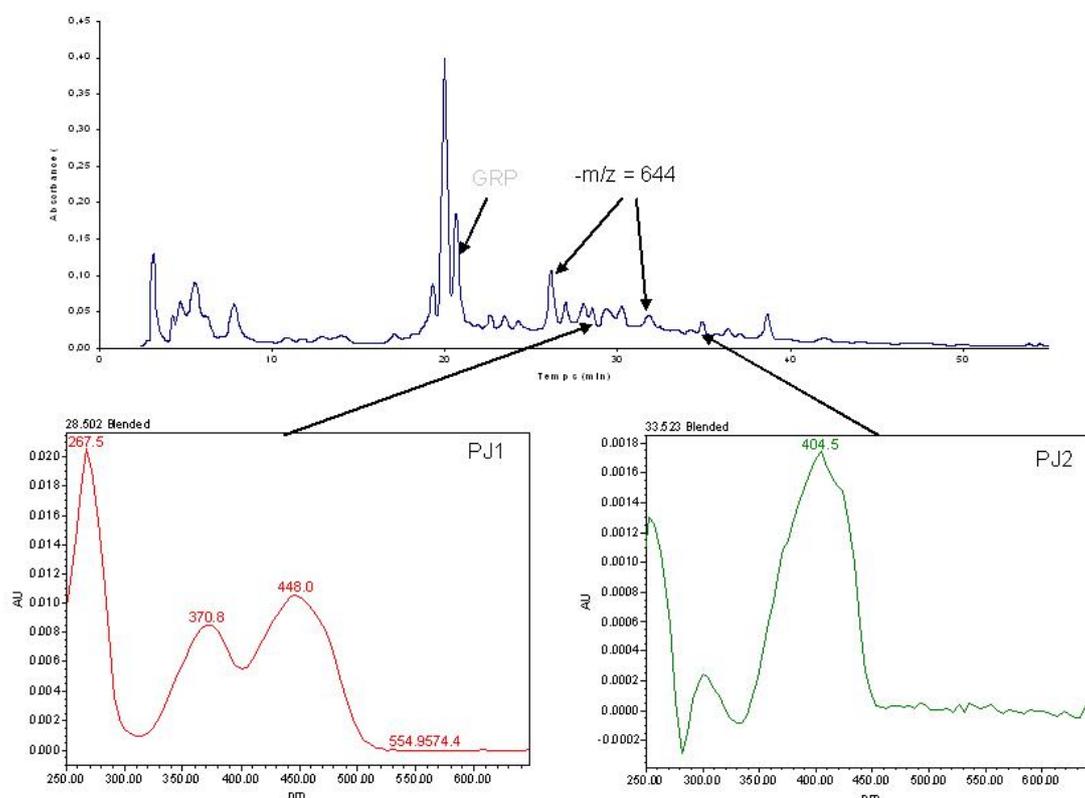


Figure 40 : Profil chromatographique à 280 nm de la fraction de lavage à l'eau acidifiée de Pinot noir

On notera également la présence de deux composés associés à la valeur paire $m/z = 644$ et qui présentent un maximum d'absorbance à 324 nm pour le plus polaire et à 339 nm pour le moins polaire. Ces résultats suggèrent que le plus polaire est un monoester éthylique de GRP. La fragmentation MS^2 de son ion moléculaire donne naissance à un fragment à $m/z = 558$ qui correspondrait à l'adduit formique (46 amu) du fragment $m/z = 484$ observé pour le GRP (résultat non montré) auquel est additionné un groupement éthyle (28 amu). La fragmentation du second composé donne naissance à des fragments qui ne sont pas classiques pour les polyphénols.

(3) Fraction méthanol 80 %

La fraction éluée avec le méthanol 80 % est incolore et contient essentiellement des composés polyphénoliques de faible poids moléculaire issus de deux familles : les flavanols et les acides phénols (

Figure 41). Seule la catéchine, de la famille des flavanols, est repérée à 24,5 min, avec un spectre UV-visible présentant un maximum d'absorption à 279 nm. En spectrométrie de masse, l'extraction des ions moléculaire d'oligomères de flavanols ne donne pas de résultat. Quant aux acides phénols, ils sont représentés, outre par l'acide gallique et l'acide caféique déjà mis en évidence par analyse directe du vin, par l'acide protocatéchique (Tr = 15 min ; $\lambda_{max} = 259, 295$ nm). Même si la présence d'acide protocatéchique dans les vins de Champagne a été reportée dans d'autres travaux,¹⁰ ce composé n'a pas été repéré lors de l'étude de la composition des baies de raisin issues des cépages champenois. L'acide protocatéchique serait donc produit par des réactions de dégradation durant la vinification et le vieillissement des vins. Sa formation au cours de l'autoxydation de la catéchine est mise en évidence dans la Partie 2, chapitre II « Autoxydation des composés phénoliques ».

L'identification de ces composés est confirmée par l'injection d'une solution des standards.

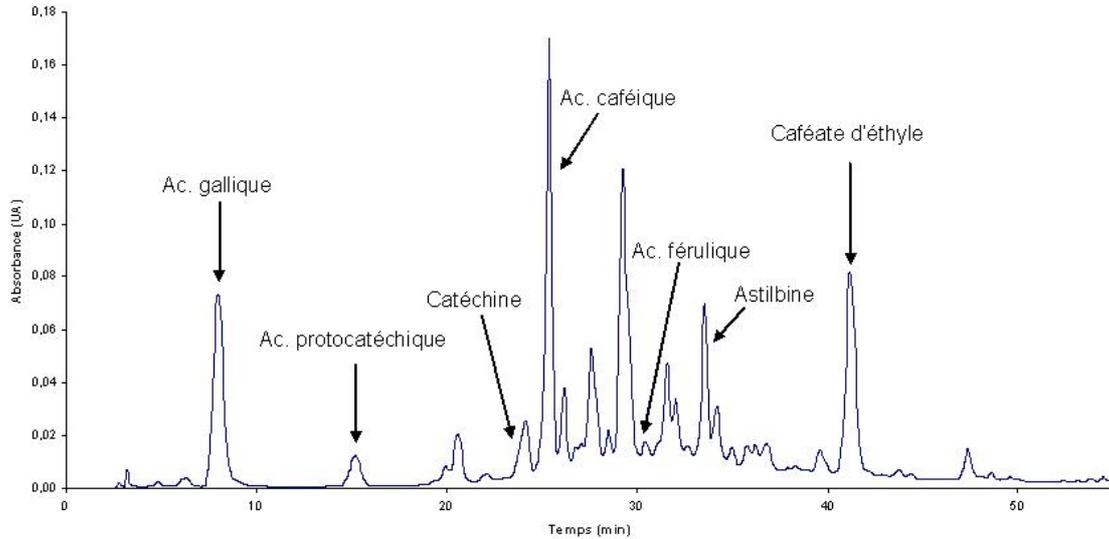


Figure 41 : Profil chromatographique à 280 nm de la fraction MeOH 80% de Pinot noir

(4) Fraction méthanol ammoniacal 0,1 %

La fraction éluée avec le méthanol ammoniacal 0,1 % est de couleur jaune et regroupe essentiellement les esters tartriques des acides hydroxycinnamiques (

Figure 42). Outre les acides *t*-caftarique, *c*-coutarique, et *t*-fertarique déjà repérés par analyse directe des vins, les acides *c*-caftarique et *t*-coutarique sont révélés par le fractionnement. Ils sont respectivement caractérisés par des temps d'éluion de 14 et 21,5 min, et des maxima d'absorption à 329 et 310 nm.

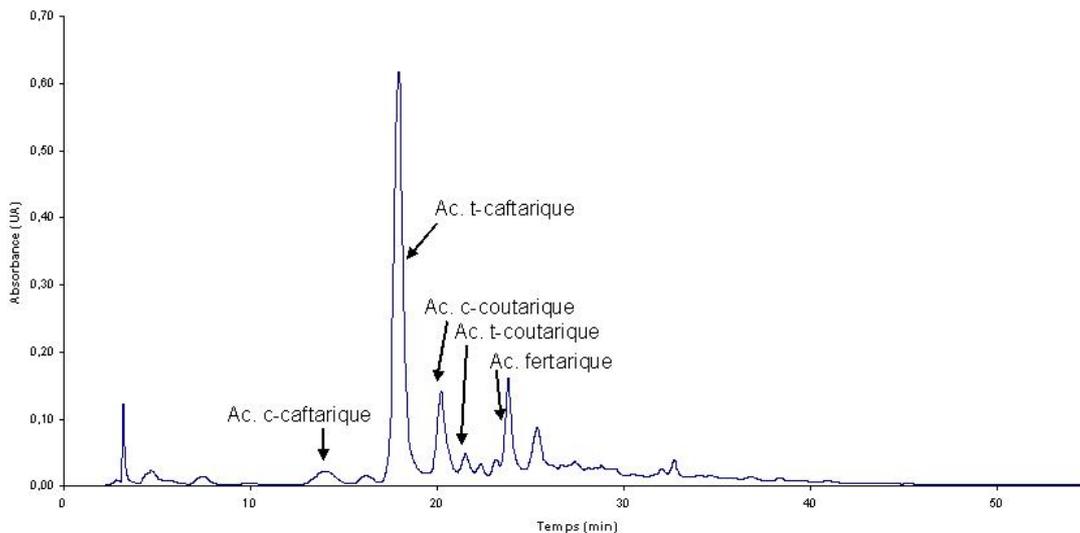


Figure 42 : Profil chromatographique à 280 nm de la fraction MeOH ammoniacal de Pinot noir

(5) Conclusion

L'objectif de ce fractionnement était d'isoler des fractions jaunes, afin de mieux caractériser les structures impliquées. Ce fractionnement nous a effectivement permis de séparer trois fractions colorées, qui sont aussi les fractions les plus concentrées.

Deux pigments jaunes sont repérés dans la fraction correspondant au lavage, mais leur contribution à la couleur jaune des vins n'est pas quantifiable. Tous les deux ont une caractéristique particulière : l'un présente deux bandes d'absorption dans le domaine visible, l'autre un ion moléculaire impair.

En revanche, la couleur jaune observée pour la fraction correspondant au volume de dépôt n'est pas expliquée par l'analyse CLHP-DAD-SM, qui ne met en évidence que des produits incolores. Ces résultats suggèrent l'absence de rétention de ces composés colorés sur la colonne de C18 comme déjà remarqué sur la polyamide. De même la coloration observée pour la fraction de méthanol ammoniacal n'est pas retranscrite par analyse. Elle pourrait cependant être expliquée de deux façons non exclusives : soit la présence d'ammoniaque dans le milieu expliquerait seule la couleur jaune, mais ce n'est pas ce qu'on observe puisqu'après évaporation sous vide de la fraction puis reprise en milieu méthanolique la fraction conserve une coloration jaune, soit l'oxydation, favorisée en milieu basique, des acides hydroxycinnamiques majoritairement présents dans cette fraction, conduit à la formation de pigments bruns divers et en faibles teneurs.

Enfin, le fractionnement a permis de révéler la présence de catéchine en faible quantité mais pas d'oligomères de flavanols dans les vins blancs tranquilles de Champagne.

D. Analyse des tanins du vin par phloroglucinolyse

Afin de mieux caractériser les tanins natifs de ce vin, une réaction de dépolymérisation par la méthode de phloroglucinolyse, a été réalisée. Celle-ci permet la quantification de cette famille de composés, ainsi que la détermination de leur degré de polymérisation moyen (DPM). Avec les connaissances actuelles, seuls les tanins natifs sont caractérisables par cette technique.

La fraction de tanins est préalablement isolée à partir du vin par extraction sur support solide. Après phloroglucinolyse, l'injection du milieu réactionnel en CLHP ne permet pas de mettre en évidence de pic correspondant à des unités terminales, ni même à des unités d'extension de tanins natifs sur le chromatogramme extrait à 280 nm. Cette absence peut

s'expliquer par une teneur inférieure au seuil de détection, ou par un degré de polymérisation moyen des tanins trop élevé pour une élution au méthanol (mode opératoire standard) lors de l'étape de fractionnement. Il est à noter qu'au moment où ce travail a été réalisé, les cépages champenois n'étaient pas encore caractérisés, et la présence de tanins de relativement haut degré de polymérisation dans les moûts (DPM = 9) n'a pas été mise en évidence. Ceci explique qu'une élution avec un solvant acétone/eau, capable d'extraire des tanins de haut degré de polymérisation contrairement au mélange (méthanol/eau), n'ait pas été testée.

Reste maintenant à savoir si des flavanols autres que monomères et tanins natifs sont décelables dans les vins blancs tranquilles de Champagne. Pour cela, des méthodes globales de dosage des polyphénols par réaction chimique ont été mises en oeuvre.

E. Dosage des composés phénoliques par réaction chimique

Le dosage des polyphénols totaux, flavanols et tanins natifs est réalisé classiquement par des méthodes colorimétriques.^{10, 130, 131} Même si le manque de spécificité est la limite majeure de ces méthodes, la confrontation des divers résultats obtenus permet d'estimer la part des familles échappant à l'analyse par CLHP-DAD-ESI/TI.

1. Dosage des polyphénols totaux : Indice de Folin –Ciocalteu

La méthode de Folin Ciocalteu est la méthode de référence pour doser les polyphénols totaux dans les vins blancs.¹³⁹ Cependant des erreurs liées à l'interférence des sulfites additionnés aux vins blancs peuvent être à l'origine d'une surestimation de la quantité de polyphénols réellement présents.¹⁴⁰

a) Détermination de la longueur d'onde d'étude

Le spectre UV-visible de la solution d'acide gallique à 250 mg.L⁻¹ présente, après incubation avec le réactif de Folin-Ciocalteu, un maximum d'absorption à 765 nm (Figure 43). Les absorbances des différentes solutions sont donc déterminées par la suite à la longueur d'onde fixe de 765 nm.

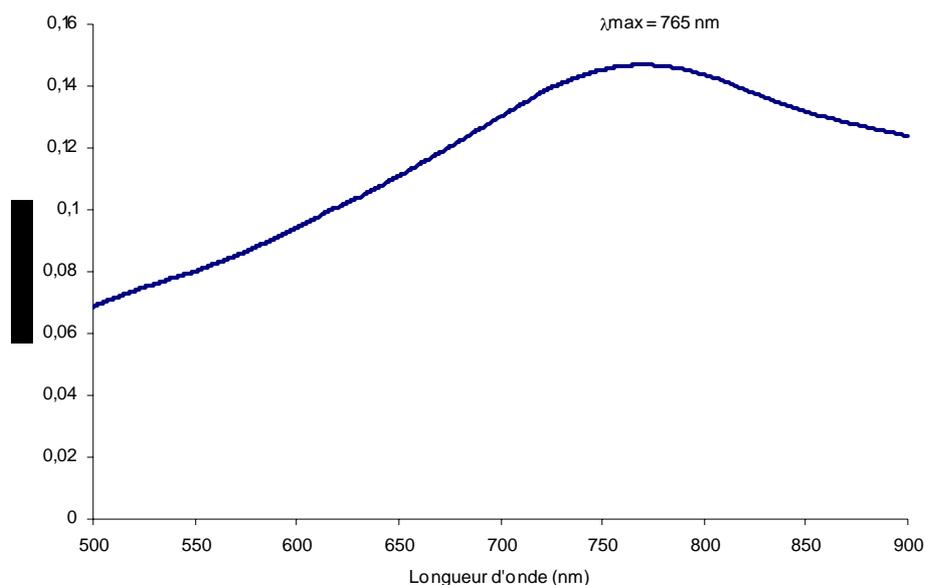


Figure 43 : Spectre visible de la solution d'acide gallique à 250 mg.L⁻¹ (1,48 mM) incubée avec le réactif de Folin Ciocalteu

b) Etalonnage avec l'acide gallique

Sur la gamme de concentrations de 0 à 400 mg.L⁻¹ (0 à 2,37 mM) d'acide gallique, la loi de Beer-Lambert est applicable, et la droite d'étalonnage construite est caractérisée par l'équation $Abs_{765} = 0,0005 \times Conc$ ($R^2 = 0,995$ et concentration exprimée en mg.L⁻¹).

c) Evaluation de la teneur en polyphénols dans les vins blancs de Champagne

A 765 nm, l'Assemblage 2003, a une absorbance moyenne $Abs_{765} = 0,0829$, soit une teneur globale en polyphénols de 0,98 mM en équivalent acide gallique (EAG). Cette valeur, même si elle est plus haute que la valeur estimée par chromatographie liquide (0,72 mM EAG ; cf I.B p99), est cohérente avec cette dernière. La différence peut s'expliquer par la présence d'interaction entre le réactif de Folin-Ciocalteu et les groupes hydroxyles de molécules telles que les protéines, les sucres, et les sulfites.

Les teneurs des vins de Champagne monovariétaux à partir desquels cet assemblage est réalisé ont, de la même façon, été évaluées entre 0,88 et 1,06 mM EAG. Ces valeurs sont

comparables à celles obtenues pour d'autres vins de Champagne monovariétaux, comprises entre 1,04 et 1,15 mM EAG.¹⁰

La teneur en polyphénols totaux dans les vins blancs étant généralement comprise entre 0,29 et 2,06 mM EAG,⁵⁰ nos vins blancs tranquilles de Champagne sont en milieu de gamme. Le pressurage doux mené lors de la vinification champenoise limite en effet l'extraction des polyphénols contenus dans la pellicule des baies de raisin.

2. Teneur en flavanols : test au DMAC

Le DMAC, exclusivement spécifique des flavanols contrairement à la vanilline,^{106, 141} est le réactif utilisé dans notre étude pour doser les flavanols. Seuls les monomères de flavanols et unités supérieures des tanins sont pris en compte, dû au blocage des positions 6 et 8 par les liaisons interflavoniques pour les unités intermédiaires et terminales.¹⁴²

a) Calibration

L'analyse des solutions de catéchine de concentrations comprises entre 0 et 0,07 mM montre que la réponse à 640 nm est linéaire sur cette gamme d'étude. La droite de calibration ainsi construite est caractérisée par l'équation $Abs_{640} = 0,008949 \times Conc$ avec un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,9994$ et la concentration exprimée en millimolaires.

b) Dosage et caractérisation des flavanols dans les vins tranquilles

A partir de la droite de calibration, le test au DMAC permet d'évaluer à $0,037 \pm 0,001$ mM équivalent catéchine la teneur en flavanols monomères et unités supérieures des tanins dans le vin issu de Pinot meunier 2003. La teneur en monomères étant estimée à 0,001 mM par dosage CLHP de la catéchine éluee dans la fraction MeOH 80 % (cf I.C.3.d)(3) p114), la majorité des flavanols du vin sont sous forme d'oligomères ou polymères.

c) Contribution des polyphénols liés aux protéines du vin

Des protéines résiduelles étant probablement présentes dans le vin, leur complexation avec une partie des tanins peut être suspectée du fait de leur forte affinité.¹⁴³ Les complexes formés ne sont pas dosables par l'analyse classique, et une étape de dissociation préalable est nécessaire avant le test au DMAC.

Après dissociation du complexe à chaud en présence de sodium dodécyl-sulfate (SDS), la teneur en flavanols monomères et proanthocyanidines dans le vin est estimée à $0,040 \pm 0,001$ mM équivalent catéchine, soit un gain de 8 %. La très faible part représentée par les polyphénols complexés aux protéines, associée aux écart-types sur les dosages avant et après dissociation des complexes polyphénols-protéines, nous a conduit à abandonner cette étape.

3. Teneur en tanins natifs : Test de Bate-Smith

Le test de Bate-Smith est une méthode colorimétrique permettant de mettre en évidence les tanins natifs contenus dans un extrait végétal^{32, 97} par rupture des liaisons interflavaniques à l'origine de la libération d'anthocyanidines. Dans le cadre de notre étude, elle est utilisée essentiellement en tant que test qualitatif permettant de confirmer ou au contraire d'infirmer la présence de tanins natifs dans les vins à partir de la détection de la couleur rouge. Néanmoins le test adapté par Porter,⁹⁷ quantitatif et reproductible, autorise une estimation de la teneur en tanins natifs dans le milieu vin.

L'étude de la composition polyphénolique des baies de Pinot noir, Pinot meunier, et Chardonnay a mis en évidence des tanins dans la pulpe. Même si une partie des tanins extraits de la pulpe par pressurage doux a été éliminée au cours du débouillage par exemple, la présence de tanins dans le vin est attendue, soit sous forme native et donc dosable par ce test, soit sous forme oxydée (liaison de type biphényle) non accessible.

a) Calibration

L'analyse des solutions standard de chlorure de cyanidine de concentrations comprises entre 0 et 0,033 mM montre que sur cette gamme d'étude, la réponse à 540 nm est linéaire (coefficient de régression linéaire R^2 de 0,98932). La droite de calibration ainsi construite est caractérisée par l'équation $Abs_{540} = 0,00428 \times Conc$ où la concentration est exprimée en millimolaires.

b) Dosage des tanins natifs dans le vin

A partir de la droite de calibration, le test de Bate-Smith permet d'évaluer à $0,0062 \pm 0,0004$ mM équivalent chlorure de cyanidine, soit $0,009 \pm 0,001$ mM équivalent catéchine la teneur en proanthocyanidines dans le vin issu de Pinot meunier 2003.

4. Conclusion des différents dosages

La confrontation des teneurs estimées en unités supérieures de polymères de flavanols (0,036 mM équivalent catéchine par test au DMAC) et unités d'extension (0,009 mM équivalent catéchine par test de Bate-Smith) conduit à une valeur de DPm de 0,25, ce qui suggère l'existence de liaisons interflavoniques non rompues par la réaction de Bate-Smith. Le fait que le rendement de la réaction de Bate-Smith soit d'environ 50 % pour les tanins natifs de DPm supérieurs à 3¹²⁹ ne permet pas d'atteindre un DPm cohérent, ce qui permet de supposer la présence de tanins dérivés dans les vins qui répondent au test au DMAC mais pas au test de Bate-Smith.

II. Recherche de marqueurs d'oxydation dans des vins champagnisés âgés présentant un différentiel de caractère oxydé

Dans un premier temps, les marqueurs d'oxydation ont été recherchés sur des gammes de vins âgées de dix et sept ans au moment de notre travail, ce qui est extrêmement vieux pour un Champagne. Bien que les vins soient commercialisés et consommés généralement bien avant cet âge, ce choix était justifié par le fait que ces gammes étaient définies sensoriellement comme présentant un différentiel de « caractère oxydé » intra-gamme très marqué. Ce différentiel avait été obtenu expérimentalement par des capsules plus ou moins hermétiques.

Le travail est centré sur l'étude de la gamme d'assemblage millésime 1995 du CIVC, et complété par la considération d'une autre gamme de vins Moët & Chandon 1998.

Sélection CIVC	Sélection Moët & Chandon
- 1995 BO	- 1998-11
- 1995 LIEGE (ou TEM)	- 1998-15
- 1995 SCEL+	- 1998-16
- 1995 SCEL++	- 1998-21
	- 1998-23

A. Caractère oxydé et couleur des vins

1. Analyse par spectrophotométrie UV-visible

a) Recherche d'un signal marqueur d'oxydation sur la gamme CIVC 1995

Les spectres UV-visible des quatre échantillons de vin sont rassemblés sur la Figure 44. Comme décrit précédemment dans le cas des vins blancs tranquilles de Champagne, ils présentent un maximum d'absorption à 274 nm et un épaulement vers 320-330 nm reflétant la présence d'acides hydroxycinnamiques dérivés ou non. Dans le domaine d'absorption visible, entre 350 et 560 nm, l'absorbance est faible et les spectres ne présentent pas de maximum d'absorption réellement défini, comme déjà souligné pour les vins tranquilles de 2003.

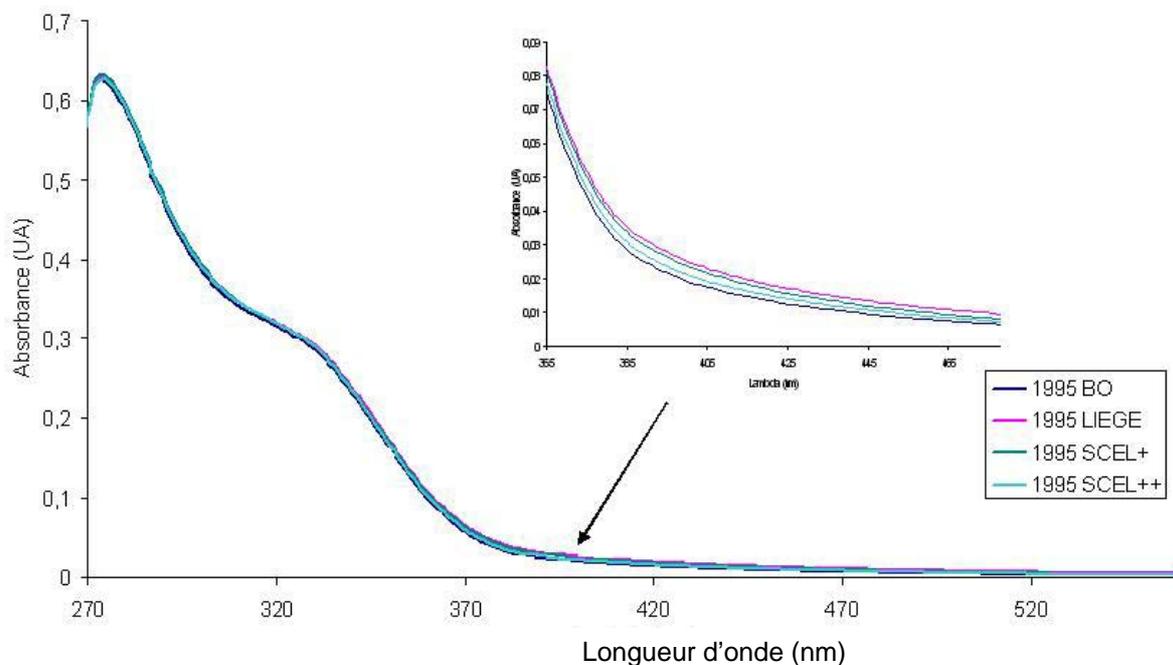


Figure 44 : Spectres UV-visible des quatre vins constituant la gamme d'oxydation de 1995 obtenus sans dilution dans une cuve en quartz de 1 mm de trajet optique

Sur la gamme de longueurs d'onde de 270 à 560 nm, aucune différence majeure n'est détectée entre les échantillons, et les spectres sont quasiment superposables (Figure 44). Cependant, dans la zone d'absorption visible s'étendant de 386 à 413 nm et qui correspond aux flavonols et autres pigments jaunes, les variations d'absorbance d'un échantillon à l'autre sont significatives.

Les différences de couleurs pouvant être interprétées comme des différences d'oxydation, le positionnement relatif des différents spectres suggère le classement suivant des modalités par ordre croissant de degré d'oxydation : 1995 BO < 1995 SCEL++ < 1995 SCEL+ < 1995 LIEGE.

b) Application à la gamme Moët & Chandon 1998

Contrairement aux résultats obtenus pour la gamme d'assemblage millésime 1995 du CIVC, l'étude de l'absorbance dans la zone des pigments jaunes ne permet pas de classer les vins de la gamme Moët & Chandon 1998. En effet, ces vins dont les spectres sont comparables à ceux des vins de 1995, ne présentent pas de différences marquées. La comparaison des absorbances dans le visible de la gamme de vins de Moët & Chandon 1998, suggère cependant que l'échantillon 1998-16 serait le moins oxydé, et l'échantillon 1998-15 le plus oxydé.

La comparaison directe de l'absorbance des vins blancs de Champagne ne semble donc pas être une méthode adaptée à la distinction des vins à caractère oxydé variable. La faible absorbance des vins mesurée directement dans le visible limite l'application de la spectrophotométrie UV-visible. Une autre approche de la mesure de la couleur, plus sensible, a donc été envisagée.

2. Colorimétrie

La colorimétrie est la technique de mesure de la couleur qui reflète au plus près la perception de l'œil humain. Cette technique est couramment utilisée dans les travaux sur la couleur des vin, par exemple pour étudier l'impact de traitements pré et post-fermentaires sur l'évolution de la couleur.^{144, 145}

Les mesures de colorimétrie ont été réalisées en collaboration avec Céline Malien-Aubert du groupe ChrisHansen basée à Prades-le-Lez.

*a) Définition de la couleur des vins dans l'espace CIEL*a*b**

En plus des deux sélections de vins âgés et oxydés, un vin blanc tranquille jeune issu de Pinot noir (PN) est considéré pour comparaison.

La Figure 45 représente la distribution du Pinot noir 2003, et des sélections 1995 du CIVC et 1998 de Moët & Chandon dans l'espace colorimétrique (a^* b^*).

De façon évidente, la colorimétrie est une technique qui permet de différencier les quatre échantillons d'assemblage ainsi que les cinq échantillons de la gamme Moët & Chandon, les écart-type calculés pour chacun d'entre eux à partir de 3 mesures du couples (a^* b^*) étant largement inférieurs aux variations relevées entre échantillons.

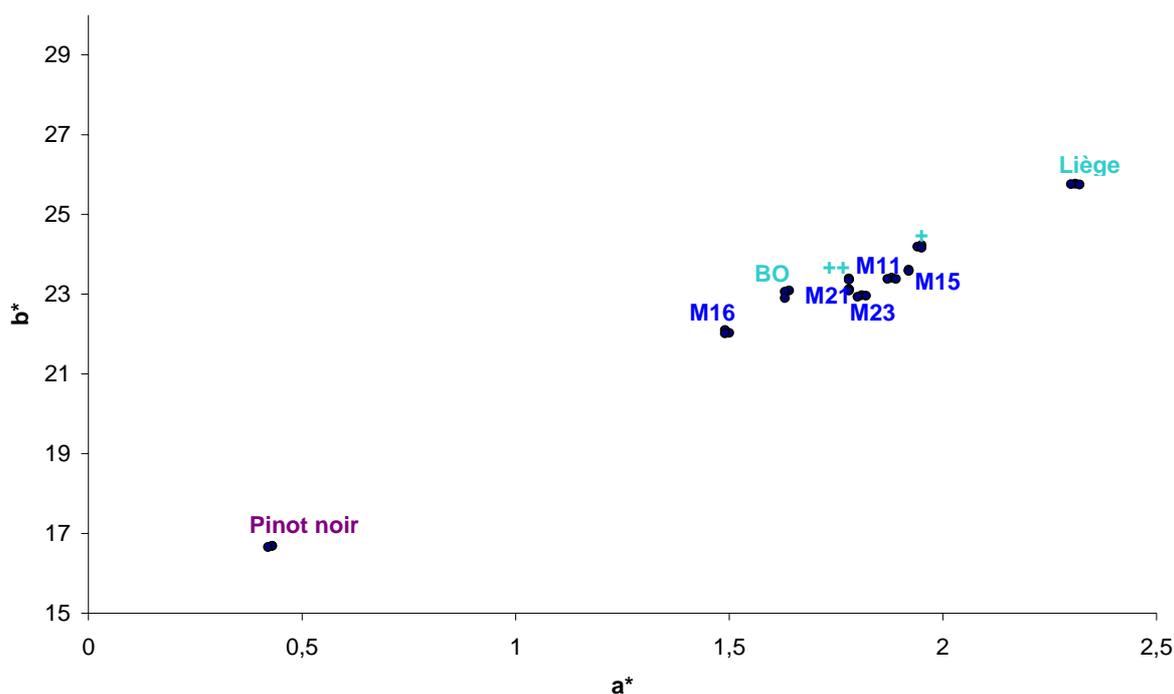


Figure 45 : Distribution des sélections CIVC (BO, SCEL++, SCEL+ ; Liège) et Moët & Chandon (M11, M15, M16, M21, M23) dans l'espace a^*b^*

De même que pour la spectrophotométrie UV-visible, les différences de couleurs peuvent s'interpréter comme des différences d'état d'oxydation. Plus précisément, l'analyse colorimétrique montre que l'augmentation du caractère oxydé dans cette gamme de vins se traduit par une augmentation simultanée de a^* et de b^* dans une plus large mesure. Cela signifie que le caractère oxydé se traduirait non seulement par un renforcement de la composante jaune mais aussi par un léger renforcement de la composante rouge. Ce résultat peut être rapproché de travaux antérieurs sur le brunissement montrant que l'estimation de ce phénomène est meilleure par considération de l'absorbance à 500 nm que de celle à 420 nm.¹⁴⁶

Cette technique d'évaluation de la couleur des vins est beaucoup plus discriminante que la spectrophotométrie UV-visible et donc plus adaptée à la différenciation de nos vins.

B. Caractère oxydé et composition polyphénolique

Afin d'expliquer les variations colorimétriques observées dans les sélections CIVC et Moët & Chandon, une recherche de molécules marqueurs d'oxydation a été réalisée par CLHP-DAD-ESI/TI SM.

1. Injection directe

Dans un premier temps, les quatre échantillons CIVC 1995 sont injectés directement en CLHP-ESI/TI SM sans concentration ou autre préparation préalable.

a) Profils chromatographiques

Les profils chromatographiques à 280 nm des vins effervescents de 10 ans d'âge ont une allure globalement similaire à celle du chromatogramme de l'Assemblage 2003, vin jeune et tranquille (cf I.B), même si l'intensité des signaux est 20 fois plus faible que dans ce vin jeune (Figure 46). Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés (acides caféique, *t*-caftarique, GRP) restent les composés phénoliques majoritaires et sont présents dans des proportions équivalentes à celles relevées dans l'Assemblage 2003, hormis le caféate d'éthyle qui a quasiment disparu. Flavanols monomères et oligomères ne sont pas détectés dans ces vins effervescents âgés, comme déjà souligné dans le vin tranquille jeune.

Les vins de la sélection CIVC 1995 se distinguent de l'Assemblage 2003 principalement par l'apparition de deux pics à 13 min et 17,3 min, caractérisés respectivement par des maximums d'absorbance à 286 nm et 276,9 nm. De plus, la spectrométrie de masse associe au composé le plus apolaire ion moléculaire $m/z = 169$ en mode positif, alors qu'aucune masse molaire n'est attribuable à ce stade au composé polaire. La caractérisation structurale de ces produits a été considérée seulement suite à l'étude des phénomènes oxydants en systèmes modèles qui a permis de faire des hypothèses sur la famille à laquelle ils sont susceptibles d'appartenir (cf partie 2 chapitre I).

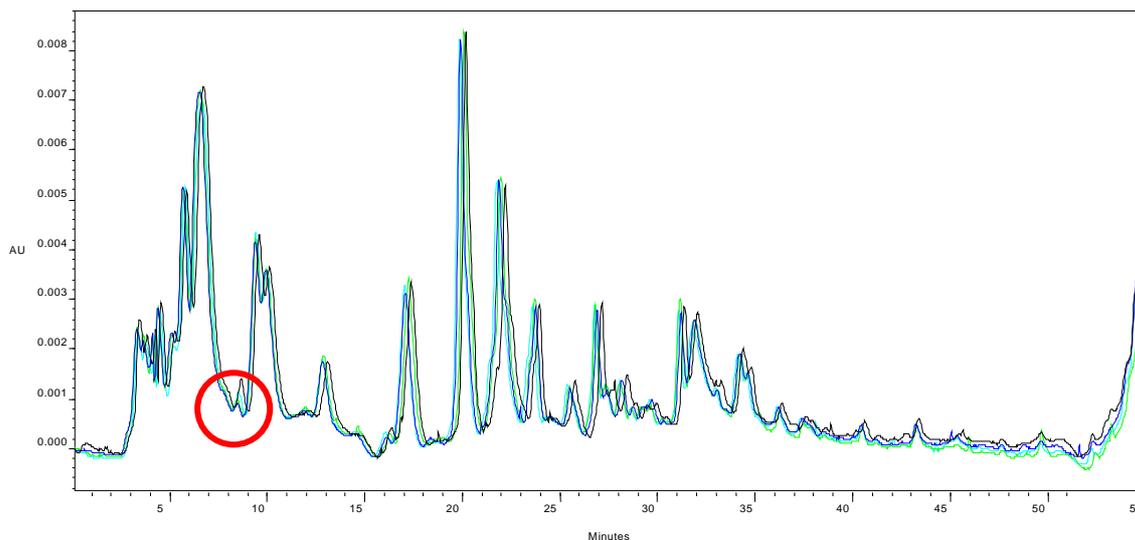


Figure 46 : Profils chromatographiques extraits à 280 nm des 4 modalités de la sélection CIVC

b) Recherche de molécules marqueurs

Dans le cas des vins effervescents de Champagne, les chromatogrammes extraits à 280 nm correspondant aux injections directes des quatre vins à différents degrés d'oxydation, sont globalement superposables, et aucun composé n'est remarquable par sa présence ou son absence dans l'un ou l'autre des échantillons (Figure 46).

La seule différence notable est la variation de l'aire du pic correspondant au composé élué à $T_r = 8,5$ min ($\lambda_{max} = 286$ nm), cerclé sur la Figure 46. Classés par aire et donc quantité de composé croissante, on trouve les échantillons 1995 LIEGE (bleu foncé), 1995 SCEL+ (vert), 1995 SCEL++ (bleu ciel) et 1995 BO (noir). Plus précisément, le relevé des aires de ce pic sur les chromatogrammes extraits à 280 nm montre que la quantité de ce composé diminue de 38% entre les modalités présentant en spectrophotométrie UV-vis et colorimétrie la plus faible et la plus forte coloration jaune (Figure 47).

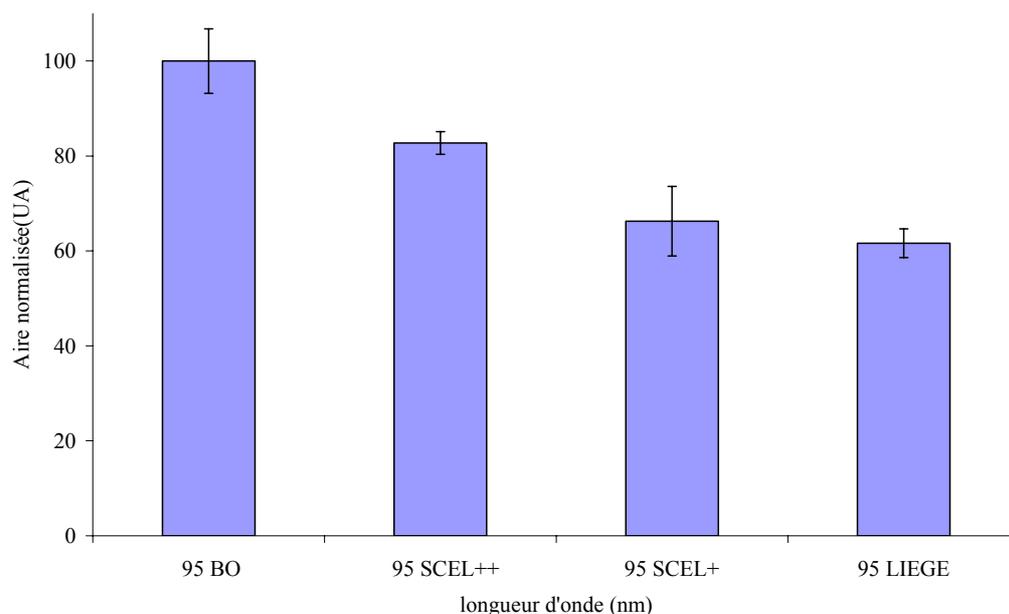


Figure 47 : Teneurs relatives en marqueur d'oxydation dans les 4 modalités de la sélection CIVC 1995 (calcul à partir des aire du pic chromatographique à 280 nm)

L'analyse par couplage CLHP/ESI-TI sous différents modes d'ionisation et à partir de différentes sources ne permet pas d'associer de masse molaire à ce composé. Les essais d'isolement du pic chromatographique par CLHP semi-préparative et lyophilisation, n'ont pas non plus permis d'atteindre ce résultat.

De la même façon, la superposition des chromatogrammes extraits à 320 nm d'une part et 420 nm d'autre part ne révèle la présence d'aucun marqueur d'oxydation.

Ce résultat est totalement différent de ce qui pouvait être attendu d'après des travaux antérieurs portant sur le brunissement du Cava (vinification selon la méthode champenoise) qui a été corrélé à la diminution des teneurs en acides trans-caftarique, cis-caftarique, et 2-S glutathionylcaftarique.⁷⁵

2. Recherche avancée de molécules marqueurs par fractionnement colorimétrique

Le fractionnement de vin tel qu'il a été défini dans le paragraphe I.C.3 est appliqué aux modalités les plus et moins oxydées de la gamme de vin du CIVC millésime 1995.

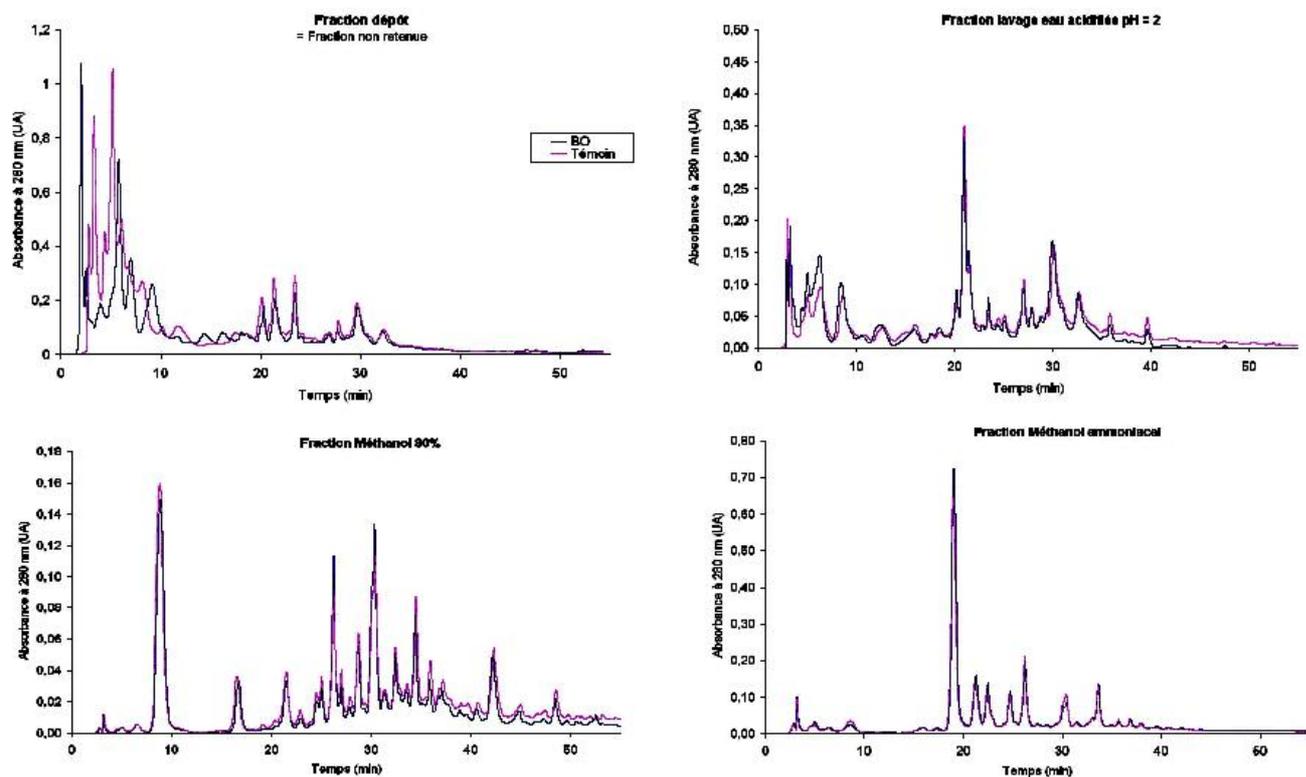


Figure 48 : Profils chromatographiques à 280 nm des différentes fractions obtenues à partir des modalités 1995 BO et 1995 LIEGE (Témoin)

En considérant chacune des fractions, la superposition des profils chromatographiques extraits à 280 nm de 1995 BO (non oxydé) et 1995 LIEGE (oxydé) confirme l'extrême similitude de leurs compositions polyphénoliques. Les plus grandes différences apparaissent dans la zone des composés les plus polaires élués dans les fractions correspondant aux volumes de dépôt et de lavage. Toutefois, il semble qu'il s'agit seulement d'un problème de distribution entre ces deux fractions. L'analyse en spectrométrie de masse révèle les mêmes ions moléculaires, et, si l'on considère pour chacun des échantillons la somme des intégrations du massif correspondant à ces composés dans la fraction non retenue et dans la fraction de lavage, les différences ne sont pas significatives. Les fractions lavage et méthanol 80% des deux modalités extrêmes se distinguent également par une plus forte absorbance de la modalité 1995-LIEGE (témoin) durant les vingt dernières minutes du gradient. Même si l'existence de molécules particulières marqueurs d'un état d'oxydation plus avancé ne peut être exclue, la spectrométrie de masse n'a pas permis de les mettre en évidence.

3. Extension à la sélection Moët & Chandon 1998

La recherche de marqueurs d'oxydation conduit à des conclusions analogues pour les gammes CIVC 1995 et Moët & Chandon 1998.

C. Autres méthodes testées

Le pH et la conductivité des quatre modalités de la sélection CIVC ont été mesurés, mais aucune différence significative n'est relevée.

D'autre part, des analyses par spectroscopie IRTF en transmission liquide et en mode Attenuated Total Reflexion n'ont permis aucune discrimination des vins plus ou moins oxydés.

D. Corrélation avec l'analyse sensorielle

Au terme de l'analyse chimique des échantillons de vin âgés, les résultats des analyses sensorielles des gammes CIVC 1995 et Moët & Chandon 1998 ont été fournis par le CIVC.

Le Tableau 14 présente la fréquence des notes attribuées aux différentes modalités lors de la dernière séance de dégustation de ces vins. Il est à noter que les deux gammes de vins n'ont pas été dégustées le même jour, et ont été soumises à des jurys d'experts différents, de sorte qu'une comparaison entre les deux gammes est hasardeuse.

	Notes Réduction		Notes Oxydation			Moyenne
	-4,5	-2,5	1	2,5	4,5	
1995 LIEGE	0	0	29	16	5	1,83
1995 Scel ⁺	0	5	16	22	7	1,80
1995 Scel ⁺⁺	1	10	31	6	2	0,51
1995 BO	19	24	3	3	2	-2,52
1998-11	0	4	11	9	1	0,56
1998-15	0	1	4	11	9	1,39
1998-16	5	6	11	3	0	-0,38
1998-21	3	5	11	6	0	0,00
1998-23	3	2	11	9	0	0,30

Tableau 14 : Fréquence des notes de dégustations des vins effervescents CIVC 1995 et Moët & Chandon 1998

A l'issue de l'analyse sensorielle, les modalités ont été classées par le CIVC de la façon suivante :

1995 BO < 1995 SCCEL++ < 1995 SCCEL+ < 1995 LIEGE

et 1998-16 < 1998-21 < 1998-23 < 1998-11 < 1998-15

où « < » signifie « présente un caractère oxydé moins marqué que »

En comptant la réduction comme une « oxydation négative », la moyenne des notes de réduction et oxydation retranscrit le classement par analyse sensorielle. Par ailleurs, on notera la disparité des notes attribuées à un même échantillon qui peut expliquer la difficulté de discriminer les échantillons par les méthodes analytiques.

Toutefois, les classements de vins issus de l'analyse sensorielle sont en accord avec le classement des vins proposés à partir des résultats de colorimétrie. Ceci amène à conclure que le caractère oxydé des vins défini par analyse sensorielle se traduit par un renforcement des composantes jaune et rouge de la couleur des vins et une disparition du précurseur d'oxydation incolore mis en évidence dans le paragraphe II.B.1.b).

III. Bilan « de la baie de raisin au vin blanc »

La couleur des vins blancs de Champagne n'a pu être associée qu'à la présence de deux pigments jaunes, même s'il est très vraisemblable que d'autres pigments participent à cette coloration. La difficulté de leur analyse pourrait naître de leur diversité ainsi que de la faible teneur de chacun d'eux.

Bien que la colorimétrie associe au caractère oxydé un renforcement des composantes jaune et rouge de la couleur, l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse n'a pas permis d'établir de corrélation entre ce défaut et une quelconque variation de la quantité des pigments jaunes, ni même d'autres polyphénols connus pour avoir un faible potentiel d'oxydation (facilement oxydables). Trois hypothèses peuvent être alors proposées pour expliquer de façon générale ce manque de résultats :

- ✓ Les produits d'oxydation ne sont pas élués de la colonne chromatographique et restent au contraire fixés sur la pré-colonne
- ✓ Les produits d'oxydation sont très hétérogènes, présents en très faible quantité et leurs structures sont proches de celles des molécules parents.
- ✓ Ils sont en compétition défavorable vis-à-vis de l'ionisation/détection en spectrométrie de masse

A ce stade, il s'avère donc nécessaire de consacrer une partie de la suite du travail à l'étude de l'oxydation des polyphénols en systèmes modèles.

Concernant plus précisément les flavanols, les analyses de vins blancs tranquilles de Champagne ne permettent pas de mettre en évidence de polymères de flavanols ni même

d'oligomères, sensibles à l'oxydation, alors que leur présence est attendue dans les jus obtenus par pressurage doux de baies de raisin par analogie avec les essais menés sur le Mourvèdre. D'une part, les tanins susceptibles d'être présents dans les vins le seraient sous forme oxydée et non plus native d'où leur non détection après phloroglucinolyse, d'autre part leur degré de polymérisation serait élevé si l'on se réfère au degré de polymérisation moyen des tanins dans la pulpe ou dans le jus de sorte qu'ils ne seraient pas détectables avec la technique de spectrométrie de masse utilisée.

En parallèle de l'étude de l'oxydation modèle des polyphénols, il paraît donc indispensable de développer des méthodologies innovantes permettant d'analyser les tanins oxydés et/ou de haut degré de polymérisation moyen.

Chapitre I

Vieillessement et oxydation modèles d'un vin blanc tranquille de Champagne (Assemblage 2003)

L'objectif de l'étude d'un modèle d'évolution rapide du vin blanc de Champagne est de révéler les marqueurs d'oxydation, qu'il s'agisse de signaux de type molécule ou empreinte, ceci afin de les rechercher ensuite dans les vins vieillis et oxydés en conditions naturelles (cave à 12°C). Un impératif découle alors de cette problématique : élaborer un modèle d'oxydation rapide permettant de distinguer les phénomènes d'oxydation des phénomènes de vieillissement.

I. Justification des modèles d'évolution des vins

Différentes voies sont proposées dans la littérature pour faire évoluer un vin de façon accélérée. La première consiste à favoriser les processus par augmentation de la température de conservation. Ce modèle, proposé par Singleton,⁹⁶ est largement utilisé comme test de brunissement : il consiste en une conservation des vins à une température autour de 55°C sous oxygène ou azote pendant des périodes qui peuvent aller de quelques jours à quelques mois. Des travaux ultérieurs menés sur d'autres vins blancs ont confirmé que le modèle de vieillissement thermique en présence d'air et donc d'oxygène était représentatif du brunissement naturel, et que la principale différence entre ces deux types d'oxydation était la cinétique du processus.^{72, 147} Toutefois, ces études ne se sont pas attachées à définir si le brunissement était plus précisément corrélé au chauffage, au vieillissement au sens non oxydatif du terme ou plutôt aux phénomènes oxydants.

Dans notre étude, la distinction entre oxydation et vieillissement est envisagée simplement à travers l'étude d'échantillons vieillis en présence d'oxygène (conditions oxydantes) ou non (conditions non oxydantes). Plus précisément, le travail est basé sur l'analyse comparative de quatre modalités d'évolution de l'Assemblage 2003, vin jeune

caractérisé comme étant non oxydé : un vieillissement en « conditions cave », soit une conservation à 12°C à l'obscurité, et un vieillissement accéléré à haute température (47°C) à l'obscurité, chaque vieillissement étant mené en conditions oxydatives ou non. Les conditions d'incubation employées permettent de suivre une évolution notable des vins sur une période de temps raisonnable (40 jours), bien que cette durée ait été déterminée de façon arbitraire.

L'oxydation chimique du même vin par le periodate de sodium, méthode rapide de brunissement (quelques heures), sera présentée pour comparaison dans un second temps, en vue de développer un test prédictif.

II. Evolution de la couleur des vins dans les différentes modalités : suivi par spectrophotométrie UV-visible

A. Stabilité du vin vieilli en conditions « cave »

Sur la gamme de longueurs d'onde étudiée, aucune évolution de l'allure du spectre UV-visible n'est à signaler après 20 et 40 jours d'incubation du vin tranquille de Champagne conservé à 12°C en conditions non oxydatives (Figure 49).

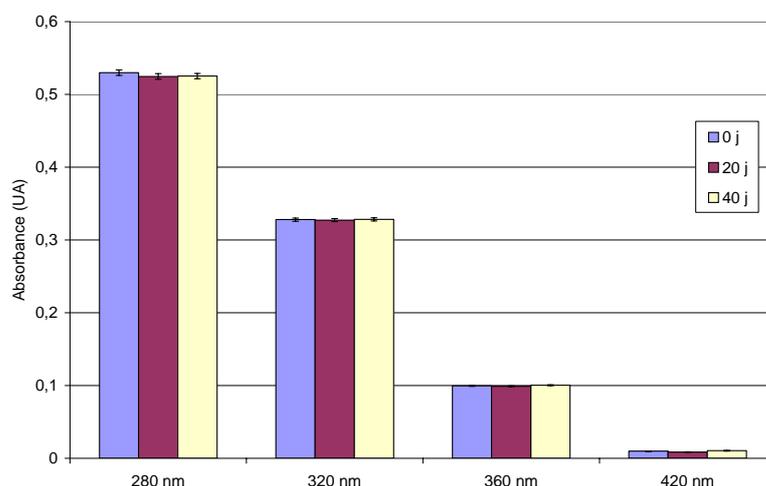


Figure 49 : Evolution des absorbances aux longueurs d'onde spécifiques du vin tranquille après 0, 20, et 40 jours d'incubation à 12°C en conditions non oxydatives

En présence d'oxygène, l'absorbance du vin est stable sur tout le domaine UV-visible étudié pendant les vingt premiers jours d'incubation (Figure 50). A partir de cette date, une

évolution significative est observable dans le visible. Cependant, cette observation doit être nuancée dans la mesure où cette augmentation est liée au moins en partie à un phénomène de diffusion, les vins incubés étant légèrement troubles. Ceci peut également expliquer l'écart-type important observé lors de la série de mesure après 40 jours d'incubation.

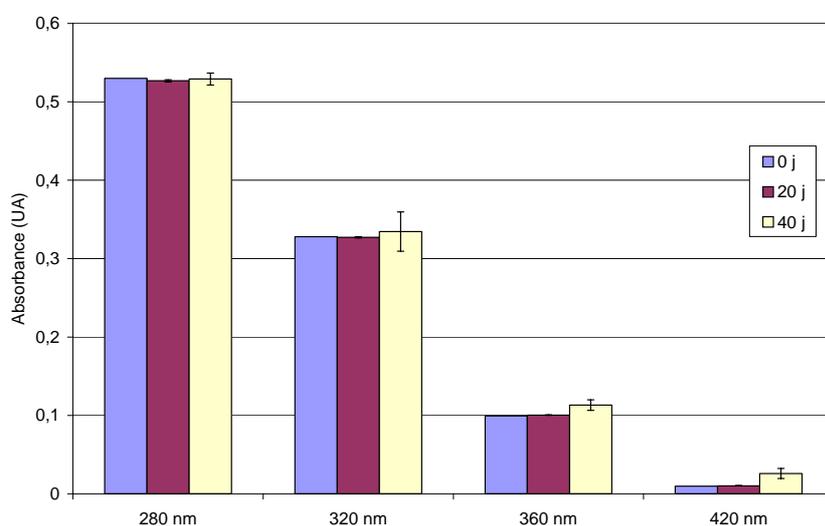


Figure 50 : Evolution des absorbances aux longueurs d'onde spécifiques du vin tranquille après 0, 20, et 40 jours d'incubation à 12°C en conditions oxydatives

B. Vieillissement accéléré non oxydatif

Au cours des quarante jours de vieillissement accéléré en conditions non oxydatives, une augmentation simultanée des absorbances dans l'ultraviolet vers 280 nm et dans le visible est observée (Figure 51). Le relevé des valeurs à 280 et 420 nm aux trois points de la cinétique permet de préciser que cette augmentation est quasiment linéaire ($R^2=0,9955$ et $R^2=0,9953$ respectivement pour 280 nm et 420 nm). Après 40 jours d'incubation, on note une augmentation de l'absorbance de 28 % à 280 nm, 15 % à 360 nm, et 138 % à 420 nm. Cette évolution traduit donc à la fois la formation de groupements chromophores au cours du vieillissement du vin, et l'existence de réarrangements qui ne s'accompagnent pas nécessairement d'une extension du système conjugué.

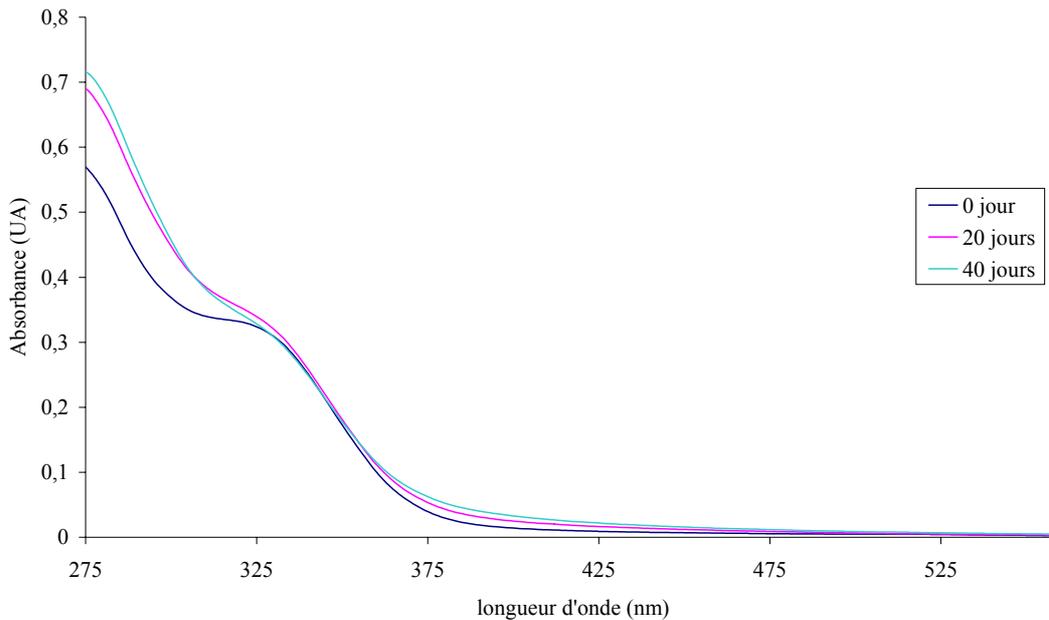


Figure 51 : Evolution du spectre UV-Visible de l'Assemblage 2003 durant le vieillissement accéléré en conditions non oxydantes après 0, 20, et 40 jours d'incubation à 47°C

L'évolution de l'absorbance à 320 nm est plus complexe puisque l'on observe l'apparition de produits absorbant à cette longueur d'onde durant la première partie de la cinétique (augmentation de l'absorbance de 6 % après 20 jours d'incubation), puis une disparition de ces produits au cours des 20 jours suivants.

Le fait que l'absorbance du vin augmente sur toute la gamme de longueurs d'onde étudiée de 275 à 560 nm pendant les 20 premiers jours pourrait s'expliquer par des coefficients d'absorption associés aux produits de réaction plus élevés que ceux caractérisant les précurseurs. Par ailleurs, l'étude comparée des cinétiques d'évolution des absorbances à 280, 320, 420 nm suggère que les composés absorbant à 320 nm correspondent à un état transitoire qui évolue, dans la seconde partie de la cinétique, à la fois vers la formation de structures absorbant dans l'Ultra-Violet⁵⁹ et à d'autres produits absorbant dans le visible.

C. Influence de la présence d'oxygène sur le vieillissement accéléré

Le vieillissement accéléré oxydatif des vins se traduit par une évolution des spectres UV-visible globalement similaire à celle observée pour le vieillissement accéléré non oxydatif, même si des nuances sont à souligner (Figure 52).

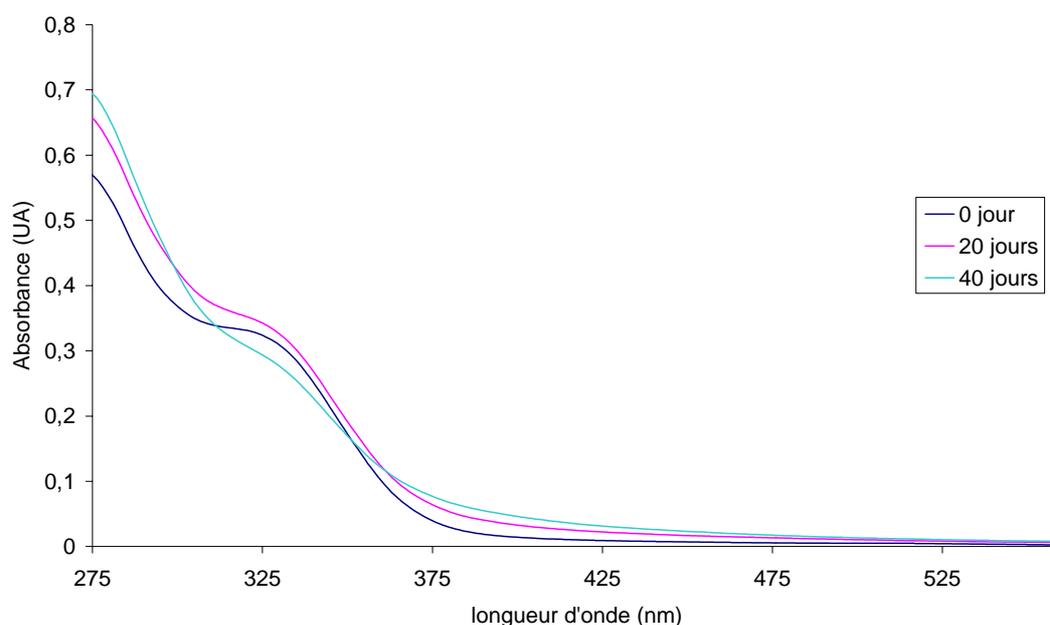


Figure 52 : Evolution du spectre UV-Visible de l'Assemblage 2003 durant le vieillissement en conditions oxydantes après 0, 20, et 40 jours d'incubation à 47°C.

L'absorbance relevée à 280 nm augmente durant les 40 jours d'incubation, mais, contrairement au vieillissement non oxydatif, le phénomène n'est pas linéaire : les produits absorbant à 280 nm se sont formés en même quantité dans les conditions oxydatives et non oxydatives au bout de 20 jours, mais après 40 jours, la formation est ralentie et devient inférieure en conditions oxydatives (Figure 53). Plus précisément, le gain est de 21 % après 20 jours d'incubation et évolue pour atteindre 22 % en mode oxydatif contre 38 % pour le mode non oxydatif. Cette différence de comportement peut être rapprochée des résultats d'une étude sur le vieillissement à haute température de vins blanc issus des cépages Pedro Ximenez et Baldi¹⁴⁸ : durant l'incubation de vins sans apport supplémentaire d'oxygène autre que l'oxygène dissous initialement et celui provenant éventuellement d'un ciel gazeux (non précisé), une forte augmentation de l'absorbance à 280 nm est observée. Au contraire après ouverture des bouteilles, cette absorbance tend à se stabiliser. Ce travail ne propose aucune explication quant à cette évolution. Toutefois, une hypothèse pourrait être la suivante : le vieillissement thermique est à l'origine de la formation en grande quantité de produits absorbant à 280 nm ; en présence d'oxygène, ces produits se formeraient toujours aussi vite, mais seraient simultanément consommés par d'autres réactions, tendant ainsi à stabiliser le gain d'absorbance. Cependant, l'évolution identique observée au 20^{ème} jour d'incubation

signifierait que les phénomènes d'oxydation ne consomment pas les polyphénols jusqu'à cette date, ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'agents réducteurs comme l'acide ascorbique ou les sulfites.

Parallèlement à ce phénomène, une accélération et un renforcement du gain d'absorbance à 420 nm sont observés. Pour illustration, le gain d'absorbance à 420 nm est de 145 % après 20 jours d'incubation en conditions oxydatives contre 99 % en l'absence d'oxygène, et il atteint respectivement 234 contre 177 % après 40 jours.

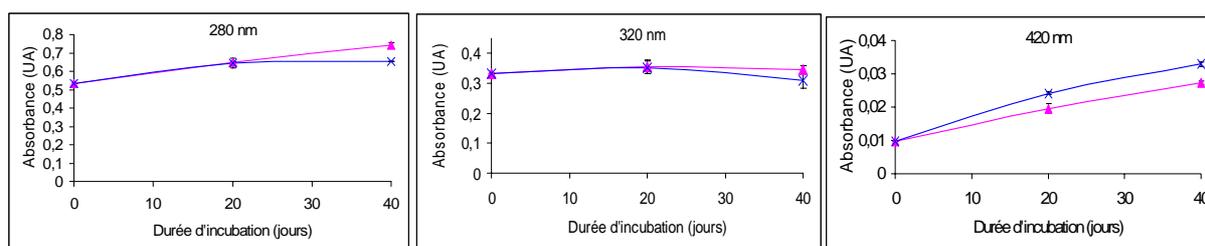


Figure 53 : Evolution des absorbances à 280, 320, et 420 nm de l'Assemblage 2003 au cours des 40 jours de vieillissement accéléré en conditions non oxydantes (▲) et oxydantes (X).

L'absorbance à 320 nm suit une évolution complexe aussi bien en conditions oxydatives que non oxydatives. En présence de dioxygène, les composés absorbant à cette longueur d'onde s'accumulent durant les 20 premiers jours (gain de 6%), et leur disparition est favorisée à partir de cette date avec une perte de 7% de la valeur initiale d'absorbance après 40 jours d'incubation.

Finalement, quelles que soient les conditions, oxydatives ou non, on observe une augmentation continue des absorbances à 280 et 420 nm, alors que l'absorbance à 320 nm augmente dans un premier temps et diminue par la suite. L'impact de l'oxygène se traduit par un brunissement favorisé et une dégradation simultanée des composés qui absorbent dans l'UV, synonyme de réactions de formation des pigments jaunes plus avancées en présence d'oxygène.

D. Conclusion et retour sur les vins vieillis naturellement

L'étude montre que la seule considération du spectre UV-visible des vins ne permet pas de mettre en évidence une évolution particulière associée aux phénomènes d'oxydation.

Par ailleurs, elle confirme qu'un état d'oxydation plus élevé se traduit par une augmentation de l'absorbance à 420 nm, indice qui avait été utilisé pour classer les vins champagnisés du CIVC et de Moët & Chandon présentant un différentiel de caractère oxydé. Cependant, l'augmentation de l'absorbance à 280 nm ainsi que l'évolution de celle à 320 nm montrées en vieillissement modèle oxydatif ou non, n'avait pas été repérée dans les vins vieillis naturellement. Ceci suggère, soit que ces évolutions du spectre sont des artefacts des conditions de vieillissement modèle utilisées (chauffage à haute température), ce qui remettrait en cause la validité du modèle, soit que ce vieillissement a permis d'atteindre un état d'oxydation beaucoup plus avancé que celui obtenu après 10 ans de maturation en cave à 12°C, qui serait dans la période 0-20 jours de la modélisation. La quantité d'oxygène provenant du ciel gazeux d'une bouteille âgée de 10 ans (entre 4 et 17 mg.L⁻¹) qui est en effet largement inférieure à celle utilisée pour nos expériences (environ 570 mg.L⁻¹) conforte cette seconde hypothèse.

Pour lever ce questionnement et aller plus loin dans l'interprétation de l'évolution de la composition polyphénolique au cours d'un phénomène d'oxydation, il apparaît donc indispensable de s'intéresser aux molécules elles-mêmes, de les rechercher dans les vins vieillis naturellement en conditions plus ou moins oxydatives et de mettre en place un test d'oxydation par un oxydant chimique.

III. Evolution des composés du vin

A. Mise en évidence de différents types de marqueurs

Les profils chromatographiques à 280 nm associés aux quatre modalités après 40 jours d'incubation sont présentés sur la Figure 54.

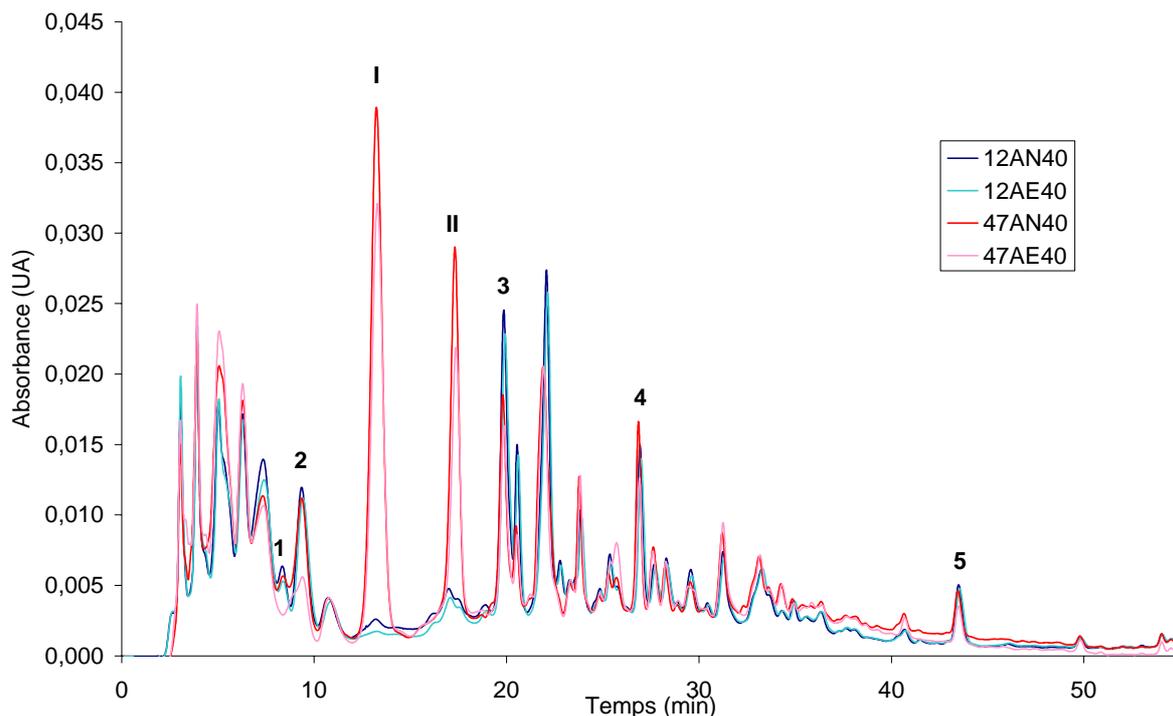


Figure 54 : Chromatogrammes extraits à 280 nm de l'assemblage 2003 incubé pendant 40 jours à 12°C en condition aérobie (bleu ciel) et anaérobie (bleu roi), et à 47°C en condition aérobie (rose) et anaérobie (rouge). 1 : composé non identifié ($\lambda_{\text{max}} = 295 \text{ nm}$), 2 : acide gallique, 3 : acide *t*-caftarique, 4 : acide caféique, 5 : caféate d'éthyle, I : 5-hydroxyméthylfurfural, II : composé non identifié ($\lambda_{\text{max}} = 277 \text{ nm}$)

Sur la majeure partie du gradient, ces profils sont superposables, même si la superposition révèle deux types de marqueurs : des marqueurs de vieillissement thermique, marqués I et II, qui apparaissent en quantité différentes au cours des vieillissements accélérés oxydatif et non oxydatif, et des précurseurs sensibles à l'oxydation associés à des pics chromatographiques dont l'aire évolue différemment en fonction de la présence ou non d'oxygène dans le milieu (annotés de 1 à 5). Notons par ailleurs que tous les marqueurs repérés sont des précurseurs qui disparaissent au cours du temps, mais que la formation d'aucun composé associée au seul phénomène d'oxydation (et qui apparaîtrait donc seulement dans les échantillons 12AE40 et 47AE40) n'est détectée.

B. Précurseurs sensibles à l'oxydation

1. Caractérisation structurale

L'identification des cinq précurseurs sensibles à l'oxydation repérés est menée par analyse CLHP-ESI/TL. Quatre d'entre eux sont des acides phénols : acide gallique (2), acide t-caftarique (3), acide caféique (4), et caféate d'éthyle (5). Quant au marqueur 1, il n'est pas identifié mais est associé à un spectre UV-visible dont le maximum d'absorption est à 295 nm. Ce composé est l'unique précurseur pour lequel nous avons relevé une différence entre les vins effervescents âgés des sélections CIVC 1995 et Moët & Chandon 1998 (cf Partie 1 chap II, § II.B.1.b)).

2. Evolution des marqueurs d'oxydation dans les différents modes de vieillissement

Les graphiques représentant la quantité de chaque marqueur après 40 jours d'incubation ont été construits en fixant à 100% la quantité de précurseur relevée avant vieillissement du vin.

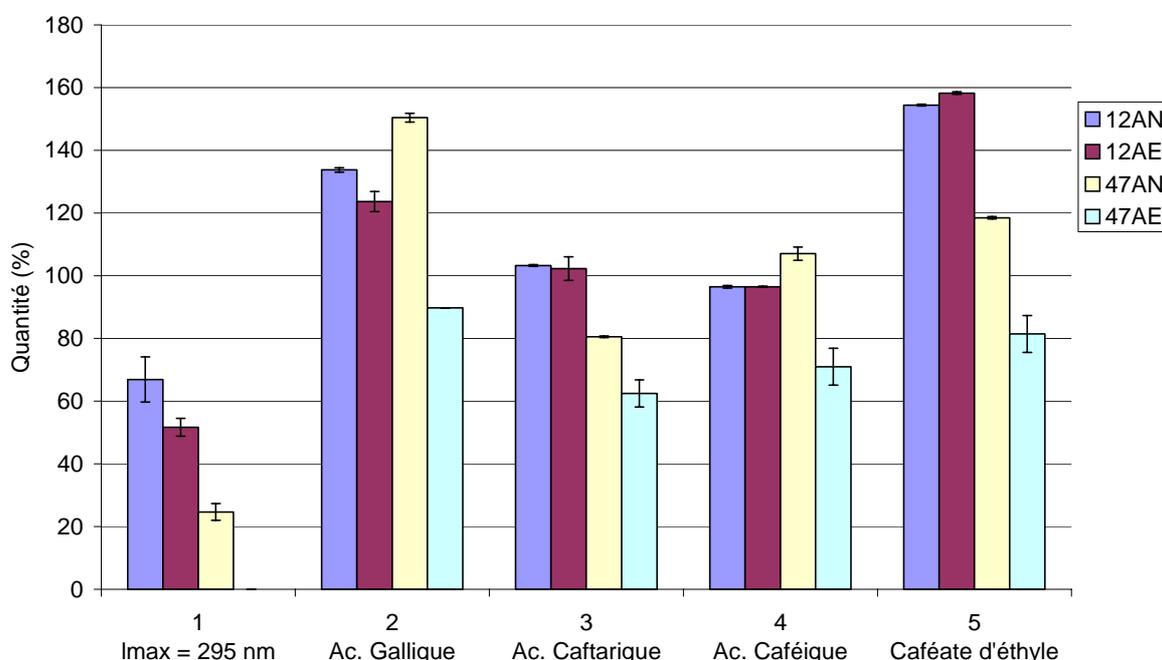


Figure 55 : Quantité des différents marqueurs après 40 jours d'incubation (le 100% est fixé à t0)

A la fin de la cinétique, soit après quarante jours d'incubation, on note que l'effet de l'oxygène sur le vieillissement des vins à faible température est moindre que dans les conditions de vieillissement à 47°C (Figure 55). Toutefois, de façon générale, sa présence favorise la disparition des précurseurs, surtout à température élevée.

Trois types de comportements se dégagent. Le premier groupe comprend uniquement précurseur 1 ($\lambda_{\text{max}}=295$ nm) dont la disparition est affectée par l'oxydation et la température d'incubation, même basse (12°C). Le second groupe rassemble l'acide *t*-caftarique et l'acide caféique pour lesquels la dégradation oxydative n'est pas significative à basse température, mais le devient lorsqu'on chauffe à 47°C. On remarque en particulier que l'acide caféique s'accumule en conditions non oxydatives, alors qu'en présence d'oxygène sa teneur est moindre que la valeur initiale. Le fait que le gain d'acide caféique en conditions anaérobies s'accompagne d'une perte d'acide *t*-caftarique dans une plus large mesure indiquerait qu'une partie de l'acide *t*-caftarique (environ 10 % d'après la comparaison des variations d'aires respectives) évolue par une réaction d'hydrolyse, voie caractérisée dans des travaux antérieurs.⁶⁷ Enfin, l'acide gallique et le caféate d'éthyle forment le dernier groupe. On observe une accumulation d'acide gallique et de caféate d'éthyle dans les modalités maintenues pendant 40 jours à 12°C et 47°C en l'absence d'oxygène, contre une perte de ces deux composés en conditions oxydatives. Les réactions d'estérification et d'hydrolyse étant des réactions non oxydatives, la formation d'acide gallique pourrait être l'indice d'une hydrolyse de tanins galloylés présents les vins, et le caféate d'éthyle, être le produit d'une réaction d'estérification de l'acide caféique ou de trans-estérification de l'acide *t*-caftarique. L'inversion de tendance sous l'effet de l'oxygène suggère que ce dernier induit une des réactions successives impliquant l'acide caféique, l'acide gallique ou encore le caféate d'éthyle : les premières non oxydatives sont à l'origine de la formation de ces molécules, tandis que les secondes, oxydatives, les consomment avec une cinétique plus rapide.

3. Cinétiques de disparition des précurseurs majeurs

Les cinétiques de disparition de l'acide *t*-caftarique et de l'acide caféique peuvent être être rapprochées de l'évolution de l'absorbance à 320 nm observée en spectrophotométrie UV-visible.

La faible évolution des teneurs en acide *t*-caftarique quelles que soient les conditions de vieillissement au début des cinétiques d'oxydation (Figure 56) suggère la présence de réducteurs dans le milieu vin tels que les sulfites, ou autres réducteurs qui protègent les acides

hydroxycinnamiques de l'oxydation ou les régénèrent par réduction instantanée de leurs quinones. Une fois les réducteurs consommés, les acides hydroxycinnamiques, qui sont très sensibles à l'oxydation, sont touchés par ce phénomène surtout à haute température et en présence d'oxygène.

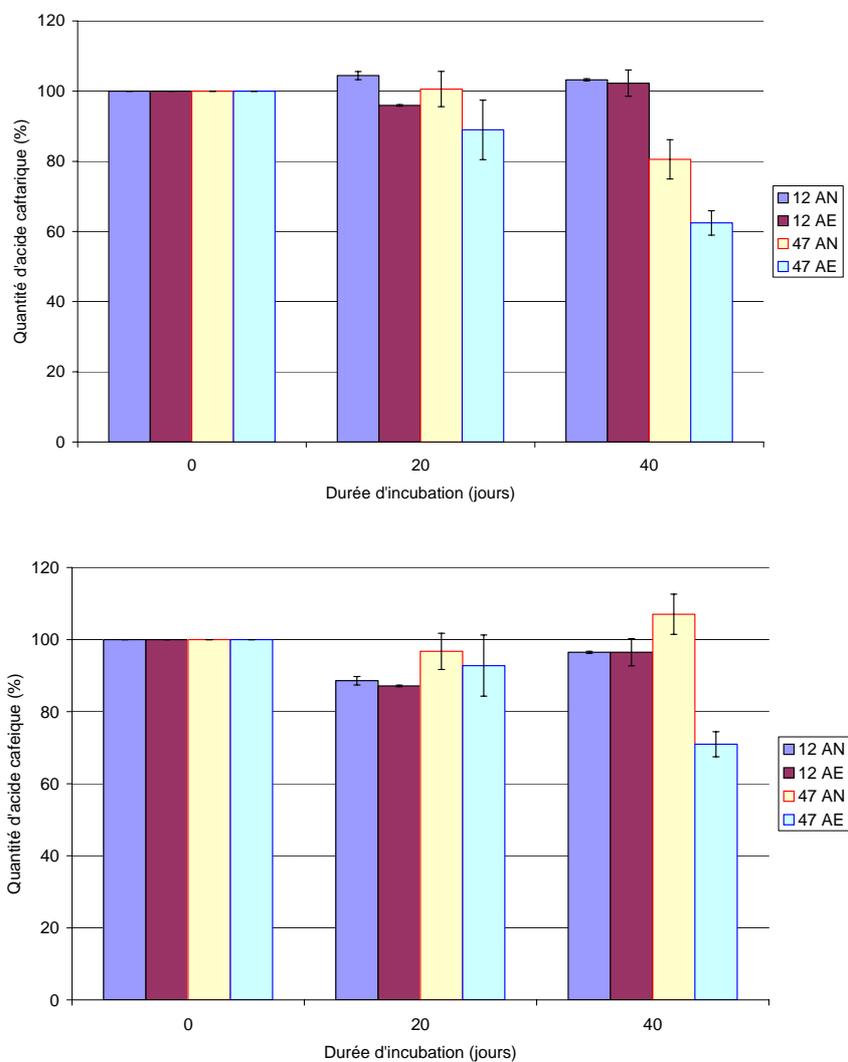


Figure 56 : Evolution de la quantité d'acide t-caféoyl et d'acide caféoyl sur 40 jours d'incubation de l'Assemblage 2003 avec les différentes modalités

C. Marqueurs de vieillissement thermique

1. Formation des marqueurs en conditions non oxydatives

Dès le vingtième jour de vieillissement accéléré en conditions non oxydatives, on note sur le chromatogramme extrait à 280 nm l'apparition de deux marqueurs principaux.

Le marqueur le plus polaire, noté I sur la Figure 54, est élué à 13 minutes dans notre gradient et est caractérisé par un maximum d'absorption à 286 nm. La formation d'un composé présentant le même maximum d'absorption et un positionnement similaire dans le profil d'éluion sur colonne C18 a été relevée au cours d'études antérieures sur le brunissement de vins blancs à haute température.^{148, 149} L'hypothèse proposée alors était qu'il s'agit d'un produit d'oxydation de polyphénol, éventuellement une semi-quinone ou une hydroquinone. L'étude des spectres de masse obtenus en LC/ESI-TI, ne permet pas la détermination immédiate de la masse molaire du marqueur que ce soit en mode positif ou négatif. Un isolement de ce marqueur ainsi qu'une optimisation de la méthode d'analyse en spectrométrie de masse sont nécessaires pour poursuivre la caractérisation voire l'identification de ce produit.

Le second marqueur, noté II sur la Figure 54, et élué à 17,2 min présente un maximum d'absorption à 276,9 nm, et l'étude du spectre de masse obtenu par couplage LC-ESI/TI en mode positif permet d'attribuer la masse molaire de 168 g.mol⁻¹.

La caractérisation de ces marqueurs est présentée dans le paragraphe III.C.3 p146.

2. Cinétique d'évolution des marqueurs au cours du vieillissement et influence de l'oxygène

Pour les deux modalités de vieillissement accéléré à haute température, les deux marqueurs s'accumulent jusqu'au quarantième jour de vieillissement accéléré (Figure 57).

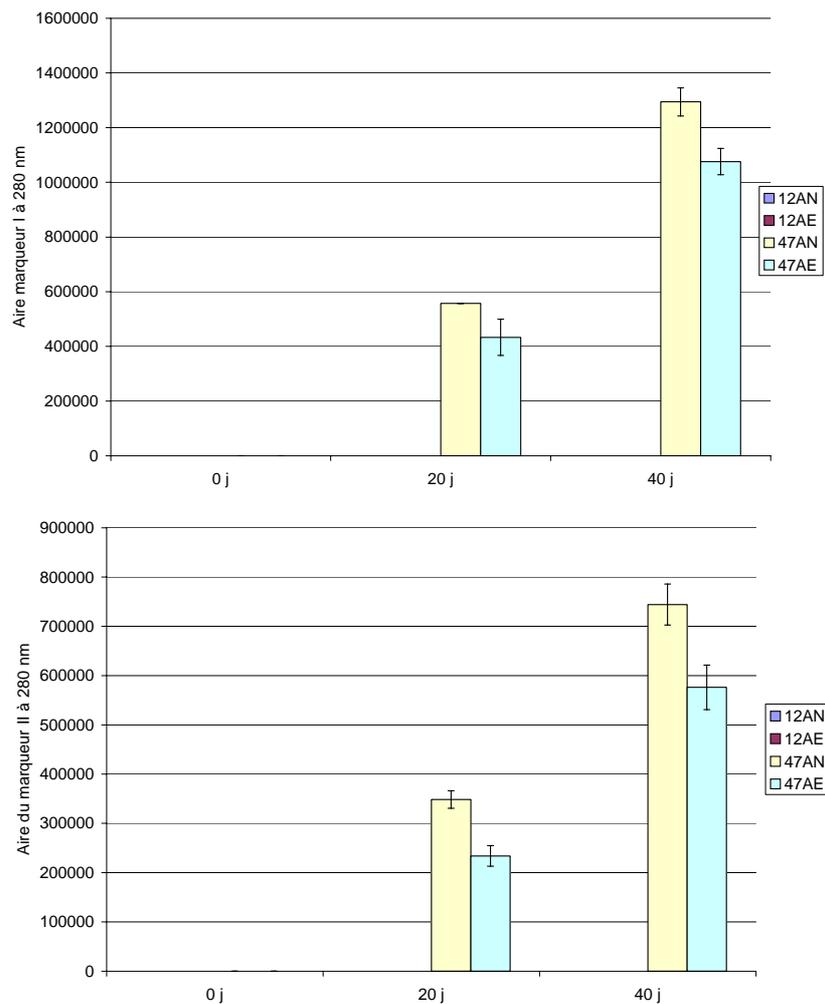


Figure 57 : Evolution des quantités des deux marqueurs principaux au cours des 40 jours de vieillissement

On remarque également que la présence d'oxygène dans le milieu a une influence significative sur la formation des deux marqueurs principaux, puisqu'on les trouve en quantités légèrement inférieures au terme des 40 jours de vieillissement oxydatif. Ceci suggère soit une compétition entre les voies réactionnelles non oxydatives à l'origine de la formation des marqueurs I et II et les voies oxydatives qui engendrent la formation d'autres produits, soit que les marqueurs I et II sont consommés par les voies oxydatives.

En outre, la formation de ces composés pourrait contribuer à l'augmentation de l'absorbance à 280 nm relevée en spectrophotométrie UV-visible (cf II.C) lors des vieillissements accélérés en conditions oxydatives et non oxydatives. En effet, l'augmentation de l'absorbance à 280 nm était plus faible en présence d'oxygène, ce qui est cohérent avec les teneurs plus faibles en marqueurs I et II relevées dans ces conditions oxydatives.

3. Caractérisation des marqueurs de vieillissement thermique

a) Isolement des marqueurs

Dans les conditions de solvant et de gradient utilisées en chromatographie liquide à l'échelle semi-préparative, les deux marqueurs de vieillissement sont piégés dans deux fractions éluées à 11 min (marqueur I), et 12 min (marqueur II).

b) Caractérisation du marqueur I

(1) Optimisation de la méthode d'analyse en spectrométrie de masse

L'analyse en CLHP-ESI/TI SM de la fraction contenant le marqueur I ne permet pas d'obtenir un signal en masse que ce soit en mode positif ou négatif. Toutefois, le spectre UV-visible associé à l'injection de la fraction I confirme le maximum d'absorption du marqueur I à 286 nm (Figure 58).

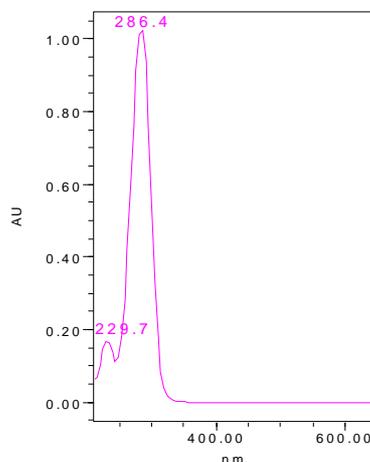


Figure 58 : Spectre UV-visible du marqueur I

Dans les essais suivants la source électrospray a donc été remplacée par une source APCI, particulièrement adaptée à la caractérisation de faibles masses.

En mode négatif, plusieurs valeurs de m/z apparaissent au niveau du pic chromatographique, mais l'extraction des ions permettant d'écarter ceux qui sont présents dans le bruit de fond sur tout le profil, ou ceux dont le temps de rétention est décalé par rapport au temps de rétention du pic chromatographique, aucun d'eux ne peut être attribué

définitivement au marqueur de vieillissement. La même approche en mode positif permet de restreindre à $m/z=127$ ou 203 les ions susceptibles de correspondre au marqueur I (Figure 59).

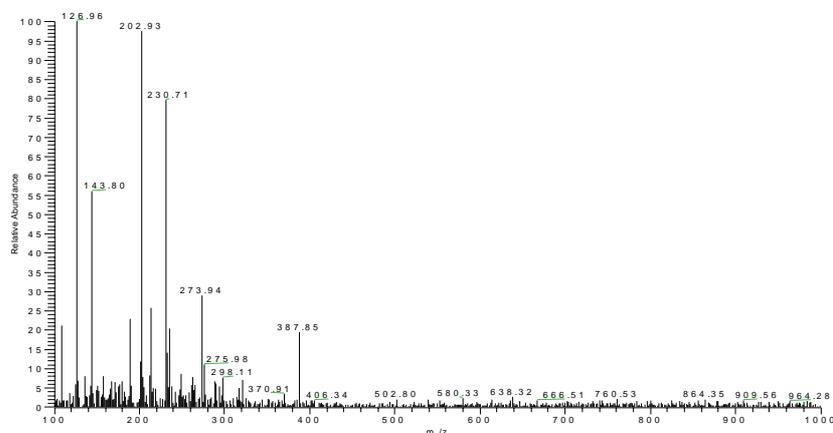


Figure 59 : Spectre de masse associé au pic chromatographique du marqueur en mode positif avec source APCI

Plusieurs gradients d'élution de courte durée sont envisagés successivement, dans le but de séparer les deux ions caractérisés par $m/z = 127$ et $m/z = 203$.

Les paramètres étudiés pour cette optimisation sont, dans un premier temps la durée de l'élution isocratique en début de gradient, puis le pourcentage initial de solvant B. Le gradient retenu est présenté dans le Tableau 15.

Temps (min)	% B
0	0
12	0
20	11
23	80
25	80
30	2
42	2

Tableau 15: Gradient CLHP optimisé

Après les deux optimisations, le marqueur de vieillissement est élué 15 min après le début du gradient. D'après le spectre de masse associé au pic chromatographique (Figure 60) et la confrontation des extractions des différents ions présents, l'ion moléculaire $m/z = 127$ peut être attribué au marqueur I, soit une masse molaire de $126 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La fragmentation de

l'ion moléculaire n'est pas réalisable par l'analyseur à trappe d'ions (valeur de m/z trop faible).

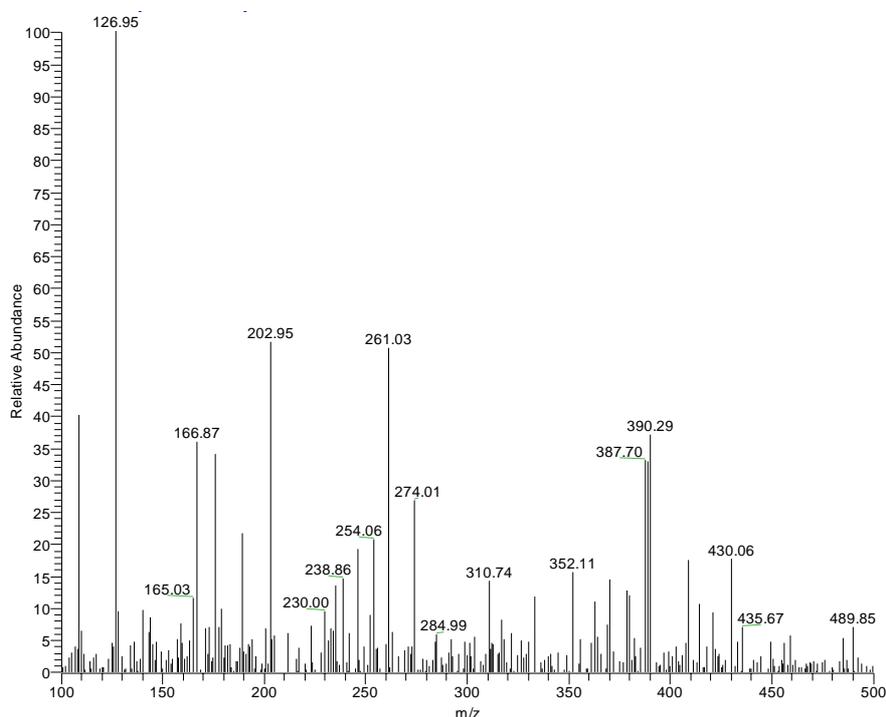


Figure 60 : Spectre de masse associé au pic chromatographique du marqueur de vieillissement.

(2) Identification du marqueur I

La formation de ce marqueur de vieillissement semble être liée au chauffage des échantillons de vins. Suite à des recherches bibliographiques et notamment sur le vieillissement de la bière dont l'élaboration comprend des étapes à haute température (75°C),¹⁵⁰ le 5-hydroxyméthylfurfural est proposé comme étant le marqueur de vieillissement thermique recherché.

L'injection d'une solution standard de 5-hydroxyméthylfurfural donne les caractéristiques suivantes pour ce composé : maximum d'absorption à 286 nm, et m/z = 127 en CLHP-APCI/TI SM en mode positif.

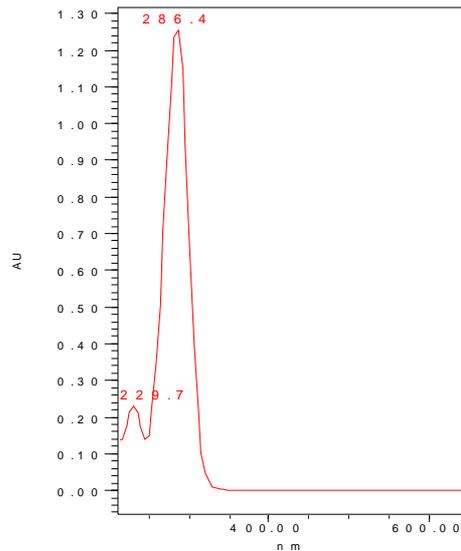


Figure 61 : Spectre UV-visible du standard de HMF

Le marqueur de vieillissement des vins le plus polaire est donc le 5-hydroxyméthylfurfural (Figure 62).

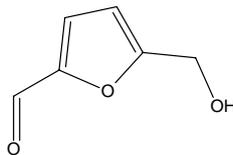


Figure 62 : 5-hydroxyméthylfurfural (Mw = 126 g.mol⁻¹)

(3) HMF et Polyphénols

La réaction de Maillard à l'origine de la formation de HMF est de type non oxydatif (Figure 63), mais celui-ci est susceptible de participer à des réactions ultérieures impliquant une étape d'oxydation. En effet, la réaction de condensation de la catéchine avec le 5-hydroxyméthyl furfural donne naissance à des sels de xanthylum, pigments jaunes caractérisés par un maximum d'absorption à 440 nm et de masse molaire égale à 667 uma.⁶²

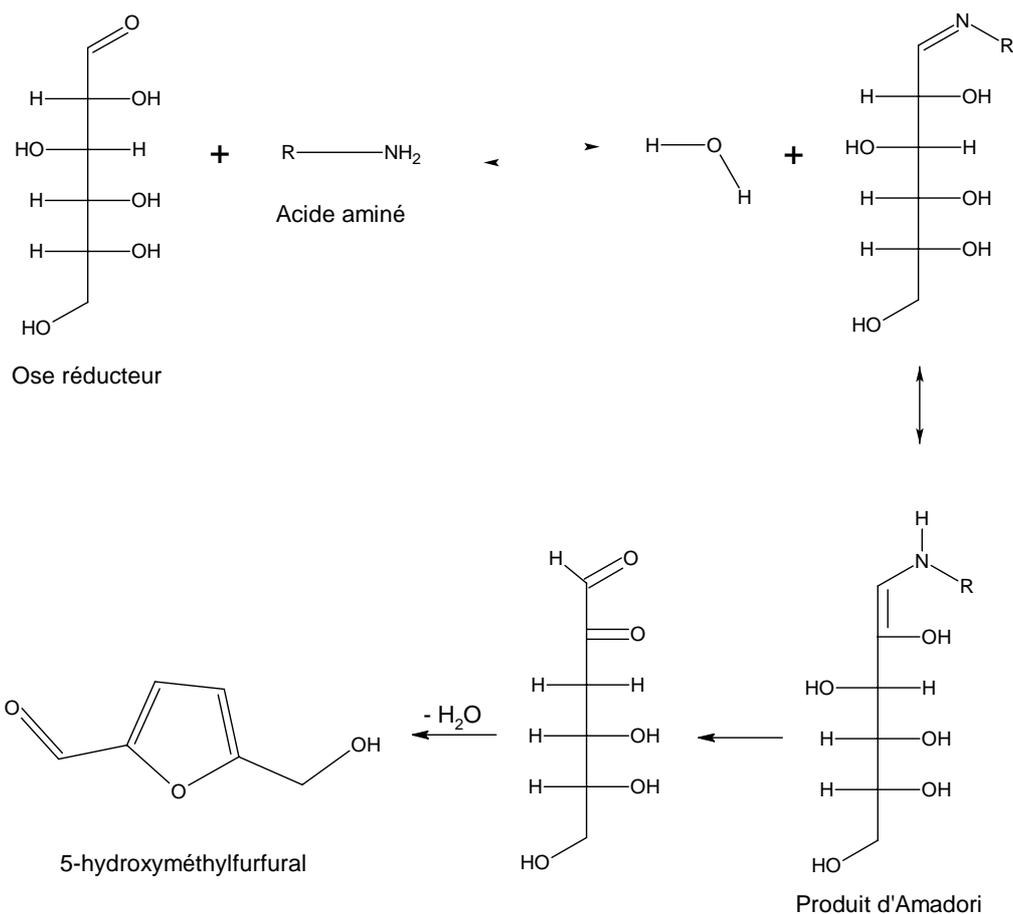


Figure 63 : Voie de formation du 5-hydroxyméthylfurfural

c) Marqueur II

(1) Etude des fragmentations

Les premières analyses CLHP/ESI-TI SM réalisées sur les vins en mode positif et négatif montrent que le composé présente un pic à $m/z = 169$ en mode positif alors qu'il ne donne pas de réponse en mode négatif.

La caractérisation du composé par fragmentations successives est donc réalisée en mode positif sur la fraction issue de la séparation sur colonne CLHP semi-préparative.

La fragmentation MS² de l'ion moléculaire $m/z = 169$ fait apparaître un fragment majeur à $m/z = 141$ et un autre fragment à $m/z = 125$, soit une perte respective de 28 uma et 44 uma (Figure 64).

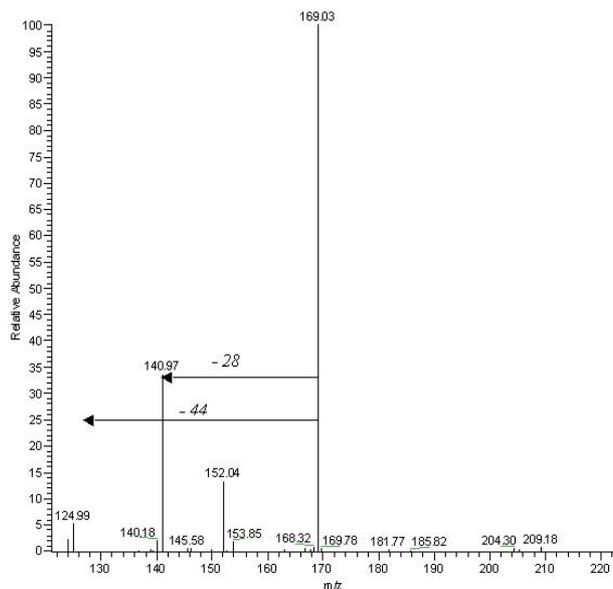


Figure 64 : Fragmentation MS² de l'ion +m/z = 169

Généralement la perte de 44 uma est associée à la perte d'une fonction acide -COOH, mais elle peut également correspondre au départ d'un groupe -OCH₂CH₃. De même, la perte de 28 uma peut être associée soit à la perte de -COH ou de -CH₂CH₃. L'existence simultanée de ces deux fragments suggère que la molécule contient un groupe éther éthylique puisque les pertes peuvent correspondre à la coupure avant l'oxygène (28 uma) ou après l'oxygène (44 uma).

La fragmentation MS³ de l'ion m/z = 141 conduit à la même perte de 28 uma, donnant naissance au fragment m/z = 113 (Figure 65), tandis qu'aucune perte de 44 uma n'est observée. La perte d'une molécule d'eau est également relevée.

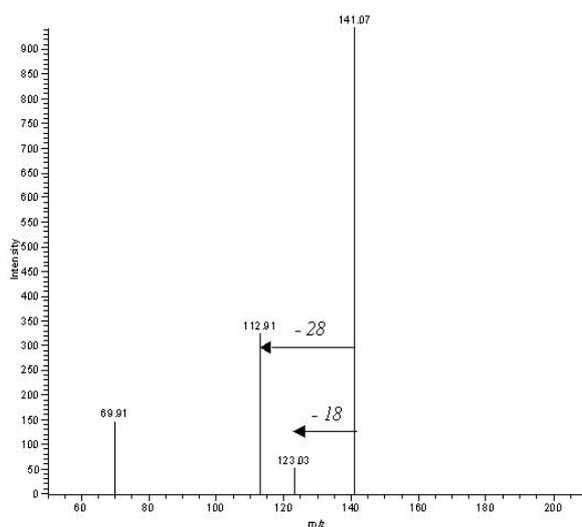


Figure 65 : Fragmentation MS³ du fragment +m/z = 141

Les différentes fragmentations effectuées sur ce produit ne sont pas suffisantes pour établir la structure du marqueur II.

IV. Corrélation évolution de la couleur/évolution des composés

Dans les conditions de vieillissement accéléré oxydatif, l'évolution de l'absorbance à 420 nm au cours des 40 jours d'incubation est modérément corrélée à l'évolution des teneurs en acides *t*-caftarique ($R^2=-0,83$) et caféique ($R^2=-0,78$), alors qu'elle est au contraire plus corrélée à la teneur en caféate d'éthyle ($R^2=-0,99$), en précurseur 1 ($R^2=-0,99$), et au HMF ($R^2=0,94$). Des résultats similaires sont obtenus dans les conditions de vieillissement non oxydatif hormis pour l'acide caféique ($R^2=0,17$) et l'acide *t*-caftarique ($R^2=-0,66$) qui ne sont, dans ce cas, pas corrélés à l'absorbance à 420 nm.

V. Comparaison avec une oxydation chimique par le periodate

Afin de compléter l'étude sur la distinction entre vieillissement et oxydation, le vin est soumis à une oxydation chimique en présence de periodate de sodium, produit utilisé dans des études antérieures pour mimer l'oxydation des polyphénols par voie enzymatique.^{55, 151} La réaction est suivie pendant deux heures.

A. Mécanisme d'oxydation par le periodate de sodium

Les premières réactions d'oxydation des phénols par le periodate de sodium ont été réalisées par Weidman,¹⁵² qui a mis en évidence l'existence d'un intermédiaire ponté dans la formation de l'*o*-quinone à partir du pyrocatechol (Figure 66). Cet intermédiaire n'a pas été clairement identifié mais une proposition de structure est faite par analogie avec l'intermédiaire obtenu par réaction du periodate de sodium sur les α -diols.

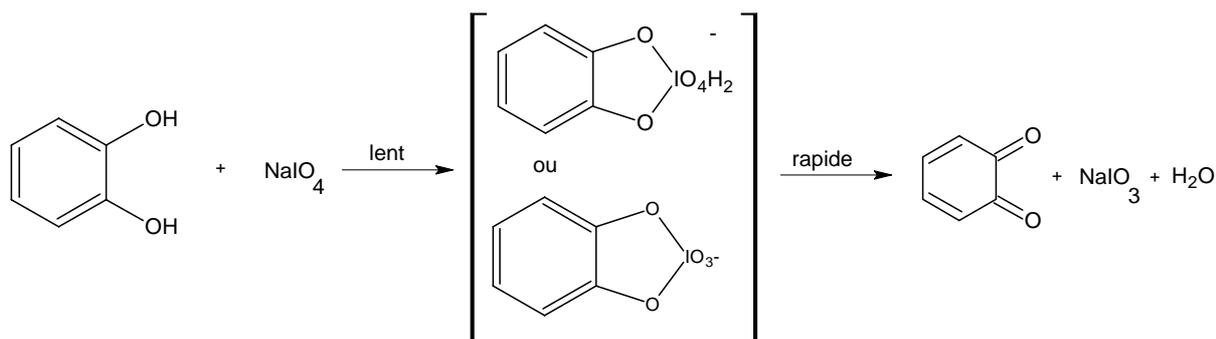


Figure 66 : Réaction d'oxydation des polyphénols par le periodate de sodium

B. Evolution de la couleur

L'oxydation du vin blanc de Champagne par le periodate de sodium se traduit par la perte de composés absorbant vers 320-330 nm ou 360 nm, et la formation simultanée de produits absorbant au delà de 360 nm, soit dans la zone des pigments jaunes ou bruns (Figure 67). D'autre part, la formation de composés insolubles n'est pas repérée. Le phénomène de diminution de l'absorbance à 320 nm parallèlement à l'augmentation de celle à 420 nm avait déjà été mis en évidence lors de la deuxième partie de la cinétique de vieillissement thermique. Au contraire, l'augmentation de l'absorbance à 280 nm observée alors n'est pas décelée ici.

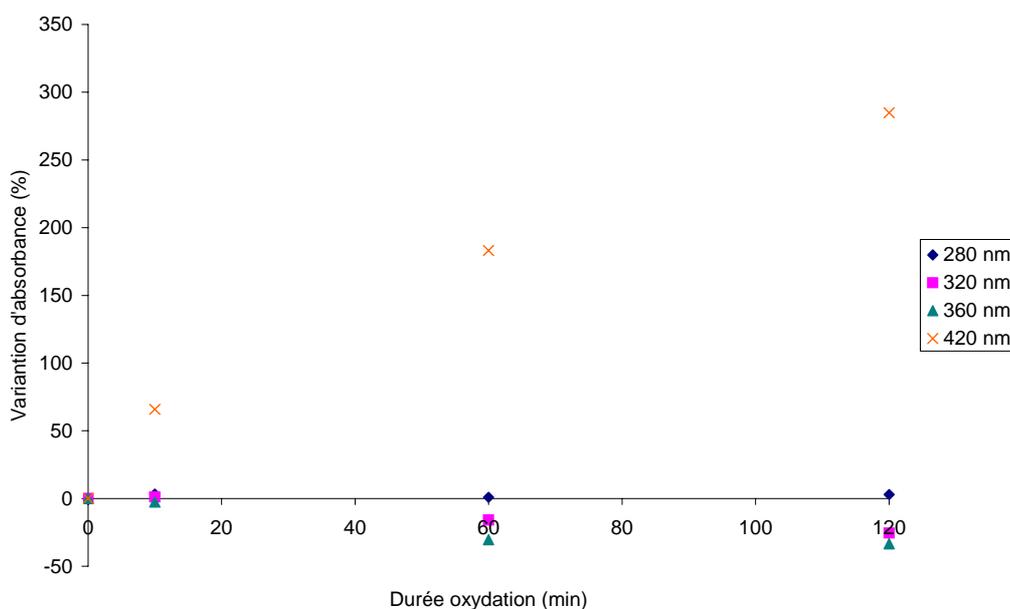


Figure 67 : Variation de l'absorbance du vin au cours des 2 heures d'oxydation chimique par le periodate de sodium

La période de latence observée pendant les dix premières minutes pour les absorbances entre 280 et 360 nm pourrait être liée à la présence de réducteurs dans le vin, hypothèse déjà proposée au vu de la stabilité de la teneur en acide *t*-caftarique pendant les vingt premiers jours de vieillissement thermique (cf § III.B.3) ; cependant, l'augmentation immédiate de l'absorbance à 420 nm suggère soit que des produits ont été consommés en quantités indécélables jusque là, soit plus probablement que les premiers produits formés ont le même spectre UV-visible que leurs précurseurs.

C. Evolution des composés

La Figure 68 présente la superposition des profils chromatographiques extraits à 280 nm du vin blanc tranquille de Champagne avant et après deux heures d'oxydation par le periodate de sodium.

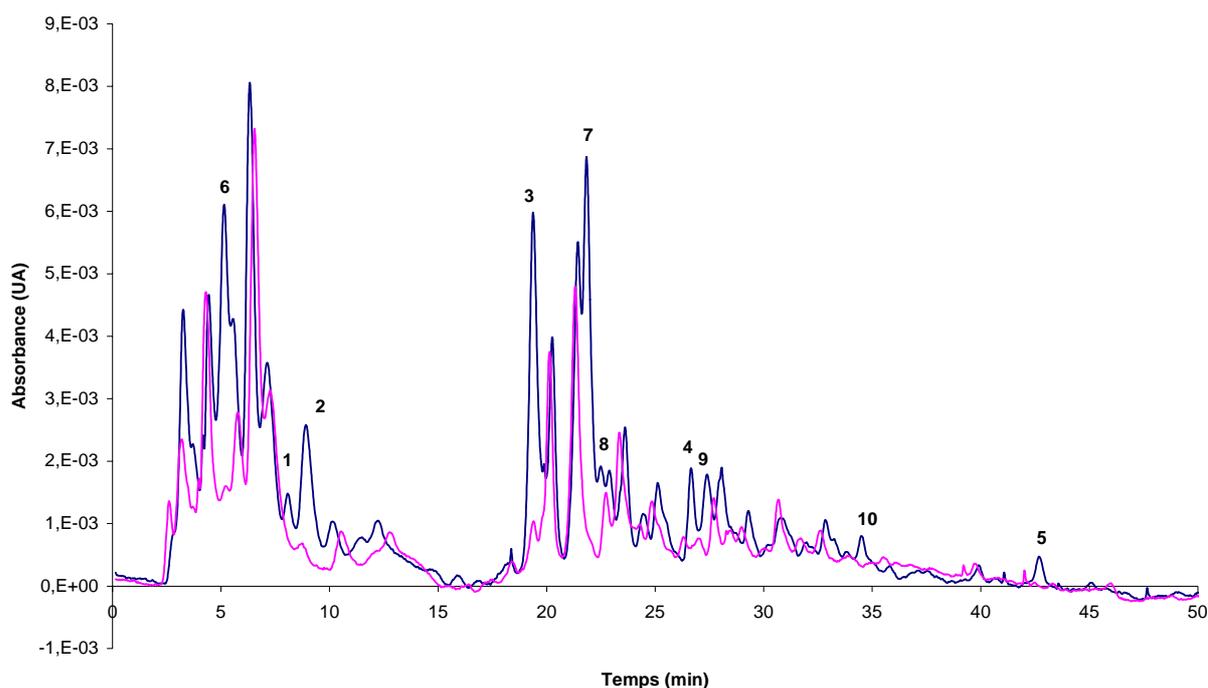


Figure 68 : Profil chromatographique à 280 nm de l'Assemblage 2003 avant oxydation (bleu) et après deux heures d'oxydation par le periodate de sodium (rose). 1 : composé non identifié ($\lambda_{\max} = 295$ nm), 2 : acide gallique, 3 : acide *t*-caftarique, 4 : acide caféique, 5 : caféate d'éthyle, 7 : GRP, 6 et 8-10 : cf tableau 16

Les précurseurs sensibles à l'oxydation mis en évidence lors du vieillissement thermique du vin, repérés de 1 à 5 (des acides phénols sauf le 1 éventuellement), apparaissent également ici comme des molécules sensibles à l'oxydation par le periodate de sodium. Cette

oxydation brutale conduit à une diminution importante voire une disparition totale de ces précurseurs. Outre ces molécules, cinq autres composés, notés de 6 à 10, sont sensibles à l'oxydation par le periodate de sodium. Les caractéristiques attribuables à ces composés sont rassemblées dans le Tableau 16, et parmi eux, on relève le GRP (7) et ce qui est supposé être son ester éthylique (8).

Pic N° (Fig. 66)	Tr (min)	λ_{max} (nm)	m/z négatif
6	5,2	289, 327	
7	21,9	327	616
8	22,6		
9	27,4	324	644
10	34,6	291	

Tableau 16 : Caractéristiques des précurseurs sensibles à l'oxydation par le periodate de sodium

On note encore que les plus grandes modifications impliquent la zone des composés les plus polaires, et contrairement à ce qui avait été observé lors du vieillissement thermique, aucune bosse n'apparaît en fin de gradient.

Enfin, de même que pour le vieillissement à haute température, aucune formation de produits d'oxydation n'est détectée par analyse des profils chromatographiques, qu'ils soient extraits à 280, 320 ou 420 nm.

VI. Recherche des marqueurs et précurseurs dans les vins oxydés naturellement

Les phénomènes mis en évidence par les tests de brunissement par vieillissement thermique et oxydation chimique impliquent des précurseurs communs, à savoir le précurseur noté 1 ($\lambda_{\text{max}} = 295$ nm), l'acide gallique, l'acide *t*-caftarique, l'acide caféique et le caféate d'éthyle pour les composés quantifiables, mais ils présentent aussi des spécificités. Le vieillissement thermique s'accompagne de la formation de deux marqueurs majeurs, alors que des précurseurs sensibles à l'oxydation supplémentaires sont repérés lors de l'oxydation chimique.

La présence des deux molécules marqueurs de vieillissement est relevée dans tous les vins constituant la gamme de degré d'oxydation de 1995, ce qui soutient le choix de notre

modèle de vieillissement thermique des vins. En conditions naturelles, toutes les conditions sont en effet réunies dans les vins effervescents de Champagne pour que le HMF se forme puisque la présence d'oses réducteurs a été détectée par réfractométrie, et que la maturation sur lies engendre une libération d'acides aminés dans le vin. Comme observé dans l'étude du vieillissement thermique, ces deux molécules sont présentes en quantité égale dans les quatre échantillons formant la gamme ce qui en fait effectivement des marqueurs de vieillissement et non d'oxydation. Cependant, il est à noter que les deux marqueurs sont en quantité beaucoup plus faibles dans les vins vieillis naturellement que dans les vins vieillis à haute température. En outre, les proportions relatives entre les deux marqueurs sont inversées dans les vins naturels, ce qui suggère que le HMF peut être impliqué dans des réactions ultérieures plus poussées dans le cas du test de vieillissement modèle. Néanmoins, les sels de xanthylum formés à partir du HMF, qu'ils soient sous forme de monomères ou de polymères ne sont pas repérés par CLHP-ESI/TI SM dans les vins blancs de Champagne.

Par ailleurs, les deux modèles de vieillissement et oxydation choisis permettent d'étudier des précurseurs sensibles à l'oxydation, mais l'approche n'est pas adaptée à la recherche et la caractérisation des produits d'oxydation des polyphénols, qu'ils dérivent de flavanols ou d'acides hydroxycinnamiques, composés majeurs des vins blancs de Champagne. Bien que l'on ait pu mettre en évidence une augmentation de l'absorbance dans le domaine visible, le caractère oxydé n'a pu être associé à la présence ou l'absence de composés polyphénoliques marqueurs d'oxydation en milieu vin réel, et aucun polyphénol sensible à l'oxydation et détectable par les méthodes d'analyse classiques n'a disparu totalement par oxydation modèle du vin, hormis le précurseur 1. La diminution de la teneur en acides phénols observée dans les systèmes modèles (chauffage ou adjonction de periodate) n'apparaît pas au travers de l'analyse des vins âgés et oxydés naturellement (sélections CIVC et Moët & Chandon). Au-delà du fait que la cinétique d'oxydation des composés polyphénoliques soit évaluée comme étant peu avancée dans les vins âgés de 7 ou 10 ans, l'absence de variation des teneurs en acides phénols est liée soit à un écart inférieur au seuil de répétabilité de l'analyse CLHP (de l'ordre de 0,7 %), soit à la présence de composés plus oxydables initiés par oxydation enzymatique. De la même façon que le rapport acides hydroxycinnamiques/glutathion influence le brunissement enzymatique des moûts, l'oxydation chimique des vins et donc le brunissement chimique en particulier pourrait être modulé par les teneurs relatives des composés polyphénoliques présents à la mise en bouteille. A ce stade, il apparaît essentiel d'étudier l'influence des teneurs relatives en

polyphénols sur l'oxydation de ceux-ci dans des milieux modèles simplifiés par rapport à la matrice vin.

Chapitre II

Oxydation des polyphénols

En milieu modèle et test prédictif

L'objectif de ce chapitre est double. Il s'agit non seulement d'étudier l'influence des teneurs relatives de polyphénols sur leur oxydation et plus généralement sur le brunissement, mais également de mettre en place un test prédictif de brunissement rapide utilisable aisément par les professionnels. L'initiation de l'autoxydation en milieu naturel est supposée être subordonnée à la présence d'ions métalliques à l'état de trace comme le fer, le fer (II) pouvant réagir avec l'oxygène moléculaire pour générer des espèces radicalaires, le fer (III) étant capable d'oxyder directement les phénols ou catéchols (*ortho*-dihydroxyphényl). Ces phénomènes, en milieu acide tel que le vin, mettent en jeu des quantités infimes de réactants et de ce fait, ne sont perçus que sur une échelle de temps relativement longue. Nous aurions pu choisir d'utiliser le Fe(III) comme oxydant, mais dans la perspective de caractériser les milieux réactionnels par RMN, cet ion est proscrit (paramagnétisme). Afin de choisir le mode d'accélération des phénomènes oxydants qui miment au mieux les phénomènes naturels, deux grandes voies ont été explorées, à savoir l'autoxydation favorisée par augmentation du pH ou chauffage, et l'oxydation chimique.

La première partie du travail s'est attachée à vérifier si l'autoxydation et l'oxydation chimique de la catéchine en milieux modèles conduisaient aux mêmes produits, et si ceux-ci étaient comparables aux produits caractérisés dans le cadre d'un modèle d'oxydation enzymatique.⁵⁶ Cette étude a été complétée par l'évaluation de l'influence des acides phénols sur l'oxydation des flavanols et le brunissement global dans la mesure où ce sont les principaux polyphénols des vins blancs de Champagne et où ils sont affectés par l'oxydation (cf Partie 2 chapitre I). A partir des premiers résultats, un test prédictif basé sur l'oxydation par le periodate de sodium a été élaboré.

I. Influence de la composition polyphénolique sur le brunissement

Les acides phénols présentant majoritairement des noyaux catéchols comme les flavanols, la question de leur compétition ou au contraire de leurs effets additifs vis-à-vis de l'oxydation a été étudiée. Deux classes d'acides phénols, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques, sont présentes dans les vins en proportions inégales. Outre la nature de l'acide, sa concentration dans le milieu a donc été considérée dans cette étude. Les modèles initialement retenus sont l'acide protocatéchi (dihydroxybenzoïque), et l'acide caféique (dihydroxycinnamique).

L'oxydation a été conduite dans un premier temps en milieu acétate d'ammonium à pH 6,5, le pH élevé par rapport à celui des vins permettant d'augmenter la quantité d'ions phénolates, espèces réactives impliquées dans les réactions d'oxydation. L'acétate d'ammonium a été choisi pour sa volatilité, propriété indispensable pour envisager l'analyse en CLHP-SM. Pour l'analyse CLHP de ces solutions à pH 6,5, les solvants utilisés contenaient 2 % d'acide formique.

A. Evolution de la couleur

1. Influence de la présence d'un acide phénol

Cinq solutions, à savoir trois témoins (catéchine, acide protocatéchi, acide caféique) et deux mélanges équimolaires (catéchine et acide protocatéchi, catéchine et acide caféique), ont été incubées à pH 6,5. La teneur de chaque composé polyphénolique est de 2 mM, que ce soit dans les solutions standards ou dans les mélanges.

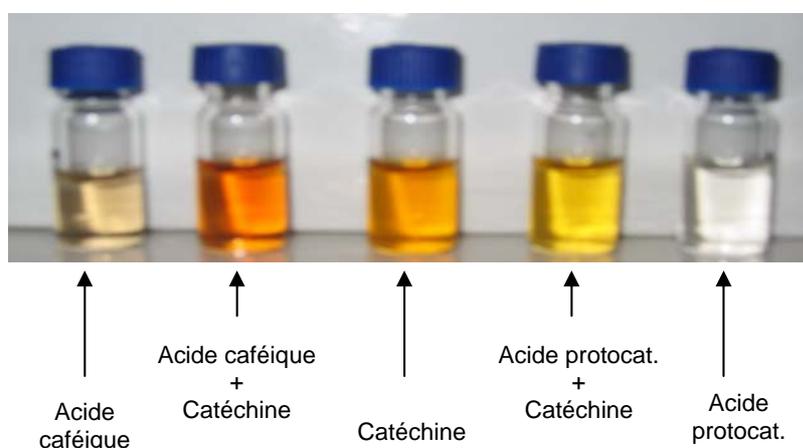


Figure 69 : Couleur des solutions réactionnelles obtenues en tampon acétate d'ammonium à pH = 6,5 et température ambiante en fonction de la composition polyphénolique

La comparaison visuelle des différentes solutions à pH 6,5 après un mois d'incubation montre que la solution contenant de l'acide protocatéchique est moins colorée que la solution témoin de catéchine, tandis que la solution contenant de l'acide caféique présente une coloration plus intense avec des nuances rouges (Figure 69). Cette propriété de l'acide protocatéchique étant originale et intéressante pour notre thématique brunissement, une caractérisation plus approfondie des phénomènes a été entreprise.

2. Influence de la proportion d'acide protocatéchique

L'acide protocatéchique a été introduit en défaut (rapport molaire 1/5) ou en quantité équimolaire dans une solution de catéchine, de telle sorte que la teneur en catéchine soit identique dans les trois essais. Les colorations de ces mélanges ainsi que celles des solutions témoins de catéchine et d'acide protocatéchiques obtenues à pH 6,5 sont présentées dans la Figure 70.

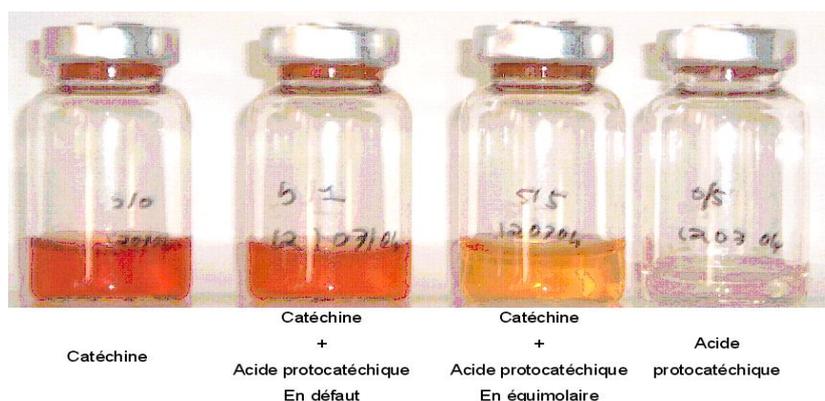


Figure 70 : Influence de la proportion d'acide protocatéchique sur l'autoxydation de la catéchine en tampon acétate d'ammonium à pH = 6,5 et température ambiante sur la couleur de la solution après 3 mois d'incubation

Après trois mois d'incubation, la solution contenant un mélange équimolaire de catéchine et d'acide protocatéchique est beaucoup moins colorée que la solution de catéchine seule. Les valeurs d'absorbance dans le domaine visible 390-440 nm sont en effet réduites de 50%. L'ajout d'acide protocatéchique en défaut (1/5) a peu d'influence sur l'oxydation de la catéchine, la différence d'absorbance entre cette solution et la solution témoin n'étant que de 2,6 %.

B. Autoxydation de la solution témoin de catéchine à pH 6,5

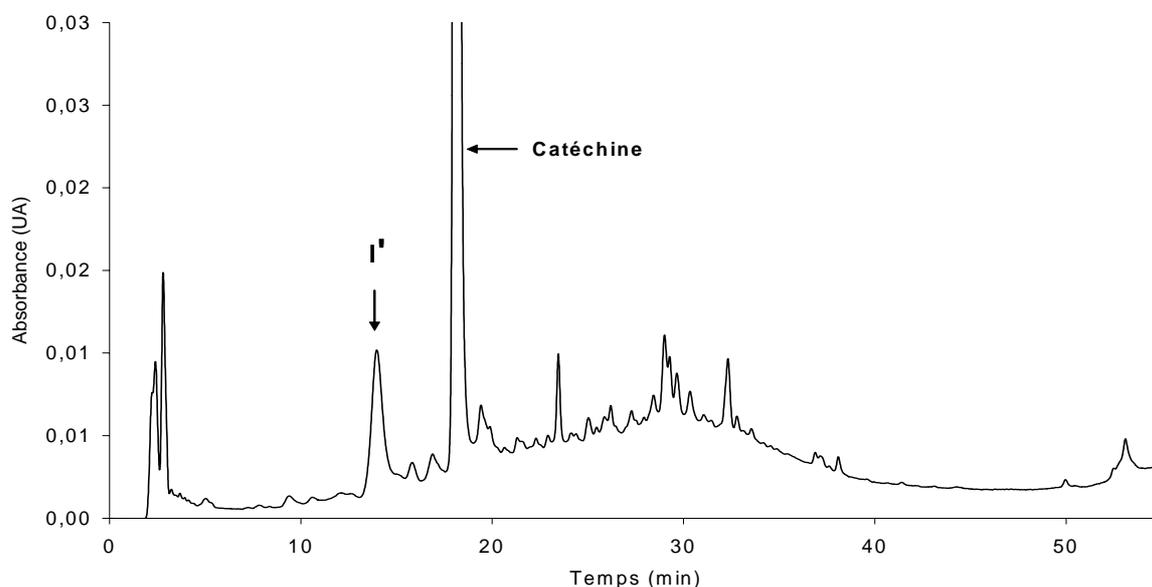
1. Caractérisation des produits d'oxydation par CLHP-ESI-TI

Les profils chromatographiques extraits à 280 nm et 390 nm de la solution réactionnelle obtenue après un mois d'autoxydation de la catéchine à température ambiante (25°C) sont présentés sur la Figure 71.

Sur le profil extrait à 280 nm, on note, outre la catéchine élue vers $T_r = 18$ min, la formation de nombreux pics de faible intensité traduisant l'apparition de multiples produits d'oxydation non colorés, dont le majoritaire est élué à $T_r = 13,7$ min (noté I'). L'analyse en CLHP-ESI/TI SM met en évidence deux produits caractérisés par un maximum d'absorption à 280 nm et détectés à $m/z = 577$ en mode négatif (Tableau 17) : le produit I' et un second coélué avec la catéchine. Il s'agit de deux dimères de catéchine, isomères de position, obtenus par simple couplage oxydatif. Le spectre UV-visible et l'ordre d'élué sur colonne C18 du dimère I' correspondent à ceux de la déhydro-dicatéchine B4 identifiée lors d'études sur l'oxydation enzymatique de la catéchine.^{56, 153} La caractérisation par RMN de ce produit isolé à partir de notre solution est décrite plus loin.

Des composés absorbant dans le jaune sont repérés sur le profil extrait à 390 nm. Leur multitude fait qu'ils apparaissent sous forme d'un massif non résolu entre 17 min et 45 min. Nous avons retenu la présence de six pigments majeurs plus apolaires que la catéchine, notés de I à VI par polarité décroissante.

(a) Extraction à 280 nm



(b) Extraction à 390 nm

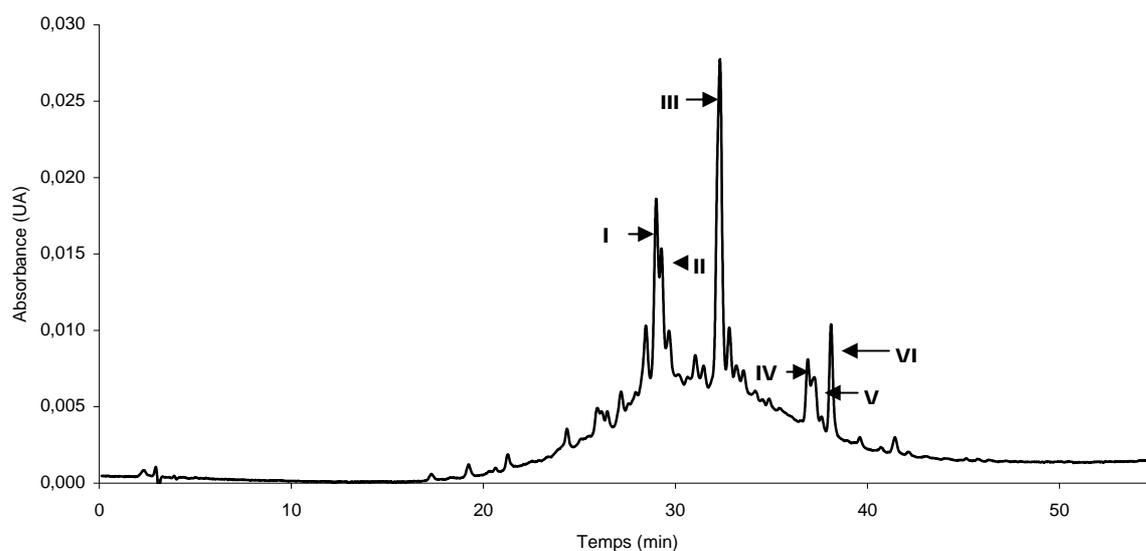


Figure 71 : Profils chromatographiques extraits à 280 et 390 nm de la solution de catéchine autoxydée pendant un mois à pH = 6,5 à 25°C

Les maximums d'absorption UV-visible, temps de rétention et masses molaires des produits d'autoxydation de la catéchine sont rassemblées dans le Tableau 17.

Pic chromatographique	Temps de rétention (min)	m/z Mode négatif	λ max (nm)
<i>I'</i>	13,7	577	280
<i>Catéchine +</i>		289	
<i>Dimère incolore</i>	18,0	577	280
<i>I</i>	29,0	575	280 ; 398
<i>II</i>	29,3	863	280 ; 390
<i>III</i>	32,3	863	280 ; 385
<i>IV</i>	36,9	575	280 ; 385
<i>V</i>	37,2	861 575	280 ; 390
<i>VI</i>	38,1	575	280 ; 385

Tableau 17 : Caractéristiques des pics chromatographiques

Les pigments jaunes correspondant aux pics I, IV, V et VI, associés à un ion moléculaire à $m/z = 575$ en mode négatif, sont identifiés à des dimères de catéchine

présentant un degré d'oxydation supplémentaire engendré par une insaturation ou une liaison intramoléculaire. Le produit d'oxydation I présente un spectre UV-Visible ($\lambda_{\text{max}} = 398 \text{ nm}$) et une polarité comparables à la ceux de la méthylène quinone de catéchine décrite par Guyot⁵⁶ et obtenue dans cette étude par oxydation enzymatique de la catéchine à pH = 6.

Les produits d'oxydation II et III, de couleur jaune également et associés à $m/z = 863$ en mode négatif, ont une masse molaire de 864 g.mol^{-1} correspondant à celle d'un trimère de catéchine (deux couplages oxydants et une étape d'oxydation supplémentaire).

Enfin, le pic V correspond à la coélution d'un dimère de $m/z = 575$ (un couplage oxydatif et une étape d'oxydation supplémentaire) et d'un trimère oxydé de $m/z = 861$ (deux couplages oxydants et deux étapes d'oxydation supplémentaires) en mode négatif.

En spectrométrie de masse, l'extraction des ions moléculaires correspondant à des oligomères de flavanols de degré de polymérisation supérieur à 3 ne donne pas de résultat.

2. Structure du produit I'

a) Analyse par fragmentation en spectrométrie de masse

Par l'analyse CLHP-ESI/TI, l'ion moléculaire à $m/z = 577$ en mode négatif associé au pic chromatographique a permis de conclure que ce composé est un dimère de catéchine. Toutefois, cette masse correspond aussi bien à celle d'une proanthocyanidine dimère dans lequel la liaison interflavanique implique le cycle C de l'unité supérieure, qu'à déhydrodicatéchine de type B.

L'analyse en masse avec trappe ionique permet de fournir des éléments de réponse à cette question à travers l'étude de la fragmentation MS^2 de cet ion. Celle-ci fait apparaître des ions caractéristiques $m/z=393$, 425 , et 439 . Comme pour les dimères natifs,¹⁵⁴ l'ion fragment $m/z = 425$ correspond à un réarrangement de Diels-Alder du noyau F qui s'accompagne de la perte du cycle E. De la même façon, l'ion $m/z = 439$ représente une perte de $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ caractéristique d'un réarrangement de Diels-Alder sur le noyau C entraînant la perte du cycle A. Cette fragmentation peut avoir lieu dans les flavanols monomères mais n'est pas observée dans le cas des proanthocyanidines, puisque le cycle F (unité inférieure) et la position C-4 de l'unité supérieure sont substitués (implication dans la liaison interflavanique). La détection des deux produits dérivant de réarrangement de Diels-Alder pour l'espèce dimérique implique nécessairement que la liaison interflavanique est établie entre le cycle B d'une unité et le cycle D de l'autre. De plus, la présence de l'ion $m/z = 439$ ($[\text{M}-184]^-$) confirme ce résultat

puisque il est caractéristique de produits d'oxydation possédant une liaison interflavanique de type biphényle, aussi appelés déhydro-dicatéchines de type B¹⁵⁴ (Figure 72).

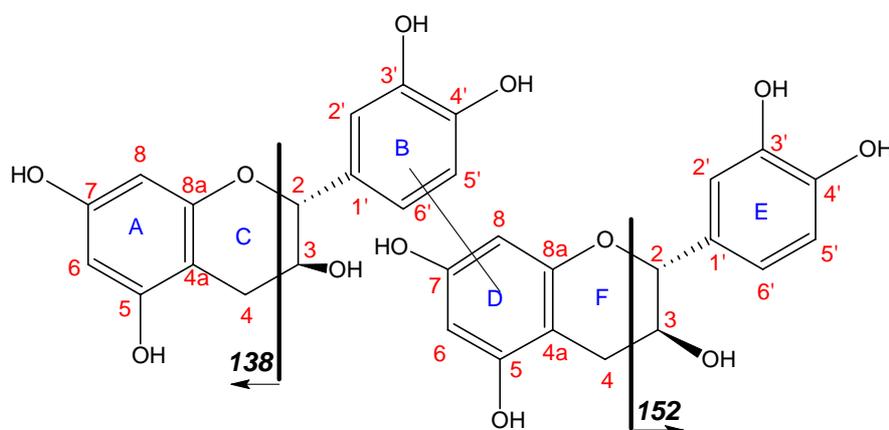


Figure 72 : Structure générale d'une déhydro-dicatéchine de type B

Les résultats obtenus en spectrométrie de masse démontrent la position de la liaison interflavanique entre les cycles B et D, mais ne permet pas de déterminer les positions exactes des substitutions sur chacun des noyaux benzéniques impliqué dans cette liaison. L'élucidation de la structure du dimère nécessite donc une analyse plus poussée par résonance magnétique nucléaire.

b) Caractérisation structurale par résonance magnétique nucléaire

Pour la caractérisation du dimère en RMN mono et bi-dimensionnelle, deux milligrammes du composé ont été isolés par CLHP semi-préparative à partir du milieu réactionnel après 6 jours d'incubation.

(1) Déplacements chimiques et constantes de couplage

Le spectre 1D¹H de l'isolat présente deux séries de signaux d'intensités différentes mais quasi superposés, reflétant la présence dans le milieu de deux produits dans les proportions 75:25, et ce malgré l'étape de purification. Ces produits sont vraisemblablement des atropo-isomères, comme déjà mentionné par Young et Guyot.^{56, 155} Chacune des séries de signaux est elle-même constituée de deux systèmes de signaux définis à travers l'analyse des expériences bi-dimensionnelles, et notés par la suite « système I » pour l'unité flavanol supérieure, et « système II » pour l'unité inférieure.

L'ensemble des déplacements chimiques est regroupé dans le Tableau 18.

		Système I = unité supérieure				Système II = unité inférieure			
Position		Produit majeur		Produit mineur		Produit majeur		Produit mineur	
		$\delta^1\text{H}, \text{m}, J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$						
C, F	2	4.81 ; d ; $J = 2.3$	78.7	4.58 ; d ; $J = 5.3$	78.3	4.43 ; d ; $J = 7.7$	81.4	4.51 ; d ; $J = 6.6$	80.8
	3	3.95 ; m	64.4	3.80	65.3	3.74 ; m	66.7	3.79	66.2
A, D	4 α, β	2.17 ; dd ; $J = 16.8, 3.7$		2.42 ; dd		2.75 ; dd		2.24 ; dd ; $J = 16.1, 6.1$	
	4 α, β	2.4 ; dd ; $J = 16.8$	23.7	2.62 ; dd ; $J = 16.2, 4.8$	27.42	2.44 ; dd	28.5	2.39	25.9
	4a	-	98.2	-		-	99.2	-	
	8a	-	155.5	-		-	153.2	-	
B, E	5	-	156.3	-		-	154.6	-	
	6	5.87 ; d	94.8	5,86		6.07 ; s	95	6.06 ; s	95.4
	7	-	156.2	-		-	152.9	-	
	8	5.73 ; d	93.8	5,68	93.9	-	106	-	
B, E	1'	-	130.9	-		-	131	-	
	2'	6.51 ; s	112.5			6.64	115.3		
	3'	-	143.4	-		-	144.4	-	
	4'	-	143.4	-		-	144.4	-	
	5'	6.30 ; s	119			6.63	115.3		
	6'	-	124.8	-		6.50	118.1		

Tableau 18: Déplacements chimiques ($\delta^1\text{H}$ et $\delta^{13}\text{C}$) et constantes de couplage (J) des protons et carbones appartenant à l'unité supérieure (gauche) et à l'unité inférieure (droite) des deux composés majoritaire et minoritaire. La position des protons et carbones est donnée par le cycle (A, B, C, D, E, F) et la localisation sur ce cycle (2-8, 1'-6')

(2) Structure du produit majoritaire

Sur le spectre $1D^1H$, les deux jeux de signaux sont divisés en trois zones de déplacements chimiques attribuées respectivement de la moins à la plus déblindée aux protons des cycles C et F, A et D, et enfin B et E. Plus précisément, l'intégration des différents massifs permet de comptabiliser trois protons pour l'ensemble des cycles A et D, cinq protons pour les cycles B et E, et huit protons pour les cycles C et F. Cette observation permet d'écarter définitivement l'hypothèse d'une substitution sur les cycles C ou F, et d'une liaison de type A impliquant ces cycles.

Les protons de chaque cycle pyranique (C et F) sont clairement identifiés à partir du spectre COSY. Les multiplets à 3,95 et 3,74 ppm sont attribués respectivement aux protons H3-C et H3-F, la complexité du signal résultant des couplages multiples avec le H2 et les H4 non équivalents portés par le cycle. De la même façon, les doublets à 4,81 et 4,43 ppm sont attribués aux protons H2-C et H2-F couplés uniquement aux H3, tandis que les deux doublets dédoublés à 2,17/2,4 et 2,75/2,44 ppm sont associés aux H4 respectivement des systèmes I et II. La différence majeure entre les systèmes I et II est le nombre de protons sur chaque noyau benzénique. La série de signaux du système I possède en effet deux doublets à 5,73 et 5,87 ppm attribués respectivement aux H6 et H8 du cycle A, et deux singulets à 6,3 et 6,51 ppm correspondant à deux protons résiduels portés par le cycle B, signe de la perte du système ABX caractéristique du système catéchol et d'une substitution en position C6'-B. Ce résultat est corroboré par l'analyse du spectre COSY. L'absence d'un système *ortho* de proton H5'-H6' dans le spectre COSY (couplage *ortho*) exclut la position la position 2' comme point d'attache sur le cycle B. Au contraire, le « système II » présente un singulet à 6,07 ppm attribué au proton résiduel H6 ou H8 du cycle D et trois multiplets caractérisant trois protons du cycle E (système ABX intégral). Ces observations confirment les résultats de spectrométrie de masse, montrant que la liaison interflavanique est de type biphényle et est localisée entre les cycles B et D.

La position exacte de la liaison interflavanique sur le cycle D est déterminée sur la base de l'étude des corrélations HMBC pour le proton résiduel H6 ou H8 : un H6 résiduel présenterait en effet des corrélations avec les carbones C5, C7, C8 et C4a du « système II », tandis que les corrélations attendues pour un H8 résiduel seraient avec C6, C7, C4a et C8a. Etant donné que les deux hypothèses structurales impliquent des corrélations avec les carbones C7 et C4a et que les carbones C6 et C8 sont difficilement différenciables, l'identification du proton résiduel ne peut être basée que sur la distinction entre C8a et C5. Le

carbone C8a-D (153,2 ppm) est identifié rapidement grâce à la corrélation longue distance qu'il présente avec H2-F (4,43 ppm) à travers l'oxygène. Par ailleurs, le carbone quaternaire C4a-D (99,2 ppm) est identifié dans un premier temps par sa double corrélation avec H4-F et H3-F. Outre C4a-D, H4-F présente des corrélations avec C2-F, C3-F, C8a-D et un autre carbone à 154,6 ppm qui peut être identifié comme étant C5-D. Une fois ces carbones attribués, la corrélation du proton résiduel du cycle D avec C5-D, mais non avec C8a-D implique qu'il est porté par le C6-D, et que la liaison interflavanique est donc localisée sur le carbone C8 de ce cycle D (Figure 73).

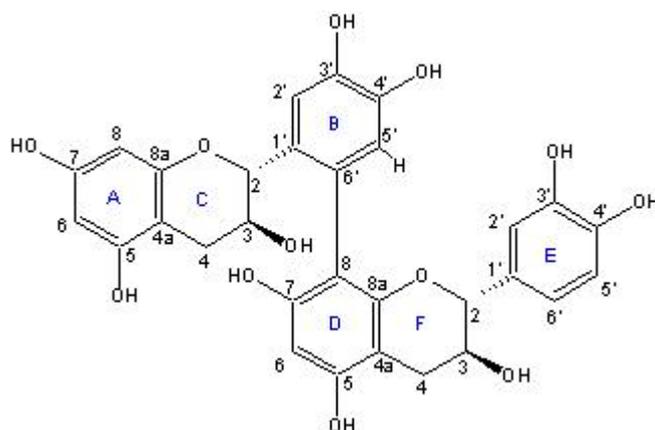


Figure 73 : Structure de la déhydro-dicatéchine B4

Des études antérieures sur l'oxydation chimique de la catéchine dans un tampon acétonitrile-glycine en présence de $K_3[Fe(CN)_6]$ ont montré que les produits de réaction étaient des déhydro-dicatéchines avec des liaisons interflavaniques de type biphenyle et biphenyl-ether, parmi lesquelles la déhydro-dicatéchine B4 caractérisée par une liaison biphenyl entre les carbones C6' et C8.¹⁵⁵ La comparaison entre les résultats de ce travail et ceux obtenus dans notre étude permettent de conclure que le premier produit incolore dérivant de l'autoxydation de la catéchine est la déhydro-dicatéchine B4.

Contrairement à l'étude de Young, où le composé a été identifié par l'analyse RMN du dérivé acétate de méthyl-ether, et aucun déplacement chimique de la molécule originelle n'est de ce fait connu, notre travail permet de caractériser un conformère de la déhydro-dicatéchine B4 par les déplacements chimiques de ses protons et carbones. Quant au travail de Guyot et al., il n'avait pas permis de définir précisément le positionnement de la liaison interflavanique sur le cycle D, l'ambiguïté entre les carbones C6 et C8 n'ayant pas été levée.⁵⁶

(3) Structure du produit minoritaire

Dans le produit minoritaire, l'intégration des massifs de signaux sur le spectre 1D¹H permet de comptabiliser trois protons pour les deux cycles A et D, cinq protons pour les cycles B et E, et enfin huit protons pour les cycles C et F. L'attribution des déplacements chimiques ¹H et ¹³C ainsi que la localisation de la liaison interflavanique sont déterminées de la même façon que pour le produit majoritaire et conduisent à la conclusion que ce produit est également une déhydro-dicatéchine B4, et donc un autre conformère en équilibre lent avec le conformère majoritaire.

Les deux conformères se différencient non seulement par les déplacements chimiques protons et carbone, mais aussi par la valeur des constantes de couplage $J_{2,3}$ sur le spectre 1D¹H : dans le produit majoritaire, la constante $J_{2,3}$ étaient de 2,3 et 7,7 Hz, respectivement pour les systèmes I et II, alors qu'ils sont de 5,3 et 6,6 Hz pour les systèmes I et II du produit minoritaire. Cela suggère que les deux conformères résultent pour partie d'une variation conformationnelle des hétérocycles. Les fortes valeurs de $J_{2,3}$ relevées pour le produit minoritaire sont caractéristiques d'un hétérocycle de catéchine proche d'une demi-chaise, ce qui implique que le cycle B est dans une position quasi-équatoriale.^{84, 156} De plus, la modification de la conformation de ces cycles est confirmée par les différences observées sur les spectres ROESY : dans le conformère majoritaire, les protons H3 des systèmes I et II sont corrélés, alors que la corrélation est observée entre les protons H2 dans le cas du conformère minoritaire.

3. Cinétique d'autoxydation

a) Disparition de la catéchine

La concentration en catéchine, calculée à partir des aires relevées sur le chromatogramme extrait à 280 nm, diminue progressivement au cours des 35 jours d'incubation (Figure 74). Cependant la cinétique se découpe en deux périodes : la dégradation de la catéchine est relativement rapide dans la première partie de la cinétique, et le temps de demi-réaction est de 15 jours ; à partir de cette date, la cinétique de disparition de la catéchine est beaucoup plus lente puis sa concentration se stabilise à 0,75 mM, soit 35% de la concentration initiale, jusqu'à la fin de l'étude. Même si l'apparition d'un produit d'oxydation coélué avec la catéchine peut expliquer le ralentissement apparent de la cinétique de

disparition de cette dernière, la stabilisation de la concentration suggère plutôt que les produits d'oxydation de la catéchine présentent une plus grande réactivité que la catéchine elle-même.

Par ailleurs, l'évolution de la quantité de catéchine au cours des 34 jours n'est pas compatible avec une cinétique d'ordre 1 ni d'ordre 2 dans la mesure où le tracé de la fonction $1/[cat] = f(t)$ (cinétique d'ordre 1) est associé à un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,9634$ et celui de la fonction $\ln [cat] = f(t)$ (cinétique d'ordre 2) à $R^2 = 0,9895$. La co-existence de multiples voies réactionnelles est ainsi démontrée.

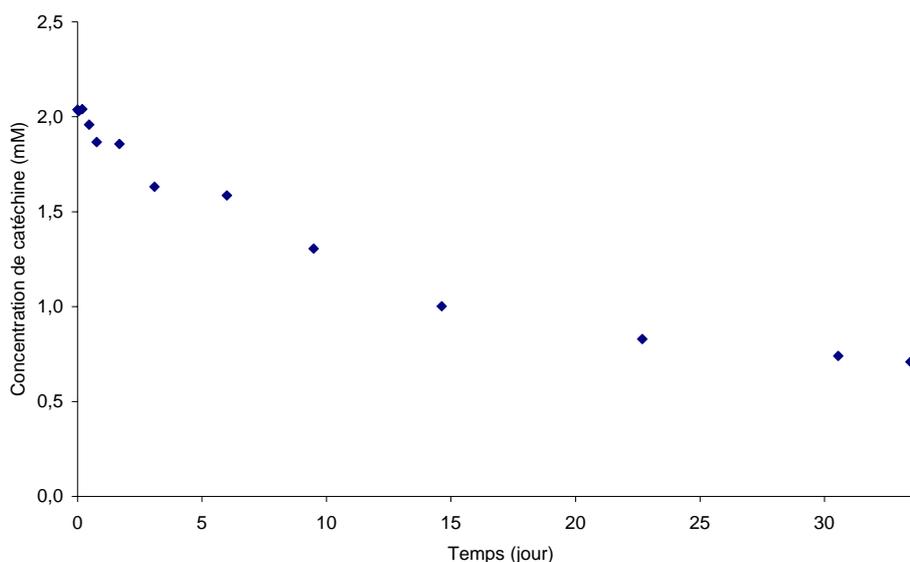


Figure 74 : Cinétique de disparition de la catéchine par autoxydation à pH 6.5

b) Evolution des produits d'oxydation

(1) Premier produit d'autoxydation de la catéchine

La déhydro-dicatéchine B4 apparaît après seulement 67 minutes d'oxydation de la catéchine (Figure 75). L'augmentation de sa concentration est très rapide pendant les premières 24 heures de réaction, puis ralentit légèrement jusqu'au 7^{ème} jour sans suivre une cinétique d'ordre simple, avant de chuter jusqu'au 20^{ème} jour à une concentration correspondant à 2/3 de la concentration maximale atteinte. A partir de cette date, sa concentration dans le milieu réactionnel se stabilise à 0,05 mM en équivalent catéchine soit 2,5 % de la teneur initiale en catéchine.

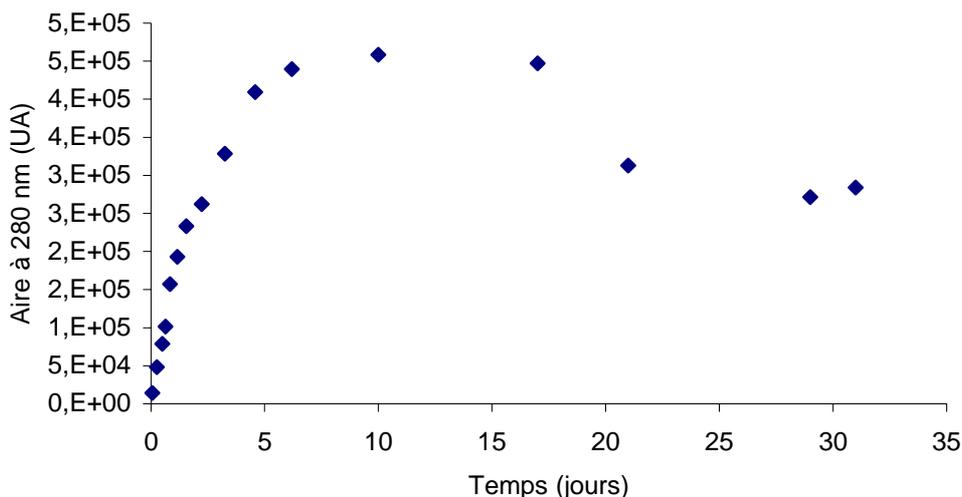


Figure 75 : Evolution de la quantité de produit I dans le milieu réactionnel

(2) Pigments jaunes

Les cinétiques d'apparition et/ou disparition des produits d'oxydation sont évaluées à partir des aires relevées sur les profils chromatographiques à 390 nm pour les pigments jaunes (Figure 76).

Les produits d'oxydation III, I, et V apparaissent rapidement dans cet ordre, après respectivement environ 2h15 min, 4h30 min, et 5h30 min de réaction. Ils atteignent une concentration maximale dans le milieu réactionnel autour du 6^{ème} jour, mais tandis que I et III disparaissent dans une large mesure par la suite, le composé V garde une concentration relativement stable.

La dernière série de produits d'oxydation, détectés après 18 heures d'incubation, est composée des pigments IV et VI qui apparaissent simultanément, et finalement du produit II. Au contraire du composé IV dont la teneur augmente puis se stabilise, les produits II et VI s'accumulent jusqu'au 9^{ème} jour de la cinétique et leurs teneurs diminuent par la suite.

D'autre part, on note la formation d'un composé transitoire élué à $T_r = 8,7$ min détecté uniquement au deuxième jour de la cinétique. L'allure particulière de son spectre UV-Visible avec deux maxima à 260 et 295 nm, ainsi que son temps de rétention, et son ion moléculaire à $m/z = 153$ en mode négatif montre qu'il s'agit de l'acide protocatéchique ; résultat confirmé par l'injection d'un standard de la molécule.

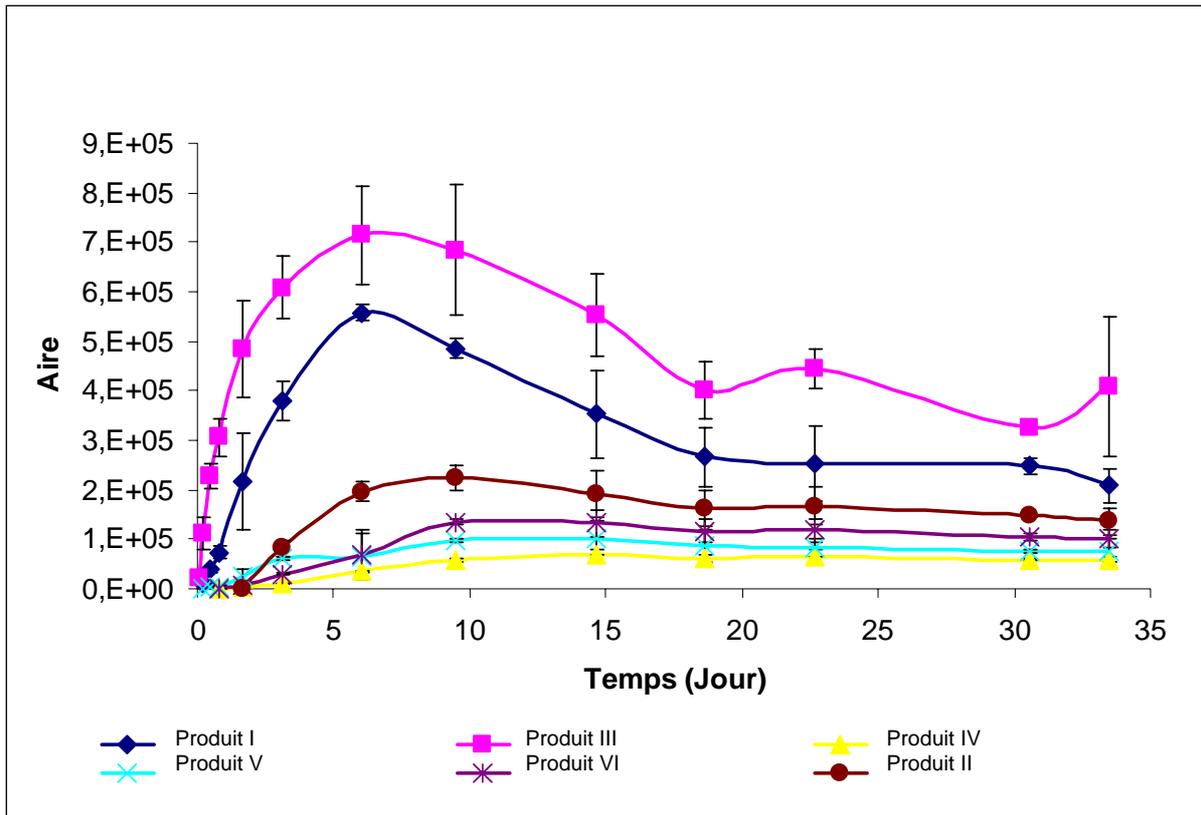


Figure 76 : Evolution des produits d'autoxydation de la catéchine

C. Influence de l'acide protocatéchique à pH 6,5 sur l'autoxydation de la catéchine

a) Analyse CLHP-DAD-SM

L'atténuation de la coloration jaune observée en spectrophotométrie UV-visible est confirmée par la diminution de l'aire du massif jaune relevée en chromatographie liquide. L'analyse CLHP-SM du mélange bianire catéchine/acide protocatéchique met en évidence les mêmes produits d'oxydation que ceux obtenus par autoxydation de la catéchine en l'absence d'acide protocatéchique, mais formés en quantités moindres.

L'acide protocatéchique a en particulier un pouvoir inhibiteur sur la formation de la déhydrocatéchine B4 (Figure 77), puisque qu'il ralentit sa formation et diminue de 37 % sa quantité dans le milieu après 6 jours d'incubation.

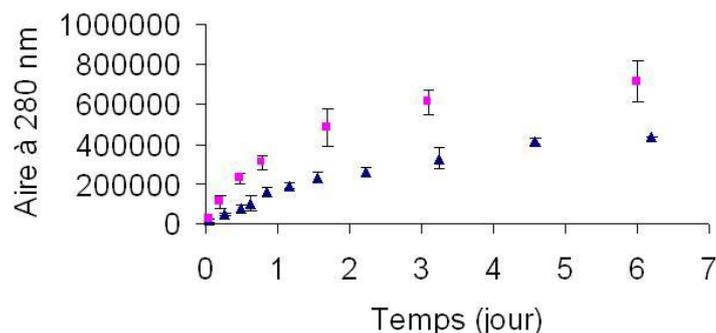


Figure 77 : Influence de l'acide protocatéchique sur la formation du produit incolore plus polaire que la catéchine. ■ sans acide protocatéchique, ▲ avec acide protocatéchique

En outre, la présence de trois composés spécifiques à ce mélange d'acide protocatéchique avec la catéchine est relevée sur le chromatogramme à 280 nm (Figure 78). Leur maximum d'absorbance se situe à 344 nm.

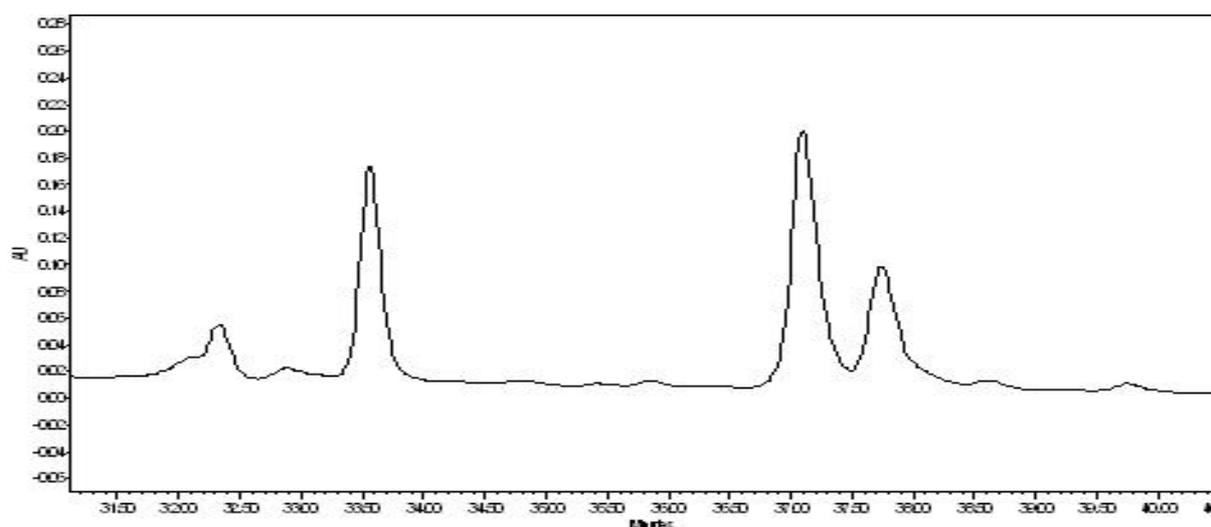


Figure 78 : Adduits mixtes catéchine/acide protocatéchique

Ce résultat suggère que ces produits absents de la solution témoin d'acide protocatéchique et élués à 33,5 min, 37 min, et 37,7 min, sont des adduits mixtes entre les deux réactifs.

b) Caractérisation des adduits mixtes

Le couplage CLHP-ESI/TI en mode négatif confirme cette hypothèse puisque l'ion moléculaire des 3 composés est détecté à une valeur de $m/z = 423$, masse correspondant à des adduits catéchine-acide protocatéchique déshydratés. Il s'agit de trois isomères de position,

les carbones en positions 2,5, 6 de l'acide protocatéchique, et 6 ou 8 de la catéchine étant susceptibles d'être impliqués dans la liaison.

La fragmentation MS² de cet ion moléculaire se traduit par la perte de 152 uma, perte caractéristique d'un mécanisme rétro Diels-Alder incluant la perte du noyau B (Figure 79). Ce dernier n'est donc pas impliqué dans la liaison entre les molécules de catéchine et d'acide protocatéchique, ce qui indique que ce n'est pas la quinone de la catéchine qui a réagi lors de la formation de ces adduits.

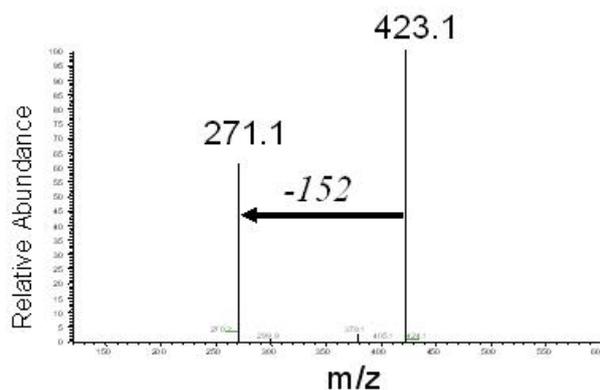


Figure 79 : Spectre de fragmentation de l'ion m/z=423

La fragmentation de ces molécules permet de proposer une voie réactionnelle de formation de ces adduits mixtes (Figure 80). Une seule des positions possibles pour la liaison formée a été illustrée dans cette figure. L'acide protocatéchique, sous forme de quinone après oxydation, s'ajouterait sur le cycle A d'une molécule de catéchine. Une étape de lactonisation entre la fonction carboxylique de l'acide protocatéchique et une fonction hydroxyle du cycle A de la catéchine conduirait à l'adduit mixte catéchine-acide protocatéchique déshydraté.

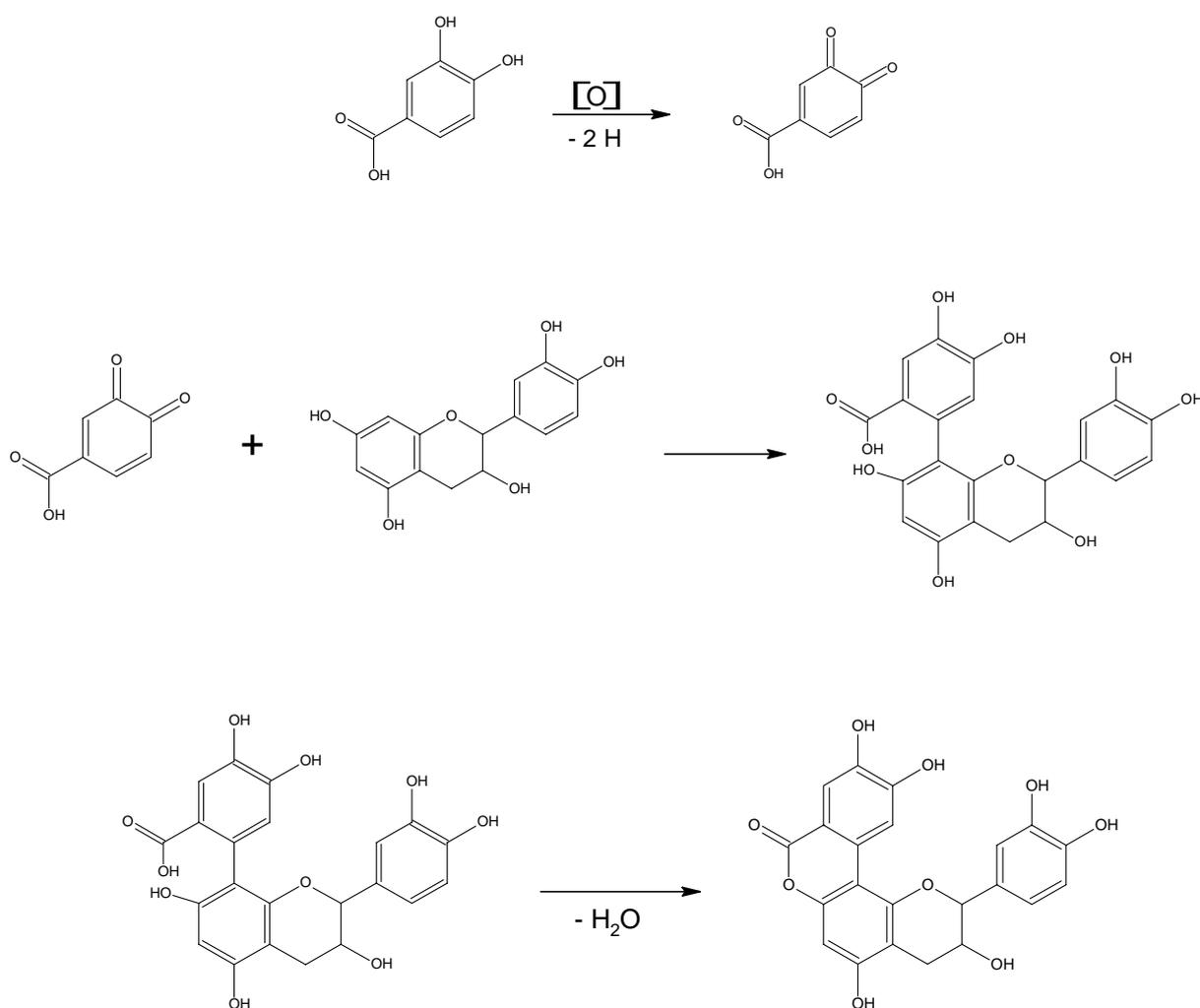


Figure 80 : Voie de formation de l'adduit mixte acide protocatéchique-catéchine en tampon acétate d'ammonium à pH = 6,5 et température ambiante

La valeur du maximum d'absorbance ($\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$) de ces adduits est en accord avec la structure proposée qui s'apparente à une coumarine.

La co-existence des dimères de catéchine et des dimères mixtes tels qu'ils sont décrits ci-dessus démontre la formation des quinones de catéchine et acide protocatéchique dans le milieu. Quatre types d'additions peuvent donc être envisagés à partir de ces quinones : addition de la forme réduite correspondante à la quinone, ou addition croisée de la forme réduite de l'autre composé. Compte tenu des produits caractérisés, deux voies semblent privilégiées, à savoir la réaction de la quinone de catéchine sur sa forme réduite et celle de la quinone d'acide protocatéchique sur la catéchine. Le fait que la dernière soit favorisée peut être expliquée par l'effet combiné d'une plus forte électrophilie de la quinone d'acide protocatéchique et d'une plus forte nucléophilie de la catéchine par rapport à l'acide protocatéchique.

D. Conclusion

L'accélération des phénomènes oxydants par élévation du pH permet de former des pigments dont les caractéristiques UV-visible et les masses molaires sont identiques à celles des produits d'oxydation enzymatique de la catéchine à pH 6.⁵⁶ Cependant, compte tenu des différences relevées dans la nature des produits d'oxydation formés à pH 6 et pH 3 par voie enzymatique, il est nécessaire de vérifier si les produits d'autoxydation sont similaires à ces deux pH. L'abaissement du pH s'accompagnant d'un ralentissement de la formation des produits d'oxydation, nous avons choisi de chauffer la solution de catéchine à 45°C, ou d'utiliser un oxydant chimique pour accélérer les phénomènes oxydants, avant de revenir à l'étude de l'influence des acides phénols sur l'oxydation des flavanols dans le cadre de l'élaboration d'un test prédictif.

II. Autoxydation de la catéchine par chauffage à pH 3

A. Autoxydation de la catéchine en milieu « acétate d'ammonium » à pH 3

La voie d'accélération de l'autoxydation par chauffage à 47°C a été conduite en milieu modèle « acétate d'ammonium » acidifié à pH 3.

Il est à noter que pour l'analyse CLHP de ces solutions à pH 3, les solvants utilisés contiennent 0,1 % d'acide formique, et non 2 %, ce qui explique les différences de temps de rétention observées.

1. Mise en évidence de produits spécifiques

Dans ce témoin, l'autoxydation de la catéchine pendant deux semaines à 47°C conduit à la formation de cinq dimères incolores de masse molaire 578 g.mol⁻¹, dont la déhydro-dicatéchine B4 caractérisée précédemment. Ces produits peuvent être rapprochés des cinq dimères incolores obtenus par oxydation enzymatique de la catéchine à pH 3.⁵⁶ L'analyse en CLHP-SM met également en évidence des pigments jaunes ne correspondant pas aux dimères détectés à m/z = 575 en mode négatif obtenus par incubation à 25°C et pH 6,5.

Cette famille est représentée par deux composés élués à 31,5 et 33,1 min, caractérisés par un ion moléculaire à m/z = 615 en mode négatif et un spectre d'absorption dont le maximum est à 439 et 443 nm respectivement. Ces composés ont des caractéristiques

similaires aux sels de xanthylum formés à partir de l'acide glyoxylique issu de l'oxydation de l'acide tartrique, et de la catéchine à pH 3,5. Cependant, le mécanisme de formation des sels de xanthylum formés dans la solution « acétate d'ammonium » à pH 3 serait différent de celui proposé jusque là, dans la mesure où les précurseurs, l'acide tartrique ou l'acide glyoxylique, n'ont pas été introduits dans le milieu. L'hypothèse avancée doit donc être confirmée par la réaction avec l'acide glyoxylique. Par ailleurs, l'intensité de l'ion moléculaire du xanthylum obtenu en mode négatif n'étant pas suffisamment intense pour obtenir des fragmentations exploitables, l'épicatéchine, connue pour sa plus grande réactivité vis-à-vis des aldéhydes,⁸¹ a été oxydée dans les mêmes conditions que la catéchine.

2. Caractérisation des pigments jaunes

Les profils chromatographiques extraits à 420 nm correspondant aux solutions issues de l'autoxydation de la catéchine (15 jours), de l'épicatéchine (60 jours) et de l'incubation de la catéchine en présence d'acide glyoxylique (2 jours) sont présentés sur la Figure 81. Notons que l'échelle d'absorbance n'est pas commune aux trois profils, et n'est valable que pour celui de l'oxydation de la catéchine avec l'acide glyoxylique.

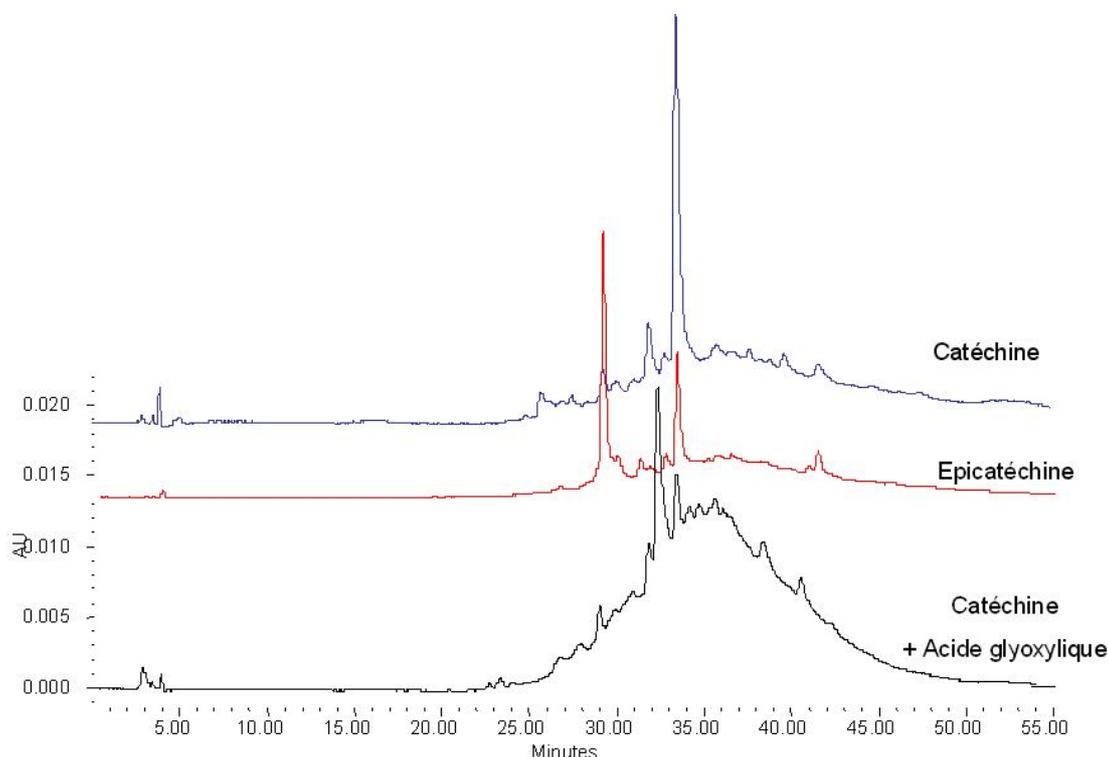


Figure 81 : Profils chromatographiques à 420nm des solutions de catéchine et épicatéchine autoxydées en milieu « acétate d'ammonium à pH = 3 et 47°C

Sur la base des temps de rétention, spectres UV-visible, et spectres de masse, des produits isomères (régio et/ou stéréoisomères) sont repérés dans les trois solutions. Pour chacun des pics élués à 32,0 et 33,7 min, le couplage avec la spectrométrie de masse ESI/TT attribue l'ion moléculaire à $m/z = 615$ en mode négatif, ou encore l'ion moléculaire à $m/z = 617$ en mode positif (Figure 82).

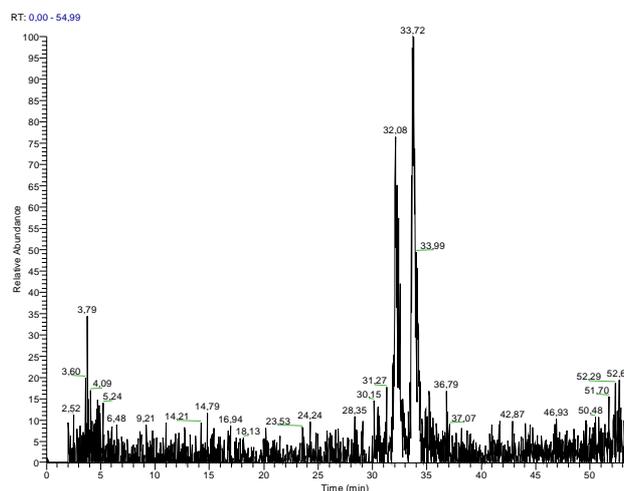


Figure 82 : Extraction de l'ion $m/z = 617$ pour la solution catéchine/acide glyoxalique

La fragmentation MS^2 de l'ion 617 donne naissance à un fragment majeur à $m/z = 465$ ($[M-152]^+$) caractéristique de la rupture de l'hétérocycle C par un processus de rétro Diels-Alder, indiquant que le cycle B ne porte pas de liaison supplémentaire (Figure 83). On observe également un ion à $m/z = 599$ ($[M-18]^+$) correspondant à une perte d'eau, systématiquement relevé dans la fragmentation des unités flavanols.

Une nouvelle fragmentation MS^3 de cet ion 465 donne naissance à trois fragments : $m/z = 313$ ($[M-152]^+$) et $m/z = 447$ ($[M-18]^+$) interprétés comme précédemment, et $m/z = 421$ ($[M-44]^+$) associé à la perte d'une molécule de CO_2 .

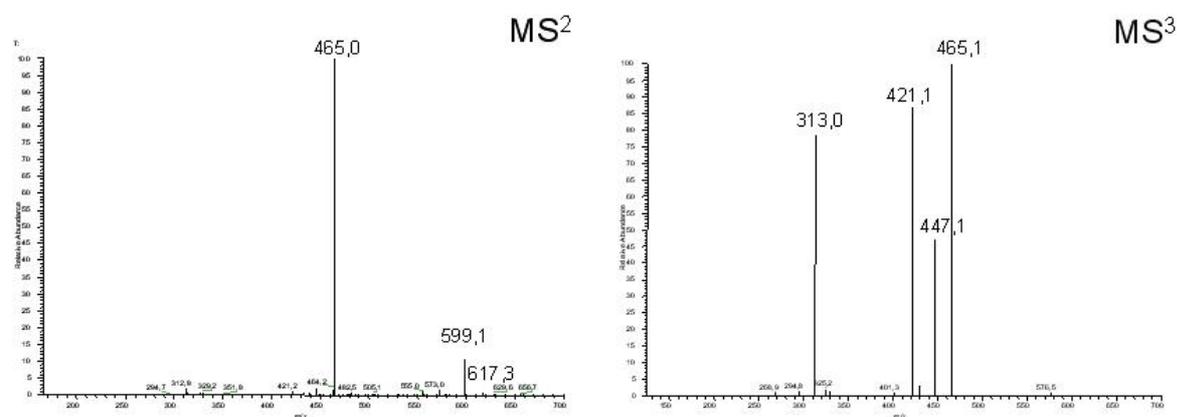


Figure 83 : Fragmentations successives de l'ion $+m/z = 617$

Ces fragmentations sont cohérentes avec la structure du sel de xanthylum, identifié dans un travail antérieur¹⁵⁷ (Figure 84). Cependant la fragmentation de cette molécule n'avait pas été réalisée dans cette étude. La nature du monomère de flavanol utilisé au départ et son isomérisation spontanée favorable à l'isomère catéchine conduit à la présence de sels de xanthylum constitués à partir de catéchine uniquement, d'épicatéchine uniquement, d'un mélange de catéchine et épicatechine, ou des régio-isomères correspondants.

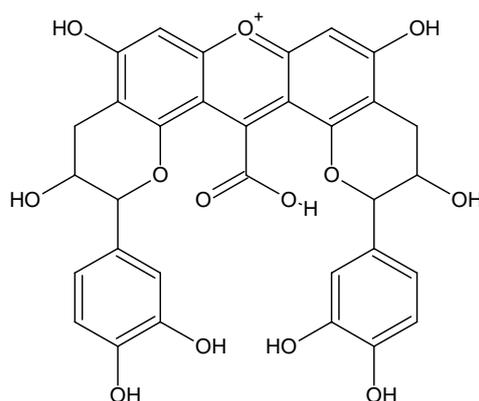


Figure 84 : Structure d'un sel de xanthylum

La question reste de savoir comment l'acide glyoxylique peut se former dans ce milieu qui contient principalement de l'acide acétique. L'hypothèse la plus probable serait que l'acide acétique est oxydé en acide glyoxylique dans une première étape, autorisant ainsi le mécanisme connu. Des travaux sur l'oxydation de l'acide acétique dans l'atmosphère suggèrent en effet que son produit d'oxydation majeur est l'acide glyoxylique.¹⁵⁸ Le mécanisme de formation proposé implique l'arrachement d'un hydrogène du groupement méthyle par un radical hydroxyle. Le radical $[\text{CH}_2\text{COOH}]^\bullet$ formé réagit avec le dioxygène de l'air donnant naissance au radical peroxyde $[\text{O}_2\text{CH}_2\text{COOH}]^\bullet$. La réduction de ce dernier suivie par l'arrachement d'un hydrogène ou la réaction de O_2 avec élimination de HO_2^\bullet conduit à l'acide glyoxylique.

Les mécanismes radicalaires impliquant les polyphénols étant plus favorables à pH acide, l'absence de formation des sels de xanthylum lors de l'autoxydation de la catéchine à pH 6,5 pourrait ainsi être expliquée par l'incapacité de former l'intermédiaire acide glyoxylique via des mécanismes radicalaires.

B. Autoxydation en milieu modèle vin à pH 3

La nature du milieu ayant été largement modifiée par rapport à une matrice vin, l'autoxydation d'une solution témoin de catéchine en milieu modèle vin à pH 3 chauffée à 47°C a été suivie.

Le milieu modèle vin est constitué d'hydrogénéo-tartrate de potassium à hauteur de 1,65 g.L⁻¹ dans une solution aqueuse d'éthanol à 12 % ajustée à pH 3 avec de l'acide sulfurique, comme utilisé par Bradshaw.⁷⁰ L'expérience d'autoxydation de la catéchine en milieu modèle vin a été suivie pendant 3 mois.

Après 90 jours d'incubation dans l'obscurité à 47°C, la catéchine reste largement majoritaire, et on relève la formation de cinq composés incolores ($\lambda_{\max} = 279$ nm) dont un coélué avec la catéchine, caractérisés par un ion moléculaire à $m/z = 577$ en mode négatif (Figure 85). Ces cinq dimères de catéchine sont analogues à ceux obtenus à pH 3 dans notre solution modèle « acétate d'ammonium » et dans le milieu réactionnel issu de l'oxydation enzymatique de la catéchine.⁵⁶ On note également une isomérisation de la catéchine.

Enfin, aucun pigment jaune ou oligomère de degré de polymérisation supérieur à deux n'est détecté.

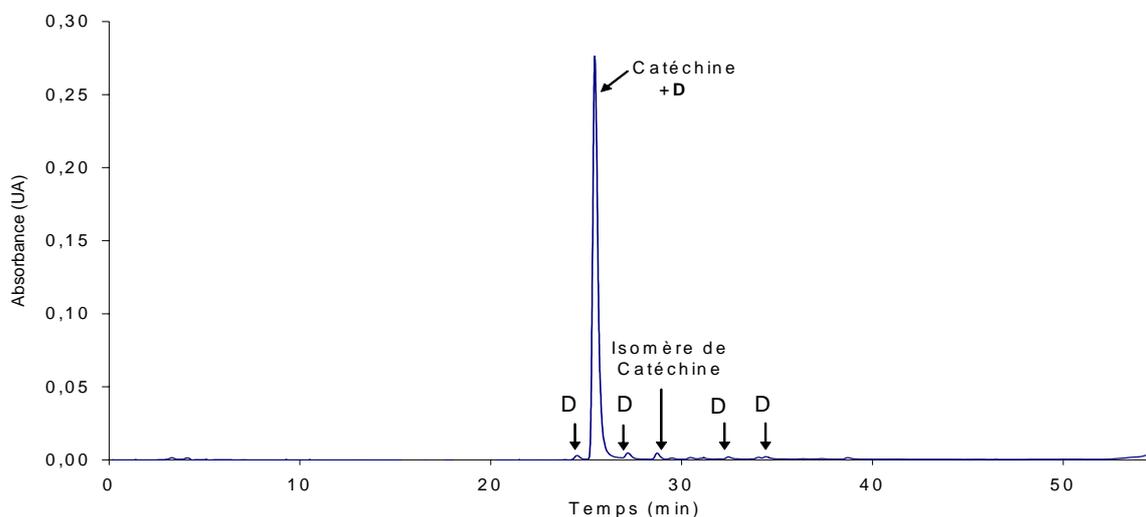


Figure 85 : Profil chromatographique à 280 nm de la catéchine en milieu modèle vin après 3 mois d'incubation

C. Conclusion

Dans tous les cas, les cinétiques d'évolution sont lentes, et particulièrement à pH 3 quel que soit le milieu modèle. L'accélération de l'autoxydation par chauffage n'a pas permis d'atteindre le niveau d'oxydation de la solution incubée à pH 6,5 si l'on se réfère à la production de pigments jaunes, telle la déhydro-dicatéchine A4 résultant de l'oxydation de la déhydro-dicatéchine B4 incolore.

En outre, la nouvelle voie réactionnelle de formation des sels de xanthylum proposée ici à partir de l'oxydation de l'acide acétique souligne l'implication des molécules constitutives du milieu réactionnel sous forme d'aldéhyde, comme cela a déjà été démontré avec l'acide tartrique⁷⁹ ou l'éthanol pour la formation des ponts méthylméthine (>CH-CH₃)
159

Dans l'objectif d'élaborer un test prédictif pour les professionnels, l'accélération des phénomènes oxydants par chauffage ou élévation du pH n'est pas satisfaisante d'un point de vue cinétique (durée supérieure à une semaine pour observer une modification de la coloration). Au contraire, le periodate de sodium, utilisé précédemment pour réaliser une oxydation modèle de l'Assemblage 2003, semble bien approprié dans la mesure où les phénomènes ont été perceptibles en quelques heures.

On notera qu'élever le pH conduit à défavoriser les mécanismes radicalaires ayant lieu à pH 3, et qui n'impliquent pas forcément les polyphénols en priorité, mais d'autres constituants tels que l'éthanol ou l'acide tartrique.

III. Oxydation chimique de la catéchine

Un des objectifs de cette étude est de comparer les modes d'autoxydation et oxydation chimique des flavanols monomères. Par conséquent, dans l'alternative que nous avons choisie avec le periodate de sodium, il nous a semblé important de se placer dans des conditions où l'oxydant était en défaut pour se rapprocher des conditions de l'autoxydation (excès de réducteur par rapport aux espèces oxygénées réactives) les limites inférieures du rapport oxydant/polyphénol étant fixées par les seuils de détections des produits d'oxydation analysés par les différentes méthodes analytiques.

A une solution (5 mM) de catéchine à pH=3, est ajoutée une solution de periodate de sodium dont la concentration finale est égale à 0,5 mM soit un rapport molaire [oxydant]/[flavanol] =1/10.

La réaction d'oxydation est suivie durant une heure par spectrophotométrie UV-visible et par chromatographie liquide.

A. Evolution de la couleur

L'oxydation de la catéchine par le periodate de sodium se traduit par une augmentation significative de l'absorbance à 280 nm de 10 % (Figure 86), ce qui implique que les produits d'oxydation formés ont des coefficients d'absorption molaires supérieurs à celui de la catéchine. Ce phénomène, déjà observé au cours du vieillissement thermique de l'Assemblage 2003 (cf Partie 2 chapitre I), n'est donc pas exclusivement imputable au chauffage. On note également le développement rapide d'une coloration jaune de la solution réactionnelle, puis une stabilisation de celle-ci à partir de 30 minutes. D'autre part, aucun précipité n'est repéré.

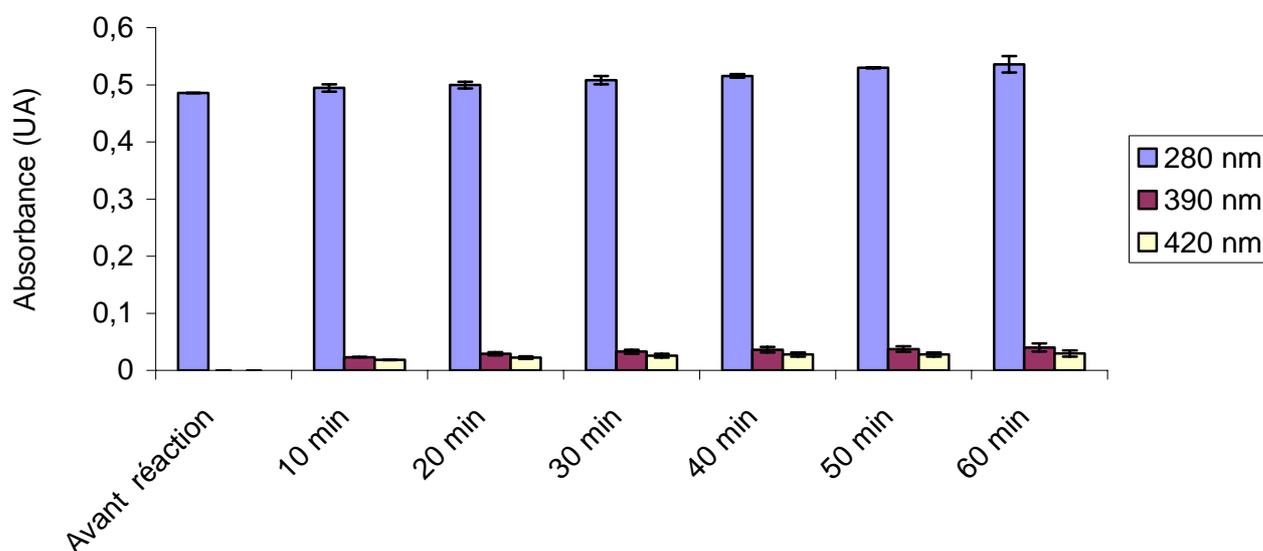


Figure 86 : Evolution de l'absorbance à 280, 390, et 420 nm au cours de l'oxydation chimique de la catéchine par NaIO_4

B. Evolution de la composition polyphénolique

Les teneurs en catéchine résiduelle et en différents produits d'oxydation ont été estimées après 10 min et 70 min de réaction (Figure 87).

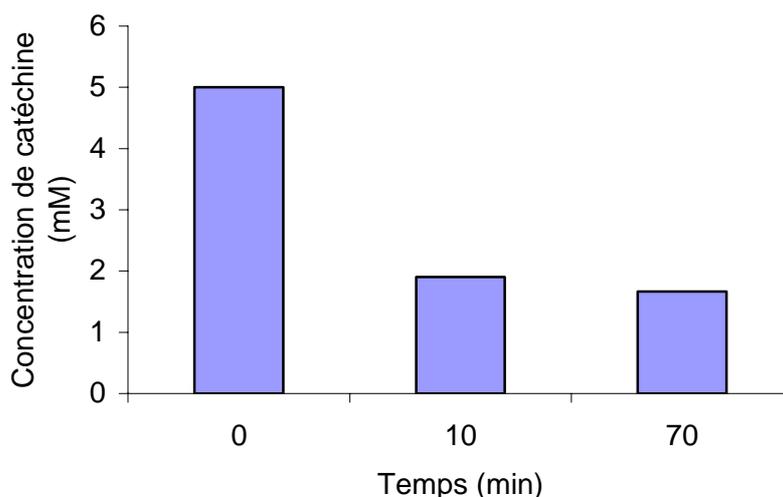


Figure 87 : Concentration en catéchine dans le milieu réactionnel après 0, 10 et 70 minutes d'oxydation

L'évolution de la catéchine est similaire à ce qui avait été observé lors de son autoxydation à pH 6,5, même si la cinétique est ici beaucoup plus rapide puisque le temps de demi-vie est de quelques minutes contre 15 jours. Les deux modes d'oxydation conduisent en effet à une disparition rapide de la catéchine dans un premier temps suivie d'une stabilisation à une quantité résiduelle de l'ordre de 33-35 % de la concentration initiale. Il est à noter cependant que la perte de catéchine est très largement supérieure à celle qui devrait correspondre au double de la quantité stœchiométrique de l'oxydant, soit 20 %, (10 % de quinone +10 % de catéchine résiduelle pour la piéger). Ceci suggère des réactions d'oxydation en cascade mettant probablement en jeu les formes réduites du periodate.

Parallèlement, les profils chromatographiques extraits à 280 et 390 nm montrent l'apparition de huit produits d'oxydation majeurs (Figure 13) : cinq dimères de catéchine incolores (Pox_i), dont la dehydro-dicatéchine B4, analogues à ceux caractérisés dans l'autoxydation par chauffage à pH 3, et trois pigments jaunes (Pox_j) correspondant à ceux obtenus par oxydation enzymatique à pH 6 et dans nos solutions d'autoxydation en milieu « acétate d'ammonium » à pH 6,5. Les évolutions de ces composés sont variables au cours de l'oxydation : tandis que quatre d'entre eux s'accumulent (Pox_i2 , Pox_i3 , Pox_i4 , Pox_j1), les autres ont une concentration stable après 10 minutes de réaction (Pox_i1), voire qui diminue (déhydro-dicatéchine B4, Pox_i1 , Pox_j2 , Pox_j3).

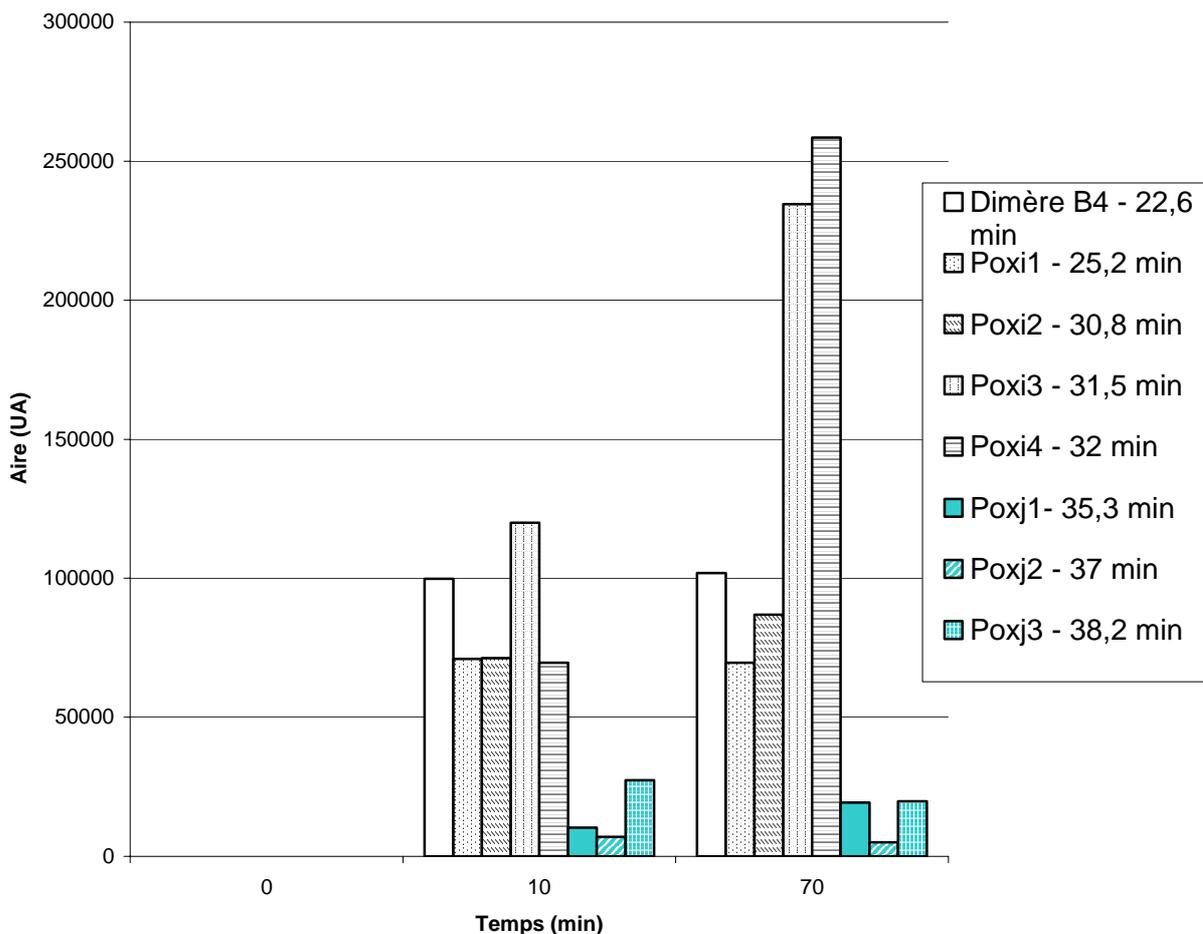


Figure 88 : Evolution des produits d'oxydations incolores et jaunes formés par oxydation chimique de la catéchine avec le periodate de sodium en défaut à pH = 3

Par ailleurs, même s'ils apparaissent sous forme d'un massif de très faible intensité et non résolu, des oligomères de flavanols sont détectés grâce au couplage CLHP-ESI/TI (Figure 89). On retrouve ainsi les dimères et trimères, ayant subi ou non une étape d'oxydation supplémentaire, préalablement repérés dans les expériences d'autoxydation de la catéchine à pH 6,5, ainsi que des traces de tetramères oxydés et pentamères. On observe également la présence d'adduits d'iode avec la catéchine et les oligomères formés par oxydation. Ceci confirme les oxydations successives des formes réduites du periodate (iodate, iodite, hypiodite, puis iode qui se transforme en iodure en solution aqueuse).

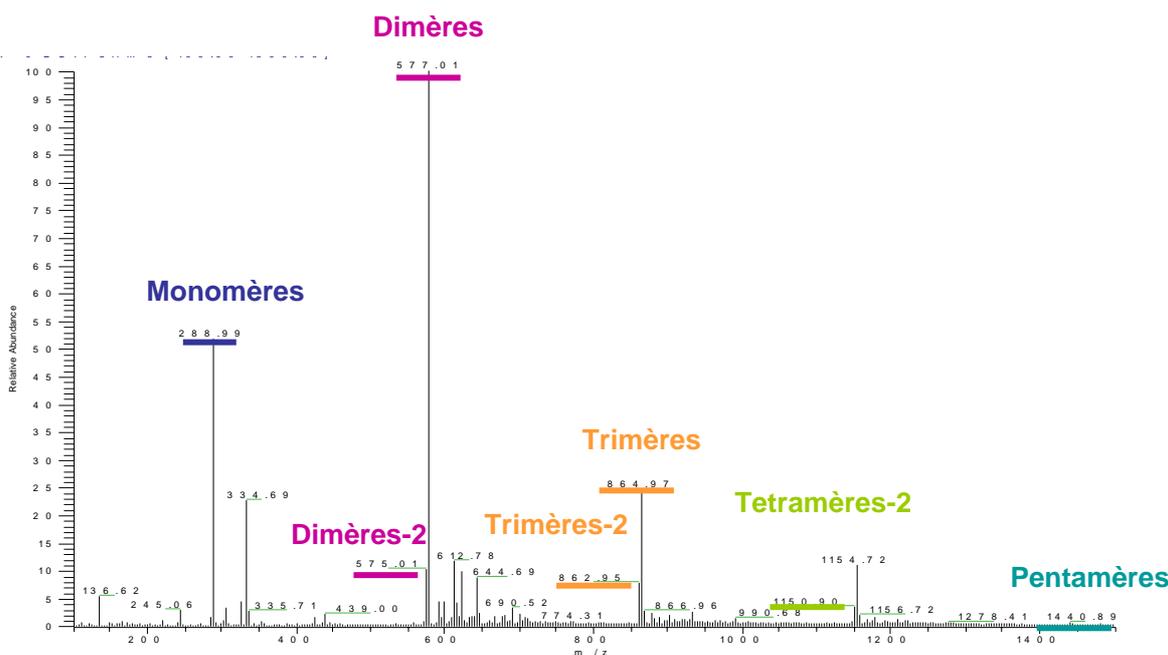


Figure 89 : Spectre de masse ESI (couplage CLHP) en mode négatif et de $m/z = 100$ à 1500 de la solution réactionnelle de catéchine oxydée par le periodate de sodium

C. Conclusion

D'après ces résultats, l'oxydation par le periodate de sodium se révèle être la voie la plus adaptée pour mimer en un temps réduit les phénomènes naturels, et servir ainsi de test prédictif. Il semble en effet être un bon compromis entre l'autoxydation en modèle vin à pH 3 avec la formation des mêmes produits incolores, et l'autoxydation en milieu acétate d'ammonium à pH 6,5, avec la formation des mêmes pigments jaunes. L'avantage de l'oxydation par le periodate est sa cinétique rapide.

IV. Test systématique d'étude du brunissement

En vue d'une exploitation des résultats par l'interprétation de courbes de réponses, un plan de mélanges comprenant cinq solutions standards (S1-S5), des mélanges binaires (S6-S15), ternaires (S16-S25), et quaternaires (S26-S28) (cf Matériel & Méthodes), a été mis en place pour étudier plus généralement les relations entre la susceptibilité au brunissement de solutions modèle vin et leur composition polyphénolique.

Ce plan a été construit de façon à ce que la concentration totale en unités phénols soit identique dans toutes les solutions. Il s'agit là d'évaluer l'impact de la composition globale en polyphénols sur l'évolution de la couleur.

Par ailleurs, afin d'étudier plus précisément l'influence des acides phénols sur l'oxydation des flavanols ou l'inverse, des solutions standards supplémentaires correspondant aux différents taux de dilution rencontrés dans les mélanges ont été préparées (oxydations comparées du flavanol en présence ou absence d'acide(s) phénol(s)).

D'après les résultats préliminaires, le periodate de sodium est choisi comme oxydant dans le cadre d'un test prédictif rapide et mimant les phénomènes naturels.

A cette date, tous les essais prévus dans le plan n'ont pas été réalisés, et seuls les résultats concernant les solutions standards et les mélanges binaires épicatechine/acide phénol et dimère B2/acide phénol sont disponibles.

A. Choix des polyphénols modèles

Les composés modèles sélectionnés incluent deux flavanols, le dimère B2 purifié au laboratoire et le monomère correspondant, l'épicatechine, afin de mettre en évidence l'influence de la longueur de chaîne, deux acides hydroxybenzoïques différant par le nombre de groupements hydroxyle (les acides protocatechique et gallique), et un acide hydroxycinnamique (l'acide caféique). Compte tenu des quantités disponibles de dimère B2 et du nombre de solutions dans le plan d'expériences (28), la concentration totale en unités phénols a été fixée à 1 mM, soit 0,5 mM de dimère B2 et 1 mM des autres composés modèles dans les solutions-mères standards.

B. Oxydation chimique simultanée des polyphénols : Test prédictif accéléré

Pour chaque essai du plan, la concentration totale en unités phénols a été fixée à 1 mM, et l'oxydant à 0,2 mM afin de renforcer la formation de pigments jaunes. Les cinétiques ont été suivies sur 24 heures par CLHP-DAD-ESI/TI SM.

1. Influence de la présence de plusieurs polyphénols sur leurs oxydations respectives

a) Comparaison de l'oxydation des polyphénols isolés ou en mélange

La Figure 90 rassemble, pour chaque flavanol, les histogrammes représentant la somme des teneurs résiduelles en acides phénols et flavanols dans les mélanges binaires, et

celle calculée à partir des teneurs résiduelles dans les solutions standards correspondantes après 24 heures d'oxydation. Initialement, les solutions standards contiennent 0,5 mM d'unités phénols, et les mélanges binaires contiennent 0,5 mM d'acide phénol et 0,5 mM d'unités flavanols (0,5 mM d'épicatéchine ou 0,25 mM de dimère B2).

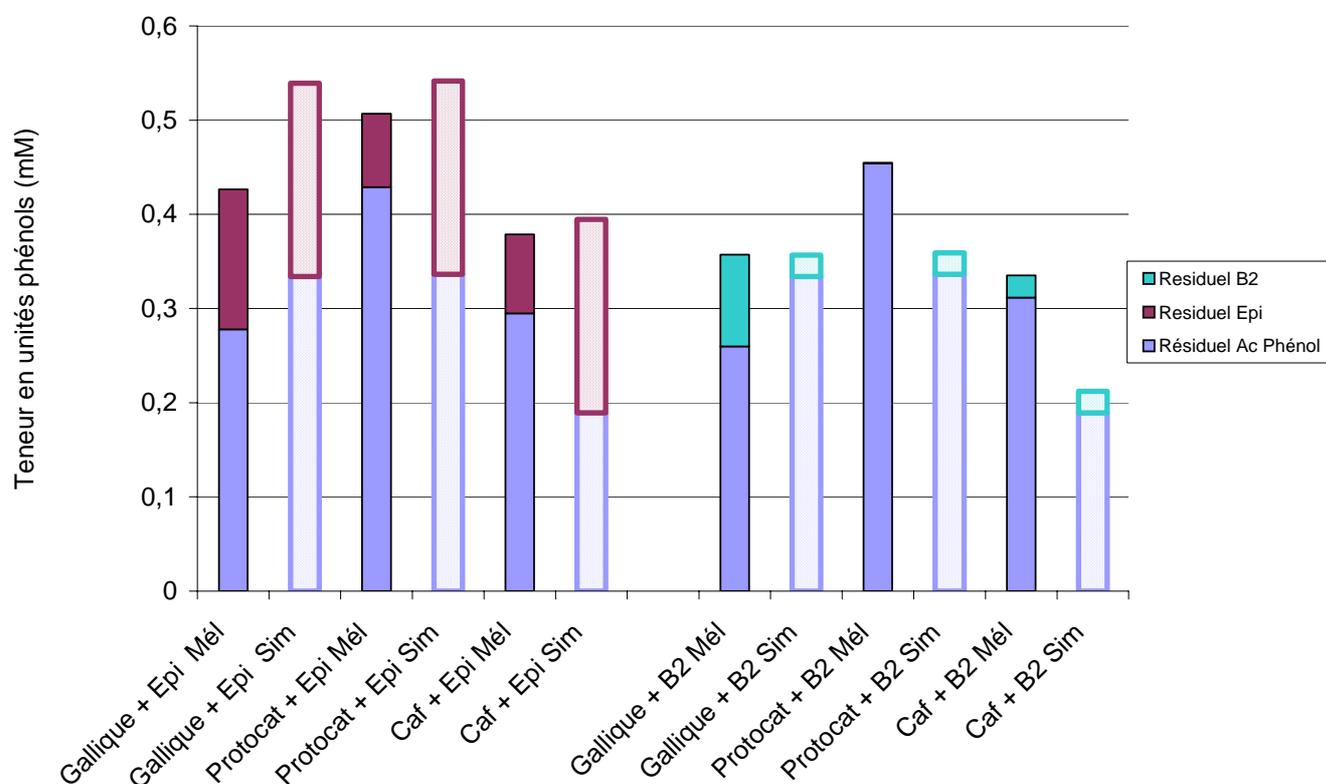


Figure 90 : Teneurs résiduelles en unités phénols dans les mélanges et simulées (pointillés) à partir des solutions standards

Les flavanols se distinguent par leur comportement. Dans les mélanges contenant l'épicatéchine, les teneurs résiduelles totales en unités phénols sont toujours inférieures à celles calculées à partir des solutions standards. Au contraire, pour le dimère B2, le total d'unités phénols résiduelles dans le mélange est supérieur ou égal aux sommes calculées à partir des solutions standards.

Ces résultats indiquent que les mélanges épicatéchine/acide phénol sont plus sensibles à l'oxydation que les solutions standards, tandis que les mélanges dimère B2/acides phénols le sont moins.

b) Influence des acides phénols sur l'oxydation des flavanols

La comparaison est réalisée à partir de l'étude des solutions standards de flavanols (S29 et S32) et des mélanges binaires (S7-S9, S10-S12) contenant initialement 0,5 mM de flavanols (0,5 mM d'épicatéchine ou 0,25 mM de dimère B2).

Après 24 heures d'oxydation des solutions standards de flavanols, la teneur résiduelle en épicatechine représente 40 % de la concentration initiale, alors que le dimère B2 disparaît presque complètement (< 5 %) (Figure 91). La présence d'acide hydroxybenzoïque ou hydroxycinnamique dans les mélanges binaires contenant un des flavanols accélère de façon générale la disparition du flavanol, sauf dans le cas des mélanges du dimère B2 avec l'acide gallique ou caféique, le premier renforçant la teneur résiduelle de B2 par rapport au standard, et le second étant sans effet. Autrement dit, l'acide gallique a un effet protecteur vis-à-vis du dimère B2 même si la coloration du mélange est plus intense, alors que les autres acides phénols ont un effet promoteur par rapport à l'oxydation du flavanol.

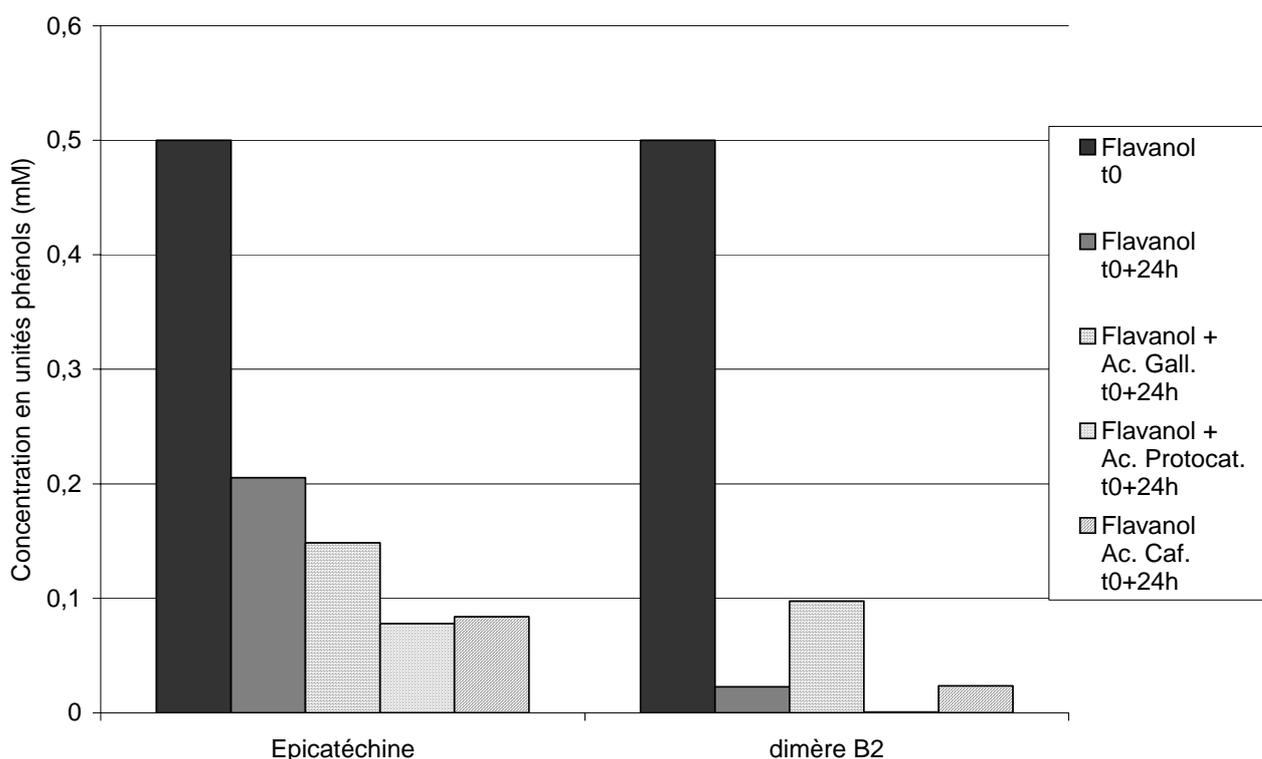


Figure 91 : Influence des acides phénols sur les teneurs résiduelles en flavanols

c) Influence des flavanols sur l'oxydation des acides phénols

Si l'on examine l'influence de la présence de flavanol sur la consommation des acides phénols par oxydation, on relève deux comportements différents vis-à-vis de l'acide gallique d'une part, et des acides protocatéchique et caféique d'autre part. La teneur résiduelle en acide gallique après 24 heures d'oxydation est plus faible en présence de flavanol que dans la solution standard d'acide gallique, soulignant le rôle promoteur des flavanols sur la réactivité de l'acide gallique. Au contraire, les teneurs résiduelles en acides caféique et protocatéchique sont plus élevées en présence d'un flavanol que dans les solutions standard. Ces résultats suggèrent tout d'abord que les acides caféique et protocatéchique sont apparemment protégés par les flavanols : soit il s'agit d'une compétition favorable à l'oxydation du flavanol, soit il existe un phénomène d'oxydation couplée qui permet une oxydation accrue des flavanols et une régénération de l'acide phénol à partir de sa forme oxydée.

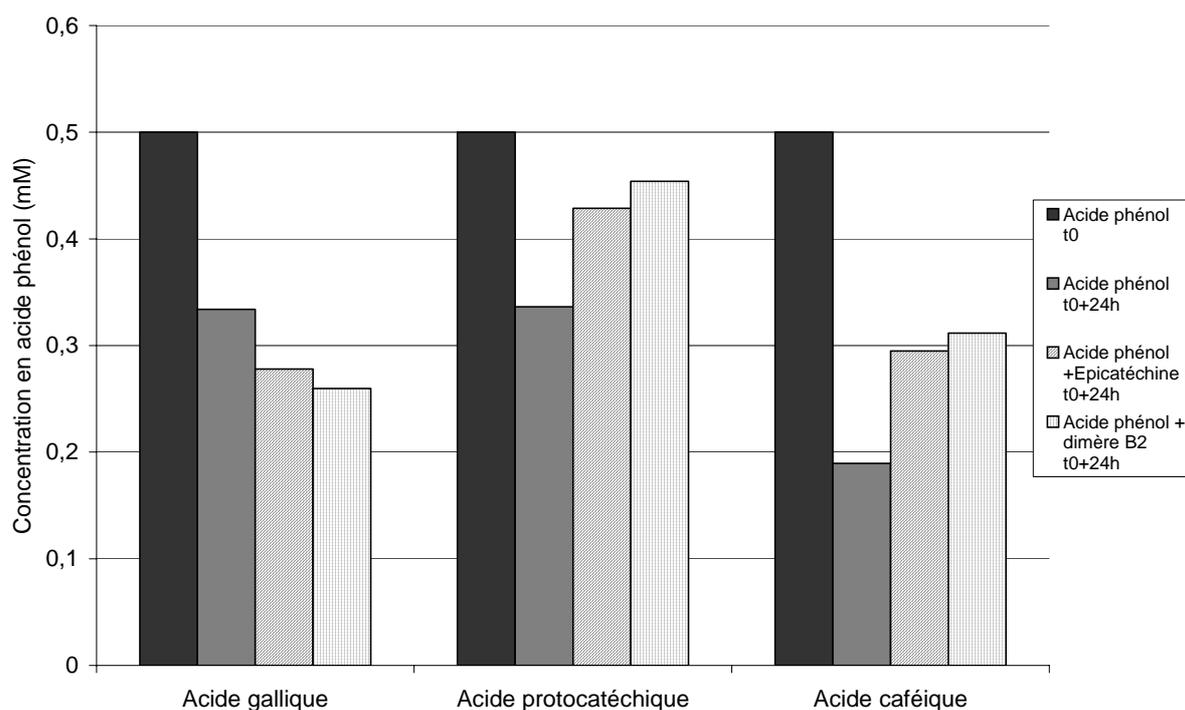


Figure 92 : Influence de la nature du flavanol sur les teneurs résiduelles en acides phénols

d) Etude des produits d'oxydation

L'évolution des solutions standards d'acides phénols à 0,5 mM met en évidence une grande hétérogénéité des produits formés à partir de l'oxydation de l'acide gallique. Hormis l'acide gallique qui reste majoritaire, seuls deux composés absorbant dans le visible sont

repérés à 27,2 min ($\lambda_{\text{max}} = 262, 353 \text{ nm}$) et 35,4 min ($\lambda_{\text{max}} = 305, 399 \text{ nm}$) mais dont la masse molaire par analyse en CLHP-ESI/TI SM n'a pu être déterminée. De même, l'oxydation de l'acide protocatéchique conduit à la formation de produits peu abondants et très hétérogènes non détectés en spectrométrie de masse. Au contraire, l'acide caféique qui présente la plus grande réactivité forme par oxydation quatre produits majeurs : deux dimères coélus à 29,6 min (en mode négatif $m/z = 357$ (couplage direct), 269 (couplage direct et deux décarboxylations)) avec des maximums d'absorption à 348 et 280 nm respectivement ; un dimère élué à 31,4 min associé à $m/z = 313$ (couplage direct et décarboxylation) et à un maximum d'absorption à 324 nm ; un dimère à 34,2 min absorbant à 280 nm ce qui indique un couplage par les doubles liaisons. On repère deux trimères à l'état de traces : un à 38,2 min est associé à $\lambda_{\text{max}} = 325 \text{ nm}$ et à $m/z = 491$ (2 couplages directs et une décarboxylation), l'autre plus apolaire associé à $m/z = 447$ (2 couplages directs et 2 décarboxylations). Cependant aucun des produits est analogues à ceux mis en évidence par Fulcrand⁵⁵ et Cilliers.⁵⁹

L'oxydation des solutions standards d'épicatéchine et de dimère B2 à 0,5 mM d'unités flavanols conduit à la formation de nombreux produits apparaissant sous la forme d'un massif très peu résolu. A partir de l'épicatéchine, les produits mis en évidence par spectrométrie de masse sont majoritairement des dimères, et deux trimères présentant ou non des degrés d'oxydation supplémentaires analogues à ceux décrits dans les solutions de catéchine oxydée (cf § I.B). L'oxydation du dimère B2 se différencie principalement de celle du monomère par l'existence d'un ou deux réarrangements intramoléculaires qui se traduisent par des ions moléculaires à $m/z = 575$ et 573 . Une dimérisation de B2 avec deux degrés d'oxydation supplémentaires est également observée (deux composés).

L'analyse des mélanges binaires contenant de l'épicatéchine montre que les dimères provenant de l'oxydation de l'épicatéchine se forment en quantité très inférieure à celle relevée dans la solution standard, au profit de dimères mixtes, quel que soit l'acide phénol. Cette conversion est particulièrement importante avec l'acide gallique. Par ailleurs, très peu de produits provenant de l'oxydation de l'acide phénol sont repérés dans les mélanges binaires.

Dans les mélanges binaires contenant le dimère B2, on observe de façon générale majoritairement ses produits d'oxydation et très peu de dimères mixtes ou de produit d'oxydation des acides sauf pour l'acide gallique (5 dimères mixtes contre 1 avec l'acide caféique et 0 avec l'acide protocatéchique). Ceci explique l'augmentation de la consommation d'acide gallique en présence de B2 et est en accord avec l'épargne des deux autres acides.

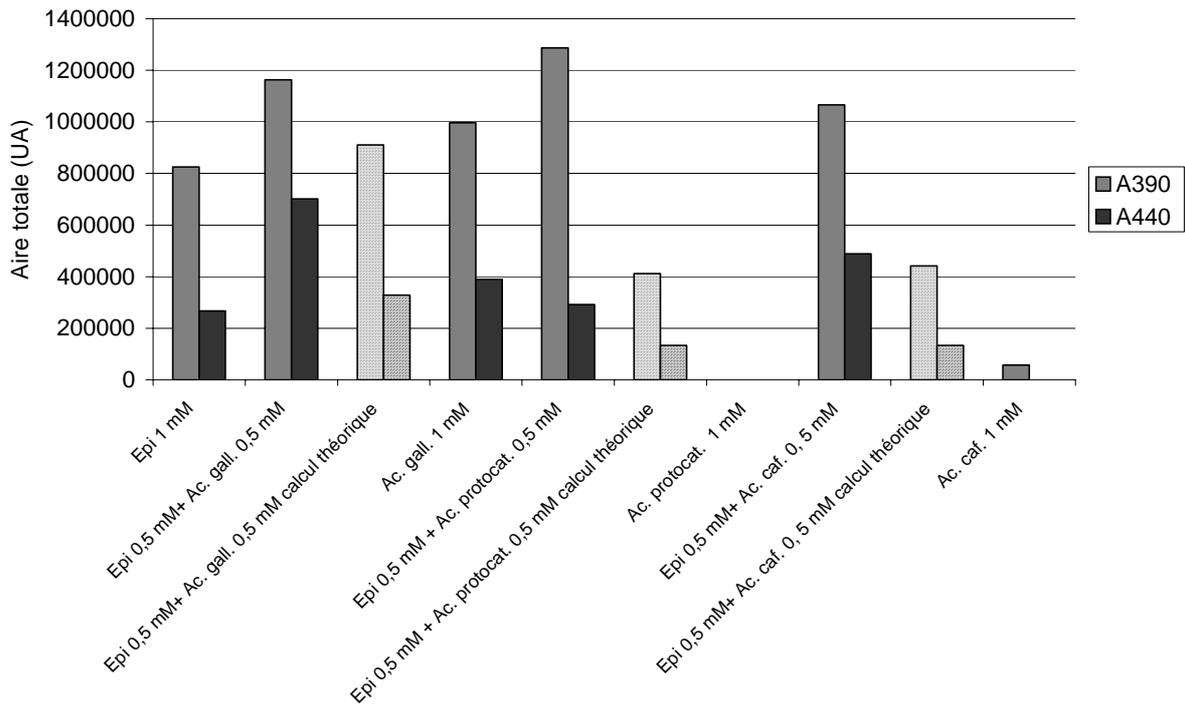
2. Impact de la composition globale sur le brunissement par oxydation

Après 24 heures d'oxydation, la coloration jaune est évaluée à travers la valeur des aires sous les profils chromatographiques extraits à 390 et 440 nm correspondant aux deux maximums d'absorption des produits d'oxydation des flavanols. On remarque tout d'abord que la solution d'acide gallique est la plus colorée ($A_{390\text{nm}} + A_{440\text{nm}}$) de toutes les solutions standards devant celles du dimère B2 et de l'épicatéchine (Figure 93). Dans ces deux dernières solutions, la coloration ($A_{390\text{nm}} + A_{440\text{nm}}$) est identique, mais la contribution de chacune des absorbances est différente : pour la solution standard d'épicatéchine, l'absorbance à 390 nm prédomine, alors que pour celle de dimère B2, les contributions à 390 et 440 nm sont presque équivalentes, ce qui renforce la teinte orangée et l'impression visuelle d'une coloration plus intense.

La présence d'un acide phénol et d'un flavanol (épicatéchine ou B2) dans les solutions binaires se traduit par une coloration beaucoup plus intense à 390 nm et 440 nm que celle obtenue par un simple effet additif des colorations des solutions standard correspondantes (calcul). Sur la base des aires CLHP, les solutions contenant le dimère B2 sont moins colorées que les solutions correspondantes avec l'épicatéchine. La solution contenant l'épicatéchine et l'acide gallique est celle, parmi les trois mélanges épicatéchine/acide phénol, qui présente la coloration la plus intense. Au contraire, dans les solutions binaires contenant le dimère B2 et un acide phénol, la coloration la plus intense est obtenue avec l'acide caféique, tandis que les colorations des autres mélanges sont plus faibles et équivalentes à celle de la solution standard de dimère B2.

On notera que l'acide protocatéchine n'a pas le même effet protecteur que celui constaté lors de l'autoxydation de la catéchine à pH = 6,5. La différence est attribuable soit à la nature du flavanol qui est ici l'épicatéchine et non la catéchine, soit à la cinétique d'oxydation très rapide avec le periodate de sodium qui ne nous permet pas de visualiser un effet protecteur initial qui s'inverserait au cours du temps.

(a) Epicatechine + Acide phénol



(b) Dimère B2 + Acide phénol

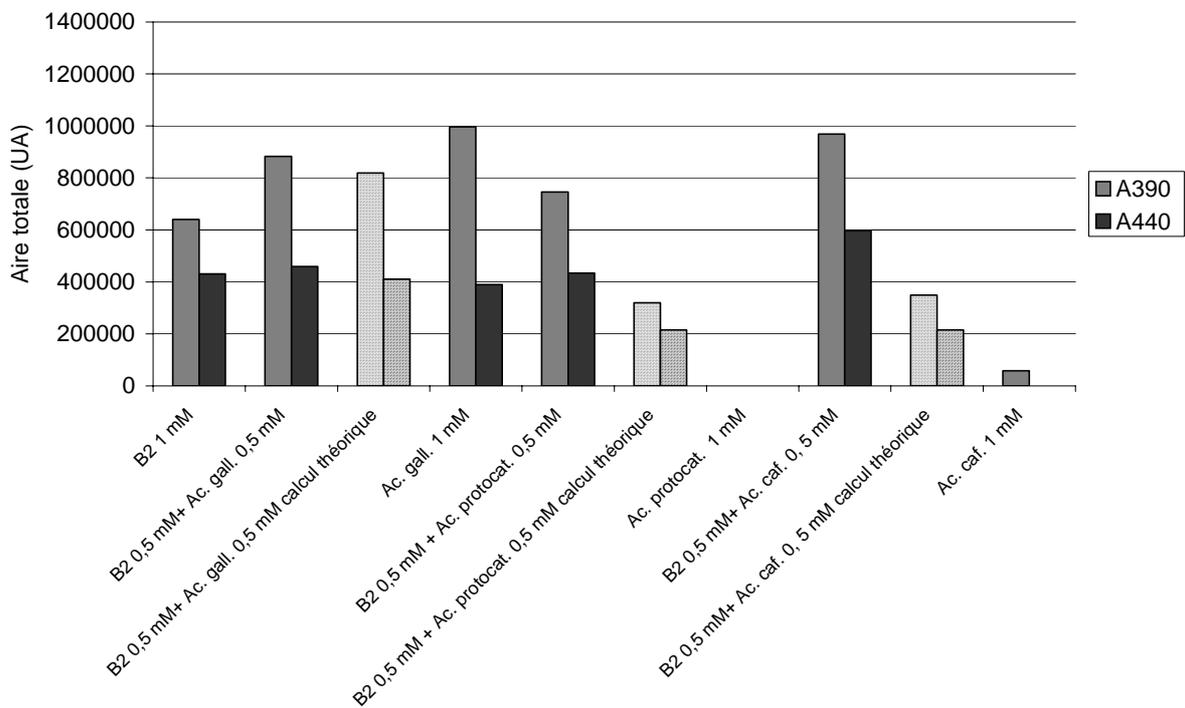


Figure 93 : Aires totales à 390 et 440 nm après 24 heures d'oxydation en fonction du milieu réactionnel (a) épicatechine + acide phénol ; (b) dimère B2 acide phénol

V. Conclusion

Les différents modèles d'oxydation testés, à savoir l'autoxydation par élévation du pH ou par chauffage et l'oxydation chimique par le periodate de sodium, ont tout d'abord montré la complexité des phénomènes et souligné l'impact de la modification d'un facteur sur l'évolution de la composition polyphénolique. Néanmoins, l'oxydation chimique par le periodate de sodium semble être le mode accéléré le plus prometteur pour l'élaboration d'un test prédictif du fait de la similitude des produits formés avec ceux obtenus en milieu modèle vin à pH 3 et de la cinétique de cette réaction qui permet, outre les produits incolores, de former les pigments jaunes. Une validation rigoureuse à partir de l'analyse CLHP-DAD-SM des solutions en conditions d'autoxydation est indispensable mais ne peut pas encore être entièrement réalisée dans le cadre de ce travail. Malgré tout, quelques comparaisons peuvent être faites. Après cinq mois d'incubation, les mélanges contenant de l'acide caféique présentent une teinte orangée similaire à celle relevée dans les solutions oxydées chimiquement et contenant initialement de l'acide caféique. Une coloration plus soutenue dans le jaune est observée pour les solutions contenant initialement du dimère B2 que pour celles contenant de l'épicatéchine contrairement à ce qui a été obtenu par oxydation chimique, mais la tendance peut être uniquement liée aux cinétiques d'oxydation.

Par ailleurs, les expériences permettent de souligner les différences de comportements entre le flavanol monomère et le dimère B2 vis-à-vis de l'oxydation. La consommation de dimère est plus importante que celle de monomère après des durées d'incubation équivalentes, ce qui pourrait suggérer une prédominance des voies intramoléculaires. Les produits résultants de l'oxydation du dimère sont à l'origine d'une teinte orangée qui se traduit par un rapport $A_{440\text{nm}}/A_{390\text{nm}}$ plus élevé que celui associé aux produits issus de l'oxydation du monomère qui sont plus jaunes. En outre, dans un système constitué de flavanols et d'acides phénols, l'interprétation de l'oxydation sur la base de la consommation des acides phénols n'est pas toujours correcte dans la mesure où ils peuvent être protégés par les flavanols, comme les acides protocatéchique et caféique dans notre étude.

Enfin, compte tenu de la disparition quasi totale du dimère B2 par oxydation, des produits de nature et de taille variées étaient attendus dans le milieu réactionnel, ce qui n'a pas pu être mis en évidence. L'analyse CLHP-DAD-SM des milieux réactionnels reste qualitative et très partielle, puisque la technique employée ne permet pas de détecter des molécules au-delà du trimère, soit à cause de quantités trop faibles, d'une trop grande polydispersité ou de masses molaires trop élevées. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches.

Chapitre 1

Caractérisation de la distribution en masses de fractions de tanins par analyse MALDI-TOF de complexes protéine-tanin

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans Analytical Chemistry (annexe 3).

La caractérisation des tanins condensés se fait de façon générale par les méthodes de référence de thiolysse ou de phloroglucinolyse.^{160, 161} Ces méthodes, basées sur le clivage des liaisons interflavoniques par acidolyse en présence d'un agent nucléophile suivi d'une analyse CLHP des produits de réaction, donnent accès à la nature et la proportion des différentes unités constitutives de la fraction de tanins condensés, et permettent de calculer leur degré de polymérisation moyen. Cependant, elles ne donnent pas d'information sur la distribution en masses des tanins puisqu'ils sont dégradés. Par ailleurs, l'analyse des tanins hydrolysables est généralement réalisée par une analyse CLHP qui permet de quantifier les unités acide gallique ou acide ellagique libérées par hydrolyse alcaline en conditions douces, mais elle ne donne accès ni au nombre moyen d'unités acide gallique par molécule (DGm), ni à une distribution en masses.

La chromatographie par perméation de gel (CPG), aussi appelée chromatographie d'exclusion stérique, est la technique la plus couramment utilisée pour analyser les polymères car elle permet de les caractériser à la fois par une masse moyenne et par une distribution autour de cette masse, déterminées à partir d'un graphe de calibration. Cette technique a été appliquée aux tanins condensés¹⁶¹ et hydrolysables.¹⁶² Dans le cas des tanins condensés, les résultats sont cohérents pour les faibles poids moléculaires mais deviennent très peu fiables lorsque le degré de polymérisation moyen augmente.¹⁶³ Cette tendance pourrait être liée à la nature même des calibrants dans le sens où les polymères de polystyrène utilisés à ces fins sont chimiquement et conformationnellement très différents des polymères analysés. C'est pourquoi la GPC est essentiellement utilisée comme technique séparative plutôt que comme

méthode permettant de déterminer une distribution en masses, objectif pour lequel la spectrométrie de masse peut être une approche alternative.

L'efficacité de la spectrométrie de masse utilisant l'ionisation électrospray est prouvée pour la caractérisation structurale de polyphénols, mais la technique montre des limites quant à l'évaluation d'une distribution en masse. Les spectres de masse ESI des mélanges de tanins sont en effet toujours dominés par les signaux des tanins de faibles masses molaires, et les intensités diminuent avec la longueur de la chaîne polymérique selon une tendance exponentielle.^{164, 165} Cet effet est également observé avec la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le fractionnement préalable des extraits tanniques améliore de façon considérable la détection des polymères de haut degré de polymérisation.^{164, 165} Cependant le résultat n'est pas totalement satisfaisant puisque que dans une fraction dont le degré de polymérisation moyen a été évalué à 22,2 par phloroglucinolyse, les polymères de plus hautes masses détectés contiennent 20 unités monomériques.¹⁶⁵

Ainsi, l'objectif de ce travail est de développer une méthode originale pour déterminer les distributions en masses de fractions tanniques, à travers la détection de complexes tanin-protéine par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Une des principales caractéristiques des tanins est leur capacité à se lier aux protéines, et les complexes protéine-tanins ont déjà été observés en spectrométrie de masse électrospray^{166, 167} et MALDI-TOF.¹⁶⁸ L'approche proposée est basée sur l'utilisation d'une protéine comme porteur de charge pour la détection des tanins, et comme protecteur des tanins contre la fragmentation, afin de limiter la discrimination vis-à-vis de l'ionisation et réduire la fragmentation des polymères les plus lourds. La technique MALDI-TOF a été choisie puisqu'elle donne naissance essentiellement à des ions simplement chargés. L'interprétation des spectres de masse s'en trouve facilitée par rapport à un spectre de masse ESI qui présenterait des profils extrêmement complexes dus à la superposition des différents états de charges de la protéine et de la distribution en masses des tanins.

I. Analyse directe des fractions de tanins par MALDI-TOF

Une série de fractions de tanins, condensés et hydrolysables, a été élaborée de façon à couvrir une large gamme de masses molaires moyennes.

A. Fraction de tanins hydrolysables

Une fraction de Tara tanins, mélange de gallotanins, a été sélectionnée pour représenter les tanins hydrolysables. La structure de base de ces tanins est constituée d'un acide quinique acylé par une ou plusieurs molécules d'acide gallique, qui peuvent elles-mêmes être acylées (Figure 94).

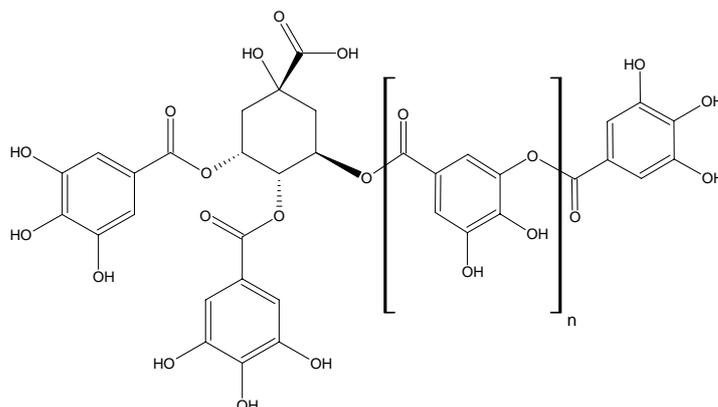


Figure 94 : Structure des Tara tanins

L'analyse directe de cette fraction par MALDI-TOF met en évidence plusieurs séries d'ions entre $m/z = 500$ et 1500 (Figure 95).

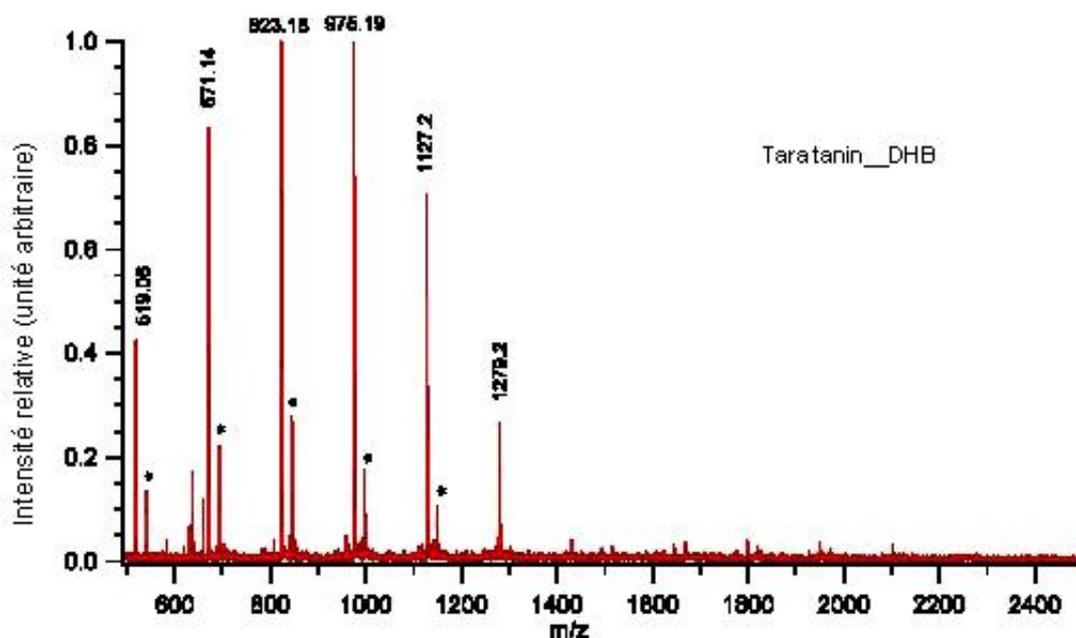


Figure 95 : Spectre MALDI-TOF de la fraction de Tara tanins (l'attribution des pics est donnée dans le tableau 1) obtenu avec pour matrice l'acide dihydroxybenzoïque (DHB). Les signaux notés * sont les adduits disodés

La différence de masse entre deux ions successifs est égale à 152 amu, soit la masse correspondant à un résidu galloyle additionnel. La série principale correspond aux adduits monosodiés comme le montre la comparaison avec les masses molaires attendues pour les polymères (Tableau 19). Le pic de plus faible masse molaire est obtenu dans nos conditions d'analyse à $m/z = 519,06$ et est attribué à une molécule d'acide quinique substituée par deux groupements galloyles, tandis que celui de plus haute masse est détecté à $m/z = 1431,2$ et attribué à une molécules d'acide quinique substituée cette fois par huit unités galloyles. Une deuxième série d'ions (désignée par * sur la Figure 95) contribuant approximativement à hauteur de 25% au signal total, est détecté à 22 amu de plus que la série précédente, qui correspond donc aux adduits disodiés simplement chargés. A partir de ce spectre, le nombre moyen d'unités galloyles par molécule est estimé entre 4 et 5, qui correspond au signal d'intensité maximum ainsi qu'au milieu de la distribution de galloyles. La masse molaire moyenne en nombre (M_n) de cette fraction de tanins calculée à partir des intensités de chaque pic est de 860 g.mol^{-1} .

	MW	$[M+Na]^+$ calculé	$[M+Na]^+$ m/z détecté
<i>1G</i>	344,07	367,06	-
<i>2G</i>	496,08	519,08	519,06
<i>3G</i>	648,101	671,09	671,14
<i>4G</i>	800,11	823,1	823,18
<i>5G</i>	952,12	975,11	975,19
<i>6G</i>	1104,13	1127,12	1127,2
<i>7G</i>	1256,14	1279,13	1279,2
<i>8G</i>	1408,15	1431,14	1431,2

G = groupement galloyle

Tableau 19 : Composition de la fraction de Tara tanins estimée à partir du spectre MALDI-TOF

B. Fractions de tanins condensés

Dans le cas des tanins condensés, trois fractions différant par la nature de leurs unités constitutives et leurs degrés de polymérisation moyens ont été sélectionnées. La première est une fraction oligomérique de proanthocyanidines extraites de pépin de raisin (appelée OPC), caractérisée par la présence d'unités catéchine et épicatechine, certaines des unités épicatechine portant des résidus galloyles ($DP_m = 2,6$, 17.5% d'unités galloylées déterminés par thiolysé). Les deux autres sont des fractions proanthocyanidiques de pomme de degré de

polymérisation moyens 9,2 et 27,8 obtenu par thiolysse constituées de polymères d'épicatéchine majoritairement, la catéchine pouvant être trouvée en position terminale.

1. OPC

Le spectre MALDI-TOF de l'OPC présente plusieurs séries d'ions correspondant à des oligomères d'épicatéchine non galloylés, mono- et di-galloylés, constitués de deux à sept unités, et qui apparaissent sous formes d'adduits sodium et potassium (Figure 96).

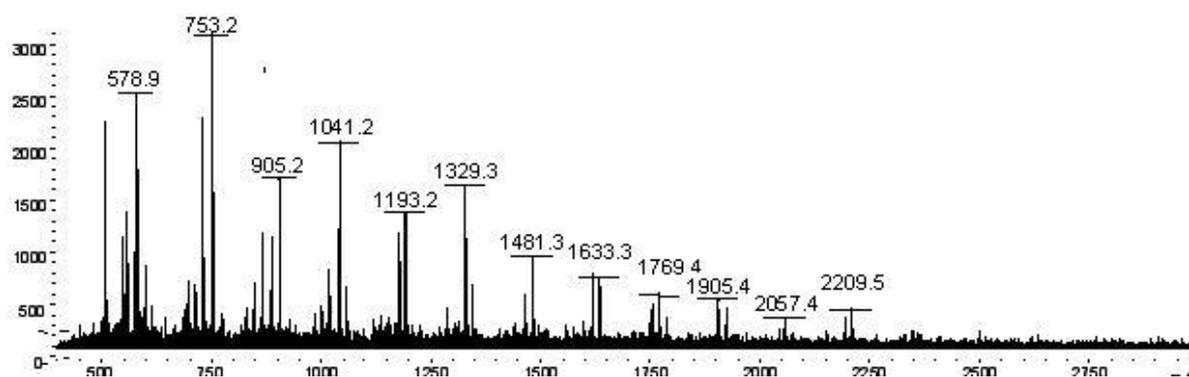


Figure 96 : Spectre MALDI-TOF de l'OPC (l'attribution des pics est donnée dans le tableau 2) obtenu avec pour matrice l'acide dihydroxybenzoïque (DHB).

Ces séries sont caractérisées par des signaux espacés de 288 amu entre les oligomères de catéchine ou épicatéchine, et de 152 amu avec les espèces galloylées correspondantes (Tableau 20). Notons que l'existence des adduits sodium et potassium pour les espèces galloylées complique l'interprétation du spectre, puisque le signal de l'adduit sodium d'un tanin de degré de polymérisation moyen n substitué par deux groupements galloyles est confondu avec celui de l'adduit potassium de l'espèce de degré de polymérisation moyen $n+1$ non galloylé. La masse molaire moyenne en nombre de cette fraction a été calculée à partir de l'intensité des pics du spectre et s'élève à 916 g. mol^{-1} .

	OPC		DP 9,2		DP 27,8				
	MW	[M+Na] ⁺ calculé	[M+K] ⁺ calculé	[M+Na] ⁺ m/z détecté	[M+K] ⁺ m/z détecté	[M+Na] ⁺ m/z détecté	[M+K] ⁺ m/z détecté		
<i>DP2</i>	578,13	601,12	617,22	-	X	X	-	-	-
<i>DP2 1G</i>	730,14	753,13	769,23	X	X	-	-	-	-
<i>DP3</i>	866,2	889,19	905,29	-	X	X	-	X	-
<i>DP3 1G</i>	1018,21	1041,2	1057,30	X	X	-	-	-	-
<i>DP4</i>	1154,26	1177,25	1193,35	-	X	X	-	X	X
<i>DP4 1G</i>	1306,27	1329,26	1345,36	X	X	-	-	-	-
<i>DP4 2G</i>	1458,28	1481,27	1497,37	X	X	-	-	-	-
<i>DP5</i>	1442,32	1465,31	1481,41	-	X	X	-	X	X
<i>DP5 1G</i>	1594,34	1617,33	1633,43	X	X	-	-	-	-
<i>DP5 2G</i>	1746,35	1769,34	1785,44	X	X	-	-	-	-
<i>DP6</i>	1730,39	1753,38	1769,48	-	X	X	X	X	X
<i>DP6 1G</i>	1882,4	1905,39	1921,49	-	X	-	-	-	-
<i>DP6 2G</i>	2034,41	2057,4	2073,5	X	X	-	-	-	-
<i>DP7</i>	2018,45	2041,44	2057,54	-	X	X	-	X	X
<i>DP7 1G</i>	2170,46	2193,45	2209,55	-	X	-	-	-	-
<i>DP7 2G</i>	2322,47	2345,46	2361,56			-	-	-	-
<i>DP8</i>	2306,51	2329,5	2345,60	-	-	X	-	X	X
<i>DP9</i>	2594,58	2617,57	2633,67	-	-	X	-	X	X
<i>DP10</i>	2882,64	2905,63	2921,73	-	-	X	-	X	X
<i>DP11</i>	3170,7	3193,69	3209,79	-	-	X	-	X	X
<i>DP12</i>	3458,76	3481,75	3497,85	-	-	X	-	X	X
<i>DP13</i>	3746,82	3769,81	3785,91	-	-	X	-	X	X
<i>DP14</i>	4034,88	4057,87	4073,97	-	-	-	-	X	-
<i>DP15</i>	4322,94	4345,93	4362,03	-	-	-	-	X	-

Tableau 20 : Composition des fractions de tanins condensés estimés à partir des spectres MALDI-TOF obtenus avec pour matrice l'acide dihydroxybenzoïque (DHB)

2. Tanins de pomme

Les séries d'ions caractérisant les deux fractions tanniques de pomme correspondent à des adduit potassium et/ou sodium d'oligomères d'épicatéchine, et les signaux les constituant sont espacés de 288 amu (Tableau 20).

Toutefois, aucune différence fondamentale ne permet de distinguer les deux fractions en terme de distribution en masses (Figure 97). Le spectre de la fraction de DPm 9,2 présente une série d'oligomères allant du DP 3 au DP 13, tandis que celui de la fraction de DP 27,8 présente des polymères dont les longueurs de chaînes varient de 2 à 15 unités monomériques.

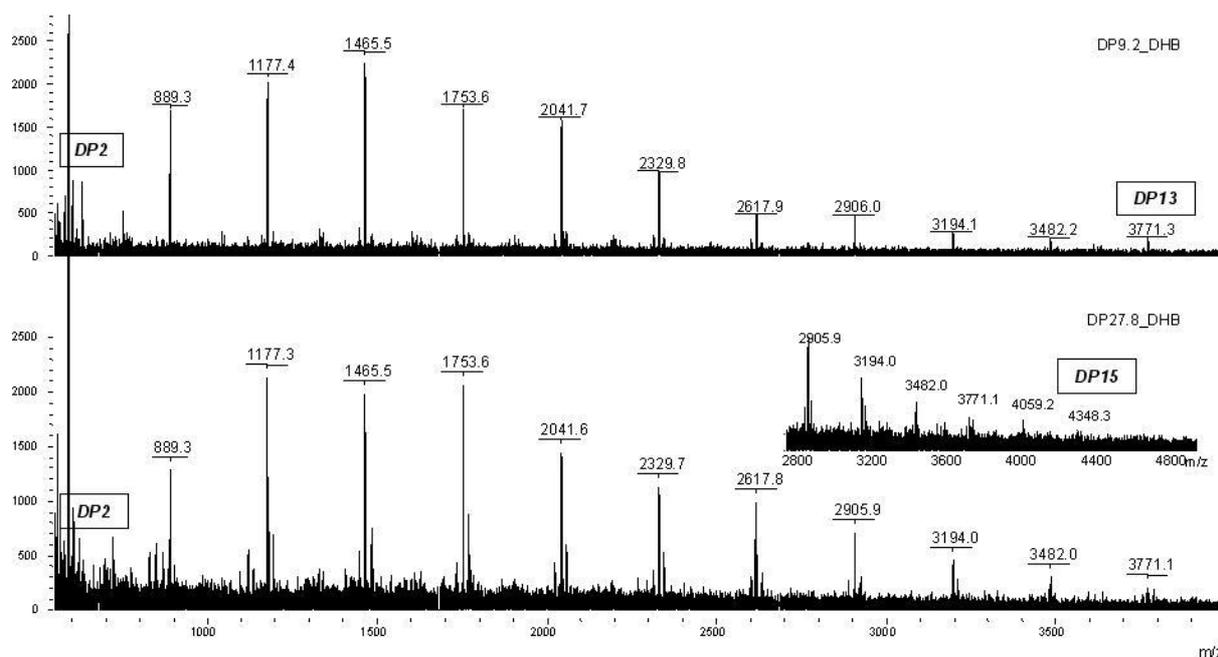


Figure 97 : Spectres MALDI-TOF des fractions de tannins condensés (l'attribution des pics est donnée dans le tableau 2).

Les masses moyennes en nombre calculées pour ces deux fractions sont respectivement de 1562 et 1908 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, au lieu des masses de 2652 et 8008 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ calculées à partir des données de thiolysse des fractions DPm 9,2 et DPm 27,8 respectivement. Ceci suggère une dérive des intensités, les signaux correspondant aux plus petites molécules étant supposés surexprimés par rapport aux autres. La plus faible intensité observée pour les molécules de grande taille pourrait résulter d'une désorption/ionisation défavorable et/ou d'une fragmentation des espèces plus lourdes, conduisant dans les deux cas à une surestimation des molécules de faible degré de polymérisation. Ces problèmes sont d'autant plus favorisés que la fraction de tanins étudiée est polydispense. Notre étude montre en effet que l'écart entre le masse molaire moyenne de la fraction atteinte par analyse du spectre de masse et celle calculée à partir des données de thiolysse croît avec le degré de polymérisation de la fraction. Le résultat est en accord avec des études antérieures montrant que les tanins de haute masse molaire sont mal détectés en spectrométrie de masse, et plus spécialement lorsqu'il s'agit de mélanges polydispenses de tanins de hauts degrés de polymérisation, dû au moins en partie à la fragmentation.¹⁶⁵

C. Conclusion

L'analyse directe de fractions de tannins par spectrométrie de masse MALDI-TOF apparaît donc utile pour caractériser la distribution en masses de mélanges de

proanthocyanidines oligomères, mais plus adaptée à l'étude de tanins de faibles masses molaires comme les Tara tanins. Cependant, la conclusion ne peut être définitive concernant cette classe de tanins, puisqu'aucune méthode de référence n'est disponible aujourd'hui. L'analyse directe des fractions de tanins devient clairement peu fiable quand la masse molaire moyenne augmente. Ainsi, nous avons envisagé d'employer les protéines comme agents de protection des tanins contre la fragmentation, en même temps que porteur de charge pour permettre la détermination de la distribution en masses des tanins de hauts degrés de polymérisation.

II. Analyse des complexes protéine-tanin par MALDI-TOF

A. Mise au point des conditions d'analyse

1. Sélection de la protéine

Les interactions protéine-tanin sont influencées à la fois par les propriétés du tanin et de la protéine. Les caractéristiques des protéines favorables à une forte interaction sont généralement une grande taille, ainsi qu'une structure ouverte et flexible.^{169, 170}

La première étape du travail consiste à sélectionner des protéines qui présentent une forte affinité pour les tanins, et qui sont détectables par spectrométrie de masse. Plusieurs protéines ont été testées de manière à couvrir une large gamme de masse, puisque les exigences pour avoir à la fois une forte interaction et un spectre de masse de bonne qualité sont à priori opposées (grande taille pour protéger les tanins de la fragmentation vs petite taille pour une bonne résolution). Disponibilité et prix ont été par ailleurs des critères essentiels dans cette sélection.

Par la suite, les conditions expérimentales ont été optimisées en faisant varier des paramètres tels que le ratio protéine : tanin, le taux de dilution des mélanges, et la nature de la matrice.

a) Mise en évidence des complexes protéine-tanin en condition d'excès de tanin

La serum albumine bovine (BSA), connue pour complexer les tanins,¹⁷¹ est la première protéine choisie. Les expériences ont tout d'abord été menées en présence d'un large excès d'OPC, correspondant à un ratio protéine : tanin de 1 : 300. Après 30 minutes

d'agitation, les mélanges de solutions de protéine et tanin sont centrifugés, faisant apparaître un culot solide. Le mélange de tanins et protéines en solution conduit donc à la formation de complexes solubles dans le surnageant et insolubles dans le culot. Leur proportion relative dépend de la concentration et de la taille des deux espèces en présence. Les complexes solubles sont favorisés en excès de concentration en protéine, tandis que les complexes insolubles se forment lorsque les tanins sont en excès.¹⁷²

Les complexes solubles représentent un problème analytique puisqu'ils ne sont détectables ni par spectrophotométrie UV-visible, ni par diffusion de lumière dynamique. Dans notre cas, les complexes solubles sont directement analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le surnageant a été prélevé puis filtré à travers un Centricon de 10 kDa. Le rétentat, qui contient la protéine libre et les complexes protéine-tanin, a été additionné d'une solution de matrice α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA). Son spectre de masse présente une large bosse non résolue à la suite du signal de la BSA qui pourrait correspondre à la distribution en masse des complexes BSA-OPC. Toutefois, aucune valeur m/z discrète correspondant à de tels complexes n'est relevable, lié au manque de résolution dans cette gamme de masses.

Le culot, redissout dans une solution aqueuse de diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 30% (v:v), présente un profil de masse similaire à celui obtenu pour la fraction soluble, et n'apporte donc pas d'information complémentaire. De plus, l'utilisation du DMSO pour préparer l'échantillon ralentit le séchage du dépôt sur la cible MALDI.

b) Essai de diverses protéines

En plus de la serum albumine bovine, trois autres protéines ont été testées : la β -caséine utilisée pour la clarification des vins, la myoglobine équine, et la β -lactoglobuline bovine connue pour se lier à de nombreuses molécules hydrophobes. Les complexes résultant de l'interaction entre l'OPC et la β -lactoglobuline, la β -caséine, ou la myoglobine n'ont pas été détectés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cependant, les complexes β -caséine-OPC ont pu être visualisés par spectrométrie de masse ESI-TOF (résultats non montrés).

2. Sélection de la matrice et de la technique de dépôt

La technique dépôt sur cible MALDI a été évaluée en testant différentes matrices au cours des étapes d'optimisation de l'étude des complexes BSA-OPC, étude complétée par

l'essai d'une méthode de dépôt double couche (première couche d'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique dans un mélange méthanol/acétone, seconde couche d'acide sinapique dans du méthanol aqueux. Le meilleur rapport signal/bruit a été obtenu avec l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique et le dépôt selon la technique de la goutte séchée.

3. Limite de l'essai en présence d'un excès de tanins

Un mode opératoire identique a été suivi avec la fraction de pomme de DPM 9,2 remplaçant l'OPC. Les spectres MALDI-TOF du surnageant et du culot présentent une « bosse » à la suite du signal de la BSA libre, similaire à celle obtenue avec l'OPC. Toutefois, aucune différence significative n'est détectée dans l'allure des bosses représentant les complexes BSA-OPC et BSA-DPM 9,2, contrairement à ce qui est attendu au vu de la différence de degré de polymérisation moyen entre les deux fractions. Cette observation peut s'expliquer par la présence des tanins en large excès dans le mélange qui, dans les deux cas, satureraient les sites de liaisons disponibles sur la protéine.

B. Optimisation du ratio protéine : tanin

Afin de valider l'utilisation des protéines pour déterminer la distribution en masses de fractions de tanins, il a donc été nécessaire d'ajuster le rapport protéine : tanin, de façon à détecter des complexes de plus faibles stoechiométries, et favoriser particulièrement ceux comptant un tanin par molécule de protéine (stoechiométrie 1 :1).

1. Affinement des conditions d'analyse : Etude sur la fraction de DP 9,2

Pour cela, les solutions de rapport molaires protéine : tanin 10 :1, 1 :1, et 1 :10 ont été préparées à partir de la fraction DPM 9,2. La première conséquence de l'augmentation du ratio protéine : tanin a été de rendre tous les complexes solubles quel que soit le ratio considéré, ce qui a permis d'obtenir une concentration des complexes en solution plus importante que celle disponible avec le rapport 1 :300. De plus, différents niveaux de dilution de la solution déposée ont été testés, et le spectre le plus exploitable a été obtenu en abaissant par dilution la concentration de la solution à 1mg.mL^{-1} avant dépôt, conditions conservées dans les expériences ultérieures. Enfin, l'acide *trans*-3,5-diméthoxy-hydroxycinnamique s'est avéré être la matrice la plus appropriée aux nouveaux ratios.

La Figure 98 présente les spectres MALDI-TOF obtenus avec les différents ratios molaires protéine : tanin.

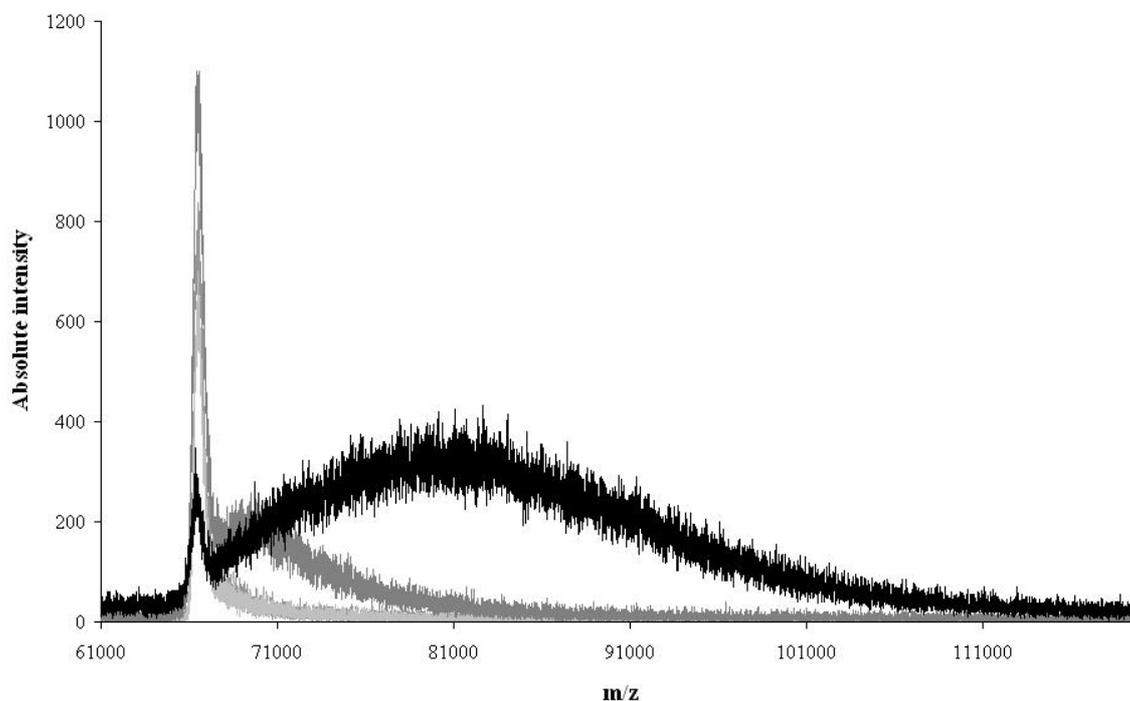


Figure 98 : Spectres MALDI-TOF en mode positif linéaire de la BSA seule (gris clair), et des mélanges BSA-DPm 9,2 10 : 1 (gris moyen), BSA-DPm 9,2 1 : 1 (gris foncé), et BSA-DPm 9,2 1 : 10 (noir) obtenus avec pour matrice l'acide *t*-3,5-diméthoxy-hydroxycinnamique.

On remarque tout d'abord que les spectres de la BSA seule et du mélange 10 : 1 sont largement superposés, démontrant que ce ratio n'est pas approprié. Ceci n'implique pas que les complexes ne se soient pas formés mais plutôt qu'ils ne peuvent être détectés faute de résolution. Les spectres de masse obtenus avec les deux autres ratios montrent que l'augmentation de la proportion de tanins engendre un élargissement de la bosse ainsi qu'un déplacement du maximum vers les hauts m/z. Dans le cas du mélange 1 : 1, la différence de masse entre le maximum de la bosse et le signal de la BSA libre est estimée à 2672 Da (Figure 99), résultat en accord avec la masse molaire moyenne de la fraction DPm 9,2 évaluée par thiolyse à 2652 Da (Tableau 21).

	Analyse directe des fractions par thiolysse		Analyse directe des fractions par MALDI-TOF		Analyse des complexes BSA-tanin par MALDI-TOF Différence entre le sommet de la “bosse” et le signal de la BSA libre			
	Masse molaire moyenne	DPm/DGm	M _n	DPm/DGm	Masse molaire moyenne		DPm/DGm	
					série 1	série 2	série 1	série 2
<i>Tara tanin</i>	-	-	860	4,5	950	982	5,0	5,2
<i>OPC</i>	820	2,6	916	2,9	1552	1531	4,9	4,8
<i>DPm 9,2</i>	2652	9,2	1562	5,4	2672	2894	9,3	10,0
<i>DPm 27,8</i>	8008	27,8	1908	6,6	3199	3157	11,1	11,1

Tableau 21 : Evaluation du degré de polymérisation moyen de chacune des fractions à partir de l'observation des signaux de la BSA libre et des complexes

Cet accord indique que les complexes de stoechiométrie 1 : 1 représentent la population majoritaire à côté de la BSA libre, et donc que la bosse reflète la distribution en masses de la fraction de tanins (Figure 99). D'autre part, le déplacement du maximum de la bosse vers les hautes masses avec le mélange 1 : 10 (tanins en excès) suggère l'existence de complexes avec de plus hautes stoechiométries. En considérant le sommet de la bosse à 81000 Da, la stoechiométrie moyenne est estimée à 5 molécules de tanins par molécule de protéine.

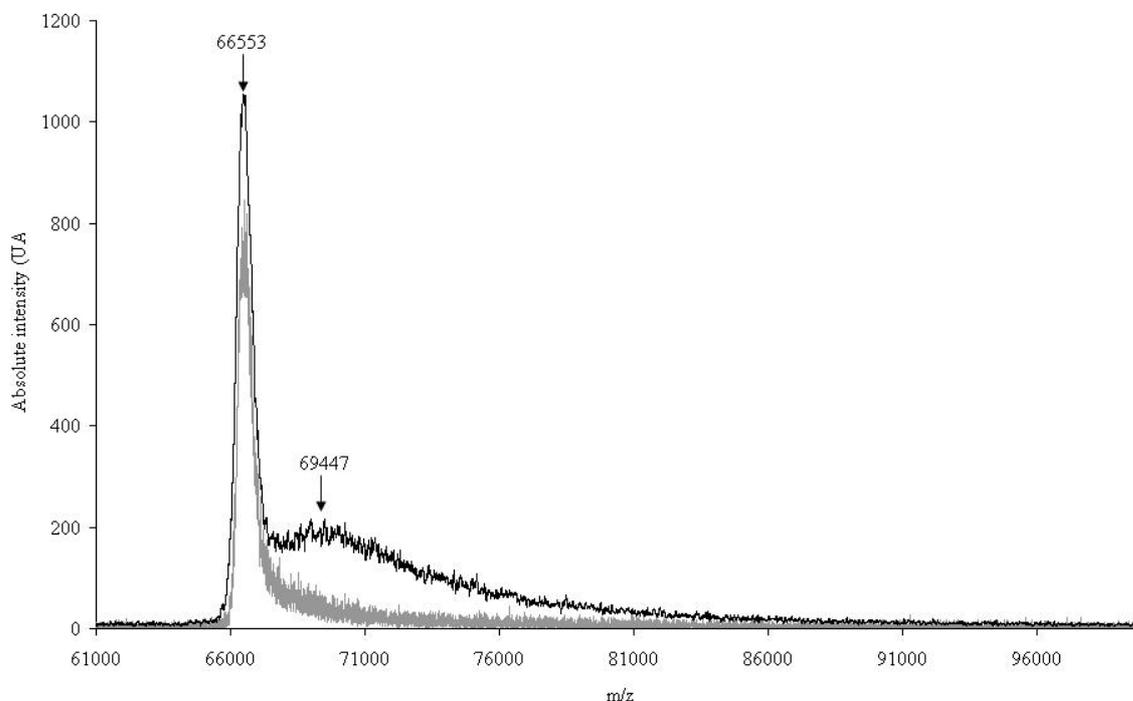


Figure 99 : Spectre MALDI-TOF en mode positif linéaire de la BSA seule (gris clair), et de la BSA en présence de la fraction de DP 9,2 (noir)

Par la suite, les expériences sont conduites avec le rapport molaire 1 : 1 puisque, dans ces conditions, le signal des complexes est cohérent avec le degré de polymérisation moyen de la fraction de tanins calculé à partir de la méthode standard (thiolyse).

2. Validation avec les autres fractions tanniques

La validation de ces premiers résultats est envisagée par l'étude d'autres fractions de tanins dans les conditions optimales définies au-dessus, et qui sont : ratio molaire protéine : tanin fixé à 1 : 1, 1mg.mL⁻¹ de BSA dans la solution additionnée à la matrice, et acide *trans*-3,5-dihydroxycinnamique comme matrice. Il est à noter que tous les spectres MALDI-TOF ont été acquis à partir des solutions de complexes diluées mis à part l'analyse de la fraction DPm 27,8 qui requiert de travailler avec la solution non diluée.

Les expériences ont été doublées.

Tous les spectres MALDI présentent une bosse couvrant des valeurs m/z plus hautes que le signal de la BSA libre, mais selon la fraction de tanins utilisée, l'allure précise de cette courbe est modifiée (Figure 100).

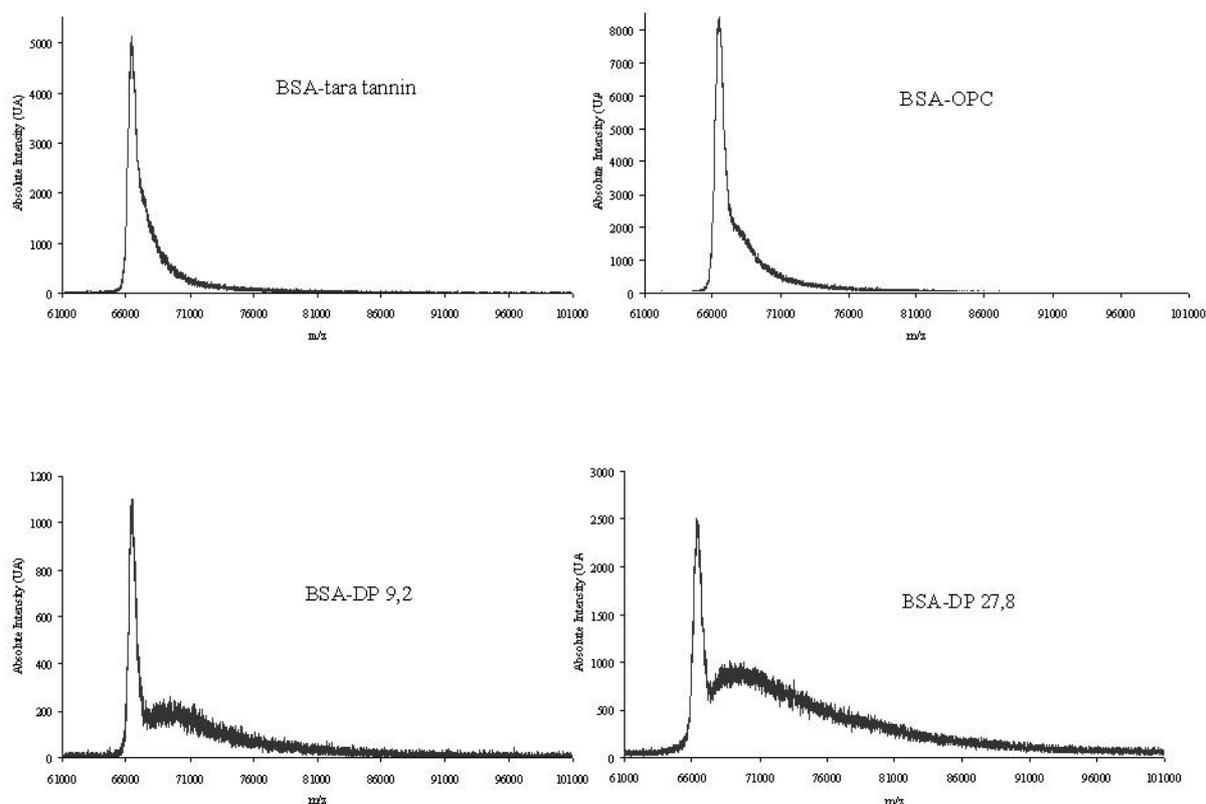


Figure 100 : Spectres MALDI-TOF des complexes 1 : 1 de BSA-Tara tanin, BSA-OPC, BSA-DPm 9,2, et BSA DPm 27,8

Lorsque le degré de polymérisation moyen de la fraction augmente, la bosse couvre une gamme de masses plus large, et le sommet de la bosse est déplacé vers des rapports m/z plus élevés. Pour chaque expérience a été calculée la différence de masse entre le sommet de la bosse et le signal de la BSA libre. Les masses molaires estimées par cette méthode ont été comparées aux valeurs obtenues par analyse directe des fractions par MALDI-TOF, et pour les tanins condensés, également aux résultats de thiolysse. Les valeurs sont rassemblées dans le Tableau 21.

A partir de celles-ci, le degré de polymérisation moyen (DPm), ou le degré de galloylation moyen (DGm) dans le cas de tanins hydrolysables, est calculé de la façon suivante :

$$DPm = (aMW-2)/288$$

$$\text{ou } DPm = (aMW-2)/[288*0.825+440*0.175] \text{ pour l'OPC} \quad (1)$$

$$DGm = (aMW-192)/152 \quad (2)$$

Une bonne reproductibilité a été obtenue entre les deux séries d'expériences. Les masses molaires calculées à partir de l'analyse MALDI-TOF des complexes BSA-tanins sont équivalentes aux les valeurs dérivées des données de thiolysse pour la fraction de DP 9,2, mais légèrement supérieures dans le cas des fractions oligomériques. A contrario dans le cas de polymères plus longs, les valeurs obtenues par analyse MALDI-TOF sont beaucoup plus faibles que celles attendues d'après les résultats de thiolysse (11,1 au lieu du DPm de 27,8 attendu). Ces résultats suggèrent que le traitement brut du spectre MALDI-TOF tel qu'il a été fait jusqu'ici présente des limites quant à l'estimation du degré de polymérisation moyen d'une fraction de tanins et n'apporte pas d'information sur sa polydispersité.

III. Développement d'une méthode de traitement du signal et modélisation de la distribution en masses

Les paramètres caractérisant les polymères que sont la masse molaire moyenne en nombre (M_n), la masse molaire moyenne en poids (M_w), et l'indice de polydispersité (PI), peuvent être calculés à partir du spectre de masse des complexes BSA-tanin. Dans notre cas, le spectre de masse donne directement accès aux paramètres caractérisant les complexes BSA-tanin, à partir desquels sont déduits ceux associés à la fraction de tanins seule par

soustraction de la masse molaire moyenne en nombre de la BSA (hypothèse faite que tous les signaux représentent des complexes de stoechiométrie 1 : 1).

La première étape du traitement consiste à sélectionner une gamme de masse englobant à la fois le signal de la BSA libre et celui des complexes. La limite inférieure a été fixée arbitrairement à $m/z = 61000$ dans tous les cas, tandis que la limite supérieure est déterminée à chaque nouvelle expérience, et définie comme étant le point de retour du signal à la ligne de base.

Afin d'éliminer les variabilités liées au dépôt et au rapport signal/bruit, les moyennes mobiles sur 30 points des spectres bruts de BSA seule et de complexes BSA-tanin ont été établies. Ce degré de lissage permet en effet de limiter le bruit, tout en modifiant le moins possible l'allure du spectre brut. De plus, pour s'affranchir de la variabilité de la ligne de base, la valeur minimum de celle-ci dans la zone du spectre brut précédent le signal de la BSA (entre $m/z = 61000$ et $m/z = 65000$) a été soustraite sur l'ensemble de la gamme de masses considérée. Pour illustration, la comparaison entre le spectre brut représentant le mélange BSA-DPm 9,2 et le spectre traité par la méthode ci-dessus est présentée sur la Figure 101.

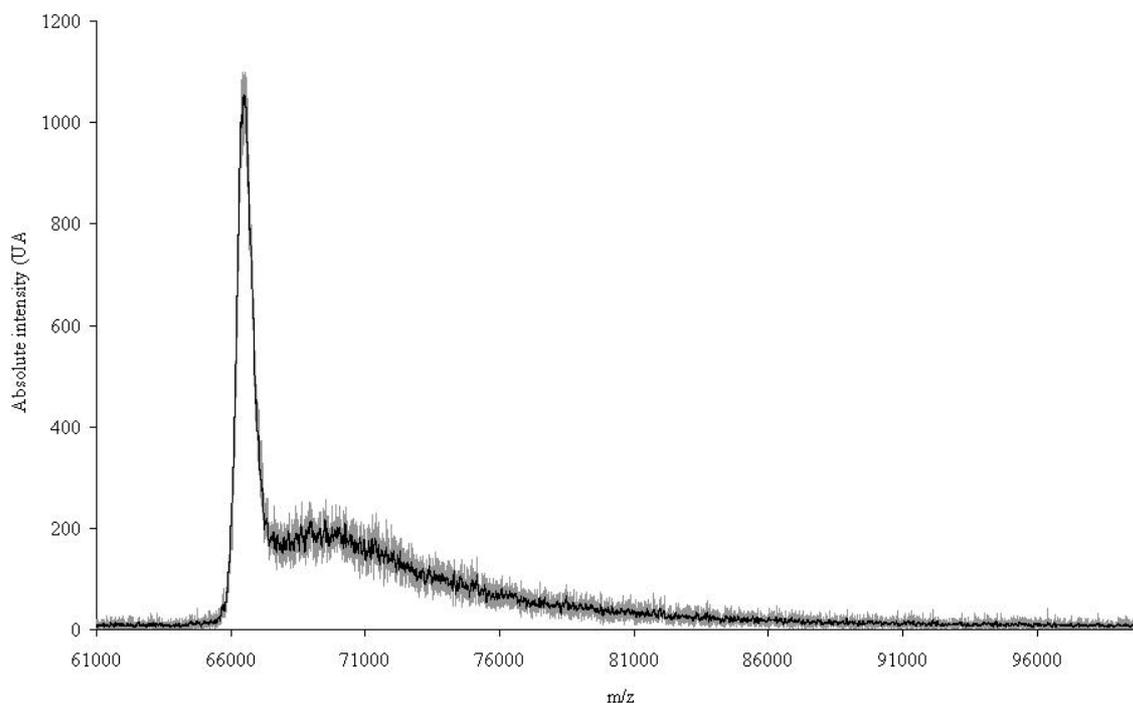


Figure 101 : Spectre brut (gris) et courbe traitée des complexes 1 : 1 de BSA-DP 9,2

Pour chaque fraction de tanins, le spectre de masse a été traité de cette manière, et les valeurs M_n et M_w ont été calculées pour la BSA et les complexes BSA-tanin. Les résultats obtenus pour les deux séries d'expériences sont rassemblés dans le Tableau 22. La masse

molaire moyenne en nombre de la fraction de tanin correspondante a ensuite été calculée en soustrayant la valeur M_n de la BSA à celle des complexes.

	Série 1		Série 2	
	M_n (kDa)	M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w (kDa)
<i>BSA</i>	66946	66961	67197	67218
<i>BSA-tara tanin</i>	67870	67935	68235	68378
<i>BSA-OPC</i>	67961	68095	68358	68515
<i>BSA-DPm 9,2</i>	69596	69759	69985	70216
<i>BSA-DPm 27,8</i>	75010	76472	75008	76304

Tableau 22 : Masse molaire moyenne en nombre (M_n) et masse molaire moyenne en masse (M_w) de la BSA et des complexes BSA-tanin

Dans le cas des tanins condensés de pomme, les valeurs M_n et DPm calculées à partir de ce traitement du spectre MALDI-TOF sont en accord total avec celles déterminées par thiolysse (Tableau 23). Au contraire, les valeurs obtenues pour l'OPC sont plus élevées que les résultats donnés par la méthode standard. La fraction d'OPC est probablement contaminée par des produits d'oxydation des tanins formés soit lors de la purification de la fraction, soit lors du stockage. Ces tanins oxydés qui résultent du couplage oxydatif des tanins natifs, ont ainsi des chaînes polymériques plus longues en moyenne que les non-oxydés, et sont aussi susceptibles de s'accrocher à la BSA. Cependant, ils ne sont pas pris en compte dans les résultats de thiolysse puisque les liaisons biphenyle interflavoniques les constituant sont résistantes au clivage en conditions acides⁵⁶, ce qui peut expliquer la différence entre les résultats de MALDI-TOF et de thiolysse.

	Analyse directe		Analyse des complexes BSA-tanins par MALDI-TOF					
	Masse molaire	DPm/DGm	Traitement mathématique					
			M_n		DPm/DGm		Indice de polydispersité	
			série 1	série 2	série 1	série 2	série 1	série 2
<i>Tara tannin</i>	860*	4,5	924	1038	4,8	5,6	1,07	1,14
<i>OPC</i>	820**	2,6	1015	1161	3,2	3,7	1,13	1,13
<i>DPm 9,2</i>	2652**	9,2	2650	2788	9,2	9,7	1,07	1,08
<i>DPm 27,8</i>	8008**	27,8	8064	7811	28	27	1,18	1,17

* Analyse directe de la fraction par MALDI-TOF

** Analyse directe de la fraction par thiolysse

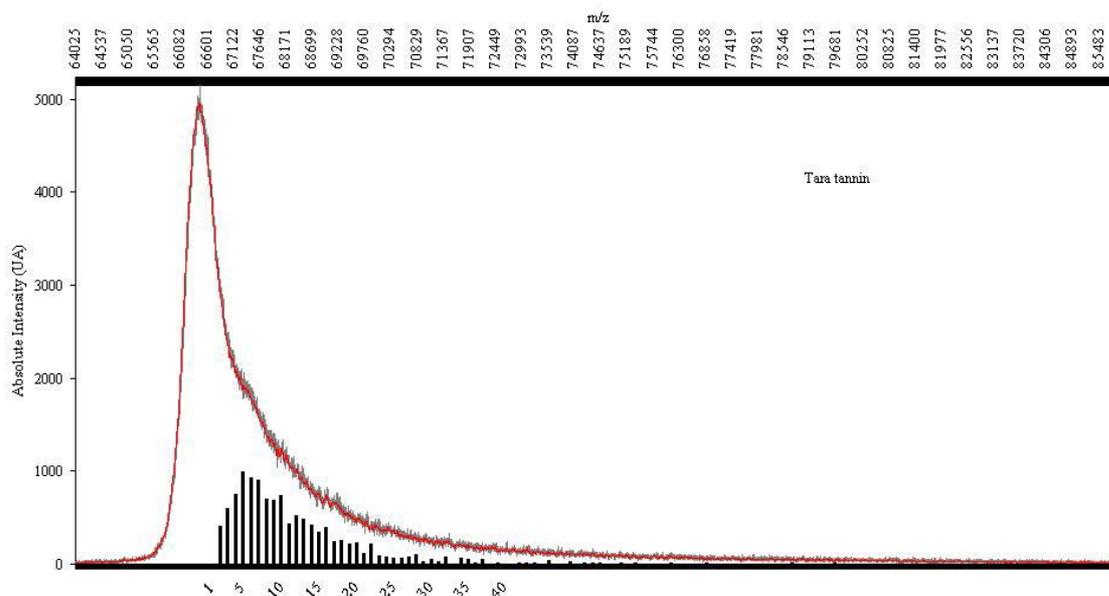
Tableau 23 : M_n , DPm et PI de chaque fraction de tanins calculés à partir du spectre de masse MALDI-TOF des complexes BSA-tanin

Les paramètres calculés à partir de l'étude des complexes BSA-Tara tanin sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par analyse directe de la fraction par MALDI-TOF.

Ceci suggère que la distribution en masse donnée par analyse directe dérive quelque peu de la réelle composition de la fraction, certainement dû à l'existence de fragmentation (clivage des liaisons esters qui libère des espèces de plus faible masse), ou à l'existence de complexes présentant des stoechiométries supérieures à 1 : 1, comme observé précédemment pour un autre gallotanin, le pentagalloylglucose.¹⁶⁸

Afin de mieux visualiser la distribution en masses de chaque fraction de tanins, un histogramme est construit à partir des valeurs discrètes de m/z correspondant à la masse de complexes BSA-tanin, auxquelles sont associées les intensités, la contribution de la BSA étant soustraite. Les histogrammes représentant la distribution en masse de la fraction de Tara tanin et de DPM 9,2 sont présentés sur la Figure 102, mettant en évidence respectivement des polymères contenant jusqu'à 30 unités galloylées, ou 52 unités flavanols.

(a) Tara tanin



(b) Fraction DPM 9,2

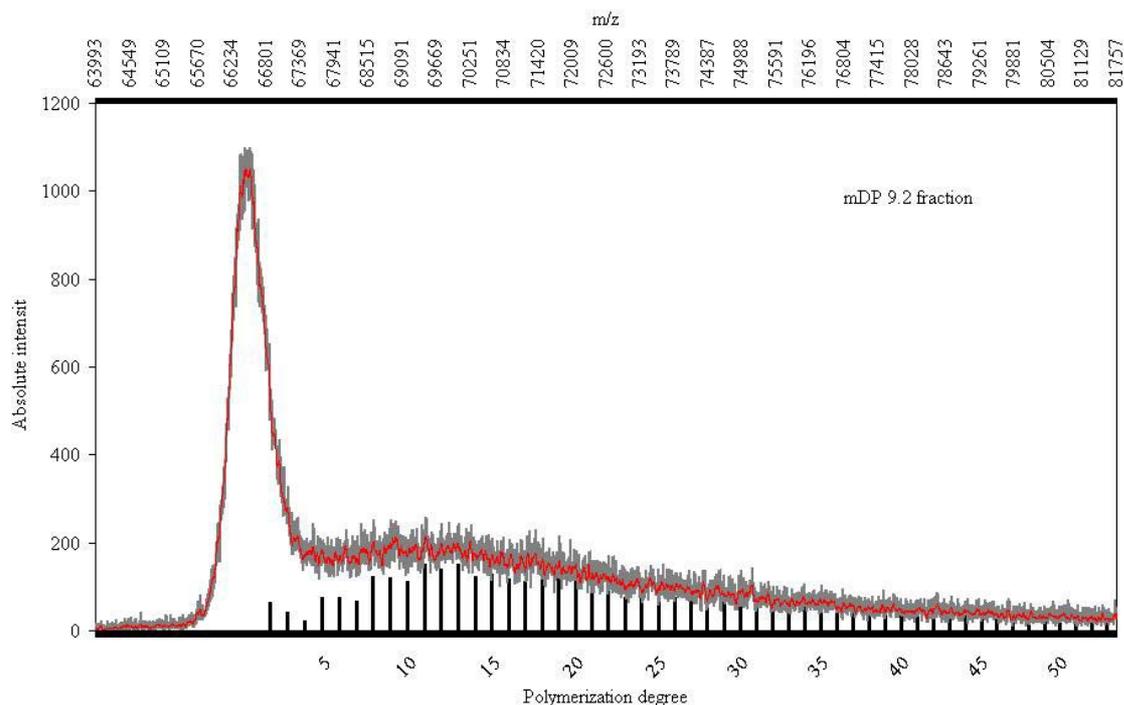


Figure 102 : Spectres bruts (gris foncé), moyenne mobile avec suppression du bruit de fond (rouge) des complexes BSA-tanins et visualisation de la distribution en masses des tanins (histogrammes) dans le cas des Tara tanins et de la fraction de DPM 9,2

IV. Conclusion

L'analyse de complexes BSA-tanin par MALDI-TOF est une nouvelle méthode pour la caractérisation des tanins de haute masse molaire, qui sont très mal détectés par analyse directe en spectrométrie de masse, dû à des phénomènes de fragmentation et d'agrégation. La méthode a été appliquée et validée sur des fractions de tanins condensés dont le degré de polymérisation moyen varie de 2,6 à 27,8, grâce à l'accord entre les valeurs de M_n obtenues par cette approche et par la méthode standard de thiolysse.

Elle constitue une alternative simple et rapide aux méthodes basées sur une dépolymérisation en présence d'un agent nucléophile, suivie d'une séparation CLHP qui nécessite une calibration préalable des produits de réactions pour permettre la détermination de la masse molaire moyenne de la fraction polymérique. En plus de cette dernière valeur, la méthode permet de définir les paramètres caractérisant la distribution en masse de la fraction, et concurrence des techniques classiques qui demandent plus de temps comme la chromatographie d'exclusion stérique. A ces fins, les signaux de masse des complexes BSA-tanin de stoechiométrie 1 : 1 ont été utilisés. Toutefois, comme la technique CPG, la méthode

souffre d'un manque de solutions de calibration adaptées pour valider les paramètres de distribution des fractions polymériques.

Pour appliquer cette méthode à la caractérisation des tanins susceptibles d'être présents sous forme partiellement oxydée dans les vins de Champagne, une étape de développement supplémentaire consisterait à optimiser les conditions d'analyse de complexes BSA-tanins oxydés, à partir de tanins oxydés en solutions modèles.

Chapitre II

Suivi d'oxydation des polyphénols et étude des tanins de haut DP par Résonance Magnétique Nucléaire

Ce chapitre a fait l'objet d'un poster (annexe 2) et d'une communication orale dans des congrès internationaux

L'analyse chromatographique avec détections UV-visible et spectrométrie de masse de la solution de catéchine oxydée a montré ses limites au niveau de la caractérisation des produits d'oxydation dont seule une fraction minoritaire semble accessible à l'analyse. En particulier, la polydispersité en taille et/ou en type de structures issues de l'oxydation n'est pas mise en évidence par le couplage CLHP-DAD-SM. Pour palier à ces difficultés, il est apparu nécessaire de disposer d'une technique de caractérisation structurale très performante qui ne requiert pas nécessairement le couplage à la chromatographie liquide. La résonance magnétique nucléaire (RMN) nous est apparue une technique prometteuse. Contrairement à l'analyse RMN classique dont le but est la caractérisation structurale d'une molécule pure, l'analyse d'un milieu complexe n'a pas pour objectif d'appréhender les molécules une à une, mais plutôt d'étudier des familles de molécules. Le fait que la technique ne soit pas séparative permet de s'affranchir de pertes de composés, problème susceptible d'être rencontré en CLHP avec l'éventuelle fixation de produits d'intérêt sur la précolonne. Par ailleurs, la rapidité d'une analyse $1D^1H$ nous autorise à envisager le suivi de cinétiques d'oxydation rapides telles que celles associées à des oxydations chimiques.

La RMN propose également une approche globale originale avec en particulier une expérience basée sur la mesure des coefficients de diffusion des molécules : Cette expérience appelée Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) semble appropriée à l'étude des molécules de haute masse molaire comme celles qui pourraient être formées à l'issue de l'oxydation de

la catéchine ou des tanins que nous n'avons pas pu mettre en évidence dans les vins analysés jusqu'ici.

Avant d'envisager l'analyse des vins, un travail de développement de la méthode sur l'oxydation de polyphénols en solution modèle a été mené, l'objectif étant de vérifier la capacité de la technique RMN à répondre à la problématique d'oxydation posée.

La catéchine et l'acide caféique ont été utilisés comme modèles, afin de mettre en évidence l'apport de cette approche par rapport aux techniques d'analyse usuelles.

Le travail a été réalisé en collaboration avec Marc-André Delsuc au Centre de Biochimie Structurale de Montpellier.

I. Suivi d'oxydation par RMN du proton : Apport et limites

A. Caractéristiques spectrales des deux molécules modèles par RMN du proton

1. Catéchine

La Figure 103 présente le spectre RMN 1D¹H de la catéchine 5mM dans l'eau acidifiée à pH 3 (TFA) obtenu avec 10 % d'eau deutérée.

La suppression du signal de l'eau utilisée dans l'expérience est « l'excitation sculpting ».⁹⁸ Cette technique est extrêmement efficace et permet de travailler à très basse concentration de soluté dans l'eau, mais présente la particularité de fortement distordre l'intensité des signaux en fonction de leur position dans le spectre. En particuliers les signaux sont d'autant plus fortement atténués qu'ils sont placés près du signal, ce qui explique la faible intensité des protons H2 et H3 de l'hétérocycle. Une légère distorsion de phase est aussi observée pour les signaux présentant un fort couplage homonucléaire comme les protons H4 de la catéchine.

De l'éthanol est ajouté dans l'échantillon qui permet la calibration du spectre à partir des valeurs de déplacements chimiques des protons de l'éthanol dans l'eau deutérée (D₂O) proposées par Goettlieb¹⁷³ : un triplet à 1,17 ppm intégrant pour les protons du groupe CH₃, et un quadruplet à 3,65 ppm pour les protons du groupe CH₂, auxquels est associée une constante de couplage unique de 7,2 Hz. Ces caractéristiques des protons de l'éthanol sont validées en particulier dans les vins de Porto analysés en solvant D₂O et référencées avec le 3-

(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-D₄ (TSP) .¹⁷⁴ Le spectre 1D¹H de la catéchine est donc référencé grâce à ces deux déplacements chimiques.

Le spectre, outre le pic résiduel de l'eau vers 5 ppm, est constitué de 3 groupes de signaux correspondant aux différents types de protons contenus dans la molécule. Des moins aux plus déblindés, sont repérés les protons de l'hétérocycle (cycle C), ceux du noyau phloroglucinol (cycle A), et enfin ceux du catéchol (cycle B).

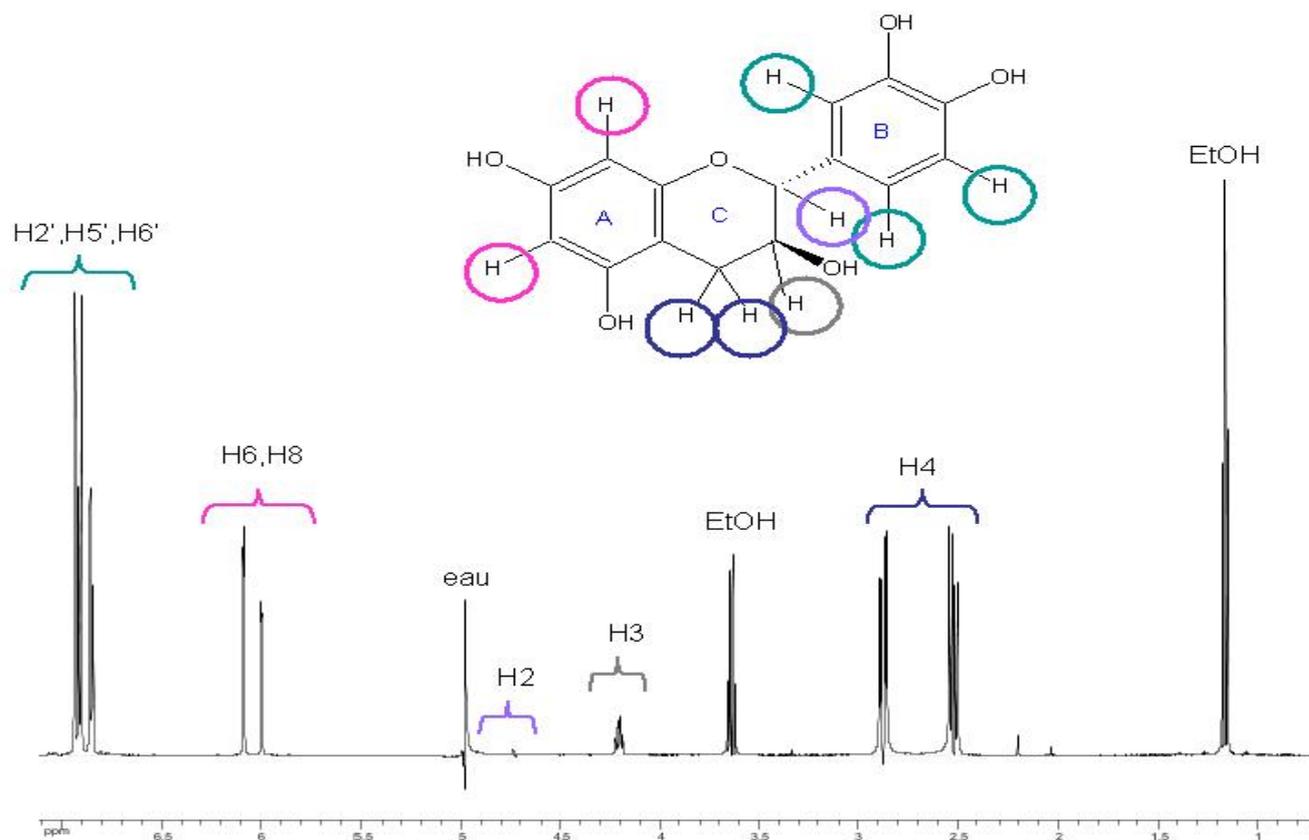


Figure 103 : Spectre 1D¹H de la catéchine obtenu en milieu aqueux pH = 3 contenant 10% d'eau deutérée

Les attributions des signaux des protons de la catéchine, établies après étude des spectres HSQC et HMBC correspondants (résultats non montrés), sont rassemblées dans le Tableau 24.

	Déplacement chimique (ppm)	Nature du signal	Constantes de couplage (Hz)
<i>H4</i>	2,52	dd	16,7 ; 8,2
	2,88	dd	16,3 ; 5,5
<i>H3</i>	4,21	q	16,78 ; ND ; ND
<i>H2</i>	4,73	d	8,7
<i>H6</i>	6,0	s	-
<i>H8</i>	6,09	s	-
<i>H6'</i>	6,85	d	8,4
<i>H5'</i>	6,93	d	8,4
<i>H2'</i>	6,9	s	-

Tableau 24 : Déplacements chimiques et couplages des protons de la catéchine en milieu aqueux pH = 3 contenant 10% d'eau deutérée

2. Acide caféique

Le spectre $1D^1H$ de l'acide caféique dans l'eau acidifiée est présenté dans la Figure 104. L'éthanol ajouté est utilisé comme référence. Compte tenu du nombre réduit de protons portés par ce composé, l'interprétation du spectre est simplifiée.

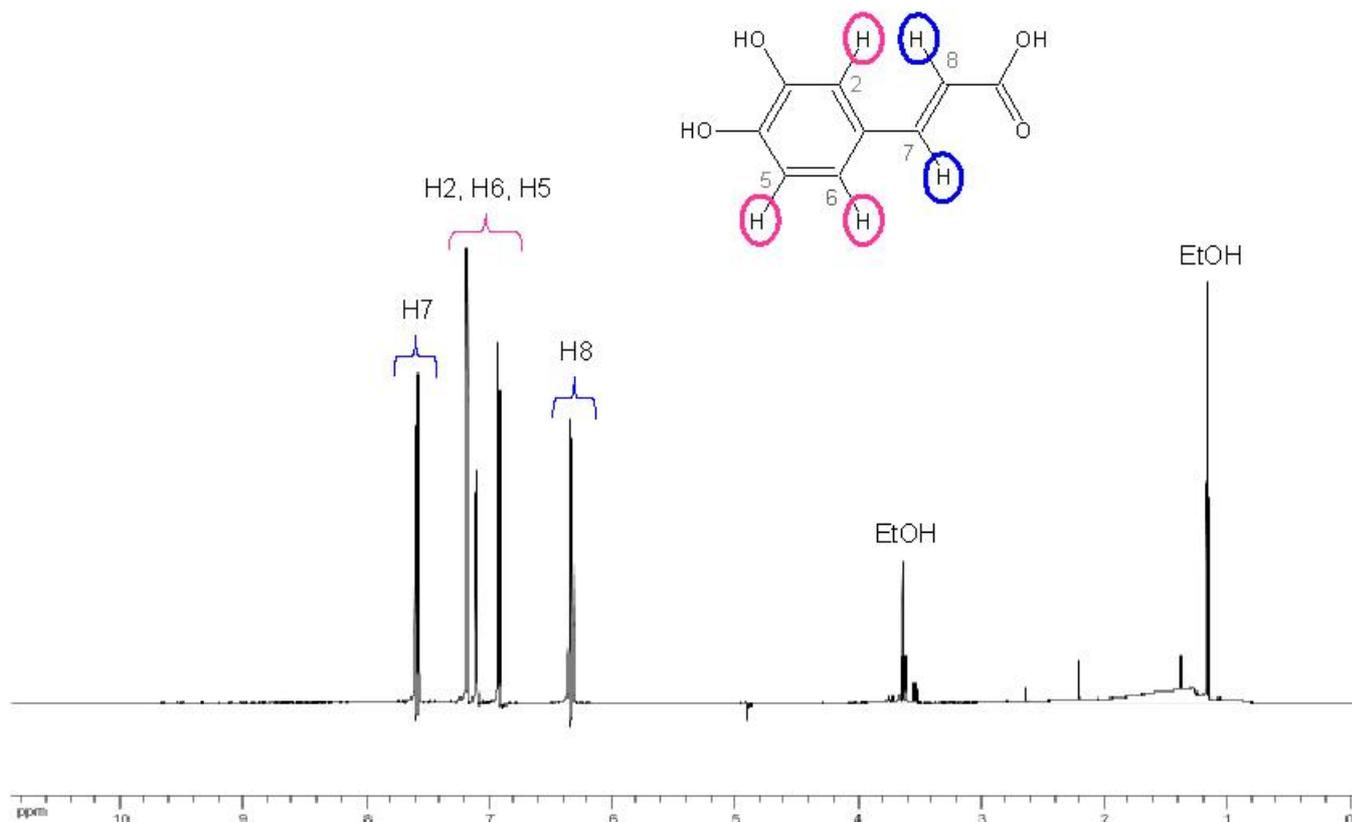


Figure 104 : Spectre 1D¹H de l'acide caféique obtenu en milieu aqueux pH = 3 contenant 10% d'eau deutérée

La méthode d'attribution des signaux est analogue à celle utilisée pour caractériser les protons de la catéchine, et les résultats sont rassemblés dans le Tableau 25. Les constantes de couplages entre protons en positions *trans* ou *ortho* sont respectivement de 15,9 et 8,3 Hz, tandis

	Déplacement chimique (ppm)	Nature du signal	Constantes de couplage (Hz)
H2	7,17	s	-
H5	6,92	d	8,3
H6	7,10	d	8,3
H7	7,60	dd	15,9 ; 2,8
H8	6,33	d	15,9

Tableau 25 : Déplacements chimiques et couplages des protons de l'acide caféique

Certains couplages associés à une faible valeur de constante ne sont pas repérés tel que celui entre H2 et H6.

B. Cinétique d'oxydation de polyphénols modèles

1. Oxydation de la catéchine

La réaction d'oxydation est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe pour l'analyse CLHP-DAD-SM sauf que le periodate est préparé dans de l'eau deutérée, ce qui fait au final 10 % d'eau deutérée dans l'échantillon analysé. Le temps de latence entre le déclenchement de la réaction d'oxydation par ajout de la solution d'oxydant et l'introduction du tube dans l'appareil RMN, est d'environ 1 min30s et difficilement compressible. La cinétique d'oxydation de la catéchine est alors suivie pendant deux heures, avec un temps d'acquisition pour chaque spectre de 12 secondes.

Sur le premier spectre $1D^1H$ de la solution réactionnelle de catéchine, référencé grâce aux traces d'éthanol présentes, on observe, en plus des signaux de la catéchine résiduelle, l'apparition d'une multitude de nouveaux signaux d'intensités beaucoup plus faibles correspondant à des produits d'oxydation (Figure 105). La modification des déplacements chimiques s'explique par une variation de l'environnement des protons portés par les produits d'oxydation. Parmi les signaux correspondant à des produits d'oxydation, on note les signaux repérés Q (quinone), Ox_f (produit d'oxydation final), et Ox_t (produit d'oxydation transitoire) sur le spectre dont les cinétiques d'évolution ont pu être caractérisées et seront discutées par la suite.

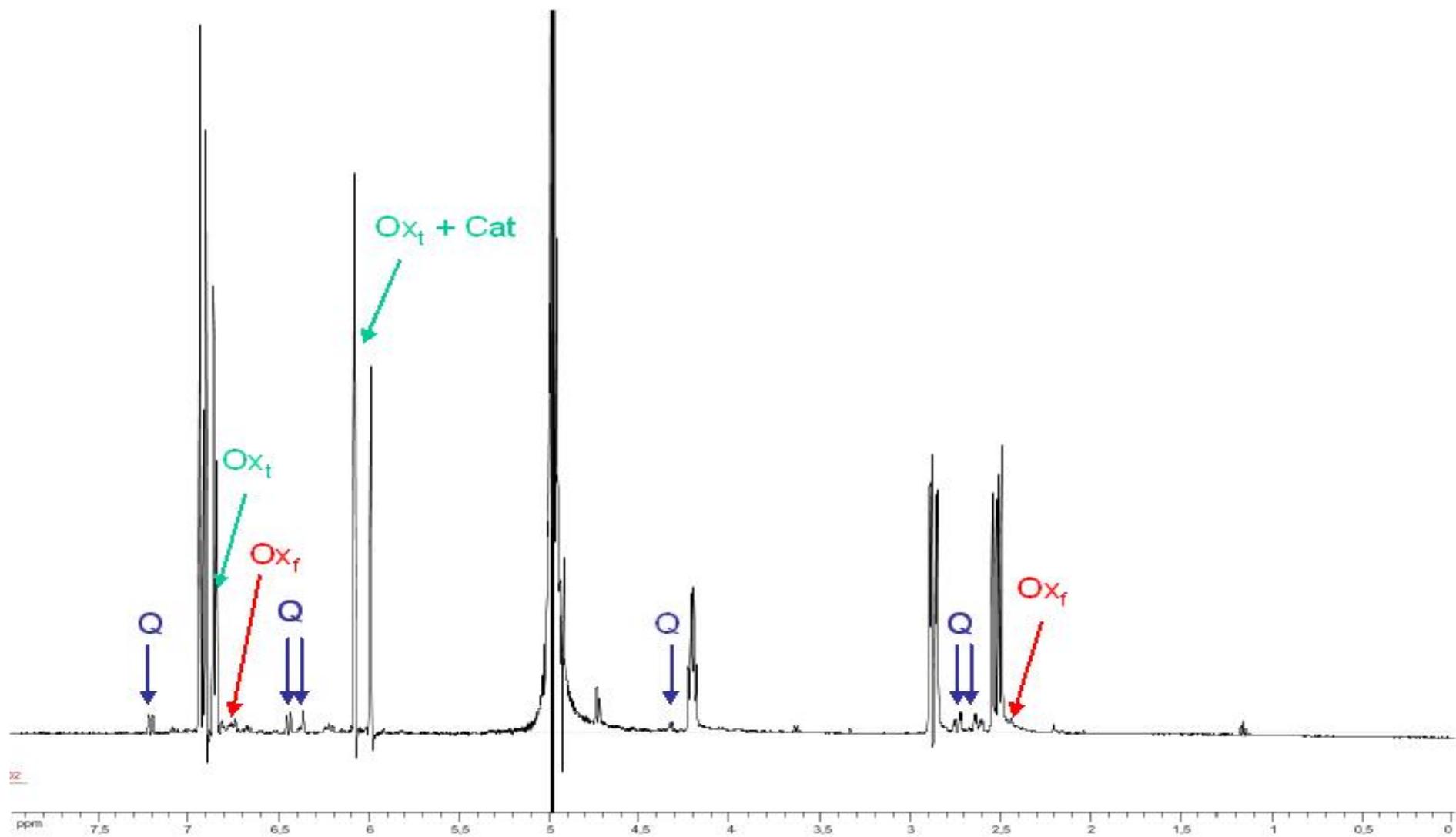


Figure 105 : Spectre 1D¹H de la solution réactionnelle de catéchine acquis 1 min 30 après le début de l'oxydation par NaIO₄

a) Cinétique de disparition de la catéchine

L'extraction de la cinétique d'oxydation de la catéchine à partir de l'évolution de l'intensité des protons H4 est présentée sur la Figure 106. Cette cinétique met avant tout en évidence une disparition extrêmement rapide mais non totale de la catéchine. Après seulement quelques minutes de réaction, il ne reste en effet dans le milieu réactionnel que 30 % environ de la catéchine initiale, quantité qui n'évolue plus significativement pendant l'heure et demie d'oxydation. Ce résultat est comparable à la quantité de catéchine résiduelle dans le milieu estimée à 35 % par CLHP (cf Partie 2 chapitre II), d'autant plus que cette dernière valeur était surestimée, conséquence de la coélution de la catéchine avec un dimère d'oxydation.

La proportion de catéchine consommée est encore largement supérieure à la quantité de catéchine oxydable par le periodate de sodium présent initialement au ratio molaire de un dixième, ce qui indique que l'oxydation de la catéchine est une réaction autoentretenu.

Cependant, le fait qu'elle ne disparaisse pas totalement lors de la réaction d'oxydation pourrait suggérer que les produits d'oxydation formés deviennent plus réactifs que la catéchine elle-même.

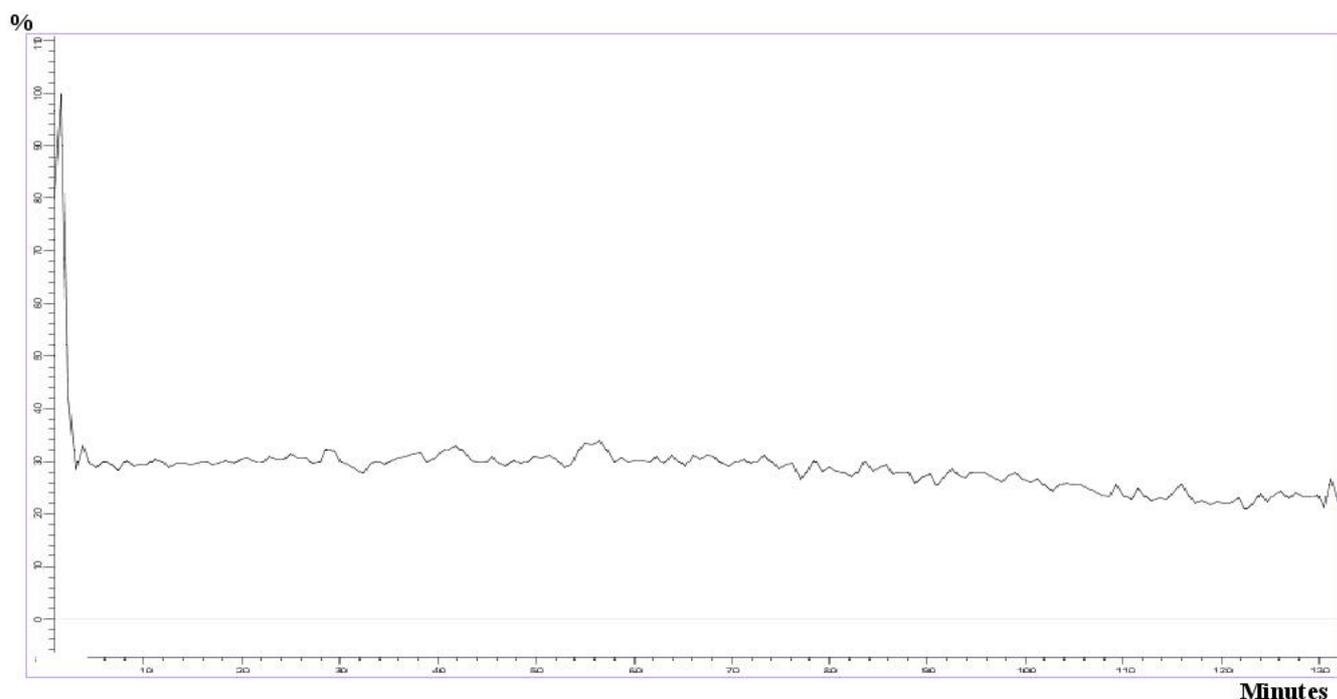


Figure 106 : Cinétique de disparition de la catéchine évaluée à partir des H4

b) Visualisation d'une espèce quinonique

L'extraction des cinétiques des signaux repérés par leurs déplacements chimiques sur le spectre 1D proton (Figure 105) permet de mettre en évidence une ou des espèces transitoires qui apparaissent lors de la première minute d'oxydation et disparaissent après seulement 8min30s (Figure 107). Le temps de demi-vie est estimé à 4 minutes.

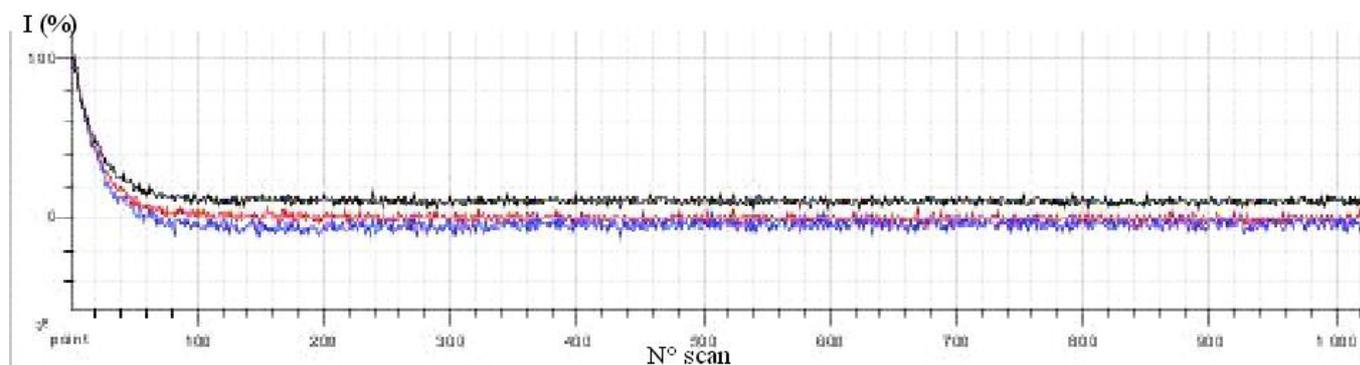


Figure 107 : Cinétique d'évolution de la quinone

La superposition des cinétiques d'évolution des différents protons suggère qu'il s'agit d'un seul et unique composé dont les caractéristiques spectrales sont rassemblées dans le Tableau 26.

	Déplacement chimique (ppm)	Nature du signal	Constante de couplage (Hz)
<i>H4</i>	2,62	dd	16,7 ; 5,6
	2,74	dd	16,7 ; 4,5
<i>H3</i>	4,32	q	ND
<i>H6 ou H8</i>	6,37	s	-
<i>H2' ou H5'</i>	6,45	d	10,9
<i>ou H6'</i>	7,21	d	11,3

Tableau 26 : Caractéristiques spectrales des protons de la quinone

Etant donné le mécanisme d'oxydation de la catéchine, l'hypothèse la plus vraisemblable est que ce produit transitoire est une quinone. Cependant, les résultats ne nous permettent pas de préciser s'il s'agit de la quinone primaire de catéchine ou bien de la quinone secondaire formée à partir d'un oligomère. En effet, seul un signal de proton du cycle A sur les deux attendus dans le cas de la quinone primaire, et deux signaux de protons du cycle B sur les trois sont attribuables sur le spectre. Il est donc possible que cette quinone soit une quinone secondaire. Toutefois on ne peut exclure qu'il s'agisse de la quinone primaire de

catéchine, d'une part parce que les signaux manquants peuvent être simplement masqués par ceux plus intenses de la catéchine, d'autre part parce que si l'on considère que les produits d'oxydation sont plus réactifs que la catéchine, leurs quinones sont d'autant plus difficilement détectables. Une façon de répondre à cette question serait de caractériser la molécule par sa masse molaire, mais sa réactivité est telle qu'une expérience DOSY, de par sa durée, n'est pas envisageable. Par ailleurs, une expérience d'oxydation similaire mais utilisant l'oxydant chimique et la catéchine en quantités équimolaires a été réalisée dans le but d'obtenir uniquement de la quinone dans le milieu et faciliter ainsi la caractérisation de la structure, mais on observe immédiatement un précipité qui interdit l'analyse par RMN 1D¹H.

c) Hypothèses de voies réactionnelles

A la vue des résultats sur les cinétiques de disparition de la catéchine et de l'espèce quinonique, il semble que des voies réactionnelles privilégiées existent.

Durant les six premières minutes, une partie de la catéchine est oxydée par NaIO₄ en quinone, qui réagit sur une molécule de catéchine réduite pour former les dimères : deux molécules sont impliquées lors de cette réaction et la quantité de catéchine chute donc brutalement dans le milieu réactionnel. Les dimères formés entrent alors en compétition avec la catéchine soit par rapport à la réaction d'addition nucléophile : le dimère réagit sur une quinone de catéchine pour former un trimère, et dans ce cas on observe un ralentissement de la disparition de catéchine ; soit par rapport à l'oxydation : on peut imaginer que l'oxydant oxyde directement les dimères et donc plus la catéchine, ou que les dimères sont d'abord oxydés par la quinone de catéchine dans un processus d'oxydation croisée qui régénère de la catéchine puis piégés par la catéchine résiduelle ou par un autre dimère, et dans ce cas, tout se passe comme si il n'y avait pas d'évolution de la quantité de catéchine.

d) Caractérisation de différents types de produits d'oxydation à partir de leur cinétique

L'extraction des cinétiques correspondant à différents déplacements chimiques met en évidence différents types de produits d'oxydation.

La première catégorie rassemble des produits d'oxydation qui s'accumulent au cours du processus d'oxydation (notés Ox_f pour produit d'oxydation final sur la Figure 105) pour atteindre un plateau après 1h30 d'oxydation. Les cinétiques extraites à 6,75 et 2,47 ppm présentées sur la Figure 108 en sont le reflet. On note en outre que les évolutions de ces deux signaux sont superposables, ce qui suggère que les protons qu'ils représentent appartiennent

aux mêmes molécules. D'après l'attribution des protons proposée par Guyot et al.⁵⁶ dans le cas de dimères de catéchine, le signal à 2,47 ppm peut être associé aux protons H4 portés par des unités dont le cycle D (noyau A de l'unité inférieure) est impliqué dans une liaison interflavanique. Il semble donc cohérent que le phénomène de polymérisation s'accompagne d'une augmentation de l'intensité de ce signal. Le signal à 6,75 ppm correspond au déplacement chimique d'un proton porté par le cycle B.

Quant aux cinétiques extraites à 6,91 et 6,09 ppm, elles indiquent la présence de produits transitoires, notés Ox_t sur la Figure 105, dans le milieu réactionnel. Plus précisément, la première est une cinétique caractéristique d'évolution d'un produit intermédiaire avec une formation rapide et une disparition lente, alors que la seconde est une combinaison de la cinétique de disparition de la catéchine et de l'évolution du produit transitoire.

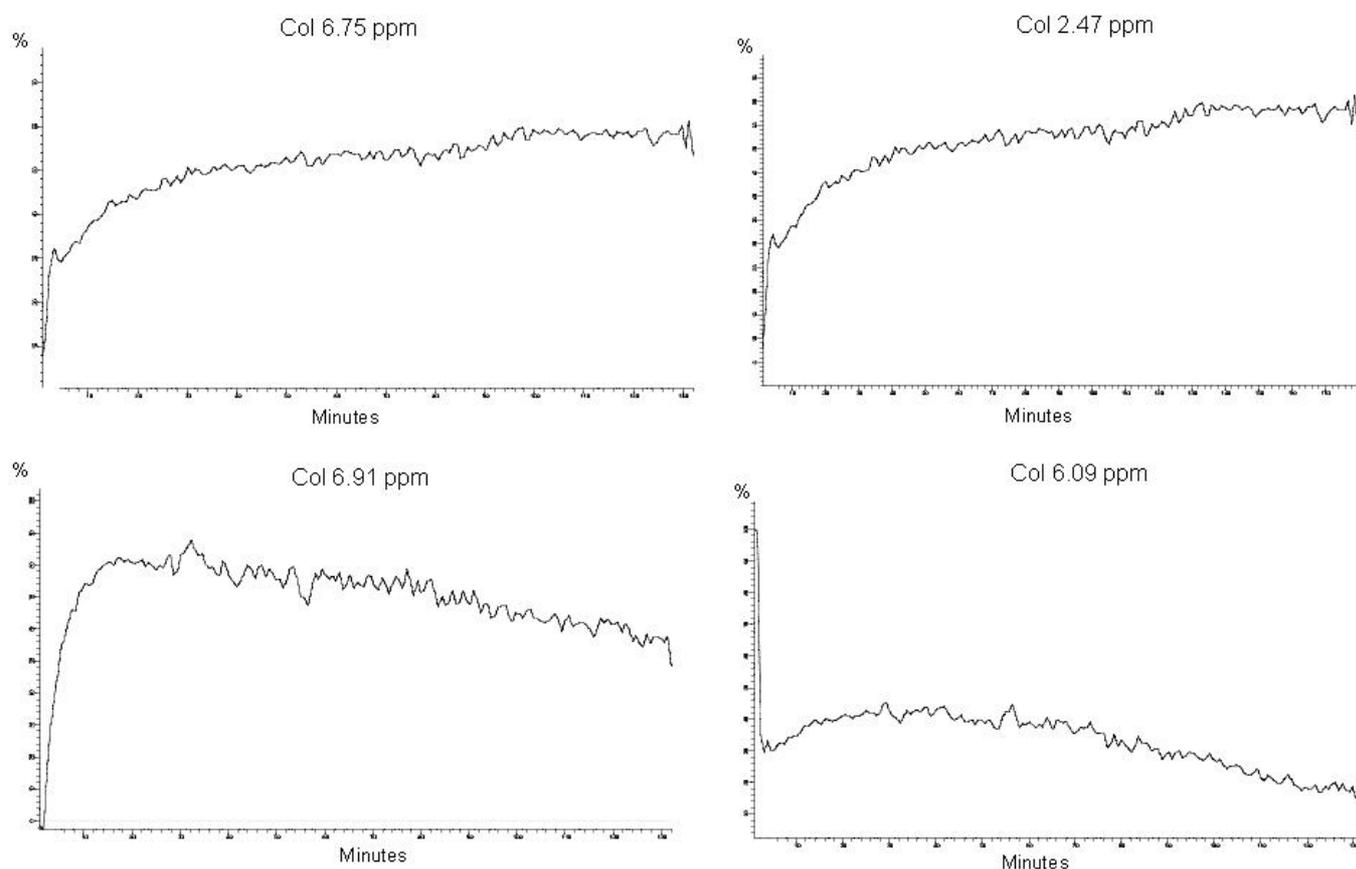


Figure 108 : Cinétiques d'évolution de produits d'oxydation de la catéchine

2. Application à l'oxydation de l'acide caféique

La cinétique d'oxydation de l'acide caféique est suivie dans les mêmes conditions que celle de la catéchine. Afin d'observer une évolution notable par RMN, la proportion d'oxydant

NaIO₄ a été fixée à 1 molécule d'oxydant pour 3,2 molécules de polyphénol, soit une valeur 3 fois plus grande que celle utilisée pour la catéchine. La solution d'une couleur jaune soutenue introduite 1min30s après le début de la réaction est caractérisée par le spectre 1D¹H présenté sur la Figure 109. Outre les signaux attribués à l'acide caféique, seuls quelques signaux supplémentaires de très faible intensité sont observés. Ce résultat, totalement différent de ce qui est observé pour la catéchine, indiquerait non seulement que la quinone d'acide caféique est moins réactive que celle de la catéchine, mais également qu'elle évolue selon un nombre de voies réactionnelles réduit. De tels résultats sont en accord avec une étude antérieure montrant qu'un nombre restreint de produits (quatre) est formé à pH = 3,6 à partir de la quinone d'acide caféique après quatre heures d'incubation.⁵⁵

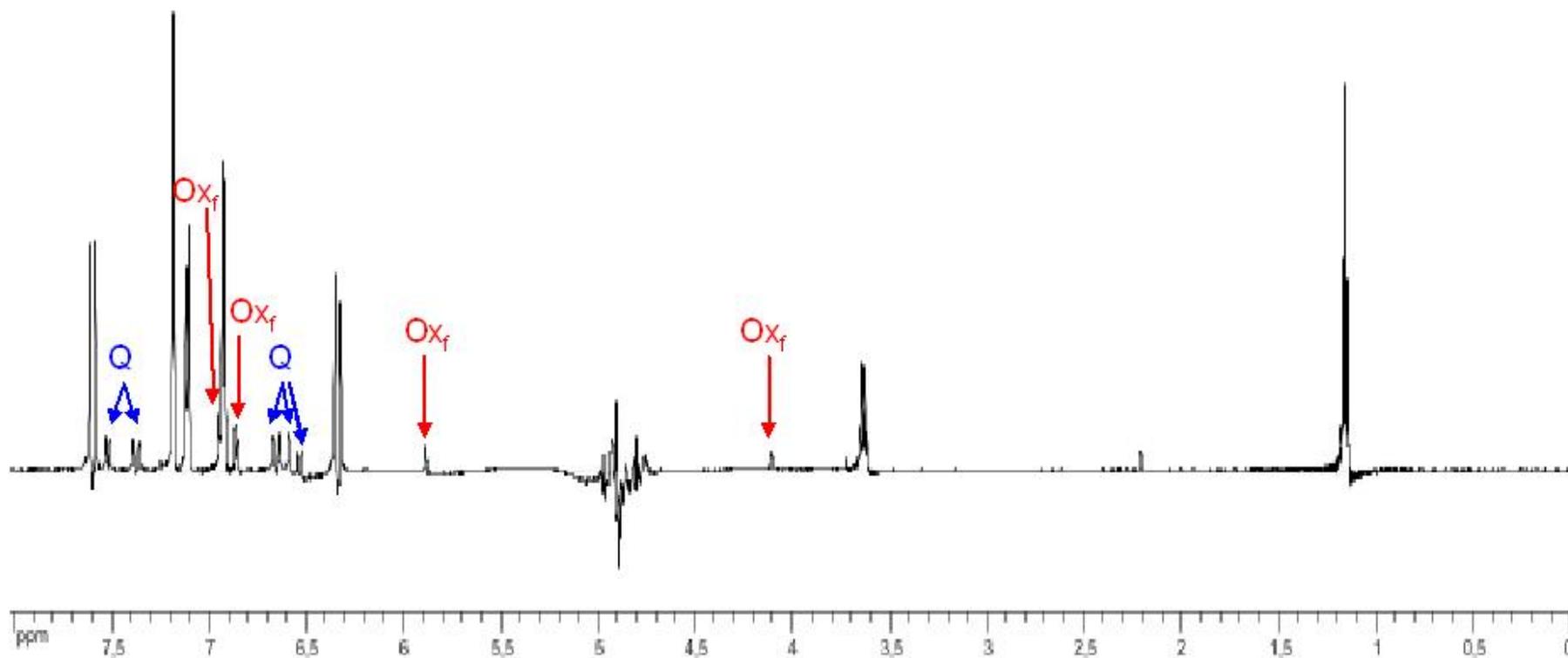


Figure 109 : Spectre 1D¹H de la solution réactionnelle d'acide caféique acquis 1 min 30 après le début de l'oxydation par NaIO₄

a) Evolution de l'acide caféique

La cinétique de disparition de l'acide caféique par oxydation est très lente, et seule une faible part de ce qui a été mis initialement est consommé. Après quelques minutes de réaction, l'acide caféique résiduel est estimé entre 80 et 85 %, quantité qui n'évolue plus par la suite. La proportion d'acide caféique ayant réagi (entre 15 et 20 %) est donc très inférieure à la proportion initiale de NaIO₄ (31 %). La superposition de signaux des produits d'oxydation avec ceux de l'acide caféique pourrait expliquer cette différence.

b) Espèce quinonique

Les protons de la quinone d'acide caféique sont caractérisés par les déplacements chimiques et constantes de couplages rassemblés dans le Tableau 27. La nature des signaux, les déplacements chimiques et constantes de couplage sont en accord avec les travaux de Fulcrand et al.⁵⁵.

	Déplacement chimique (ppm)	Nature du signal	Constantes de couplage (Hz)
H2	6,60	s	-
H5	6,55	d	10,5
H6	7,53	d	10,5
H7	7,38	d	16,7
H8	6,67	d	16,7

Tableau 27 : Déplacements chimiques et constantes de couplages de la quinone d'acide caféique

Par analogie avec l'évolution de l'espèce quinonique issue de l'oxydation de la catéchine, on observe un composé assimilable à une quinone, qui se forme très rapidement et disparaît totalement après 13 minutes d'oxydation de l'acide caféique (Figure 110). La demi-vie de ce composé est de 5 minutes environ.

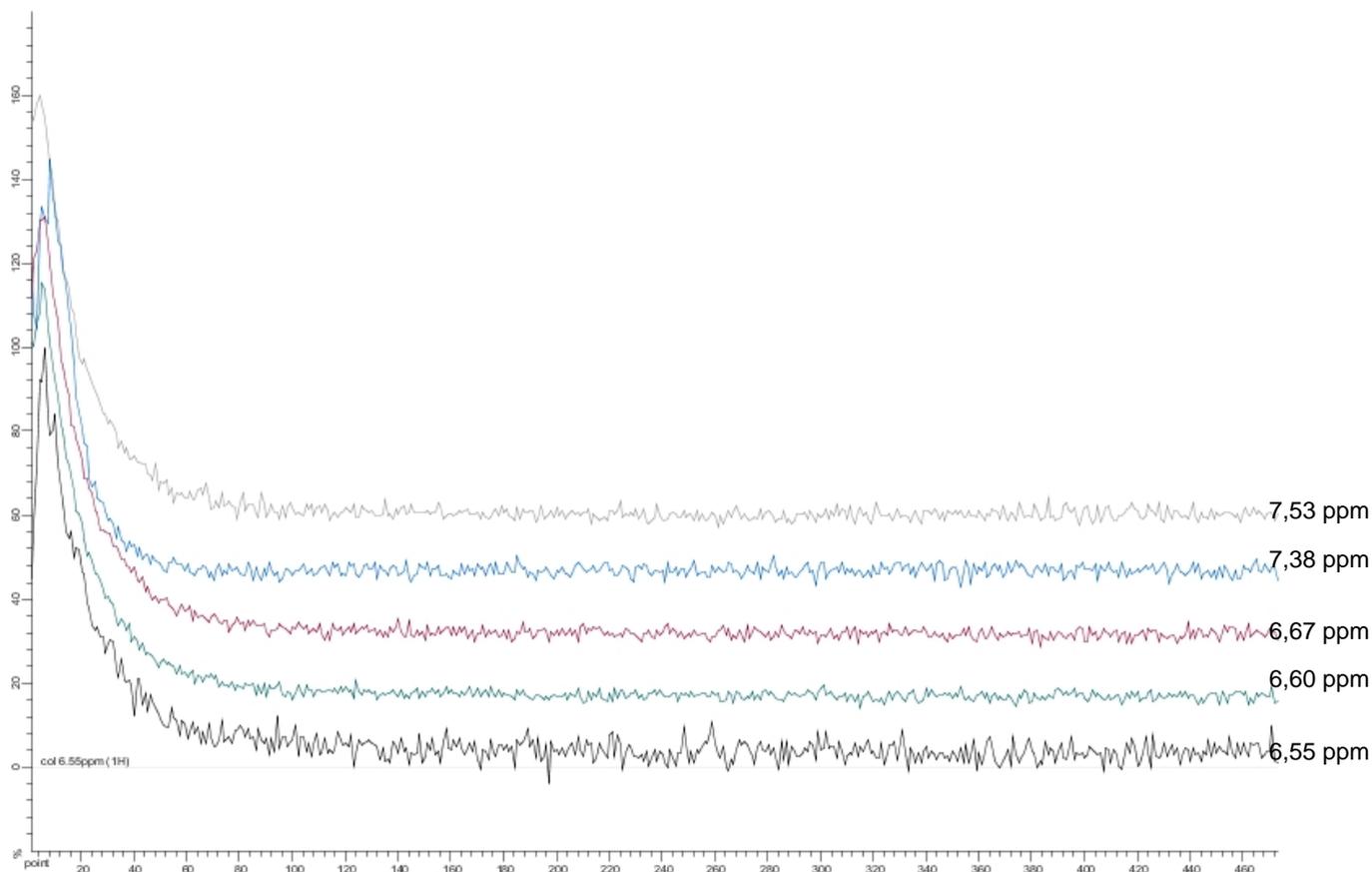
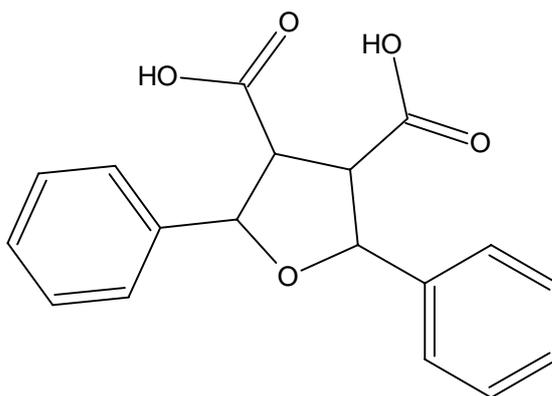


Figure 110 : Superposition des cinétiques d'évolution des protons de la quinone (en décalé pour une meilleure lecture)

c) Produits d'oxydation

Une série de produits d'oxydation majeurs apparaît rapidement dans le milieu réactionnel, définie par quatre signaux à 4,11, 5,87, 6,85 et 6,96 ppm aux cinétiques d'évolution identiques (Figure 112). Aucun des produits mis en évidence par Cilliers⁵⁹ ne présente un déplacement chimique vers 4 ppm. Au contraire l'étude de Fulcrand et al.⁵⁵ a permis d'identifier un produit d'oxydation de l'acide caféique dont une partie des protons présentent des déplacements chimiques analogues mais des multiplicités de signaux différentes. Le signal à 3,7-3,73 ppm relevé dans cette étude antérieure pourrait correspondre à celui relevé à 3,73 ppm, mais sa faible intensité sur nos spectres ne nous a pas permis d'extraire la cinétique pour la comparer à celle des quatre autres signaux. Le signal à 5,6 ppm ne trouve cependant pas de correspondant sur notre spectre.



	Déplacement chimique (ppm)	Nature du signal	Constantes de couplage (Hz)
<i>H3</i>	3,7-3,73	dd	3,3-10
<i>H4</i>	4,0-4,07	dd	8,6-10
<i>H2</i>	5,6	d	3,4
<i>H5</i>	5,79	d	8,5
<i>Harom</i>	6,7-6,79	m	-

Figure 111 : Caractérisation des protons d'un des produits d'oxydation mis en évidence par Fulcrand et al.⁵⁵

Par ailleurs, on peut remarquer que cette cinétique est quasiment inverse de la cinétique de la quinone, avec un plateau atteint après 13 minutes de réaction, ce qui suggère que la quinone évolue suivant une voie réactionnelle préférentielle.

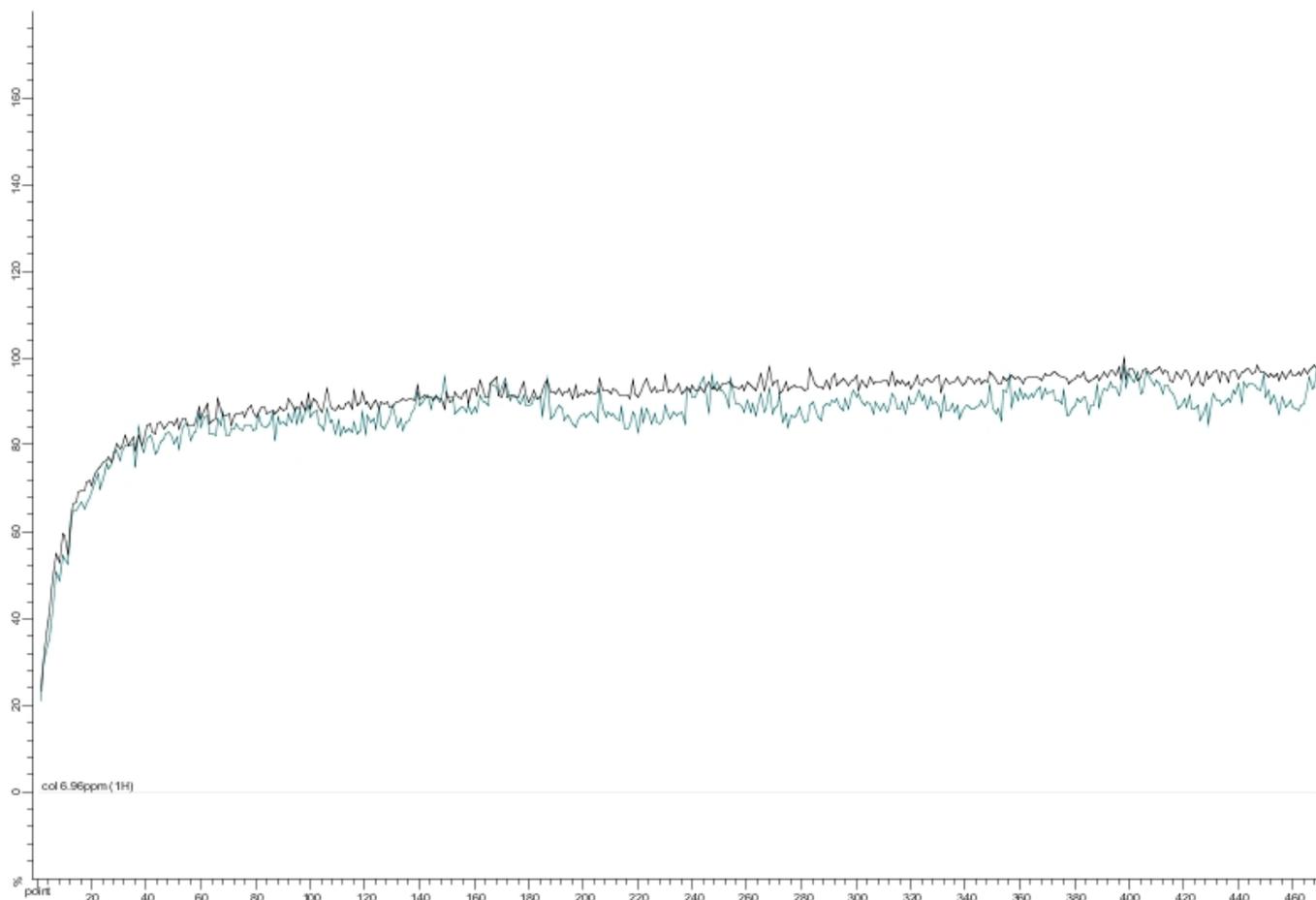


Figure 112 : Extraction des cinétiques à 6.85 et 6.96 ppm

C. Limites de l'analyse RMN 1D1H

De même qu'avec les méthodes classiques d'analyse des polyphénols, l'évolution du spectre 1D¹H au cours de l'oxydation met essentiellement en évidence la disparition des composés de départ, catéchine ou acide caféique, et les produits d'oxydation apparaissent sous forme de signaux superposés et de faible intensité. Néanmoins, l'analyse a permis de caractériser une quinone.

II. Inhibition de l'oxydation

La caractérisation par analyse RMN bi-dimensionnelle des produits d'oxydation formés et en particulier de l'expérience DOSY, nécessite que la solution réactionnelle soit totalement stable sur quelques heures, ce qui n'est pas le cas d'après la cinétique présentée précédemment.

Deux voies sont alors envisageables pour arrêter la réaction d'oxydation. La première est basée sur la complexation des *o*-diphénols présents dans le milieu réactionnel par des ions borate, et a été utilisée dans des travaux antérieurs pour inhiber l'autoxydation de monomères de flavanols.¹⁷⁵ La seconde voie consiste à introduire un réducteur dans le milieu réactionnel, et ainsi le stabiliser.

Les premières expériences réalisées avec le borate montrent que les chromatogrammes obtenus en CLHP ainsi que les spectres UV-Visible sont rendus difficilement interprétables à cause de la présence de nouveaux composés correspondant aux complexes polyphénols borates (données non montrées). La poursuite de l'étude a donc été réalisée avec un arrêt de la réaction d'oxydation par l'ajout d'un réducteur. L'acide sulfureux, a été choisi pour son fort pouvoir réducteur comparé à l'acide ascorbique, son état liquide, et le fait qu'il n'ait pas de signaux interférant avec les signaux des molécules d'intérêt.

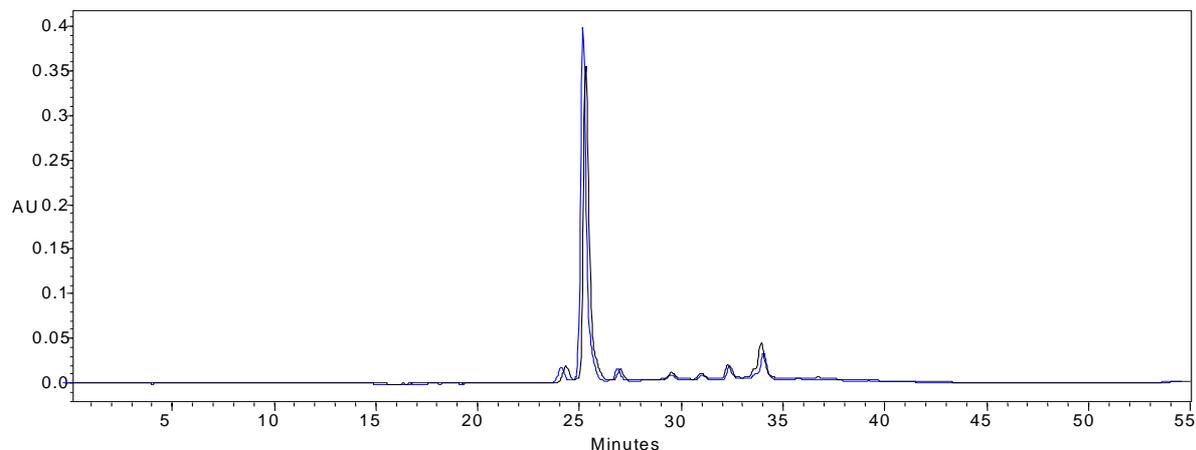
A. Evaluation préliminaire de l'efficacité

L'efficacité de la réduction est évaluée dans un premier temps par spectrophotométrie UV-visible, l'objectif étant de stabiliser le milieu. Différents volumes d'acide sulfureux sont donc additionnés à un volume défini de solution réactionnelle issue de l'oxydation de la catéchine, et les spectres UV-visible sont acquis avant ajout, immédiatement après l'ajout et deux heures plus tard.

Les résultats montrent que l'ajout d'un volume de H₂SO₃ inférieur à 20 µL par millilitre de milieu réactionnel ne permet pas de stabiliser la solution réactionnelle, alors qu'un ajout de 20 µL par millilitre apporte une stabilité de quelques heures, ce qui est suffisant pour réaliser nos analyses.

Le résultat est confirmé par analyse du milieu réactionnel en CLHP. La superposition des chromatogrammes extraits à 280 nm pris à t₀ au moment de l'ajout de H₂SO₃, et t₀+2h, suggère que l'inhibition par ajout de H₂SO₃ est efficace (Figure 113). En effet, les concentrations des composés incolores majeurs contenus dans la solution réactionnelle n'ont pas évolué au cours des deux heures. Ce résultat est plus délicat à valider au niveau de la zone d'absorption des pigments jaunes puisque les intensités relevées sont extrêmement faibles et donc variables. Cependant, on remarque que le chromatogramme extrait à 390 nm présente le même profil à t₀ et t₀+2h.

a) 280 nm



b) 390 nm

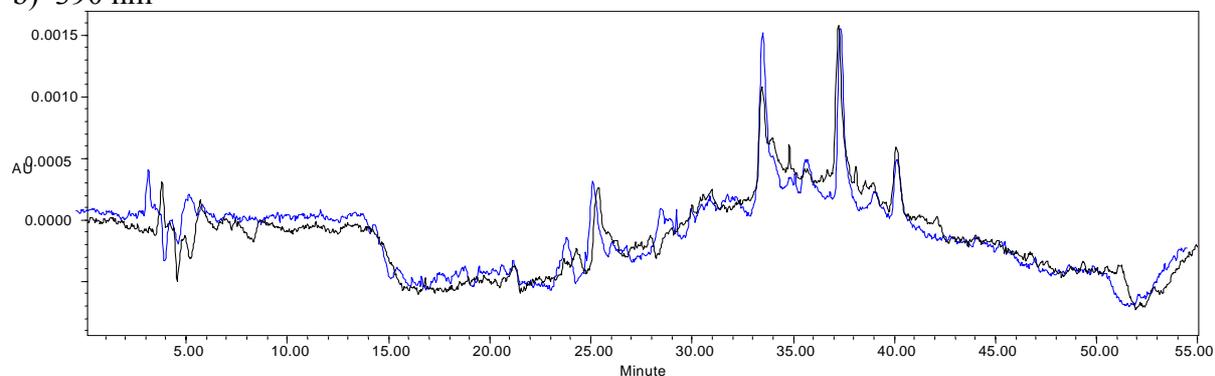


Figure 113 : Chromatogramme extrait à 280 nm à t0 (noir) et t0+2h (bleu)

Cet ajout de 20 μL d'acide sulfureux par millilitre de solution réactionnelle est également validé sur les solutions réactionnelles issues de l'oxydation de l'acide caféique.

B. Vérification par RMN

En pratique et de façon systématique, trois spectres RMN 1D ^1H de la solution analysée, ont été enregistrés en fin de cinétique d'oxydation (après 1h30) mais avant ajout d'acide sulfureux, juste après ajout, et enfin après l'expérience DOSY.

Dans le cas de la catéchine comme dans celui de l'acide caféique, la comparaison de ces trois spectres montre d'une part que l'ajout d'acide sulfureux ne modifie pas le spectre 1D ^1H des milieux réactionnels, et d'autre part que les solutions n'évoluent pas pendant l'expérience DOSY.

III. Principe de l'expérience Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)

L'expérience RMN DOSY permet d'obtenir l'empreinte d'un mélange complexe et de décrire le comportement hydrodynamique de chaque constituant de ce mélange à partir de la mesure des coefficients de diffusion translationnelle, ceux-ci étant mesurés par application d'une séquence « écho de spin » comportant des impulsions de gradients de champ.¹⁷⁶

Plus précisément, le principe de l'analyse est basé sur l'application de deux gradients de champs magnétiques inversés, et séparés par un délai plus ou moins long. Le second gradient identique mais de signe opposé au premier permet de rephaser le signal déphasé à la suite du premier gradient. Durant le délai, les composés se déplacent selon l'axe du gradient en fonction de leurs coefficients de diffusion, l'échelle des mouvements se situant entre la micro et la milliseconde. L'atténuation de l'intensité du signal présente une décroissance exponentielle.

Après traitement de l'expérience DOSY par transformée de Laplace inverse, le spectre obtenu est bidimensionnel : le premier axe représente le spectre 1D¹H de la molécule, et le coefficient de diffusion translationnel correspondant est porté sur la deuxième dimension (échelle logarithmique).

IV. Diffusion translationnelle de petites molécules

L'expérience DOSY est principalement utilisée pour l'analyse¹⁷⁷ et l'identification de petites molécules dans des mélanges ou pour la caractérisation du comportement hydrodynamique de plus grosses molécules telles que les protéines. La modélisation du comportement de molécules de taille voisine à celle du solvant reste très peu développée car la diffusion de telles molécules n'obéit pas de façon systématique au modèle de Stokes Einstein Debye.¹⁷⁸ La littérature rassemble néanmoins quelques travaux réalisés sur des molécules de faible poids moléculaire comme les arômes. En particulier, les diffusions de deux molécules d'arômes, le butanoate d'éthyle et le linalool, à travers des milieux modélisant une matrice alimentaire gélifiée ont pu être étudiées par cette technique.¹⁷⁹

Concernant des matrices plus complexes telles que le vin, l'expérience DOSY a permis d'identifier avec succès des changements de composition associés globalement au

cépage, au procédé de vinification, et à l'âge d'un vin de Porto, notamment l'évolution de la composition en polyphénols, acides organiques et acides aminés.¹⁷⁴

V. Calibration de la gamme de coefficients de diffusion translationnelle

A. Droite de calibration

La calibration des coefficients de diffusion sur celui de l'éthanol à $1290 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ permet d'associer à la molécule de catéchine un coefficient de diffusion translationnelle de $562 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ dans les conditions de solvant utilisées (Figure 114), relevé fait au centre des tâches de corrélation.

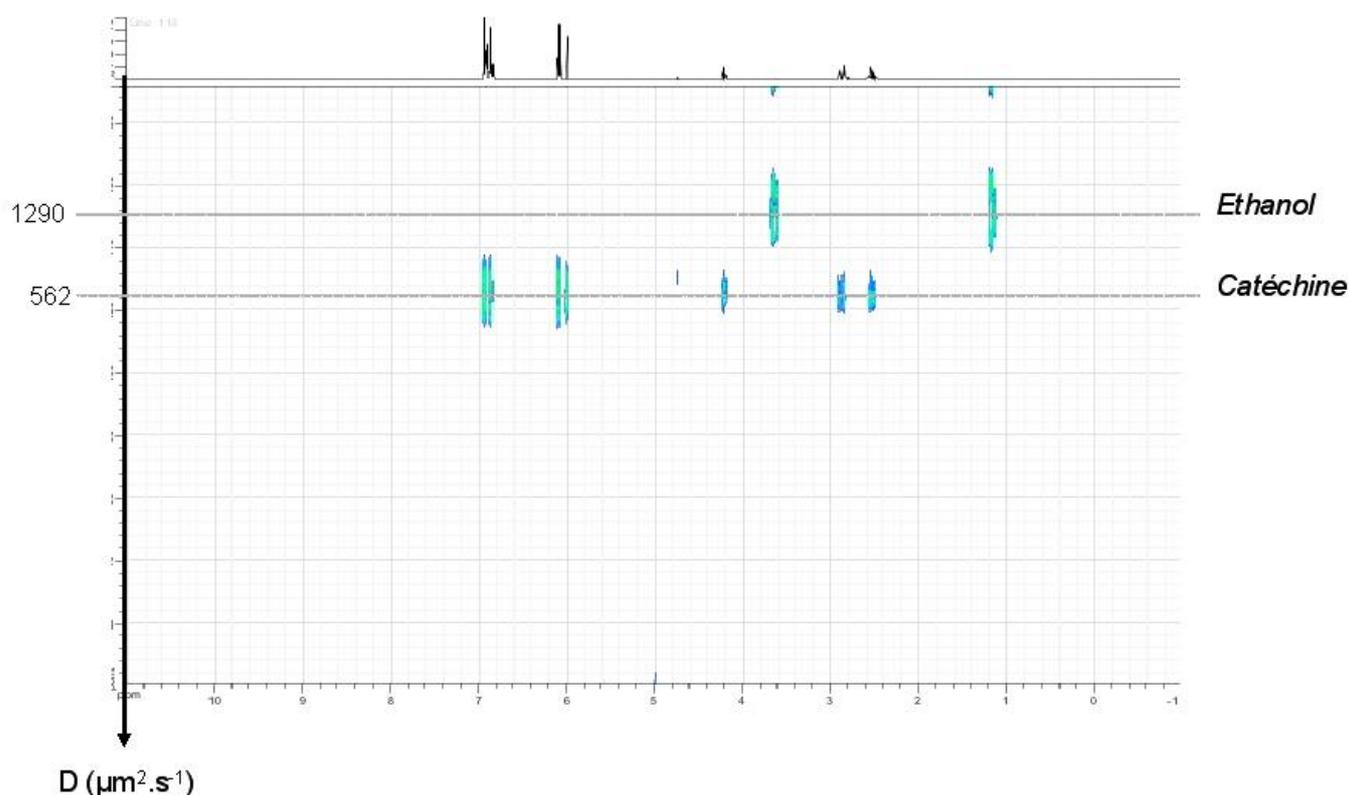


Figure 114 : Spectre DOSY de la catéchine

De la même façon, le coefficient de diffusion de l'acide caféique dans ce milieu est évalué à $696 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, et celui de l'épigallocatechine gallate (EGCG) à $472 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

Introduisons le paramètre $r_{\text{ref,m}}$, rapport entre le coefficient de diffusion D_{ref} d'un polyphénol choisi comme référence et celui d'un autre polyphénol m.

En choisissant par exemple la catéchine comme molécule de référence, le calcul des rapports $r_{\text{cat,ac caf}}$, $r_{\text{cat,cat}}$, et $r_{\text{cat,EGCG}}$ permet de mettre en évidence une relation linéaire entre la masse de cette molécule et le cube du rapport r_m (coefficient de régression de 0,9998).

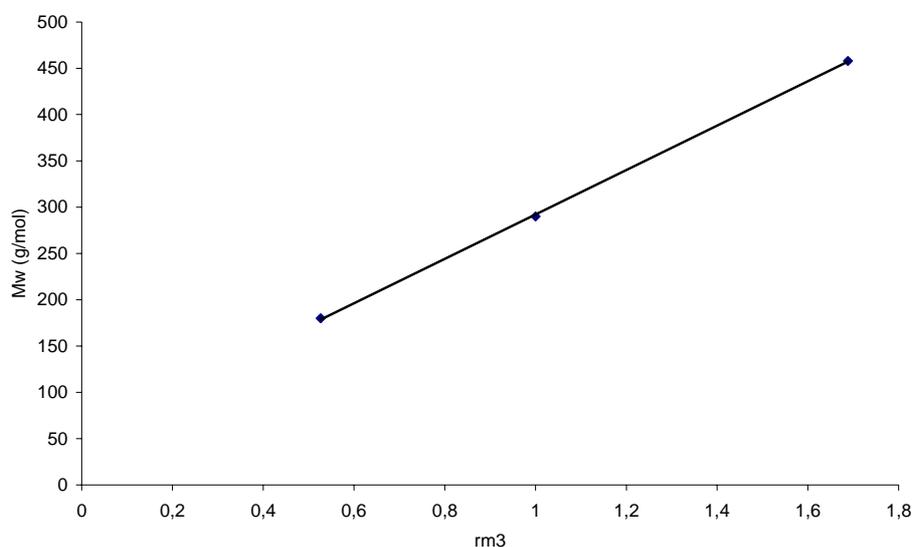


Figure 115 : Corrélation entre r_m^3 et masse molaire

De façon générale, cette observation permet d'exprimer la masse de ces trois polyphénols de la façon suivante :

$$\frac{Mw_m}{Mw_{ref}} = \left(\frac{r_m}{r_{ref}} \right)^3$$

soit, en simplifiant,

$$\frac{Mw_m}{Mw_{ref}} = \left(\frac{D_{ref}}{D_m} \right)^3$$

Dans le cas général, la barre d'erreur sur la masse molaire calculée est estimée à 15%.

En prenant par exemple la catéchine comme référence, la masses molaire calculée à partir de cette formule est de 153 g.mol⁻¹ mol pour l'acide caféique, contre 180 g.mol⁻¹ attendu, soit une différence inférieure à la barre d'erreur. L'écart observé peut être expliqué simplement par la différence structurale entre un acide hydroxycinnamique et un flavanol. Quant à l'épigallocatechine gallate, sa masse molaire calculée à partir de l'expérience DOSY s'élève à 490 g.mol⁻¹, soit un écart moins important avec la valeur théorique (458 g.mol⁻¹).

Dans les expériences d'oxydation, la référence devra être choisie en fonction du polyphénol initial, pour caractériser au mieux les produits d'oxydation.

B. Application à la fraction de tanins extraits de pomme DPM 9,2

Le spectre DOSY de la fraction de tanins de pomme dont le degré de polymérisation moyen a été estimé à 9,2 par thiolysse, est présenté dans la Figure 116. Il est référencé sur la valeur du coefficient de diffusion de l'éthanol, et plusieurs séries de raies y sont remarquables.

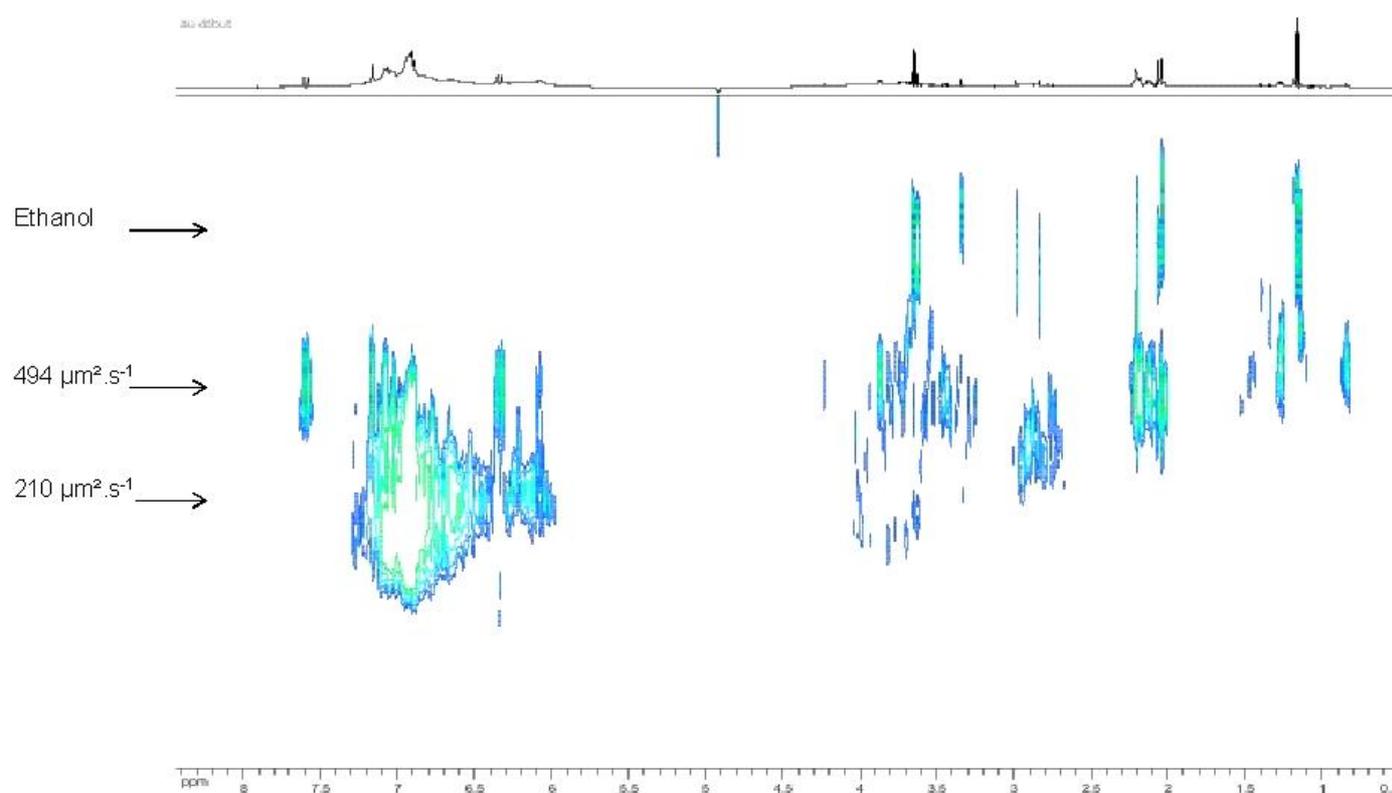


Figure 116 : Spectre DOSY de la fraction de tanins de pomme mDP = 9,2

On observe tout d'abord un massif polymérique relativement polydispersé centré vers $210 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. L'extrait à 6,95 ppm montre nettement cette dispersité avec des valeurs de coefficients de diffusion translationnelle variant entre 158 et $368 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Dans le cas des polymères de flavanols et en prenant comme référence la catéchine, le rapport de masses molaires M_w/M_{ref} correspond au degré de polymérisation. Ceci permet de conclure que la gamme de coefficients de diffusion recouvre à la fois des oligomères contenant environ 3 ou 4 motifs, et des polymères contenant jusqu'à 45 unités monomériques environ. Ce résultat peut

être rapproché de la caractérisation de cette même fraction de tanins obtenue par MALDI-TOF à travers l'étude des complexes formés avec la BSA. Par cette dernière méthode, nous en avons en effet conclu que les tanins de cette fraction pouvaient atteindre des degrés de polymérisation de 52 environ, ce qui est en total accord avec le degré de polymérisation de 45 estimé par l'analyse DOSY.

Outre le massif représentatif des polymères, le spectre DOSY présente une série de raies fines caractérisée par un coefficient de diffusion de $494\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. En utilisant la formule précédemment établie, la masse molaire de ce composé s'élève à 427 g.mol^{-1} . Cette série de raie pourrait être attribuée à la phloridzine, composé de masse molaire 452 g.mol^{-1} dont la présence dans cette fraction de tanins a été mise en évidence par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Cette molécule possède des protons caractéristiques, en particulier le proton anomérique H1 du sucre qui est perdu avec le signal de l'eau, les signaux du sucre vers 4 ppm que l'on retrouve dans le spectre DOSY, et des signaux aliphatiques à 2 et 2,2 ppm qui pourraient correspondre.

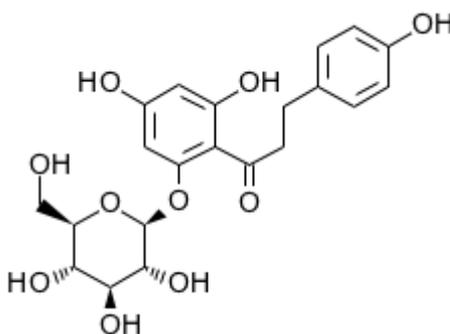


Figure 117 : Structure chimique de la phloridzine

VI. Caractérisation des produits d'oxydation par RMN DOSY

Les solutions issues de l'oxydation chimique de la catéchine et de l'acide caféique analysées par les techniques usuelles dans la partie précédente, ont été reprises et analysées par RMN-DOSY.

A. Produits d'oxydation de la catéchine

L'analyse par ESI-TI de la solution de catéchine oxydée avait permis de repérer la formation d'oligomères de catéchine dont le degré de polymérisation était inférieur ou égal à

5. L'analyse par RMN 1D¹H de cette même solution n'avait pas permis de compléter la caractérisation des produits d'oxydation du fait de la multiplicité, de la faible intensité et la superposition de leurs signaux. La séparation des produits selon une seconde dimension fournit des informations complémentaires.

Le spectre DOSY de la solution réactionnelle obtenue après 1h30 min d'oxydation de la catéchine par le periodate de sodium est présenté sur la Figure 118.

1. Empreinte massique

En observant les intensités relatives sur ce spectre DOSY et en comparant l'empreinte à celle de la catéchine avant oxydation, on note que la catéchine reste le produit majoritaire dans le milieu réactionnel, ce qui peut être relié en particulier au large excès initial par rapport à la quantité d'oxydant. En plus de ce signal, une série de produits dont les déplacements chimiques sont décalés et dont les masses molaires sont toutes plus élevées que celle de la catéchine apparaissent sous forme de bandes non résolues. Ces signaux correspondraient à des polymères qui, d'après l'analyse des coefficients de diffusion, contiennent de 2 à 23 unités monomériques environ.

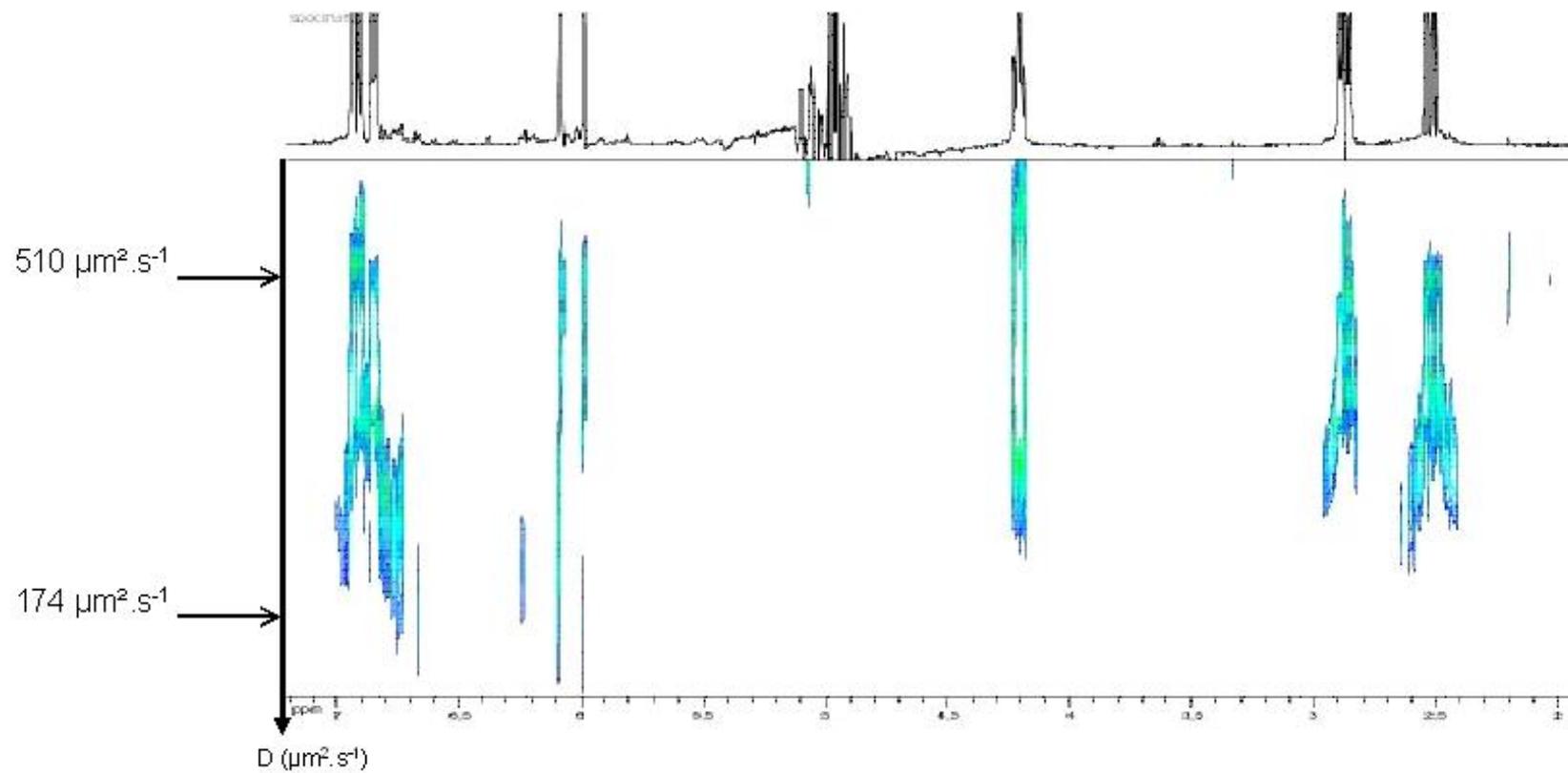


Figure 118 : Spectre DOSY de la solution de catéchine après 1h30 d'oxydation par NaIO_4

2. Mise en évidence des liaisons covalentes

Le spectre DOSY est l'image de tous les produits constituant le milieu réactionnel, et la question se pose de savoir si le phénomène mis en évidence est bien une polymérisation et non pas seulement de l'agrégation.

L'indice d'une polymérisation se trouve dans la comparaison des intensités relatives entre protons du cycle A et protons du cycle B pour chacun des produits. On constate en effet visuellement une nette différence de ce rapport entre la catéchine et ses produits dérivés, qui se traduit par une perte d'intensité des signaux des protons H6/H8 du cycle A plus importante que celle des protons H2'/H5'/H6' du cycle B. Il a été en effet montré que la catéchine dimérise par oxydation chimique en établissant des liaisons interflavoniques de type biaryle ou biaryle ether entre les cycles A et B de deux unités de catéchine. Cependant, la différence d'intensité entre les signaux des protons H6 et H8 ne nous permet pas de préciser plus précisément la position de la liaison. Celle-ci est à l'origine sur le cycle A de la perte d'un proton sur les deux présents initialement, et sur le cycle B d'un proton sur trois seulement, voire d'aucun proton si la liaison est de type C-O-C. Il est donc cohérent de trouver une disparition des signaux H6/H8 plus marquée que celle des protons H2'/H5'/H6'.

Pour vérifier la coexistence ou non d'un phénomène d'agrégation, il faudrait réaliser l'expérience DOSY dans un solvant organique ce qui n'a pu être fait dans le cadre de ce travail. D'autre part pour aller plus loin dans l'interprétation, la caractérisation de protons spécifiques des produits jaunes est nécessaire. Le signal caractéristique des protons H2' appartenant à des produits jaunes, qui intègre pour deux protons au lieu d'un et est très peu déblindé (environ 3 ppm contre 7 ppm dans les produits incolores⁵⁶) a été recherché sans succès dans la solution réactionnelle.

B. Produits d'oxydation de l'acide caféique

Le spectre DOSY de la solution réactionnelle obtenue après 1h30 min d'oxydation de l'acide caféique est présenté sur la Figure 119. Contrairement à ce qui avait été observé pour la catéchine, l'oxydation de l'acide caféique se traduit par un phénomène de polymérisation très limité, et la gamme de coefficients de diffusion des produits d'oxydation est étroite.

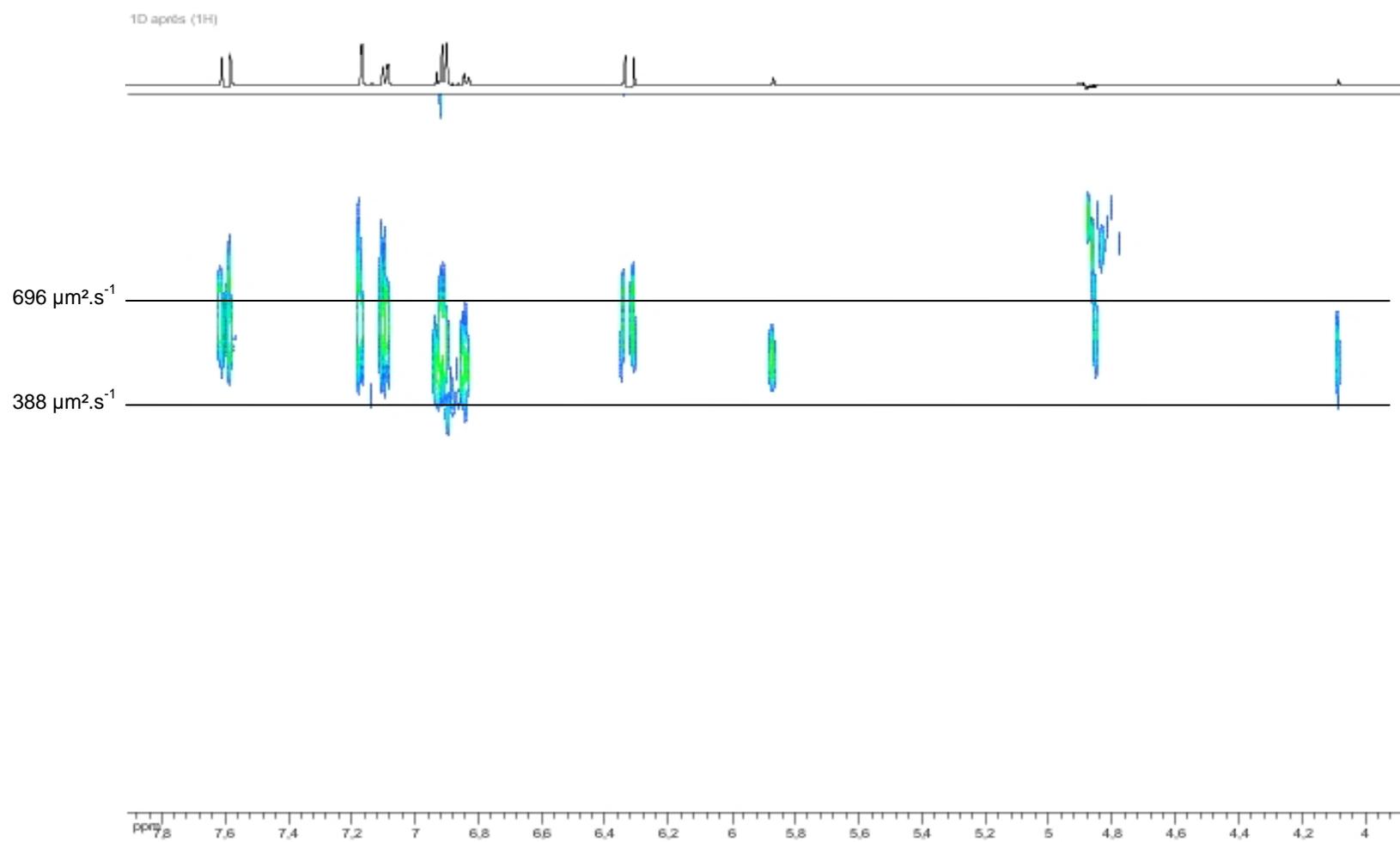


Figure 119 : Spectre RMN DOSY de l'acide caféique après 1h30 min d'oxydation

Plus précisément, l'ensemble des coefficients de diffusion relevés sur le spectre et de leurs masses molaires associées est rassemblé dans le Tableau 28.

\square	D ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	Mw (g.mol^{-1})	Mw attendue
<i>Ac caféique</i>	696±18	180	180
<i>Prod ox majeur (6,85, 6,96 ppm)</i>	524±25	422	404
<i>Dimère (5,87 ppm)</i>	552	361	358
<i>Trimère (6,92 ppm)</i>	477	559	536
<i>Tetramère (6,89 ppm)</i>	449	670	714
<i>Prod ox (6,92 ppm)</i>	642	229	
<i>Hexamère traces</i>	388	1039	1070

Tableau 28 : Caractérisation de produits d'oxydation de l'acide caféique

L'analyse de la cinétique d'oxydation de l'acide caféique avait mis en évidence la formation d'un produit majoritaire qui s'accumulait au cours du temps. L'expérience DOSY permet de lui associer un coefficient de diffusion de $524 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, soit une masse molaire de 422g.mol^{-1} . Ce résultat est en accord avec l'analyse de la solution en CLHP-ESI/TI SM qui permet d'associer au produit d'oxydation majoritaire et qui s'accumule une masse de 404g.mol^{-1} . Ce produit n'est donc pas celui obtenu par Fulcrand⁵⁵ et proposé à partir de l'analyse $1\text{D}^1\text{H}$ de notre spectre (cf I.B.2.c). Sa présence n'est pas relevée non plus dans l'étude de Cilliers⁵⁹.

Outre ce produit, on remarque la formation d'oligomères qui contiennent jusqu'à quatre voire éventuellement six unités monomériques, ainsi que d'un composé de masse molaire 229g.mol^{-1} dont le signal est superposé au signal du H5 de l'acide caféique.

VII. Application de la RMN à la mise en évidence d'un phénomène oxydatif dans les vins blancs de Champagne

La même approche a été appliquée à un vin issu de Pinot noir oxydé par le periodate de sodium.

A. Approche par analyse monodimensionnelle 1H

1. Caractéristiques globales du spectre 1D¹H du Pinot noir

L'analyse RMN a été réalisée sur le vin non fractionné préalablement évaporé et repris dans du DMSO deutéré (facteur de concentration de 13). Comme attendu, les polyphénols sont des constituants mineurs du vin et apparaissent dans la zone aromatique du spectre RMN proton, zone présentant de loin la plus faible intensité. Le rapport est d'environ 500 entre les signaux les plus intenses du spectre et ceux de la zone des protons aromatiques, ce qui rend difficile l'analyse RMN. Un agrandissement de la zone aromatique est présenté sur la Figure 120 (haut).

Les polyphénols apparaissent sous forme de signaux larges et non résolus qui reflètent une forte dispersion des espèces moléculaires présentes. De façon plus précise, les signaux des protons aromatiques des flavanols sont attendus entre 6 et 7,1 ppm environ, tandis que les protons des acides hydroxycinnamiques couvrent une gamme de déplacements chimiques plus large et se situent entre 6,3 et 8,2 ppm environ.

Toutefois, plusieurs signaux sont repérables sur ce spectre. On note la présence d'un doublet à 6,33 ppm caractérisé par une constante de couplage de 16,2Hz qui peut être le signal associé à un proton porté par la double liaison C=C des acides hydroxycinnamiques,^{67, 180} et plus précisément celui porté par le carbone en position α .¹⁷⁴ L'autre doublet correspondant n'est pas repéré. Les deux doublets à 6,75 et 7,07 ppm caractérisés par une constante de couplage de 8,6 Hz correspondraient quant à eux aux protons H5/H6 de cette même famille de polyphénols,¹⁸⁰ ou de structures flavanols.

2. Oxydation et évolution du spectre 1D¹H

Le vin de Pinot noir a été oxydé pendant quelques heures par ajout de periodate de sodium à 1mg.ml⁻¹ de vin qui correspond à une teneur en oxydant cinq fois moins grande que celle en polyphénols dans les vins (rapport utilisé en oxydation chimique des solutions modèles ; Partie 2 chapitre II). L'analyse en RMN a été réalisée directement sur cette solution, après concentration à sec sous vide et reprise dans le DMSO avec le même facteur de concentration que le vin non oxydé. Malgré la faible concentration en polyphénols, on note des différences remarquables au niveau de la zone aromatique des spectres 1D¹H du Pinot Noir avant et après oxydation (Figure 120).

Contrairement à ce qui avait été conclu jusqu'ici avec les autres techniques d'analyse, l'apparition de nombreux signaux entre 6 et 8,4 ppm est évidente et s'accompagne de la

disparition de cinq doublets à 6,33, 6,75, 6,8, 7,07 et 7,81 ppm, le premier étant associé à une constante de couplage de 16 Hz et les quatre suivants à une constante de couplage de 8,7 Hz. L'acide *t*-caftarique étant l'acide hydroxycinnamique majeur dans les vins d'après l'analyse en chromatographie liquide, on peut raisonnablement penser que la disparition des signaux à 6,33, 6,75 et 7,07 ppm reflète la disparition de cet acide. Pour comparaison, une étude sur les vins de Porto associe au H6 de l'acide *t*-caftarique un doublet à 7,12 ppm, et au H8 un doublet à 7,67 ppm caractérisé par une constante de couplage de 16 Hz dans 10 % D₂O.¹⁷⁴

Les signaux majeurs qui apparaissent sont des singulets non identifiés à 7,58, 7,68, 7,76, 7,92, 8, 8,25, et 8,3 ppm. L'un d'entre eux pourrait correspondre à l'acide formique dont la quantité augmente avec l'âge du vin et repéré à 8,32 ppm sous forme d'un singulet dans les vins de Porto.¹⁷⁴ Une confirmation en RMN bidimensionnelle HSQC serait nécessaire.

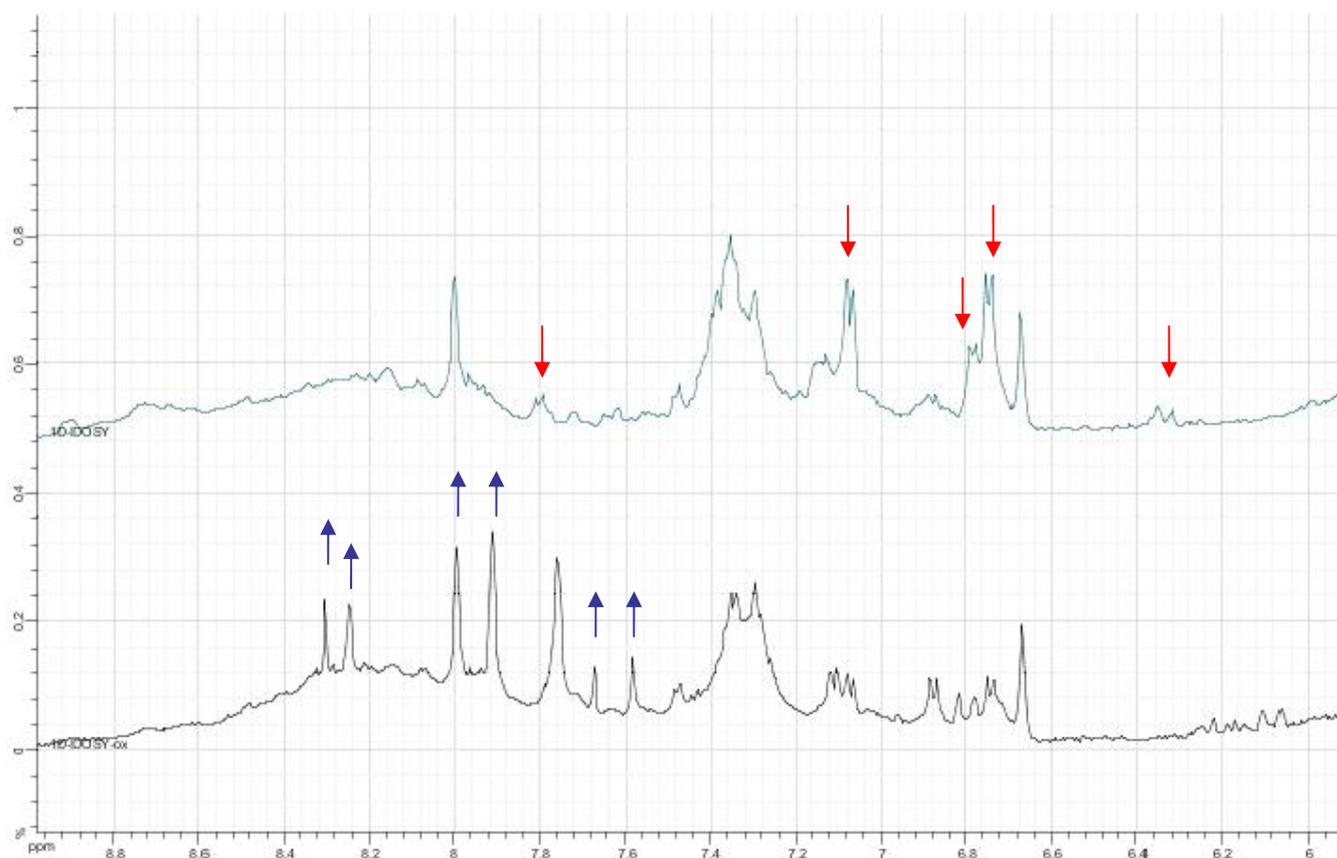


Figure 120 : Spectres 1D¹H du vin issu de Pinot noir avant (haut) et après (bas) oxydation chimique

B. Apport de l'analyse DOSY du vin

Les spectres DOSY de ces mêmes échantillons de Pinot Noir sont présentés dans la Figure 121.

On note tout d'abord l'homogénéité des masses molaires sur le vin de contrôle avant oxydation, et la faible résolution due à la multitude de composés. Ceux-ci sont caractérisés par des coefficients de diffusion compris entre 187 et 374 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ soit des masses molaires variant d'un rapport 8 au maximum. L'absence de hautes masses molaires correspondant à des protéines sur toute la gamme de déplacements chimiques confirme la faible quantité de ces composés décelée à partir d'une électrophorèse de ce vin (résultat non montré).

L'oxydation s'accompagne d'une grande stabilité de la gamme de masses. La disparition de l'acide t-caftarique est confirmée dans l'analyse DOSY puisque qu'une chute de l'intensité des signaux correspondant aux doublets 6,33, 6,75 et 7,07 est observée. Au contraire, on remarque l'apparition de composés de masses molaires équivalentes voire largement inférieures qui correspondraient à des produits de dégradation.

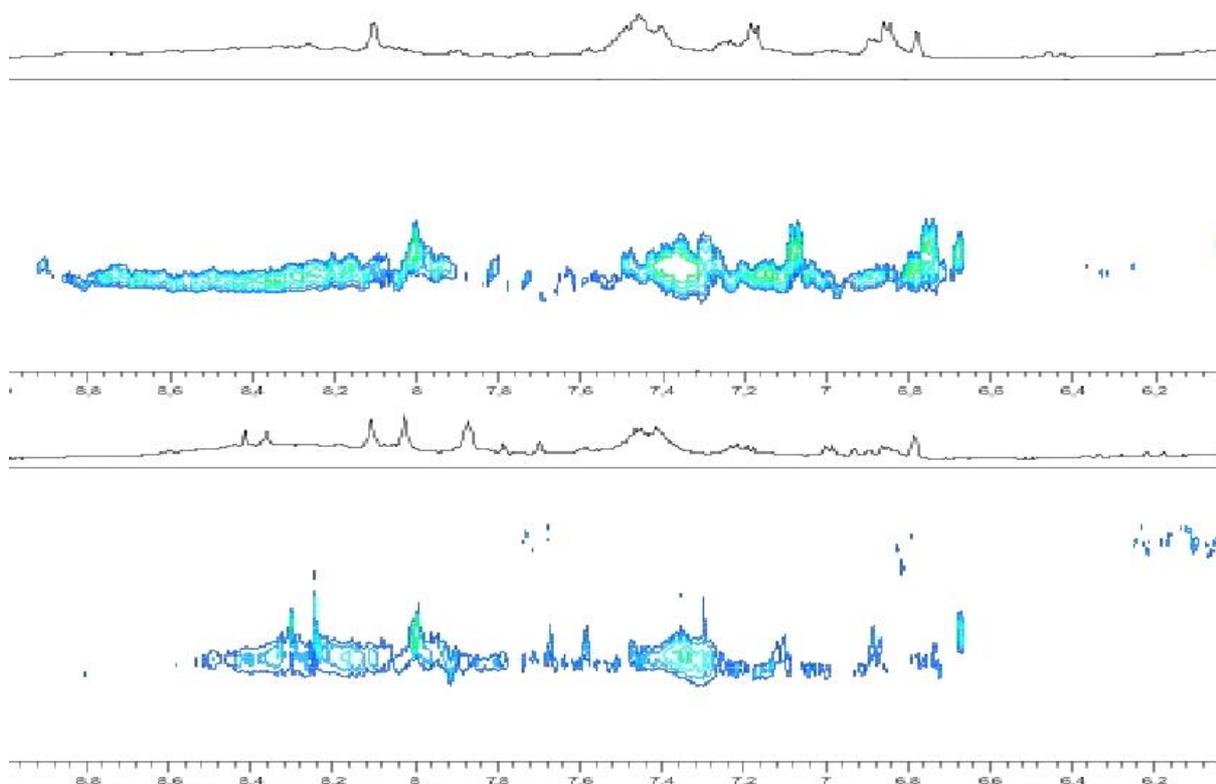


Figure 121 : Spectres RMN DOSY du Pinot noir avant (haut) et après (bas) oxydation chimique

Pour aller plus loin dans le traitement des coefficients de diffusion relevés, il conviendrait d'ajouter un polyphénol comme calibrant. On pourrait envisager de choisir un

flavonol puisque cette famille de molécules n'est pas détectée dans les vins de Champagne étudiés et que certains de leurs signaux protons se distinguent à priori de ceux des flavanols et acides phénols.

VIII. Conclusion

L'analyse par RMN DOSY apporte des informations complémentaires aux méthodes classiques quant au degré de polymérisation des produits d'oxydation de polyphénols. Nous avons en outre montré que cette technique était applicable à la mise en évidence de réactions d'oxydation, ainsi qu'à la recherche de marqueurs dans les vins. Toutefois, l'oxydation chimique qui a été réalisée sur le vin de Pinot noir semble très poussée par rapport à l'oxydation naturelle. Dans ce dernier cas, on peut donc s'attendre à avoir des marqueurs d'oxydation qui ne sont pas seulement des produits de dégradation, mais aussi des produits de masses molaires plus hautes ou équivalentes. Afin de gagner en résolution, l'application de la technique RMN DOSY aux vins jeunes de Champagne ayant mûri de façon naturelle sera donc restreinte à la caractérisation des fractions polyphénoliques isolées à partir de ces vins.

Caractère oxydé et sensibilité à l'oxydation de vins blancs de Champagne jeunes

Ce chapitre rassemble des travaux de transfert des résultats obtenus sur les oxydations en milieu modèle et des vins âgés, vers la différenciation de vins jeunes présentant des caractères oxydés différents. Il s'agit de relier ce caractère oxydé, d'une part, à des paramètres colorimétriques, d'autre part, à une composition polyphénolique afin de mettre en évidence des marqueurs d'oxydation. Le deuxième objectif du chapitre est d'identifier les facteurs qui prédisposent le vin à être plus ou moins sensible à l'oxydation.

Pour cela, des vins blancs champenois monovariétaux issus des trois cépages Pinot noir (PN), Pinot meunier (PM), et Chardonnay (CH) de 3 millésimes successifs 2002, 2003, et 2004 ont été utilisés. Pour chacun des neuf vins, deux modalités « oxydée » et « non oxydée » sont disponibles, obtenues à partir de bouchages avec des capsules plus ou moins étanches aux gaz.

I. Définition du caractère oxydé des vins par analyse sensorielle

A. Protocole de dégustation

L'analyse sensorielle de ces vins a été réalisée fin 2006 dans les locaux du Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne par un jury d'experts (de 11 à 14 personnes) sous forme d'un test triangulaire. Ce test consiste à déguster trois échantillons dont deux identiques, et déceler celui qui est différent des deux autres. Dans le cadre de cette étude, le CIVC a demandé aux experts de tester les modalités oxydée et non oxydée d'un vin issu d'un même cépage, et d'un même millésime, portant à 9 le nombre de tests réalisés (3 cépages, 3 millésimes). Outre la reconnaissance de l'échantillon différent, il a été demandé au jury de définir les vins par des descripteurs libres. Notons que les experts ont eu connaissance de l'âge du vin.

B. Analyse des résultats

Les fiches récapitulatives individuelles des commentaires de dégustation sont rassemblées en annexe 4.

Les commentaires sensoriels s'appuient sur la documentation proposée par le CIVC sur l'évolution normale des arômes dans les vins de Champagne. Ces descripteurs sont les suivants :

- Jusqu'à 2-3 ans : fleurs blanches, agrumes, fruits blancs, fruits rouges, végétaux, arômes fermentaires, et minéraux
- De 3/4 ans à 6/8 ans : fruits jaunes, fruits secs, fruits cuits, fruits à l'alcool, pâtisserie, confiserie, épices, végétaux
- Au-delà de 6/8 ans : fruits confits, sous-bois, torréfaction, grillé, miel, animal

Le jury de dégustation a su distinguer de façon significative l'échantillon différent des deux autres dans huit tests triangulaires sur les neuf. Seul le test sur le Pinot meunier 2004 a conduit à un nombre de réponses exactes inférieur au seuil de signification fixé par les tables en fonction du nombre de dégustateurs. Les pourcentages de réponses exactes sont rassemblés dans le Tableau 29.

Réponses exactes	
(%)	
<i>02-CH</i>	100
<i>02-PN</i>	100
<i>02-PM</i>	100
<i>03-CH</i>	73
<i>03-PN</i>	79
<i>03-PM</i>	83
<i>04-CH</i>	73
<i>04-PN</i>	65
<i>04-PM</i>	50

Tableau 29 : Pourcentages de réponses exactes aux 9 tests triangulaires (nombre = millésime ; lettres = cépage)

Au-delà de la significativité du test, on remarque que les modalités oxydée et non oxydée d'un vin sont différenciées avec un taux de réponses exactes d'autant plus grand que le vin est âgé. Cette constatation peut être liée au fait que le différentiel d'oxygène reçu par les modalités oxydée et non oxydée, et donc l'évolution oxydative, s'amplifie avec la durée de maturation.

Au lieu de traiter les résultats par une analyse lexicale complexe, nous avons supposé que, pour un même millésime, plus le vin est sensible à l'oxydation, plus l'échantillon oxydé

se distingue du non oxydé, ce qui se traduit par un nombre de réponses exactes plus important.

Pour chacun des millésimes 2003 et 2004, le classement suivant a été obtenu :

04-PM < 04-PN < 04-CH

03-CH < 03-PN < 03-PM

< signifiant “est moins sensible à l’oxydation que”

La sensibilité à l’oxydation des trois cépages pour les vins du millésime 2002 ne peut pas être estimée sur cette base puisque les trois tests triangulaires ont donné 100 % de réponses exactes. Cependant, l’analyse des descripteurs associés à ces tests suggère que le vin issu de Pinot noir est le moins sensible à l’oxydation dans la mesure où les termes « réduit » pour la modalité non oxydée et « oxydé » pour la modalité oxydée ont été peu utilisés comparé aux commentaires sur les deux autres vins issus de Pinot meunier et Chardonnay. On obtient donc le classement suivant :

02-PN < 02-CH ~ 02-PM

Aucune relation entre cépage et sensibilité à l’oxydation n’a donc été mise en évidence.

Par ailleurs, de façon générale, l’augmentation du caractère oxydé se traduit par une évolution des caractéristiques sensorielles qui s’apparente à un vieillissement accéléré dans la mesure où les descripteurs employés caractérisent habituellement des vins d’âge plus avancé que celui correspondant aux millésimes de nos échantillons (cf annexe 3).

II. Influence relative du cépage et du millésime par rapport au caractère oxydé

A. Colorimétrie

Les coordonnées tristimulaires L*, a*, et b* des 18 échantillons de vins ont été mesurés par colorimétrie. Le logiciel de traitement a donné accès à un paramètre supplémentaire, le $\Delta E(\text{CMC})$, combinaison complexe de L*, a*, et b*, souvent utilisé par les industriels, et en particulier les fabricants de colorants, pour noter la qualité de leurs produits. Les valeurs ont été relevées quatre fois par échantillon.

Le traitement des données a été réalisé par une analyse en composante principale (ACP) avec le logiciel Tanagra disponible librement sur internet à partir des paramètres L^* , a^* , b^* , et $\Delta E(\text{CMC})$. Cette approche statistique est une technique de représentation bi-dimensionnelle d'un ensemble d'individus caractérisés par de multiples variables. Les angles entre variables s'interprètent en terme de corrélations, alors que les proximités d'individus s'interprètent en termes de similitude de la composition globale.

1. Interprétation des axes

Compte tenu de l'inertie de chaque axe, soit 72,8 % pour le premier, 26,2 % pour le second et 1 % pour le troisième, l'interprétation de l'ACP est limitée aux deux premiers axes.

La projection des variables sur le cercle de corrélation montre que celles-ci sont essentiellement corrélées avec le premier axe, positivement pour a^* ($r=0,81$), b^* ($r=0,83$), et $\Delta E(\text{CMC})$ ($r=0,89$), négativement pour L^* ($r=-0,81$) (Figure 122). Le premier axe peut donc s'interpréter comme un axe de brunissement opposant les vins très lumineux à ceux présentant une forte intensité colorante. Les corrélations des quatre variables avec le second axe sont beaucoup plus faibles avec des coefficients de corrélation (r) relevés entre -0,46 et 0,56 pour L^* et a^* respectivement. Néanmoins cet axe apparaît comme un axe de teinte opposant les vins ayant une couleur jaune à ceux présentant une teinte plus orangée.

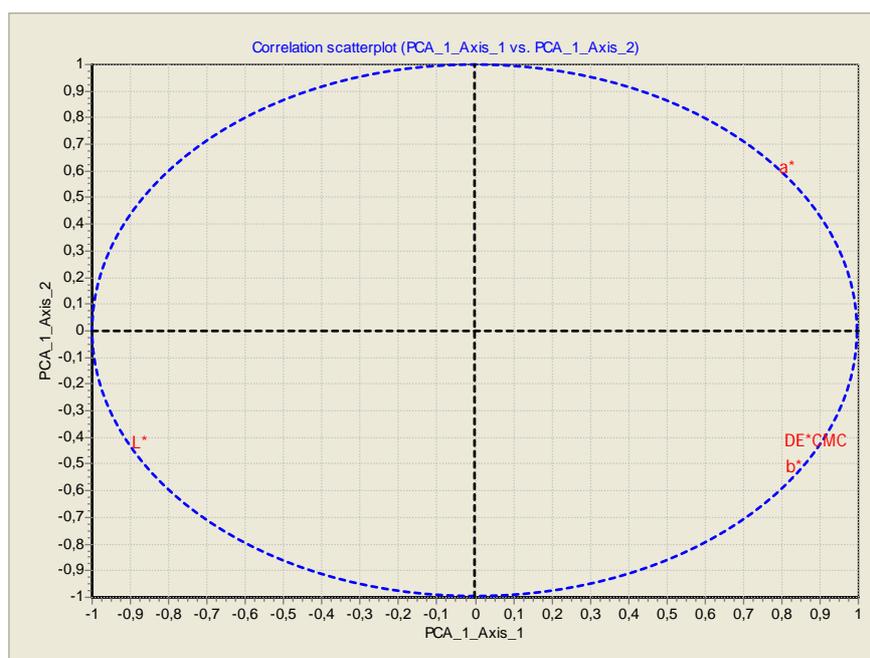


Figure 122 : Cercle de corrélation dans l'espace 1,2

Toutefois, les grandes tendances d'évolution de la couleur des vins monovariétaux associées au développement du caractère oxydé peuvent être dégagées. On souligne tout d'abord que les phénomènes oxydants se traduisent par des évolutions de couleurs différentes selon le cépage utilisé. Une oxydation plus poussée des vins de Chardonnay s'accompagne d'un renforcement de l'intensité colorante et va donc dans le même sens que l'âge. L'analyse des données brutes permet de préciser qu'il s'agit pour majeure partie, voire exclusivement, d'une augmentation de la composante jaune. De même l'oxydation des vins de Pinot noir se traduit par un renforcement de l'intensité colorante, mais qui est associée dans ce cas à une augmentation marquée de la composante rouge, accompagnée ou non, selon le millésime, d'une augmentation de la composante jaune (données brutes). Au contraire, une oxydation plus poussée des vins de Pinot meunier se traduit par un gain de teinte rouge aux dépens de la composante jaune et s'oppose donc à la perte de composante rouge induite par l'âge, sans renforcement de l'intensité colorante.

B. Analyse par CLHP-SM

1. Composés majeurs de teneurs variables

La composition polyphénolique des 18 échantillons de vins a été analysée par HPLC-SM en mode négatif. Sur les profils obtenus, 11 composés majeurs, dont la teneur est très variable d'un échantillon à l'autre on été repérés et annotés de I à XI (Figure 124).

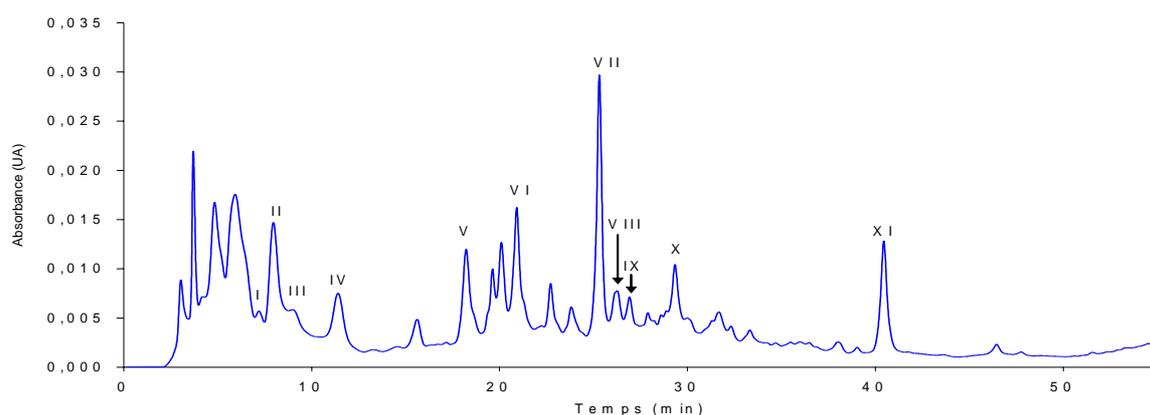


Figure 124 : Profil chromatographique d'un vin jeune. I : $\lambda_{\max} = 282$ nm, II : $\lambda_{\max} = 294$ nm, III : acide gallique, IV : 5-hydroxyméthylfurfural, V : acide *t*-caftarique, VI : GRP, VII : acide caféique, VIII : $\lambda_{\max} = 324$ nm et $-m/z = 644$, IX : $\lambda_{\max} = 272$ nm et $-m/z = 197$, X : $\lambda_{\max} = 281$ nm et $-m/z = 509$, XI : caféate d'éthyle

Parmi ces composés, on note le précurseur sensible à l'oxydation, non identifié mais repéré dans les vins âgés de 1995 et lors de notre vieillissement thermique, de $\lambda_{\max} = 294$ nm (II), l'acide gallique (III), le HMF (IV), l'acide *t*-caftarique (V), le GRP (VI), l'acide caféique (VII) et la caféate d'éthyle (XI). Les autres composés présentent les caractéristiques suivantes :

I : $\lambda_{\max} = 282$ nm

VIII : $m/z = 644$ en mode négatif repéré lors du fractionnement réalisé sur l'Assemblage 2003 ; $\lambda_{\max} = 324$ nm

IX : $m/z = 197$ en mode négatif ; $\lambda_{\max} = 272$ nm

X : $m/z = 509$ en mode négatif ; $\lambda_{\max} = 281$ nm

2. Influence des différents facteurs

Quel que soit le millésime, la variabilité majeure de la composition polyphénolique est liée à la nature du cépage, et dans une extrême mesure à la modalité de bouchage du vin comme illustré par la comparaison du profil chromatographique du Pinot meunier 2002 oxydé avec celui du vin non oxydé correspondant (différenciation par analyse sensorielle avec 100 % de réponses exactes) et des Pinot noir et Chardonnay 2002 oxydés (Figure 125).

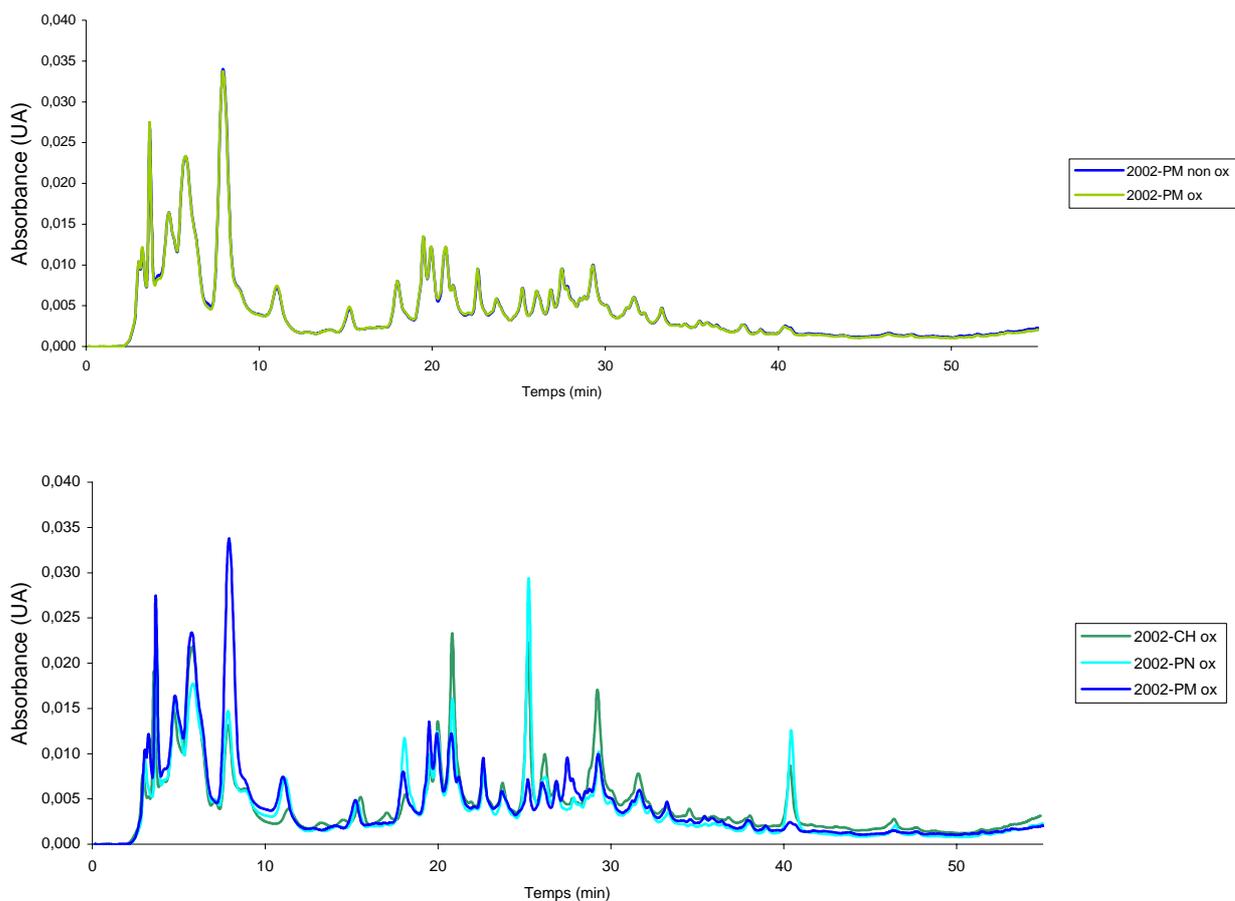


Figure 125 : Profils chromatographiques à 280 nm des modalités oxydée et non oxydée du Pinot meunier 2002 et comparaison des vins monovariétaux oxydés de 2002

Le différentiel d'oxygène vu par ces modalités oxydée et non oxydée est relativement faible (5 milligrammes par litres au maximum) comparé à la totalité des apports en oxygène au cours de leur élaboration, et apparaît comme insuffisant pour induire des différences au niveau des composés polyphénoliques analysables. L'expérience de vieillissement de l'Assemblage 2003 en conditions oxydatives ou non avait en effet révélé des différences entre les deux modalités seulement après 40 jours d'incubation à 47°C, alors que la teneur d'oxygène disponible était nulle dans un flacon et supérieure à 500 mg.L⁻¹ dans l'autre.

Les arômes étant présents à des teneurs de l'ordre de 10 à 100 µg soit environ 1000 fois inférieures à celle de polyphénols (de l'ordre de la centaine de milligrammes par litre pour les vins blancs), le différentiel d'oxygène provoque des altérations des arômes détectables alors que la modification de la composition en polyphénols n'est pas accessible au dosage.

Par ailleurs, pour un cépage donné, les différences observées entre les vins sont associées essentiellement au millésime et non au caractère oxydé défini par analyse sensorielle (Figure 126).

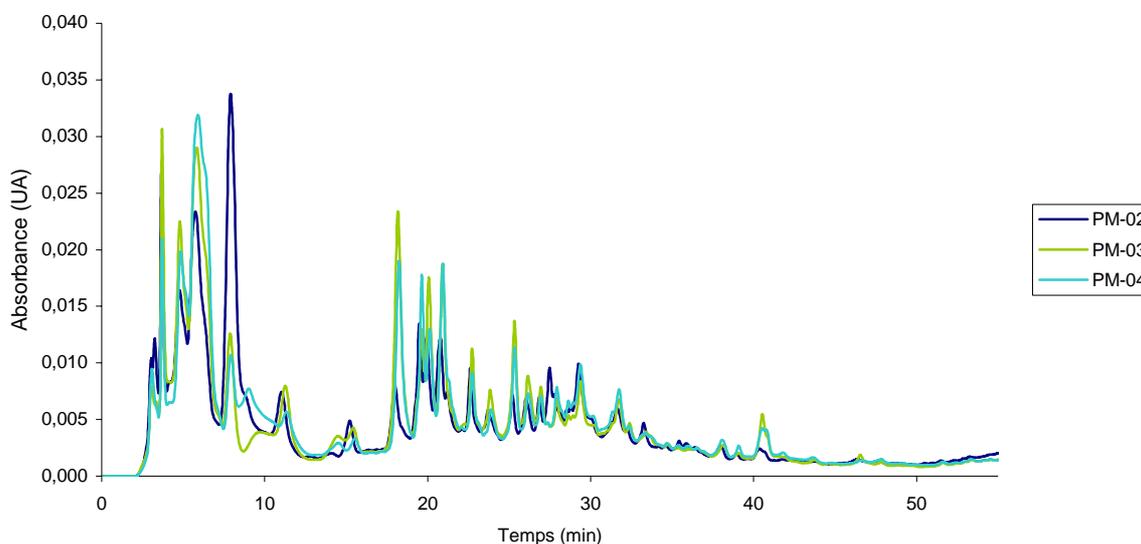


Figure 126 : Profils chromatographiques à 280 nm des vins issus de Pinot meunier millésimes 2002, 2003, et 2004

Les précurseurs sensibles à l'oxydation mis en évidence lors des études de vieillissement modèle de l'Assemblage 2003 par voie thermique ou chimique ne présentent pas de différences significatives entre les modalités oxydée et non oxydée d'un même vin monovariétal.

Cependant quelques relations entre la composition polyphénolique du vin et son âge ou le cépage utilisé peuvent être soulignées. L'acide *t*-caftarique présente des teneurs moindres dans les vins de 2002 que dans ceux de 2003 et 2004, ce qui va dans le sens de la disparition observée lors du vieillissement thermique de l'Assemblage 2003 ou de son oxydation par le periodate de sodium (cf Partie 2, chapitre I). L'acide caféique est présent dans les vins à des teneurs comparables dans tous les vins, hormis le Pinot noir et le Chardonnay 2002 qui en contiennent une quantité beaucoup plus importante. Ce résultat montrerait que le stade d'évolution de ces vins correspond à un vieillissement thermique inférieur à 20 jours, dans la mesure où l'acide caféique conserve une teneur constante pendant cette période dans l'expérience à 47°C (cf Partie 2, chapitre I). Les concentrations en caféate d'éthyle et acide gallique sont plus élevées dans les vins les plus vieux de Chardonnay et Pinot noir, et inversement pour le Pinot meunier. Nous avons observé, pendant le vieillissement thermique, que les teneurs en caféate d'éthyle et acide gallique

augmentaient en conditions non oxydatives alors qu'elles diminuaient en présence d'oxygène ou par oxydation chimique avec le periodate. On peut donc supposer que le Pinot meunier 2002 est plus sensible à l'oxydation que les deux autres cépages issus des mêmes vendanges. Enfin, le HMF présente des teneurs moyennes plus élevées dans les vins de 2002 et 2003 que dans ceux de 2004, confirmant ainsi son statut de marqueur de vieillissement défini lors du vieillissement thermique de l'Assemblage 2003.

Pour aller plus loin dans la comparaison avec le test d'oxydation par le périodate et le vieillissement thermique, la connaissance de la composition polyphénolique des vins à l'embouteillage aurait été nécessaire.

C. Approche RMN 1D¹H et DOSY

L'application des expériences RMN 1D¹H et DOSY aux vins a montré, dans le chapitre précédent, que les signaux des polyphénols au niveau de la zone des protons aromatiques étaient de très faible intensité par rapport à ceux des autres familles de composés ce qui rendait difficile la lecture des spectres.

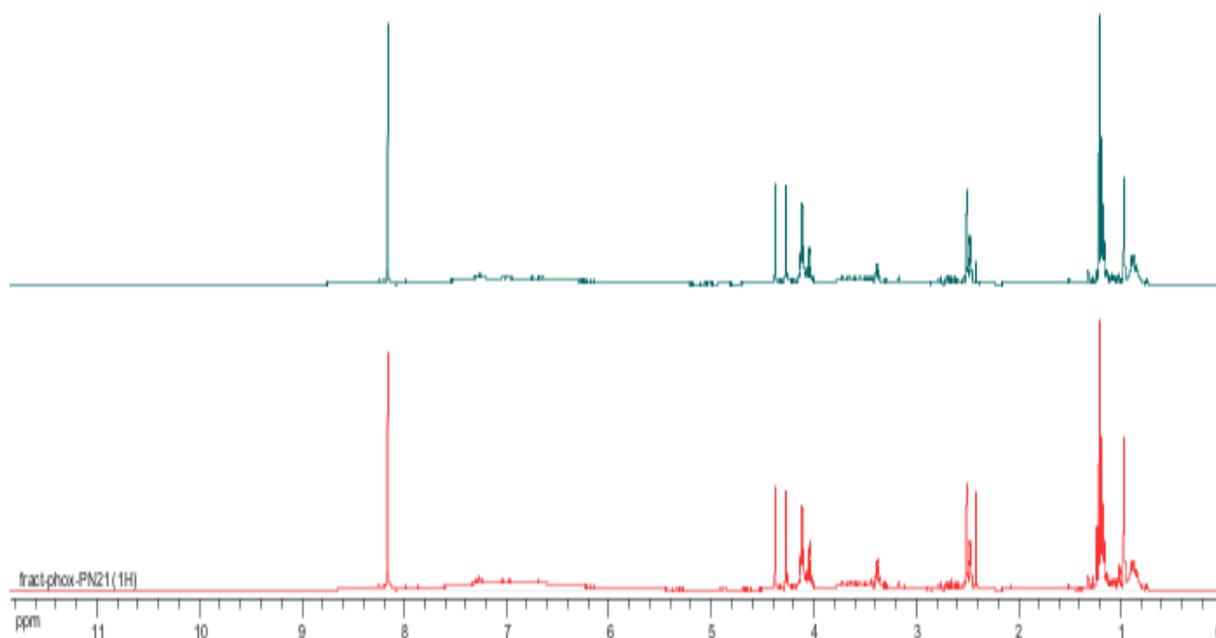
Afin de gagner en sensibilité et résolution, les vins de Pinot noir 2002 oxydé et non oxydé ont été déposés sur une cartouche de tC18, et, après un lavage à l'eau acidifiée, les fractions polyphénoliques ont été éluées avec un mélange eau/acétone/méthanol acidifié. Après évaporation à sec, les résidus solides ont été repris dans du DMSO deutéré ($\delta_H = 2,49$ ppm, $D = 257 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et analysés par RMN 1D¹H et DOSY.

Ce fractionnement a permis d'obtenir des signaux plus intenses et mieux résolus dans la zone des protons aromatiques des spectres 1D¹H (Figure 127 (a)). Cependant les spectres restent dominés par des signaux peu déblindés, ce qui suggère que la fraction contient des produits autres que les acides hydroxycinnamiques majoritaires dans le vin qui ne possèdent pas ce type de protons. Parmi les polyphénols, seuls les tanins et quelques glycosides peuvent présenter des signaux dans cette région du spectre, mais son intensité très supérieure à celle de la zone des protons aromatiques suggère la présence d'autres familles telles que des polysaccharides ou éventuellement des peptides en interaction avec la fraction polyphénolique. Dans cette zone de déplacements chimiques, la différence majeure entre les deux échantillons oxydé et non oxydé se traduit par une forte augmentation de l'intensité du singulet à 2,42 ppm dans la fraction issue de la modalité oxydée. Le spectre DOSY permet d'attribuer à ce composé une masse de 106 g.mol⁻¹ environ ($D = 232 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), mais reste insuffisant pour une identification de la molécule. Le singulet à 2,08 ppm, auquel est associée

une masse de $57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ environ par DOSY, voit également son intensité augmenter dans la fraction oxydée. Ce signal peut être attribué à l'acide acétique ¹⁷³, molécule susceptible d'apparaître par oxydation de l'éthanol.

Un agrandissement du spectre au niveau de la zone des composés aromatiques rend compte de l'extrême similitude des deux échantillons de Pinot noir oxydé et non oxydé (Figure 127 (b)). Seule une différence d'intensité globale du massif est repérée pour la modalité oxydée, ainsi que le renforcement de l'intensité du signal à 7,86 ppm.

(a) Spectre 1D ¹H de 0 à 12 ppm



(b) Zoom sur la zone aromatique

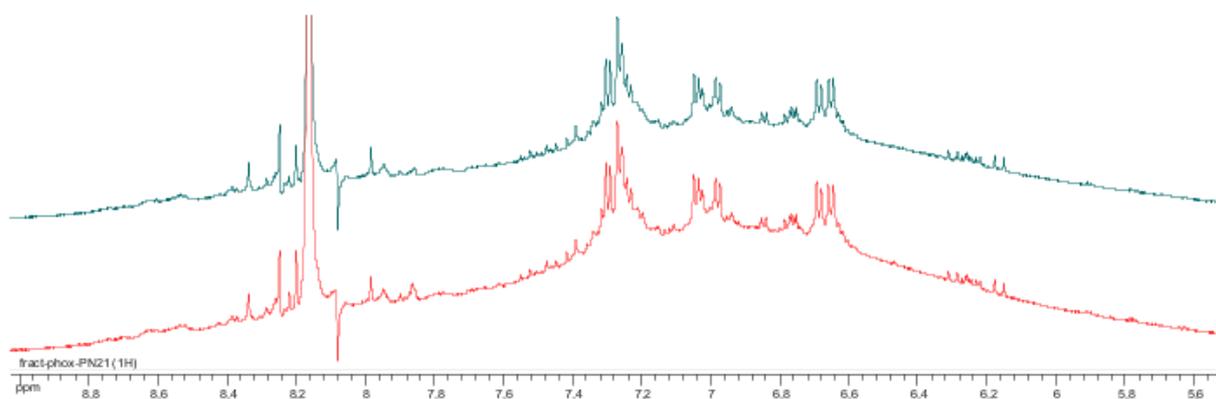


Figure 127 : Spectres 1D ¹H de 0 à 12 ppm et zoom sur la zone aromatique (b) des fractions polyphénoliques du Pinot noir 2002 oxydé (rouge) et non oxydé (vert)

Le spectre DOSY (Figure 128) met en évidence dans cette zone des composés dont les masses molaires peuvent atteindre quelques milliers de grammes par mole ($D = 62,9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) pour le signal à 5,84 ppm, valeur obtenue en augmentant progressivement l'intensité du signal pour faire apparaître les corrélations. Afin d'évaluer plus précisément la valeur, le mieux serait d'ajouter un composé polyphénolique qui servirait de calibrant tel qu'une flavone. La grande stabilité de la gamme de masses observée entre les modalités oxydée (bleu vert) et non oxydée (rose) reste peu surprenante dans la mesure où l'oxydation chimique du vin par le periodate de sodium avait déjà révélé ce type de comportement (cf Partie 3 chapitre II).

Plus qu'une stabilité de la gamme de masses, les spectres DOSY mettent en évidence une composition identique, et aucun marqueur lié à l'oxydation parmi les signaux majoritaires n'a pu être mis clairement en évidence.

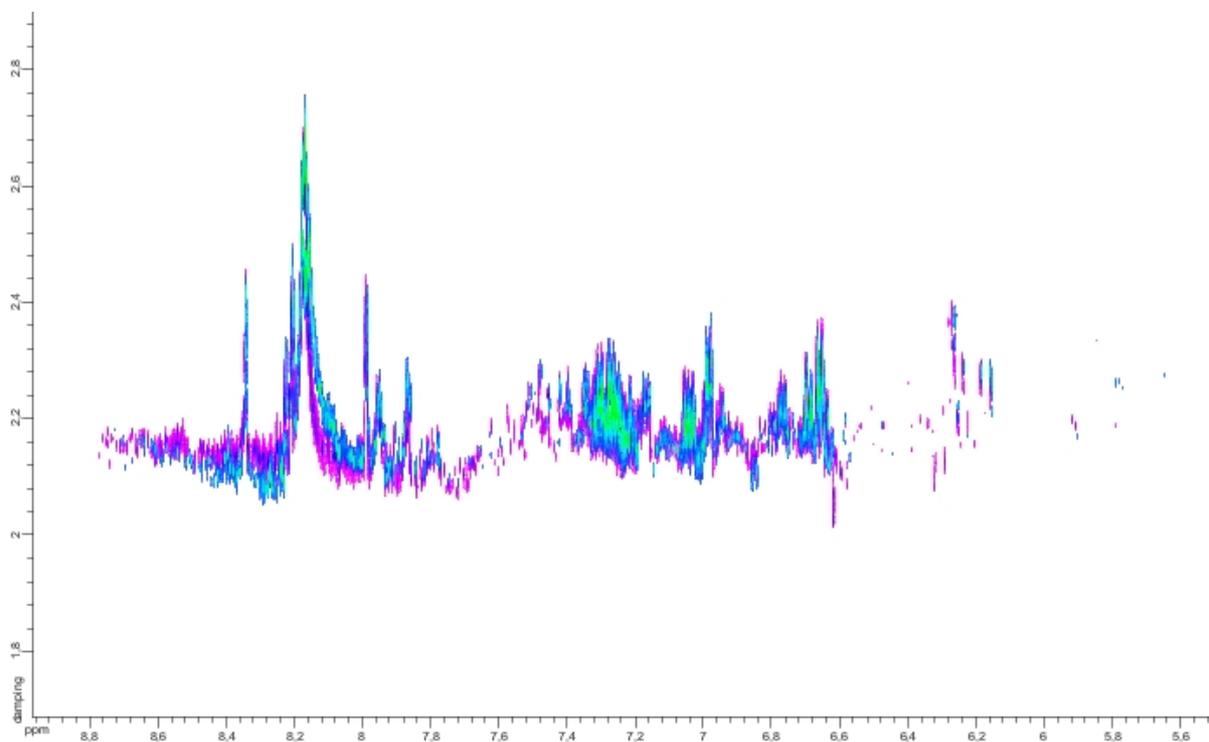


Figure 128 : Superposition des spectres DOSY des modalités oxydée et non oxydée du Pinot noir 2002

De la même façon, les analyses RMN $1\text{D}^1\text{H}$ et DOSY réalisées sur les échantillons de Chardonnay 2002 oxydé et non oxydé n'ont pas permis de distinguer les deux modalités.

III. Sensibilité des cépages à l'oxydation

La sensibilité à l'oxydation étant liée notamment à une modification globale de la couleur, la première hypothèse proposée a été la suivante : plus la modalité oxydée d'un vin est éloignée de la modalité non oxydée correspondante dans l'espace tri-dimensionnel $L^*a^*b^*$, plus le vin est sensible à l'oxydation. Nous avons également cherché à savoir s'il existait des corrélations entre la sensibilité à l'oxydation et la couleur de la modalité non oxydée correspondante ou les variations relatives des différents paramètres L^* , a^* et b^* .

A. Sensibilité à l'oxydation et approche colorimétrique

Une ACP a été réalisée à partir des données colorimétriques des modalités non oxydées et de paramètres traduisant la différence entre elles et les modalités oxydées correspondantes.

1. Structure du fichier de données colorimétriques

Treize variables ont été distinguées :

La modalité non oxydée est définie par ses paramètres L^* , a^* , et b^* , et la différence entre les modalités non oxydée et oxydée par les variables :

- ΔL^* , Δa^* , Δb^*
- distance3D, distance L^*a^* , distance L^*b^* , et distance a^*b^* : distances évaluées respectivement dans l'espace tridimensionnel $L^*a^*b^*$, les plans (L^*a^*), (L^*b^*), et (a^*b^*)
- $\Delta L^*/\Delta a^*$, $\Delta L^*/\Delta b^*$, $\Delta a^*/\Delta b^*$, variations relatives des différents paramètres colorimétriques.

2. Interprétation des axes

Les trois premiers axes de l'ACP expliquent à eux trois 91,9% de la variabilité (Axe 1 : 42,1%, Axe 2 : 31 %, Axe 3 : 18,8 %).

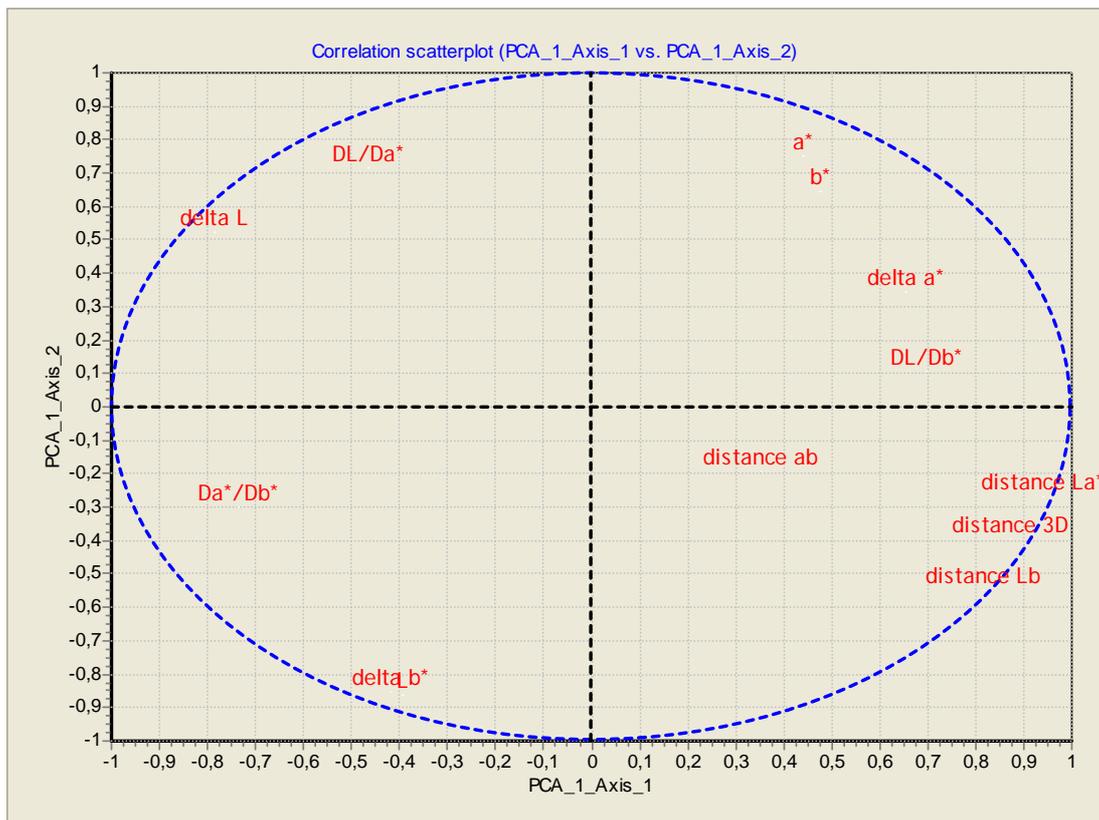
Les cercles de corrélations associés aux plans 1,2 et 1,3 sont présentés sur la Figure 129. Les variables les plus corrélées au premier axe sont les paramètres distance3D ($r = 0,87$), distance L^*a^* ($r = 0,94$) et distance L^*b^* ($r = 0,81$) positivement, ΔL^* ($r = -0,79$) et $\Delta a^*/\Delta b^*$ ($r = -0,74$) négativement. Cet axe oppose donc les échantillons qui ont le plus évolué

au niveau couleur que ce soit dans l'espace tridimensionnel ou dans les espaces L^*a^* et L^*b^* , à ceux dont les variations de luminosité ou de teinte sont importantes.

Les variables a^* et $\Delta L^*/\Delta a^*$ sont positivement corrélées à l'axe 2 ($r = 0,75$ et $0,72$ respectivement), tandis que L^* et Δb^* le sont négativement ($r = -0,86$ et $-0,85$ respectivement). Cet axe oppose donc les échantillons qui ont une nuance rouge marquée et un rapport $\Delta L^*/\Delta a^*$ grand à ceux dont la luminosité et la variation de la composante jaune entre les modalités oxydée et non oxydée sont élevées.

Enfin, l'axe 3 oppose principalement les vins dont la variation de luminosité est élevée relativement à la variation de la composante jaune (paramètre $\Delta L^*/\Delta b^*$; $r = 0,66$) et ceux caractérisés par un fort paramètre distance a^*b^* ($r = -0,89$).

(a) Cercle de corrélation du plan 1,2



(b) Cercle de corrélation du plan 1,3

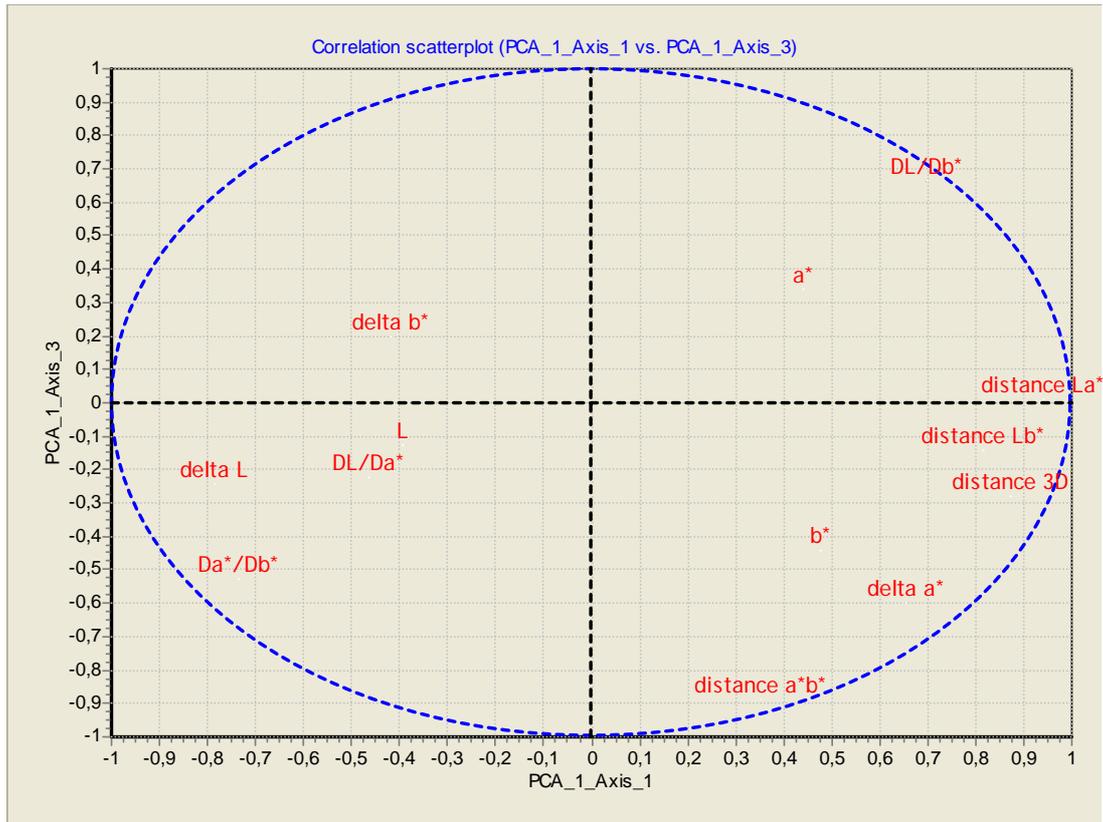


Figure 129 : Cercles de corrélations des plans 1,2 et 1,3

3. Typologie des vins

Le plan 1,2 structure les échantillons de vins par cépage et n'apporte pas d'informations susceptibles d'être reliées aux résultats d'analyse sensorielle.

Au contraire, le plan 1,3 nous apporte des renseignements qui peuvent être reliés aux résultats d'analyse sensorielle. La projection des échantillons de vins sur ce plan est présentée dans la Figure 130. Les échantillons sont identifiés par deux codes : un code graphique (triangle jaune = Pinot meunier, rond rouge = Chardonnay, croix verte = Pinot noir), et un code chiffré du type XX-DoxY (XX = millésime et Y=1, 2, 3 où 1 correspond, pour un millésime donné à l'échantillon sensoriellement défini comme le moins sensible à l'oxydation et 3 à celui le plus sensible).

L'axe 1 ne présente pas de structuration particulière, au contraire de l'axe 3 qui classe, pour chaque millésime, les trois cépages de la même façon que l'analyse sensorielle. En considérant un à un les millésimes 2002, 2003, et 2004, le balayage de l'axe 3 de façon décroissante permet en effet de trier les cépages du moins sensible à l'oxydation (Dox1) au

plus sensible (Dox3). Pour un millésime donné, le cépage le plus sensible à l'oxydation serait donc celui dont les modalités oxydée et non oxydée sont les plus éloignées dans le plan a*b*. Le classement relatif entre les millésimes est délicat puisque les échantillons analysés ne sont pas au même stade d'évolution.

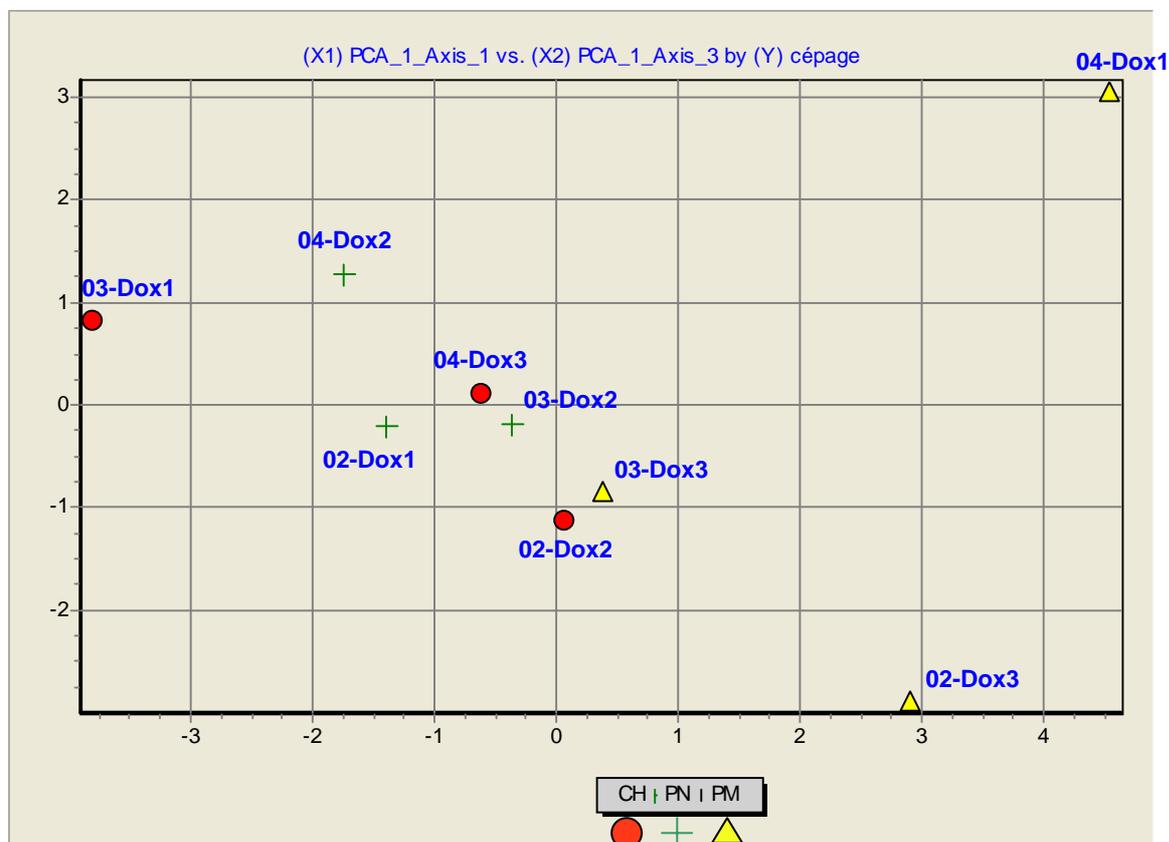


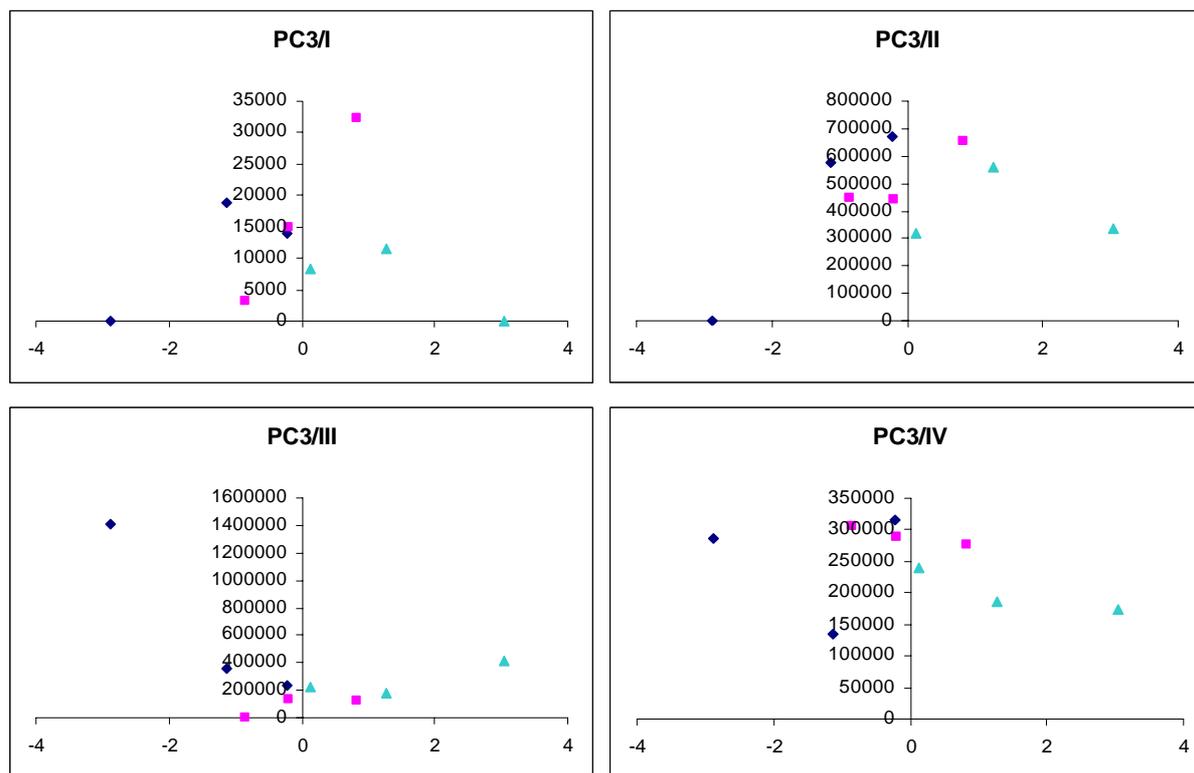
Figure 130 : Représentation des individus dans le plan 1,3 de l'ACP

B. Sensibilité à l'oxydation et composition polyphénolique

La sensibilité d'un vin à l'oxydation est certainement liée à sa composition polyphénolique à l'embouteillage et à son évolution au cours du temps. Ne disposant pas de ces données, nous avons malgré tout tenté de chercher des liens entre ce critère et la composition polyphénolique des 9 échantillons de vins. Les résultats ne peuvent pas donner de réponse absolue mais sont des pistes à confirmer.

Pour cela, les vins ont été caractérisés par les aires, à 280 ou 320 nm suivant les maximums d'absorption, des onze composés majeurs présentant de fortes variabilités (cf II.B.1).

Un lien a été recherché entre la composition phénolique des vins et la coordonnée de ces vins selon l'axe 3 de l'ACP précédente qui a permis de classer les vins selon leur sensibilité à l'oxydation. Quel que soit le composé considéré, la représentation de l'aire du pic chromatographique en fonction de la coordonnée selon l'axe 3 se traduit par un nuage de points (Figure 131). Aucune évolution particulière n'a été décelée, même en considérant les millésimes un par un.



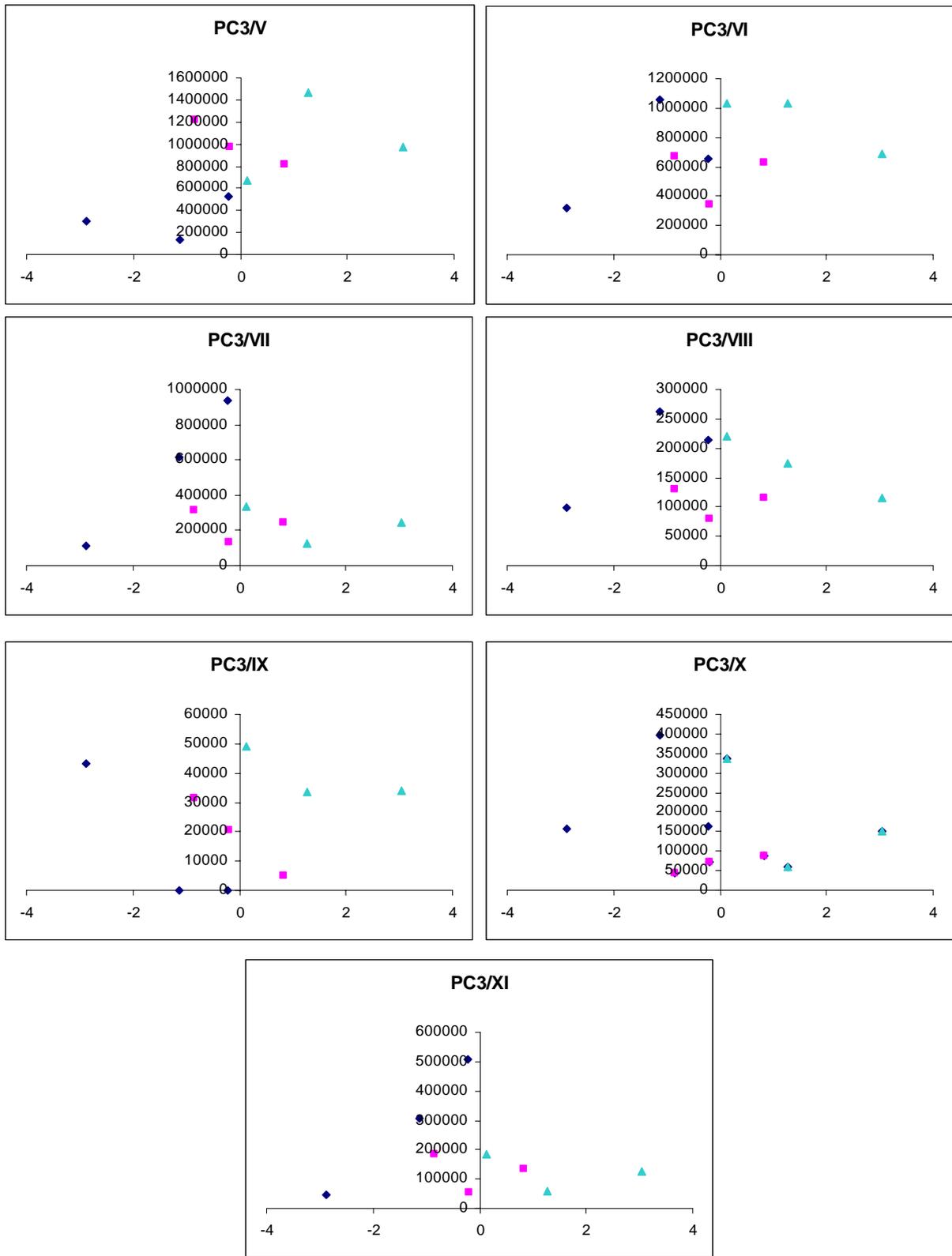


Figure 131 : Composition polyphénolique en fonction de la sensibilité à l'oxydation (▲ : 2004, ■ : 2003, ◆ : 2002)

IV. Conclusion

L'analyse sensorielle a permis de déceler des différences entre les échantillons « oxydés » et « non oxydés » pour tous les cépages et tous les millésimes, sauf le Pinot meunier 2004, alors que l'étude de la composition polyphénolique accessible à l'analyse HPLC ou à la RMN ne le permet pas. Les polyphénols semblent donc être des indicateurs d'oxydation pas suffisamment sensibles pour traduire le différentiel d'oxygène obtenu par les différents bouchages. Seule la colorimétrie est capable sur la base des distances entre les variables colorimétriques, et principalement la distance a^*b^* , de fournir le classement des cépages vis-à-vis de leur sensibilité à l'oxydation pour chaque millésime.

Cependant aucune méthode ne permet dans l'absolu, à savoir sans tenir compte du cépage ou de l'âge du vin, de différencier les 9 modalités oxydées des 9 modalités non oxydées. Le cépage, l'âge du vin, sont donc des sources de variabilités plus importantes que l'apport d'oxygène. Par ailleurs, la composition polyphénolique initiale est certainement influente comme l'ont montré les travaux en solutions modèles.

Des similitudes ont pu être montrées entre l'incidence de l'âge sur la composition polyphénolique de vins et les résultats qui avaient été obtenus par vieillissement thermique ou par oxydation chimique de l'Assemblage 2003 par le periodate de sodium dans une moindre mesure. Tous les précurseurs sensibles à l'oxydation détectés à travers le vieillissement thermique avaient été mis en évidence à partir de l'oxydation chimique par le periodate, mais cette dernière méthode avait permis d'atteindre un stade d'évolution des vins plus avancé et un nombre plus grand nombre de précurseurs sensibles à l'oxydation. Il est donc logique de trouver de trouver des similitudes plus grandes entre l'évolution des composés polyphénoliques dans les vins jeunes et celle obtenue par vieillissement thermique.

Conclusion et Perspectives

Le travail s'inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension de l'implication des polyphénols dans l'apparition des défauts sensoriels de type oxydé dans les vins blancs de Champagne durant leur maturation sur lies.

La démarche adoptée a été de caractériser les cépages et vins champenois, afin, d'une part, de déterminer les composés susceptibles d'être impliqués dans les phénomènes d'oxydation, et d'autre part, de rechercher des marqueurs d'oxydation à partir de deux gammes de vins plus ou moins oxydés.

L'analyse de la composition polyphénolique des trois cépages champenois vendanges 2005 a permis de mettre en évidence dans la pulpe, non seulement des acides phénols, mais aussi des tanins. Les travaux ont montré qu'une faible quantité de ces tanins diffuse dans les jus par pressurage doux, mais pourrait représenter malgré tout une teneur comparable à celle de l'acide caftarique dans les vins. Ces tanins, caractérisés par un degré de polymérisation moyen certes plus faible que celui des tanins trouvés dans la pulpe mais qui reste relativement élevé, s'oxydent rapidement en présence de polyphénoloxydase au cours de l'obtention du moût, ce qui pourrait expliquer qu'ils n'aient pas été détectés dans les vins par les approches classiques, hormis via un dosage global (DMAC) qui laisse supposer leur présence. Par ailleurs, les teneurs et proportions variables d'acides phénols et tanins dosés dans les pulpes des cépages champenois sont susceptibles de conduire à des sensibilités des vins plus ou moins grandes vis-à-vis de l'oxydation.

L'analyse des gammes de vins plus ou moins oxydés n'a pas permis de mettre en évidence de marqueurs d'oxydation, même après fractionnement, suggérant une évolution insuffisante de la composition polyphénolique liée à un faible différentiel d'oxygène reçu. Il est alors apparu nécessaire de provoquer l'oxydation, soit par un apport plus important d'oxygène accompagné ou non d'un chauffage, soit par l'adjonction d'un oxydant chimique, dans le but d'accélérer les phénomènes. Dans ces conditions, les composés phénoliques sont affectés par l'oxydation. La comparaison des résultats obtenus par le chauffage en présence d'oxygène (40 jours) et par l'oxydation chimique (quelques heures) a permis de distinguer les phénomènes thermiques des phénomènes purement oxydants. En outre, l'étude a confirmé que le stade d'oxydation des vins de Champagne même âgés de dix ans reste peu évolué.

Ces résultats nous ont conduit à mettre au point un test prédictif de vieillissement oxydatif des vins de Champagne avec le periodate de sodium. Dans cet objectif, une étude comparative entre l'autoxydation et l'oxydation par le periodate a été entreprise sur la base de la caractérisation des produits d'oxydation de la catéchine. L'oxydation chimique par le periodate s'est révélée être un bon compromis entre l'autoxydation à 47°C en milieu modèle vin à pH 3 et celle conduite à un pH plus élevé (pH 6,5), tant du point de vue de la nature des produits formés que de la cinétique (quelques heures). Le développement du test prédictif a été l'occasion de s'intéresser au rôle potentiel des teneurs relatives en acides phénols et flavanols sur leur oxydation. Un effet inhibiteur de l'acide protocatéchique vis-à-vis du brunissement lié à l'autoxydation de la catéchine à pH 6,5 a été démontré, effet qui se traduit par la formation de dimères mixtes en compétition avec les voies réactionnelles impliquant uniquement le flavanol. Lors de l'oxydation de l'épicatéchine par le periodate de sodium, un tel effet de l'acide protocatéchique n'a pas été observé du fait des conditions d'oxydation différentes (pH) ou de la nature du conformère susceptible de favoriser d'autres voies réactionnelles que celle conduisant à la formation d'adduits mixtes. Une protection des acides caféique et protocatéchique par les flavanols a été observée lors de l'oxydation par le periodate, alors que l'acide gallique protège le dimère de flavanol B2. L'analyse des produits issus des mélanges binaires, et en particulier l'étude des schémas de fragmentation des produits mixtes, est en cours afin d'élucider les mécanismes d'oxydation des différents polyphénols et de vérifier leur éventuelle spécificité.

Suite au succès limité de la mise en évidence de tanins dans les vins par les méthodes classiques et du rôle majeur que ces flavanols pourraient avoir dans l'oxydation, deux nouvelles approches ont été développées. La première méthodologie, basée sur l'analyse de complexes BSA-tanins par MALDI-TOF SM a permis de caractériser différentes fractions de tanins natifs (DPm 2,6 à DPm 28,7) par leur degré de polymérisation moyen et leur distribution en masses pour la première fois. La seconde voie explorée s'est appuyée sur des analyses en RMN. L'expérience DOSY a permis de valider la caractérisation d'une des fractions de tanins natifs analysée par MALDI-TOF SM et de déterminer l'amplitude de la polymérisation obtenue par oxydation de solutions modèles de flavanols et d'acides phénols. L'analyse de vins oxydés avec le periodate de sodium a révélé des modifications notables dans la région des protons aromatiques entre les vins oxydés et non oxydés mais n'a pas fait apparaître d'évolution de la gamme de masses des produits formés.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à la distinction de modalités oxydée et non oxydée de vins issus de trois cépages et trois millésimes. L'analyse sensorielle basée sur

un test triangulaire a permis de distinguer dans presque tous les cas ces deux modalités, mais elle n'apporte pas de conclusion quant à un classement unique des vins selon leur caractère oxydé. L'analyse CLHP différencie les vins suivant le cépage d'origine et le millésime, et non selon la nature oxydée ou non oxydée des modalités. De même, l'application de l'expérience DOSY aux fractions polyphénoliques des modalités oxydée et non oxydée de vins ne permet pas de les distinguer. Les études colorimétriques ont montré que, selon le cépage utilisé pour élaborer le Champagne, le caractère oxydé se traduit par des évolutions différentes de la couleur, avec un renforcement de l'intensité colorante pour les vins monovariétaux issus de Chardonnay et de Pinot noir, et une modification de la teinte du jaune vers le rouge sans renforcement de l'intensité colorante pour ceux issus de Pinot meunier. L'implication des anthocyanes dans les phénomènes oxydants pourraient donc être envisagée ainsi que l'existence de produits d'oxydation ayant cette nuance de couleur. On pensera en particulier, aux solutions modèles contenant de l'acide caféique qui présentent une teinte orangée attribuée à aucun composé jusque-là. Par ailleurs, pour chaque millésime étudié, la sensibilité à l'oxydation des cépages définie par analyse sensorielle a été visualisée par colorimétrie en considérant les distances entre les modalités oxydée et non oxydée dans l'espace CIE $L^*a^*b^*$, la plus corrélée étant la distance dans le plan a^*b^* .

Les perspectives à donner à ce travail se déclinent en trois axes.

Afin de poursuivre la mise en place d'un test prédictif, il est nécessaire de valider le test d'oxydation par le periodate sur des vins non oxydés. Il s'agira de vérifier par colorimétrie que l'évolution de couleur obtenue à travers ce test est identique à celle observée suite à une conservation de ces mêmes vins en conditions normales plus ou moins oxydatives. Par ailleurs, il serait intéressant de tester des oxydants générant des mécanismes radicalaires de façon à impliquer les molécules constituant la matrice vin, tel que l'éthanol, qui ne semblent pas être mis en jeu par le periodate de sodium spécifique des ortho-diphénols.

Les oligomères et polymères de flavanols restent inaccessibles à l'analyse, mais leur rôle pressenti dans le brunissement souligne l'importance de poursuivre le développement de la méthodologie MALDI-TOF SM par une étape de mise au point sur des fractions de tanins oxydés avant de s'intéresser à la mise en évidence et au dosage de ces tanins dans les vins. Une recherche de corrélation avec l'analyse sensorielle et/ou un test de brunissement pourrait alors être envisagée.

Pour aller plus loin dans l'interprétation de la sensibilité des cépages à l'oxydation, un suivi de la composition polyphénolique de différents cépages et des vins correspondants

(modalité oxydée et non oxydée) à l'embouteillage puis au cours de la prise de mousse et de la maturation pourrait être envisagé en association avec des analyses sensorielles et des mesures colorimétriques à chaque stade. Un nombre important d'échantillons permettrait de traiter les résultats selon une approche chimiométrique autorisant une vision globale du phénomène, et en particulier la détermination du facteur prépondérant.

Enfin, les polyphénols apparaissant comme des indicateurs peu sensibles pour traduire le différentiel d'oxygène lié à l'étanchéité du capsulage, il serait utile de s'intéresser aux composés volatils, qui, de par leurs teneurs, semblent plus largement affectés.

Références

1. Valade, M.; Tribaut-Sohier, I.; Bunner, D.; Pierlot, C.; Moncomble, D. et Tusseau, D. Les apports d'oxygène en vinification et leurs impacts sur les vins - Le cas particulier du Champagne - Partie 1 *Revue française d'oenologie*, **2006**, 221.
2. Valade, M.; Tribaut-Sohier, I.; Bunner, D.; Pierlot, C.; Moncomble, D. et Tusseau, D. Les apports d'oxygène en vinification et leurs impacts sur le vin - Le cas particulier du Champagne - Partie 2. *Revue Française d'Oenologie*. **2006**, 222, p. 17-28.
3. Navarre, C., 1991 *L'oenologie*, Paris, pp. 456.
4. Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Ribéreau-Gayon, P. et Sudraud, P., 1976 Tome III - Vinifications, transformations du vin, Paris.
5. Malvy, J.; Robillard, B. et Duteurtre, B. Influence des protéines sur le comportement de la mousse des vins de Champagne. *Sciences des Aliments*. **1994**, 14, p. 87-98.
6. Maujean, A.; Poinault, P.; Dantan, H.; Brissonnet, F. et Cossiez, E. Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'OIV*. **1990**, 63, p. 405-427.
7. Poux, C. et Ournac, A. Acides aminés libres et polypeptides du vin. *Annales de Technologie Agricole*. **1970**, 19, p.
8. Tusseau, D. et Van Laer, S., 1993 Etude des macromolécules des vins de Champagne *Sciences des Aliments*, vol. 13. pp. 463-482.
9. Puff, N.; Marchal, R.; Aguié-Béghin, V. et Douillard, R. Is grape invertase a major component of the adsorption layer formed at the air/Champagne interface? *Langmuir*. **2001**, 17, p. 2206-2212.
10. Chamkha, M.; Cathala, B.; Cheynier, V. et Douillard, R. Phenolic composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot noir vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, p. 3179-3184.
11. Leroy, M.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M. et Charpentier, C. Yeast autolysis during Champagne aging. *American Journal of Enological Viticulture*. **1990**, 41, p. 21-28.
12. Boidron, J.N.; Avakians, S.P. et Bertrand, A. Investigation of the aroma component of sparkling wines. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. **1969**, 3, p. 43.
13. Iland, P. et Gago, P., 1995 *Discovering Australian wine - a taster's guide*, Patrick Iland Wine promotions ed, Campbelltown. pp. 164.
14. Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J. et Ferreira, V. Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*. **2002**, 77, p. 325-331.
15. Silva Ferreira, A.C.; De Pinho, P.G.; Rodrigues, P. et Hogg, T. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50, p. 5919-5924.
16. Silva Ferreira, A.C.; Hogg, T. et de Pinho, P.G. Identification of key-odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, p. 1377-1381.

17. **Wildenradt, H.L. et Singleton, V.L.** The production of acetaldehyde as a result of oxidation of phenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1974**, 25, p. 119-126.
18. **Chatonnet, P.; Barbe, C.; Boidron, J.N. et Dubourdieu, D.** Origines et incidences organoleptiques de phénols volatils dans les vins. Application à la maîtrise de la vinification et de l'élevage. *Revue Française d'Oenologie*. **1993**, p. 279-287.
19. **Ribéreau-Gayon, P.** Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. **1965**, 260, p. 341.
20. **Boursiquot, J.; Sapis, J. et Macheix, J.** Les esters hydroxycinnamiques chez le genre *Vitis*. Essai d'application taxonomique : premiers résultats. *CR Académie des Sciences, Ser III*. **1986**, 302, p. 177.
21. **Cheynier, V.; Souquet, J.M. et Moutounet, M.** Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1989**, 40, p. 320-324.
22. **Singleton, V.L.** Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems : observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1987**, 38, p. 69-76.
23. **Cheynier, V.; Osse, C. et Rigaud, J.** Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *Journal of Food Science*. **1988**, 53, p. 1729-1732.
24. **Lu, Y.R. et Foo, L.Y.** The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*. **1999**, 65, p. 1-8.
25. **Jeandet, P.; Bessis, R. et Gautheron, B.** The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystibene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1991**, 42, p. 41-46.
26. **Waterhouse, A.L. et Lamuela-Raventos, R.M.** The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochemistry*. **1994**, 37, p. 571-573.
27. **Hebrero, E.; Santos-Buelga, C. et Rivas-Gonzalo, J.** High Performance Liquid Chromatography-Diode Array spectroscopy identification of anthocyanins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1988**, 39, p. 227-233.
28. **Baldi, A.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Vincieri, F.F. et Casetta, B.** HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1995**, 43, p. 2104-2109.
29. **Vidal, S.; Hayasaka, Y.; Meudec, E.; Cheynier, V. et Skouroumounis, G.** Fractionation of grape anthocyanin classes using Multilayer Coil Countercurrent Chromatography with step gradient elution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, p. 713-719.
30. **Roggero, J.P.; Larice, J.L.; Rocheville Divorne, C.; Archier, P. et Coen, S.** Composition anthocyanique des cépages. I : Essai de classification par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante. *Revue Française d'Oenologie*. **1988**, 112, p. 41-48.
31. **Souquet, J.-M.; Cheynier, V.; Brossaud, F. et Moutounet, M.** Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*. **1996**, 43, p. 509-512.
32. **Bate-Smith, E.C.** Astringency in foods. *Food*. **1954**, 23, p. 124-135.
33. **Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V. et Moutounet, M.** Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*. **1994**, 36, p. 781-784.
34. **Souquet, J.-M.; Labarbe, B.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V. et Moutounet, M.** Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48, p. 1076-1080.

35. **Souquet, J.-M.**, 1997 Caractérisation des tanins de la grappe de raisin. Mémoire d'Ingénieur CNAM.
36. **Boukharta, M.; Girardin, M. et Metche, M.** Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*) séparation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography*. **1988**, 455, p. 406-409.
37. **Ricardo da Silva, J.M.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Cheminat, A. et Moutounet, M.** Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*. **1991**, 30, p. 1259-1264.
38. **Salagoity-Auguste, M.H. et Bertrand, A.** Wine phenolics. Analysis of low molecular weight components by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1984**, 35, p. 1241-1247.
39. **Glories, Y.; Crico, N.S.; Vivas, N. et Augustin, M.**, 1996 Identification et dosage de la procyanidine A2 dans les raisin et les vins de *Vitis vinifera* L. C. V. merlot noir, cabernet sauvignon et cabernet franc. In: J. Vercauteren, C. Chèze, M. Dumon and J.-F. Weber (eds.), Polyphenols Communications 96, *vol. 1*, Bordeaux. pp. 153-154
40. **Bourzeix, M.; Weyland, D. et Heredia, N.** Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bulletin de l'OIV*. **1986**, 669-670, p. 1171-1253.
41. **Ricardo da Silva, J.M.; Rosec, J.P.; Bourzeix, M.; Mourgues, J. et Moutounet, M.** Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvèdre grapes and wines. *Vitis*. **1992**, 31, p. 55-63.
42. **Souquet, J.M.; Veran, F.; Mané, C. et V., C.**, 2006 Optimization of extraction conditions for analyzing flavonoids from the different parts of grape cluster. Application to six grape varieties, XXIII International Conference on Polyphenols, Winnipeg
43. **Ricardo da Silva, J.M.; Bourzeix, M.; Cheynier, V. et Moutounet, M.** Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. *Vitis*. **1991**, 30, p. 245-252.
44. **Ribéreau-Gayon, P.** Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les flavonosides et les anthocyanosides. *Annales de Physiologie Végétale*. **1964**, 6, p. 211-242.
45. **Wulf, L.W. et Nagel, C.W.** Identification and changes of flavonoids in Merlot and Cabernet sauvignon wines. *Journal of Food Science*. **1980**, 45, p. 479-484.
46. **Cheynier, V. et Rigaud, J.** HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1986**, 37, p. 248-252.
47. **Price, S.F.; Breen, P.J.; Vallado, M. et Watson, B.T.** Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1995**, 46, p. 187-194.
48. **Hmamouchi, M.; Es-Safi, N.; Lahrichi, M.; Fruchier, A. et Essassi, E.M.** Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 47, p. 186-192.
49. **Trousdale, E. et Singleton, V.L.** Astilbin and engeletin in grapes and wines. *Phytochemistry*. **1983**, 22, p. 619-620.
50. **Flanzy, C.**, 1998 Oenologie - Fondements scientifiques et technologiques, Technique et Documentation ed. Lavoisier, Paris, pp. 1311.
51. **Souquet, J.-M.; Cheynier, V. et Moutounet, M.**, 1998 Phenolic composition of grape stems, XIX emes journées internationales d'études des polyphénols, Lille, France
52. **Dangles, O.**, 2006 Propriétés chimiques des polyphénols. In: Lavoisier (ed.), Les polyphénols en agroalimentaire, Tec & Doc ed.
53. **Harel, E. et Mayer, A.M.** Partial purification and properties of catechol oxidases in grapes. *Phytochemistry*. **1971**, 10, p. 17-22.

54. **Gunata, Y.Z.; Sapis, J.C. et Moutounet, M.** Substrates and carboxylic acid inhibitors of grape polyphenoloxidases. *Phytochemistry*. **1987**, 26, p. 1573-1575.
55. **Fulcrand, H.**, 1993 Brunissement enzymatique des moûts et des vins blancs : aspects cinétique et analyse spectroscopique des produits formés à partir d'une solution modèle d'acide caféique-Université Louis Pasteur, Strasbourg, pp. 89.
56. **Guyot, S.; Vercauteren, J. et Cheynier, V.** Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin oxidative coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*. **1996**, 42, p. 1279-1288.
57. **Weinges, K. et Miller, J.M.** Ber die enzymatische oxydative Kupplung der natürlichen Polyhydroxyflavane. *Chemiker Zeitung*. **1972**, 96, p.
58. **Wild, R.; Schick, H.; Oeser, T.; Irngartinger, H. et Weinges, K.** About the oxidative coupling of catechins - crystal and molecular structure of a 6',8' dehydro-dicatechin. *European Food Research and Technology*. **2000**, 211, p. 121-125.
59. **Cilliers, J.J.L. et Singleton, V.L.S.** Characterisation of the products of non enzymic autoxidative phenolic reaction in a caffeic acid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1991**, 39, p. 1298-1303.
60. **Fulcrand, H.; Cheminat, A.; Brouillard, R. et Cheynier, V.** Characterization of compounds obtained by chemical oxidation of caffeic acid in acidic conditions. *Phytochemistry*. **1994**, 35, p. 499-505.
61. **Antolovich, M.; Jr., D.R.B.; Bishop, A.G.; Jardine, D.; Prenzler, P.D. et Robards, K.** LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, p. 962-971.
62. **Es-Safi, N.E. et Cheynier, V.**, 2004 Flavanols and anthocyanins as potent compounds in the formation of new pigments during storage and aging of red wine. In: K. J. A. Waterhouse A.L. (ed.), Red wine color revealing the mysteries, *vol. ACS symposium series 886*. pp. 143-159.
63. **Es-Safi, N.E.; Le Guerneve, C.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. et Moutounet, M.** New polyphenolic compounds with xanthylum skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47, p. 5211-5217.
64. **Oszmianski, J.; Cheynier, C. et Moutounet, M.** Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in wine-like model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44, p. 1712-1715.
65. **Clark, A.C.; Prenzler, P.D. et Scollary, G.R.** The role of copper(II) in the bridging reactions of (+)-catechin by glyoxylic acid in a model white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, p. 6204-6210.
66. **Singleton, V.L.; Salgues, M.; Zaya, J. et Trousdale, E.** Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1985**, 36, p. 50-56.
67. **Cheynier, V.; Trousdale, E.; Singleton, S.L.; Salgues, M. et Wylde, R.** Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1986**, 34, p. 217-221.
68. **Cheynier, V.; Rigaud, J.; Souquet, J.M.; Duprat, F. et Moutounet, M.** Must browning in relation to the behaviour of phenolic compounds during oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1990**, 41, p. 346-349.
69. **Rigaud, J.; Cheynier, V.; Souquet, J.-M. et Moutounet, M.** Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1991**, 57, p. 55-63.

70. **Bradshaw, M.P.; Cheynier, V.; Scollary, G.R. et Prenzler, P.D.** Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)-catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, p. 4126-4132.
71. **Cheynier, V.; Rigaud, J.; Souquet, J.M.; Barillère, J.M. et Moutounet, M.** Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1989**, 40, p. 36-42.
72. **Simpson, R.F.** Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*. **1982**, 21, p. 233-239.
73. **Nagel, C.W. et Wulf, L.W.** Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1979**, 30, p. 111-116.
74. **Singleton, V.L.; Trousdale, E. et Zaya, J.** Oxidation of wines . I. Young wines periodically exposed to air. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1979**, 30, p. 49-54.
75. **Ibern-Gomez, M.; Andres-Lacueva, C.; Lamuela-Raventos, R.M.; Buxaderas, S.; Singleton, V.L. et Torre-Boronat, M.C.d.l.** Browning of cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *American Journal of Enology and Viticulture*. **2000**, 51, p. 29-36.
76. **Cantos, E.; Espin, J. et Tomas-Barberan, F.** Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50, p. 5691-5696.
77. **de Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J.C. et Santos-Buelga, C.** Prodelphinidins and related flavanols in wine. *International Journal of Food Science and Technology*. **2000**, 35, p. 33-40.
78. **Fulcrand, H.; Remy, S.; Souquet, J.-M.; Cheynier, V. et Moutounet, M.** Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47, p. 1023-1028.
79. **Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Oszmianski, J. et Moutounet, M.** An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry*. **1997**, 46, p. 223-227.
80. **Saucier, C.; Little, D. et Glories, Y.** First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1997**, 48, p. 370-373.
81. **Es-Safi, N.E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. et Moutounet, M.** Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47, p. 2088-2095.
82. **Revilla, I.; Perez-Magarino, S.; Gonzalez-SanJose, M.L. et Beltran, S.** Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 847, p. 83-90.
83. **Balas, L. et Vercauteren, J.** Extensive high-resolution reverse 2D NMR analysis for the structural elucidation of procyanidin oligomers. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **1994**, 32, p. 386-393.
84. **Balas, L.; Vercauteren, J. et Laguerre, M.** 2D NMR structure elucidation of proanthocyanidins : the special case of the catechin-(4a-8)-catechin-4a-8)-catechin trimer. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **1995**, 33, p. 85-94.
85. **Cheynier, V.; Doco, T.; Fulcrand, H.; Guyot, S.; Le Roux, E.; Souquet, J.M.; Rigaud, J. et Moutounet, M.** ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers. *Analisis*. **1997**, 25, p. M32-M37.

86. Guyot, S.; Doco, T.; Souquet, J.M.; Moutounet, M. et Drilleau, J.F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry*. 1997, 44, p. 351-357.
87. Le Roux, E.; Doco, T.; Sarni-Manchado, P.; Lozano, Y. et Cheynier, V. A-type proanthocyanidins from pericarp of litchi (*Litchi sinensis* Sonn). *Phytochemistry*. 1998, 48, p. 1251-1258.
88. Krueger, C.G.; Dopke, N.C.; Treichel, P.M.; Folts, J. et Reed, J.D. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48, p. 1663-1667.
89. Kennedy, J.A. et Jones, G.P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49, p. 1740-1746.
90. Salas, E.; Atanasova, V.; Poncet-Legrand, C.; Meudec, E.; Mazauric, J. et Cheynier, V. Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta*. 2004, 513, p. 325-332.
91. Singleton, V.L. et Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enological Viticulture*. 1965, 16, p. 144-158.
92. Delcour, J.A. et Janssens de Varebeke, D.J. A new colorimetric assay for flavanoids in pilsner beers. *Journal of the Institute Brewing*. 1985, 91, p. 37-40.
93. Cheynier, V.; Labarbe, B. et Moutounet, M. Estimation of procyanidin chain length. *Methods in Enzymology*. 2001, 335, p. 82-94.
94. Skouroumounis, G.K.; Kwiatkowski, M.J.; Francis, I.L.; Oakey, H.; Capone, D.L.; Duncan, B.; Sefton, M.A. et Waters, E.J. The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2005, p. 369-377.
95. Rigaud, J.; Moutounet, M. et Cheynier, V. Relation entre la consommation d'oxygène et la composition en dérivés hydroxycinnamiques de quatre moûts de raisins blancs. *Sciences des Aliments*. 1988, 8, p. 467-477.
96. Singleton, V.L. et Kramling, T.E. Browning of white wine and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enological Viticulture*. 1976, 27, p. 157-160.
97. Porter, L.J.; Hrstich, L.N. et Chan, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. 1986, 25, p. 223-230.
98. Hwang, T.L. et Shaka, A.J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*. 1995, 112, p. 275-279.
99. Wu, D.H.; Chen, A. et Johnson Jr, C.S. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*. 1995, 115, p. 260-264.
100. Pons, J.L.; Malliavin, T.E. et Delsuc, M.A. Gifa V4: A complete Package for NMR data-set processing. *Journal of Biomolecular NMR*. 1996, 8, p. 445-452.
101. Tramesel, D.; V., C. et Delsuc, M.A. Modeling of NMR processing, toward efficient unattended processing of NMR experiments. *soumise à Journal of Magnetic Resonance*. 2007, p.
102. Delsuc, M.A. et Malliavin, T.E. Maximum entropy processing of DOSY NMR spectra. *Analytical Chemistry*. 1998, 70, p. 2146-2148.

- 103. Cheynier, V.; Masson, G.; Rigaud, J. et Moutounet, M.** Estimation of must oxidation during pressing in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1993**, 44, p. 393-399.
- 104. Kallithraka, S.; Garcia-Viguera, C.; Bridle, P. et Bakker, J.** Survey of solvents for extraction of grape seed polyphenolics. *Phytochemical Analysis*. **1995**, 6, p. 265–267.
- 105. Zou, H.; Kilmartin, P.; Inglis, M. et Frost, A.** Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir wine examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Australian Journal of grape and wine research*. **2002**, 8, p. 163-174.
- 106. Santos-Buelga, C. et Treutter, D.,** 1995 Considerations on the identification of oligomeric proanthocyanidins Polyphenols Actualités, vol. 12. pp. 17-19.
- 107. Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet, J.M.; Moutounet, M. et Cheynier, V.** Accumulation of extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, p. 7331-7338.
- 108. Spagna, G.; Barbagallo, R.N. et Pifferi, P.G.** Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilisation against browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48, p. 4619-4627.
- 109. Foo, L. et Porter, L.** The structure of tannins of some edible fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1981**, 32, p. 711-716.
- 110. Hemingway, R. et McGraw, G.** Kinetics of acid-catalyzed cleavage of procyanidins. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1983**, 3, p. 421-435.
- 111. McMurrugh, I.; Madigan, D. et Smyth, M.R.** Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44, p. 1731-1735.
- 112. Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanoner, P. et Drilleau, J.F.** Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1998**, 46, p. 1698-1705.
- 113. Nawaz, H.; Shi, J.; Mittal, G.S. et Kakuda, Y.** Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. **2006**, 48, p. 176-181.
- 114. Dopico-Garcia, M.S.; Valentao, P.; Guerra, L.; Andrade, P.B. et Seabra, R.M.** Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Analytica Chimica Acta*. **2007**, 583, p. 15-22.
- 115. Rodriguez Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacon Vozmediano, J.L.; Martinez Gascuena, J. et Garcia Romero, E.** Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in warm climates. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2006**, 19, p. 687-693.
- 116. Oszmianski, J.; Romeyer, F.M.; Sapis, J.C. et Macheix, J.J.** Grape seed phenolics : Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1986**, 37, p. 7-12.
- 117. Amrani-Joutei, K. et Glories, Y.,** 1995 Etude de la localisation et de l'extractibilité des tanins et des anthocyanes de la pellicule de raisin. In: A. Lonvaud-Funel (ed.), Oenologie 95, 5ème Symposium International d'Oenologie. Lavoisier Tec et Doc, Paris. pp. 119-123.
- 118. Park, H.S.; Fougère-Rifot, M. et Bouard, J.,** 1995 Les tanins vacuolaires de la baie de *Vitis Vinifera* L. var Merlot à maturité. In: Lavoisier (ed.), Oenologie 95, Londres, Paris, New-York. pp. 115-118.
- 119. Canals, R.; Llaudy, M.; Valls, J.; Canals, J. et Zamora, F.** Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skins and seeds of

Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, p. 4019-4025.

120. BenAbdeljalil, C.; Cheynier, V.; Fulcrand, H.; Hakiki, A.; Mosaddak, M. et Moutounet, M. Mise en évidence de nouveaux pigments formés par réaction des anthocyanes avec des métabolites de levures. *Sciences des Aliments*. **2000**, 20, p. 203-220.

121. Metivier, R.P.; Francis, F.J. et Clydesdale, F.M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*. **1980**, 45, p. 1099-1100.

122. Sun, B.; Spranger, M. et Ricardo da Silva, J., 1996 Extraction of grape seed procyanidins using different organic solvents. In: J. Vercauteren, C. Cheze, M. Dumon and J. Weber (eds.), Polyphenols communication 96, *vol. 1*. Groupe Polyphenols, Bordeaux. pp. 169-170.

123. Yilmaz, Y. et Toledo, R. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2006**, 19, p. 41-48.

124. Perret, C.; Pezet, R. et Tabacchi, R. Fractionation of grape tannins and analysis by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*. **2003**, 14, p. 202-208.

125. Sarni, P.; Fulcrand, H.; Souillol, V.; Souquet, J.-M. et Cheynier, V. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1995**, 69, p. 385-391.

126. Labarbe, B.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Souquet, J.-M. et Moutounet, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47, p. 2719-2723.

127. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O. et Ricardo da Silva, J.M. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* l. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, p. 6475-6481.

128. Souquet, J.-M.; Cheynier, V. et Moutounet, M., 1999 Tannin composition of different grape varieties. In: A. Lonvaud Funel (ed.), VIème Symposium International d'oenologie, *vol. Actualités Oenologiques 1999*. Lavoisier, Bordeaux, France. pp. 165-168

129. Le Bourvellec, C.; Guyot, S. et Renard, C.M.G.C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part I - Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2004**, 1672, p. 192-202.

130. Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Gutmann, M. et Kolodziej, H. Identification of flavan-3-ol and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *Journal of Chromatography*. **1994**, 667, p. 290-297.

131. de Beer, D.; Harbertson, J. et Kilmartin, P., et al. Phenolics: A comparison of diverse analytical methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. **2004**, 55, p. 389-400.

132. Baderschneider, B. et Winterhalter, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49, p. 2788-2798.

133. Boselli, E.; Minardi, M.; Giomo, A. et Frega, N.G. Phenolic composition and quality of white d.o.c. wines from Marche (Italy). *Analytica Chimica Acta*. **2006**, 563, p. 93-100.

134. Somers, T.C.; Verette, E. et Pocock, K.F. Hydroxycinnamate ester of *Vitis vinifera*: changes during vinifications, and effect of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1987**, 40, p. 67-78.

135. Pozon Bayon, M.A.; Hernandez, M.T.; Martin Alvarez, P.J. et Polo, M.C. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines

manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, p. 2089-2095.

136. Pastore, P.; Rizzetto, T.; Curcuruto, O.; Dal Cin, M.; Zaramella, A. et Marton, D. Characterization of dehydroascorbic acid solutions by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2001**, 15, p. 2051-2057.

137. Tatsis, E.C.; Boeren, S.; Exarchou, V.; Troganis, A.N.; Vervoort, J. et Gerotheranassis, I.P. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*. **2007**, 68, p. 383-393.

138. Piraud, M.; Vianey-Saban, C.; Petritis, K.; Elfakir, C.; Steghens, J.-P.; Morla, A. et Bouchu, D. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acids metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2003**, 17, p. 1297-1311.

139. Ribéreau-Gayon, J. Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. **1972**, 6, p. 161-175.

140. Somers, T.C. et Ziemelis, G. Gross interference by sulphur dioxide in standard determinations of wine phenolics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1980**, 31, p. 600-610.

141. Treutter, D.; Feucht, W. et Santos-Buelga, C. Determination of catechins and procyanidins in plant extracts-A comparison of methods. *Acta Horticulturae*. **1994**, 381, p. 789-796.

142. de Pascual-Teresa, S.; Treutter, D.; Rivas gonzalo, J.C. et Santos Buelga, C. Analysis of flavanols in beverages by high performance liquid chromatography with chemical reaction detection. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **1998**, 46, p. 4209-4213.

143. Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Lefebvre, S.; Cheynier, V. et Moutonet, M. Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **2001**, 52, p. 140-145.

144. Gil-Munoz, R.; Gomez-Plaza, E.; Martinez, A. et Lopez-Roca, J.M. Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Impact of some pre and postfermentative factors. *Food Research International*. **1997**, 30, p. 699-705.

145. Gomez-Miguez, M.J.; Gonzalez-Miret, M.L.; Hernanz, D.; Fernandez, M.A.; Vicario, I.M. et Heredia, F.J. Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*. **2007**, 78, p. 238-245.

146. Skouroumounis, G.K.; Kwiatkowski, M.J.; Francis, I.L.; Dambergs, B.G.; Oakey, H.; Capone, D.L.; Kleinig, A.; Cozzolino, D.; Duncan, B.; Sefton, M.A. et Waters, E.J., 2005 The effect of ascorbic acid, closure type and storage conditions on the composition, colour, and flavour properties of a Riesling and wooded Chardonnay wine, In *Vino Analytica*, Montpellier

147. Fernandez-Zurbano, P.; Ferreira, V.; Pena, C.; Escudero, A.; Serrano, F. et Cacho, J. Prediction of oxidative browning in white wines as a function of their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1995**, 43, p. 2813-2817.

148. Mayen, M.; Baron, R.; Merida, J. et Medina, M. Changes in phenolic compounds during accelerated browning in white wines from cv. Pedro Ximenez and cv. Baladi grapes. *Food Chemistry*. **1997**, 58, p. 89-95.

149. Baron, R.; Mayen, M.; Merida, J. et Medina, M. Comparative study of browning and flavan-3-ols during the storage of white sherry wines treated with different fining agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80, p. 226-230.

150. Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H. et Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging - a critical review. *Food Chemistry*. **2006**, 95, p. 357-381.

- 151. Guyot, S.**, 1994 Obtention et caractérisation de produits d'oxydation enzymatique de la (+)-catéchine et de l'acide caféoyltartrique. Inhibition d'enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux. Thèse de doctorat-Université de Rennes I, France, pp. 246.
- 152. Weidman, S.W. et Kaiser, E.T.** The mechanism of the periodate oxidation of aromatic systems - III. A kinetic study of the periodate oxidation of catechol. *Journal of the American Chemical Society*. **1966**, 88, p. 5820-5827.
- 153. Weinges, K. et Piretti, M.V.** Isolierung des C₃₀H₂₆O₁₂-procyanidins B1 aus Wientrauben. *Liebigs Annalen der Chemie*. **1971**, 748, p. 218-220.
- 154. Sun, W. et Miller, J.M.** Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodiccatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Journal of Mass Spectrometry*. **2003**, 38, p. 438-446.
- 155. Young, D.A.; Young, E.; Roux, D.G.; Brandt, E.V. et Ferreira, D.** Synthesis of condensed tannins. Part 19. Phenol oxidative coupling of (+)-catechin and (+)-mesquitol. Conformation of Bis (+)-catechins. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I*. **1987**, p. 2345-2351.
- 156. Hatano, T. et Hemingway, R.W.** Conformational isomerism of phenolic procyanidins: preferred conformations in organic solvents and water. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions II*. **1997**, p. 1035-1043.
- 157. Es-Safi, N.E.; Le Guerneve, C.; Labarbe, B.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. et Moutounet, M.** Structure of a new xanthylum salt derivative. *Tetrahedron Letters*. **1999**, 40, p. 5869-5872.
- 158. Rosado-Reyes, C.M. et Francisco, J.S.** Atmospheric oxidation pathways of acetic acid. *The Journal of Physical Chemistry A*. **2006**, 110, p. 4419-4433.
- 159. Timberlake, C.F. et Bridle, P.** Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1976**, 27, p. 97-105.
- 160. Rigaud, J.; Perez-Illarbe, J.; Ricardo-da-Silva, J.M. et Cheynier, V.** Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*. **1991**, 540, p. 401-405.
- 161. Kennedy, J.A. et Taylor, A.W.** Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of chromatography A*. **2003**, 995, p. 99-107.
- 162. Viriot, C.; Scalbert, A.; Hervé-du-Penhoat, C.; Rolando, C. et Moutounet, M.** Methylation, acetylation and gel permeation of hydrolysable tannins. *Journal of Chromatography A*. **1994**, 662, p. 75-85.
- 163. Nonier, M.F.; Absalon, C.; Vivas, N. et Vivas-de-Gaulejac, N.** Application of off-line size-exclusion chromatographic fractionation-matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for proanthocyanidin characterization. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1033, p. 291-297.
- 164. Yanagida, A.; Kanda, T.; Shoji, T.; Ohnishi-Kameyama, M. et Nagata, T.** Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography*. **1999**, 855, p. 181-190.
- 165. Taylor, A.W.; Barofsky, E.; Kennedy, J.A. et Deinzer, M.L.** Hop (*Humulus lupulus* L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, p. 4101-4110.
- 166. Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V.** Study of noncovalent complexation between catechin derivatives and peptide by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). *Journal of Mass Spectrometry*. **2002**, 37, p. 609-616.

167. Vergé, S.; Richard, T.; Moreau, S.; Richelme-David, S.; Vercauteren, J.; Promé, J.C. et Monti, J.P. First observation of non-covalent complexes for a tannin-protein interaction model investigated by electrospray ionisation mass spectroscopy. *Tetrahedron Letters*. **2002**, 43, p. 2363-2366.
168. Chen, Y. et Hagerman, A.E. Characterization of soluble non-covalent complexes between Bovine Serum Albumin and -1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, p. 4008-4011.
169. Hagerman, A.E., 1989 Chemistry of tannin-protein complexation. In: R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (eds.), Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press, New York, London. pp. 323-331.
170. Charlton, A.J.; Baxter, N.J.; Lilley, T.H.; Haslam, E.; McDonald, C.J. et Williamson, M.P. Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with proline-rich repeats. *FEBS Letters*. **1996**, 382, p. 289-292.
171. Hagerman, A.E. et Butler, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1978**, 26, p. 809-812.
172. McManus, J.P.; Davis, K.G.; Beart, J.E.; Galfney, S.H.; Lilley, T.H. et Haslam, E. Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of Chemical Society Perkin Trans II*. **1985**, p. 1429-1438.
173. Gottlieb, H.E.; Kotlyar, V. et Nudelman, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal of Organic Chemistry*. **1997**, 62, p. 7512-7515.
174. Nilsson, M.; Duarte, I.F.; Almeida, C.; Delgadillo, I.; Goodfellow, B.J.; Gil, A.M. et Morris, G.A. High resolution NMR and diffusion-ordered spectroscopy of Port wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, p. 3736-3743.
175. Mochizuki, M.; Yamazaki, S.; Kano, K. et Ikeda, T. Kinetik analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica Biophysica Acta*. **2002**, 1569, p. 35-44.
176. Stilbs, P. Fourier Transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. **1987**, 19, p. 1-45.
177. Crutchfield, C.A. et Harris, D.J. Molecular mass estimation by PFG NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*. **2007**, 185, p. in press.
178. Monteiro, C. et Hervé du Penhoat, C. Translational diffusion of dilute Aqueous Solutions of sugars as probed by NMR and hydrodynamic theory. *Journal of Physical Chemistry A*. **2001**, 105, p. 9827-9833.
179. Gostan, T.; Moreau, C.; Juteau, A.; Guichard, E. et Delsuc, M.A. Measurement of aroma compound self-diffusion in food models by DOSY. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2004**, 42, p. 496-499.
180. Gil, A.M.; Duarte, I.F.; Godejohann, M.; Braumann, U.; Maraschin, M. et Spraul, M. Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*. **2003**, 488, p. 35-51.

Annexe 1

Publication

Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design ; application to the characterization of Champagne grape varieties

Mané C, Souquet J.M., Véraan F., Mazerolles G., Cheynier V., Fulcrand H.
Soumission à JAFC

Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid and anthocyanin extraction from grapes
using an experimental design; application to the characterization of Champagne grape
varieties

C. Mané, J.M. Souquet, F. Véran, G. Mazerolles, V. Cheynier, H. Fulcrand*

INRA, UMR1083 Sciences pour l'œnologie, 2, place Pierre Viala, F-34060 Montpellier,
France

*To whom correspondence should be addressed: phone 33 4 99 61 25 84, fax 33 4 99 61 28

57; e-mail fulcrand@supagro.inra.fr

E-Mail addresses of coauthors: souquet@supagro.inra.fr; veran@supagro.inra.fr;

mazeroll@supagro.inra.fr; cheynier@supagro.inra.fr; mane@ensam.inra.fr

Abstract

Optimization of polyphenol extraction from grape skins, seeds, and flesh was performed on *Vitis vinifera*, cv. Pinot noir, by response surface methodology using a Doehlert design. An acidified ternary mixture of acetone/water/methanol was the best solvent for simultaneous extraction of major polyphenol classes (anthocyanins, phenolic acids, flavanols including proanthocyanidins) from all berry compartments whilst optimum extraction times and solid-to-liquid ratios varied according to the compartment. The composition determined from the model agreed with independent experimental results.

Analysis of the three major Champagne grape varieties showed that proanthocyanidins were the major phenolic compounds in seeds, skins and flesh. The total berry proanthocyanidin content was highest in Pinot meunier and lowest in Chardonnay but the flesh of Pinot meunier contained lower amounts of proanthocyanidins and phenolic acids than that of the other two varieties. The berry anthocyanin content were equivalent in both Pinot noir and Pinot meunier.

Keywords

Champagne grapes, polyphenols, extraction, experimental design, tannins, optimization

Introduction

Grape polyphenols are characterized by a large range of structures diversely distributed in every compartment of the berry. Phenolic acids, mainly represented by hydroxycinnamic acids, are localized in both skin and flesh and are considered to be the major constituents of the latter (1;2). Flavonoids comprise mostly flavanols, under monomeric and polymeric (proanthocyanidins, also called condensed tannins) forms, that have been known to be present in seeds and skins for a long time. Trace amounts of monomers and oligomers have also been reported in flesh (3;4) but the presence of highly polymerised condensed tannins has only recently been shown in this compartment (5). In red grape varieties, another flavonoid family, the anthocyanins, are responsible for the red colour of the skin.

Champagne wine is made from three major grape varieties used in different proportions creating the typical organoleptic characters of each Champagne house, namely Chardonnay, a white variety, Pinot noir and Pinot meunier which are red varieties. The particularity of Champagne winemaking is a soft and progressive pressing so as to limit in particular staining due to extraction of anthocyanins from the skin. Flesh is thus the major compartment of the berry providing polyphenolic compounds to the juices and wines of Champagne, compared to the contribution of skin and seeds.

Phenolic acids of flesh and must from Pinot noir and Chardonnay have already focused interest (6;7), and more particularly in the Champagne context through a study on Pinot noir and Chardonnay must oxidation (8). Trace amounts of catechins / flavanol monomers have also been reported in musts but no data is available on tannins contained in the flesh of Champagne grape varieties. This information may however be of interest since the browning susceptibility of white wines has been related to their flavanol content (9;10).

The aim of the work reported herein was thus to study the phenolic composition of the three grape varieties involved in Champagne winemaking and to determine the distribution of phenolic compounds, namely flavanols, phenolic acids, and anthocyanins, in the flesh, skin and seeds. This information is essential to confirm or infirm the potential implication of tannins in the browning of Champagne wines.

To achieve this goal, extraction of all three classes of polyphenols had to be optimized for each berry compartment. Extraction of polyphenols depends on their diffusion into the extraction solvent (11), that is determined, on one hand by their structure, on the other hand by their interactions with other fruit components. Thus, literature gathers various extraction conditions (time, solvent), according to the accessibility of polyphenols in the different matrices. Moreover, because of the acidic lability of interflavan linkages within tannins and of the oxidizability of polyphenols, a valid extraction method should provide an extraction of the polyphenol pool as complete as possible while limiting their degradation (12). Acidified water, hydroalcoholic solutions of methanol (13), ethanol (14), or acetone (15) are the common solvents used for extracting polyphenols from grape berries. In particular, lower molecular weight polyphenols, such as phenolic acids, anthocyanins and flavanol monomers and oligomers, are well extracted with methanol whilst the higher molecular weight flavanols are better extracted with aqueous acetone than with methanol (16-19).

The adjustment of the extraction conditions is usually performed by optimizing successively the main parameters influencing the efficiency of extraction without taking into account the eventual interactions between them (20).

In our work, a response surface methodology (RSM) using Doehlert design was applied to optimize the procedure. This approach allows minimizing the number of experiments and evaluating simultaneously the effect of each parameter and that of

interactions between them on the extraction efficiency. The contribution of each factor is thus determined with better precision than would be obtained from successive optimizations of the various factors.

Such a methodology has been recently used to determine the most influent parameters for simultaneous extraction of phenolic compounds and organic acids from white Vinho Verde grapes (21), but no precision was given on the compartment studied. Moreover, extraction efficiency was evaluated only on four flavonols and a monomeric flavanol (epicatechin) which are known to be minor phenolic compounds of grapes while phenolic acids, anthocyanins, and tannins were not considered.

V. Materials and methods

Chemicals. All HPLC-grade solvents, *i.e.* methanol, acetone and acetonitrile, as well as formic and hydrochloric acids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Phloroglucinol, L-ascorbic acid, and methylparaben were purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA). Sodium acetate was purchased from VWR Prolabo (Fontenay sous Bois, France).

Fruit Sampling and preconditionment. Grape clusters of *Vitis Vinifera* var. Pinot noir, Pinot meunier, and Chardonnay were collected from a same parcel in Champagne during the 2005 grape harvest by the Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne. For each variety, a representative set of 50 berries kept with their pedicel were frozen and stored at -80°C in order to limit oxidation. The frozen berries were then peeled with a scalpel, and the three compartments composing the berries, *i.e.* the skin, the flesh and the seeds, were separately placed in Dewar vases full of liquid nitrogen. The different compartments were

immediately milled with a liquid nitrogen precooled Danguoumau grinder (Longjumeau, France), and stored at -80°C until used for analysis.

Extraction of polyphenols from skin, flesh and seed. All extractions were performed on a mechanical stirrer at room temperature. Methylparaben was used as internal standard and added to the extraction solvents at $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, for extraction from skin and seed and from flesh.

The development of extraction process was performed on the Pinot noir variety.

Preliminary experiments consisted in two hour extractions using water/acetone (40:60, v:v) acidified with trifluoroacetic acid 0.05% as the extraction solvent, in a single step or multiple step process. In the case of single step extraction, the supernatant was removed after a 2-hour extraction followed by a centrifugation at 10000g during 10 minutes. For the multiple step extraction, a centrifugation at 10000g during 10 minutes was operated after 30 min-extraction. The supernatant was then removed, and fresh solvent was added on the solid residue. The operation was repeated three times. All preliminary experiments were performed in triplicate.

Further optimization was achieved using a Doehlert experimental design (see below) with mixtures of (1) methanol acidified with trifluoroacetic acid 0.05% and (2) water/acetone (40:60, v:v) acidified with trifluoroacetic acid 0.05%, in variable proportions of (1) and (2) (from 0:100 to 30:70, v/v) as the extraction solvent.

For the runs including methanol, the powder was first suspended in a defined volume of methanol and the mixture was stirred during two minutes before adjusting to the final extraction volume with the water/acetone mixture.

Polyphenols analysis. Two aliquots of each extract ($200\text{ }\mu\text{L}$ for skin and seed, half of the extraction volume for flesh, so as to get an acceptable signal-to-noise ratio in

chromatographic analyses) were taken to dryness with a centrifugal evaporator Genevac (New York, NY, USA). One of the two residues was dissolved in 200 μ L methanol/water (20:80, v:v) containing 1% HCl and analyzed by HPLC for the determination of flavanol monomers, phenolic acids and anthocyanins. The second one was used for tannin characterization that was achieved by HPLC analysis after phloroglucinolysis following a protocol adapted from earlier studies (14;22). The solid residue was dissolved in 200 μ L methanol-HCl 0.2N containing phloroglucinol (50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and L-ascorbic acid (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The solution was then heated in a water bath at 50°C during 20 minutes, and the phloroglucinolysis reaction was stopped by adding an equal volume of sodium acetate 200 mM. Samples were then analysed by HPLC.

HPLC analysis was carried out using Agilent technologies system (Waldbronn, Germany) equipped with a photodiode array detector and a Shimadzu spectrofluorimeter (Kyoto, Japan). Samples (10 μ L injection volume) were injected onto a reversed- phase Atlantis dC18 column (5 μm packing, 250 x 4.6 mm) supplied by Waters (Milford, MA, USA) protected by a guard column (20 x 4.6 mm) of the same material, and maintained at 30°C. A binary solvent system was used at a 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate with solvent A being water/ formic acid (98:2, v:v), and solvent B being acetonitrile/water/formic acid (80:18:2, v:v:v). The elution gradient was as follows: 0-5 min, isocratic 0% B; 5-65 min, linear 0-20% B; 65-70 min, linear 20-100% B; 70-75 min, 100-0% B. Concentrations were calculated using peak areas from calibration curves established using external standards, either commercial ((+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin-3-gallate for flavanol quantification, and malvidin-3-O-glucoside for anthocyanin quantification), or purified in the laboratory (phloroglucinol-derivatives for flavanol quantification, and caffeoyl tartaric acid for hydroxycinnamic acid quantification). They were determined with the PDA detector at 280, 320 and 520 nm, respectively, for flavanols, phenolic acids and anthocyanins,

or with the spectrofluorimeter at emission 275 nm and detection 322 nm for non galloylated flavanol units. Eventual differences in the dilution or injection volumes were compensated for by taking into account the peak area of the internal standard (methylparaben). Tannin concentration was calculated as the sum of the concentrations of constitutive units, terminal units being detected as flavanol monomers and extension units as the corresponding phloroglucinol adducts. Their average degree of polymerization (aDP) was calculated from the proportions of the different constitutive monomeric units of tannins by the formula given below.

$$\text{aDP} = \frac{\sum_{\text{terminal+extension}}}{\sum_{\text{terminal}}}$$

Experimental design and statistical treatment. Optimization of extraction conditions was carried out on Pinot noir variety using response surface methodology.

A Doehlert experimental design was built for determining the experimental conditions that provide the highest responses. This design was built with three factors at 7, 5 and 3 levels respectively, and was composed of 15 runs including three replicates at the central point. The three independent factors chosen were extraction time, solvent volume and rate of methanol (Table 1), the weight of sample analyzed being fixed at around 50 mg for the skin and seed, and 100 mg in the case of flesh.

The proposed model to which the experimental data were fitted is a second-order polynomial model. The following equation was used:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$$

Where Y is the amount of extracted compound per g of raw material

a_i are the regression coefficients

X_1 , X_2 , and X_3 are the experimental factors

Confidence intervals were evaluated with the $T_{95\%, 3}$ as the Student coefficient.

The same Doehlert experimental design was applied to each of the three berry compartments.

Results and discussion

Effect of the solid-liquid ratio. A first study was performed on each compartment of the Pinot noir berry in order to determine the most appropriate range of solid-to-liquid ratios to be considered afterwards. The weight of solid residue being fixed in the further experimental design, this will lead to the choice of a range of extraction volumes. Three solid-to-liquid ratios were tested for each compartment, namely 100 mg in 2 mL, 50 mg in 2 mL and 50 mg in 4 mL for skin and seed extraction, 200 mg in 2 mL, 100 mg in 2 mL and 100 mg in 4 mL for flesh extraction, building experimental domains from 12.5 to 50 mg.mL⁻¹ and from 25 to 100 mg.mL⁻¹, respectively.

The influence of solid-to-liquid volume on the concentration and characteristics of flavanols, anthocyanins and phenolic acids extracted from the different parts of the Pinot noir berries is illustrated in Figure 132.

The extraction yield of anthocyanins from skins was the same with the three solid-to-liquid ratios tested. Those of flavanols and phenolic acids was significantly lower with the highest ratio than with the other two, for all compartments. Further decreasing the solid-to-liquid ratio induced no significant increase in the extraction yields of hydroxycinnamic acids from flesh nor of flavanols from skin and flesh, indicating that saturation of the solvent occurred only at the highest ratio. Therefore, the extraction conditions selected for further experiments used 25 mg.mL⁻¹ (for seed and skin) and 50 mg.mL⁻¹ (for flesh), as the upper limit of the range of solid-to-liquid ratios. In contrast, flavanol extraction yield from seeds

and phenolic acid extraction yield from skin significantly increased for each decrease in the solid-to-liquid ratio, so that solvent saturation could not be ruled out within the range tested. Consequently, lower ratios were tested in further optimization steps.

Influence of the number of extraction steps. A series of experiments consisting in extractions at constant total volume of extraction, and constant extraction time, *i.e.* a single 2 hour-extraction step against four successive 30 min-extraction steps, was performed in order to determine if increasing the number of extractions improves the extraction efficiency. Indeed previous studies described experiments based on multi-step extractions with a single solvent (20;23) while others preferred to use a single step extraction (24).

In the multi-step extractions performed on each berry compartment, the major part of phenolic compounds was extracted in the first extraction step, less and less being extracted in successive steps (Figure 133). This result was expected and optimization by the exhaustion method is actually based on this observation. For seed and flesh, the amounts of flavanols extracted in the single step and four-step procedures were not significantly different. Extraction of anthocyanins from skins did not depend either on the number of extraction steps. In contrast, extraction of flavanols from skin and of phenolic acids from both skin and flesh was significantly lower with a 4-step extraction than with the corresponding single step extraction (Figure 133). Skin tannins which are located in vacuoles and partly bound to the cell wall and the vacuolar membrane (25;26) have been shown to be rather easily extracted in wine-making compared to seed tannins (27). A possible explanation is that exposure to organic solvents leads to irreversible adsorption of tannins on plant cell walls or other cell components (e.g. proteins, polysaccharides) thus reducing their extractability in subsequent extraction steps. Another possibility is that the rather small solvent volume used in each

extraction of the four-step procedure is insufficient to inhibit enzymatic oxidation resulting in degradation of hydroxycinnamic acids and flavanols.

Simultaneous optimization of solvent, solid-to-liquid ratio and time of extraction using a Doehlert experimental design. A Doehlert experimental design was used to evaluate the weight of different factors, namely solvent volume, extraction time and methanol rate in the solvent and that of interactions between them on the extraction efficiency, in order to determine the optimal extraction conditions.

According to the preliminary experiments, the maximum of extraction was reached with a single step 2-hour extraction. The extraction time was varied between 15 min and 2 hours as it is expected to influence the amount of extracted phenolics but longer extraction times may also induce degradation of the extracted compounds. In particular, artifacts arising from anthocyanin reactions with acetone have been reported (28). Indeed, the main objective of the study was to determine a suitable compromise to ensure proper extraction while minimizing degradation. A second objective was to decrease the extraction duration so as to make it possible to handle high throughput experiments. The preliminary results have shown that the solid-to-liquid ratios have to be sufficient to avoid saturation. For modifying the solid-to-liquid ratio, the volume of extraction solvent was varied and the amount of sample was maintained at 50 mg (for skin and seed) or 100 mg (for flesh). However, rather small solvent volumes should be preferred in the development of environment-friendly protocols and to reduce evaporation times while enabling appropriate final concentration factors. The extraction volume was thus varied between 2 and 9 mL.

Moreover, previous studies have shown that extraction of anthocyanins and of lower molecular weight flavanols by acidified methanol and methanol/water mixture is efficient (29;30), whilst the use of acetone/water mixture is more adapted for the extraction of tannins

with higher aDP (16;31). Therefore, we evaluated the extraction efficiency with acetone/methanol/water mixtures in different proportions. Such a mixture (acetone/MeOH/water 40:40:20, v:v:v) was chosen by Perret (32) for extracting tannins from a grape powder. Furthermore, in our experiments, methanol was first added on the solid residues in order to inhibit PPO activity which may lead to oxidation of hydroxycinnamic acids and coupled oxidation of flavanols (33) and anthocyanins (34) by the o-quinone derived from caffeoyl tartaric acid. The rate of methanol in the extraction solvent was thus studied in a reasonable range, from 0 to 30%.

Solvent volumes, extraction time, and methanol rate were assigned 7, 5 and 3 levels, respectively. The models built from all the runs of the experimental design representing the amounts of extracted flavanols, anthocyanins and phenolic acids from each berry compartment as a function of extraction time, solvent volume, and methanol rate are summarized in Table 2.

Firstly, the quadratic terms being negative, maximum extraction of tannins, anthocyanins and phenolic acids can be found in the experimental domain considered. For each model, only terms higher than the coefficient variance are significant.

Flavanol extraction from skin was primarily affected by the solvent volume and, to a lesser extent, by the methanol content in opposite ways, while impact of the extraction time was much weaker in the time range considered (Table 2 and Figure 134). More precisely, the response increases as the total volume increases and as the extraction time or the rate of methanol decreases. Their extraction from seeds was significantly affected by all three parameters, positively by time and volume and negatively by methanol rate. None of the main effects was significant in the case of flavanol extraction from flesh. The negative effect of methanol is in agreement with earlier work showing that higher molecular weight tannins

are better extracted with aqueous acetone than with methanol (16-19). The amount of extracted anthocyanins is lower with longer extraction times and with higher methanol rate but is increased when larger solvent volumes are used. Phenolic acid extraction from skin or flesh only depends on the solvent volume.

Interactions between extraction time and total volume are significant only in the case of flavanol extraction from seeds and anthocyanin and phenolic acid extraction from skin. Their negative values indicate that higher extraction rates are obtained either with longer times and smaller volumes or with larger volumes and shorter times. Significant and positive interactions between the extraction time and the rate of methanol are observed for all compounds and all compartments, except phenolic acids from flesh. This indicates that extraction is largely favored in two cases: a long extraction time in presence of high methanol rate and a short extraction time with low methanol rate. Nevertheless, this has to be modulated by the influence of the mains effects and the last interaction term (Volume x %MeOH) that is significant for anthocyanins and phenolic acids from skins (positively) and for flavanol from seed (negatively).

Examination of the response surface curves (Figure 134) enables to select optimal conditions for extraction of the different phenolics from each compartment and confirms that maximum extraction is reached in the range of conditions considered. Thus, the maximum amount of extracted flavanols is obtained with intermediate solvent volumes, extraction times, and methanol rates. This indicates that a minimum volume is requested to avoid a saturation phenomenon limiting the amount of tannins extracted. Moreover, competition occurred between extraction and degradation, degradation overcoming extraction when the extraction time increased. When a higher rate of methanol was used, the amount of flavanol

extracted was slightly lower and the aDP of tannins lower, confirming that this solvent fails to extract higher molecular weight flavanols.

Maximum extraction of phenolic acids from skin is obtained using the same conditions. The areas corresponding to the maximum extraction of anthocyanins from skins and phenolic acids from flesh are wider, meaning that the three factors are less influential than for extraction of flavanols. However, the sets of optimized conditions determined on the basis of flavanol extraction for each compartment appear like good compromises for other phenolic classes. Maximum extraction is thus obtained by using acetone/water/methanol (51:34:15, v:v:v) acidified with 0.05% TFA as the solvent, and extraction for 67 min with 7 mL (for skin) or 5 mL (for flesh) or for 90 min with 5.5 mL (for seed).

Validation of the models. Triplicates of phenolic extraction were carried out on each part of the Pinot noir berries using the optimized conditions. Results are reported in Table 3, and compared to the values obtained from the modeling. For all three compartments, the phenolic amounts estimated from the model equations are in good agreement with the experimental values, none of the differences between the two values being significant.

Distribution and characterization of flavanols, phenolic acids and anthocyanins in the different parts of Pinot noir, Pinot meunier, and Chardonnay grape berries. The amounts of flavanols, anthocyanins and phenolic acids in Pinot meunier and Chardonnay grape varieties were then determined using the same extraction protocol and compared to those of Pinot noir (Table 4).

In all three varieties, 90% of the berry polyphenol content is represented by flavanols which are the only polyphenols found in seeds but also the major phenolic constituents of the other compartments, accounting for 78 to 93% of skin phenolics and around 60% of flesh

phenolics. Pinot meunier contains larger amounts of flavanols, and consequently of polyphenols, than Pinot noir which is richer than Chardonnay. However, it contains lower amounts of phenolic acids and anthocyanins than Pinot noir while Chardonnay shows no anthocyanins and intermediate contents of phenolic acids. The majority of flavanols are contained in seeds, regardless of the variety, while phenolic acids are distributed almost evenly between skins and flesh. Concentrations of the latter are much higher in the skin than in the flesh for the three varieties considered, but the specific rate (contribution of each compartment to the berry weight) leads skin and flesh to supply these compounds in similar quantities.

The highest content of seed flavanols is found in Pinot meunier with 6400 mg.kg^{-1} berry, followed by Pinot noir (4840 mg.kg^{-1} berry) while Chardonnay contains the lowest amount with 2300 mg.kg^{-1} berry. Part of these flavanols actually corresponds to flavanol monomers that represent 17%, 37% and 11% of the total flavanol amount, respectively, in Pinot meunier, Pinot noir and Chardonnay. Chardonnay tannins (calculated after subtracting the concentration of monomers from that of terminal units) are characterized by a slightly higher aDP of 4.2 against 2.9 and 3.7, respectively, for Pinot noir and Pinot meunier. These low values compared to those of the literature can be explained by the removal of oligomers (dimers, trimers) in the extraction or fractionation procedures used in earlier works (35-37). The absence of epigallocatechin units and the galloylation rates varying from 9.5% for the Pinot noir to 13.2% for the Pinot meunier are consistent with those determined in other varieties (5).

The skin flavanol content is evaluated at 3000, 2400 and 2100 mg.kg^{-1} berry fresh weight for Pinot noir, Pinot meunier and Chardonnay, respectively, but as the proportion of skin also varies according to the grape variety (Table 4), Pinot meunier contains the largest concentration of flavanols in skins, followed by Pinot noir, and finally Chardonnay.

Moreover, skin flavanols of the two red varieties can be differentiated from those of the white variety by a higher mean degree of polymerization (aDP=38 and aDP=36 for Pinot noir and Pinot meunier compared to aDP=23 for the Chardonnay) and a higher proportion of epigallocatechin units. These amounts and aDP are consistent with the results obtained in an earlier study on Chardonnay and Pinot noir harvested in a different vineyard (38). The aDP values for Pinot noir and Pinot meunier are slightly higher than those obtained for other red varieties such as Mourvedre or Grenache (aDP =26) (5). Besides, skin tannins of Champagne varieties have a lower galloylation rate (from 1.1 to 1.8%) compared to varieties such as Grenache or Muscat Frontignan, and a proportion of epigallocatechin units (from 9.6 to 14.5%) similar to that usually found in skin tannins (5). Skins of Pinot noir contain larger amounts of phenolic acids and anthocyanins than Pinot meunier, the concentration of phenolic acids in Chardonnay being intermediate. However, due to different thickness, skins of the three grape varieties supply phenolic acids in equivalent amounts and the red ones the same amounts of anthocyanins, i.e. around 200 and 600 mg.kg⁻¹ berry f.w., respectively, for phenolic acids and anthocyanins.

Characteristics of flesh tannins of the three grape varieties are globally similar even if slight differences can be pointed out. The average degrees of polymerization are equivalent with values varying from 18 for Pinot meunier to 21 for Pinot noir. These values are lower than the aDP evaluated in the corresponding skins, but remain high compared to those of seed tannins. Similar results were obtained for Maccabeo white grape with aDP of tannins evaluated at 51 and 32 for skin and flesh, respectively (5). The proportions of galloylated and epigallocatechin units are intermediate between those found in skin and seed tannins. The main difference between the three varieties lies in the rate of epigallocatechin units (1.7 and 1.9 for the red cultivars vs 4.3% for the white one). The amounts of tannins in the flesh are quite different, varying from 26 for Pinot meunier to 45 mg.kg⁻¹ flesh for Pinot noir. In spite

of the high specific rate of flesh, its contribution to the berry tannin content is rather low (4%, 2% and 6% for Pinot noir, Pinot meunier and Chardonnay, respectively). These contributions are much lower than those found in the six varieties studied by Souquet which vary between 8 and 15% (5). The lower amount and lower aDP estimated for flesh tannins compared to the values obtained for skin tannins might suggest that the presence of tannins in the flesh is only an artifact of handling and results from tannin diffusion from the skin towards the flesh. But previous studies have shown that few cells containing tannins are present in the skin layer close to the flesh (26). Moreover, the particular composition of flesh tannins (higher galloylation rate and lower proportion of epigallocatechin units than in skin tannins) allows us to rule out this hypothesis since galloylation decreases the solubility of tannins while hydroxylation increases it. Finally, Pinot noir is the variety containing the highest content of phenolic acids in the flesh with 276 mg.kg⁻¹ f.w. berry against 174 mg.kg⁻¹ f.w. berry for the Chardonnay and 127 mg.kg⁻¹ f.w. berry for Pinot meunier. The amounts of flavanols and phenolics acids in Pinot noir flesh are thus equivalent, while Chardonnay and Pinot meunier contain about twice as much flavanols as phenolic acids. This variability may lead to different oxidation susceptibilities of the three Champagne varieties.

Acknowledgment

This work is financially supported by the Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne (CIVC) and Moët & Chandon Company.

Literature cited

1. Ribéreau-Gayon, P. Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1965**, 260, 341.
2. Singleton, V. L.; Trousdale, E. White wine phenolics : varietal and processing differences as shown by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture* **1983**, 34, 27-34.
3. Bourzeix, M.; Weyland, D.; Heredia, N. Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bulletin de l'OIV* **1986**, 669-670, 1171-1253.
4. Ricardo Da Silva, J. M.; Rosec, J. P.; Bourzeix, M.; Mourgues, J.; Moutounet, M. Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvèdre grapes and wines. *Vitis* **1992**, 31, 55-63.
5. Souquet, J. M.; Veran, F.; Mané, C.; V., C. *XXIII International conference on polyphenols, Winnipeg*.
6. Boursiquot, J.; Sapis, J.; Macheix, J. Les esters hydroxycinnamiques chez le genre *Vitis*. Essai d'application taxonomique : premiers résultats. *CR Académie des Sciences, Ser III* **1986**, 302, 177.
7. Cheynier, V.; Rigaud, J.; Souquet, J.-M.; Duprat, F.; Moutounet, M. Must browning in relation to the behaviour of phenolic compounds during oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture* **1990**, 41, 346-349.
8. Cheynier, V.; Masson, G.; Rigaud, J.; Moutounet, M. Estimation of must oxidation during pressing in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture* **1993**, 44, 393-399.

9. Rossi, J. A.; Singleton, V. L. Contribution of grape phenols to oxygen absorption and browning of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1966**, *17*, 231-239.
10. Simpson, R. F. Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis* **1982**, *21*, 233-239.
11. Kallithraka S., G.-V. C., Bridle P., Bakker J. Survey of solvents for extraction of grape seed polyphenolics. *Phytochem. Anal.* **1995**, *6*, 265.
12. Zou, H.; Kilmartin, P.; Inglis, M.; Frost, A. Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir wine examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Australian Journal of grape and wine research* **2002**, *8*, 163-174.
13. Santos-Buelga C., F.-A. E. M., Escribano-Bailon M.T. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry* **1995**, *53*, 197-201.
14. Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet, J. M.; Moutounet, M.; Cheynier, V. Accumulation of extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 7331-7338.
15. Spagna, G.; Barbagallo, R. N.; Pifferi, P. G. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilisation against browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 4619-4627.
16. Foo, L.; Porter, L. The structure of tannins of some edible fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1981**, *32*, 711-716.
17. Hemingway, R.; McGraw, G. Kinetics of acid-catalyzed cleavage of procyanidins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **1983**, *3*, 421-435.

18. McMurrough, I.; Madigan, D.; Smyth, M. R. Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 1731-1735.
19. Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanoner, P.; Drilleau, J. F. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 1698-1705.
20. Nawaz H., S. J., Mittal G.S., Kakuda Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* **2006**, *48*, 176-181.
21. Dopico-Garcia, M. S.; Valentao, P.; Guerra, L.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M. Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *583*, 15-22.
22. Kennedy, J. A.; Jones, G. P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 1740-1746.
23. Rodriguez Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacon Vozmediano, J. L.; Martinez Gascuena, J.; Garcia Romero, E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in warm climates. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 687-693.
24. Oszmianski, J.; Romeyer, F. M.; Sapis, J. C.; Macheix, J. J. Grape seed phenolics : Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture* **1986**, *37*, 7-12.

25. Amrani-Joutei, K.; Glories, Y. Etude de la localisation et de l'extractibilité des tanins et des anthocyanes de la pellicule de raisin. In *Oenologie 95, 5ème Symposium International d'Oenologie*; Lonvaud-Funel, A., Ed.; Lavoisier Tec et Doc: Paris, 1995; pp 119-123.
26. Park, H. S.; Fougère-Rifot, M.; Bouard, J. Les tanins vacuolaires de la baie de *Vitis Vinifera* L. var Merlot à maturité. In *Oenologie 95*; Lavoisier, Ed.: Londres, Paris, New-York, 1995; pp 115-118.
27. Canals, R.; Llaudy, M.; Valls, J.; Canals, J.; Zamora, F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skins and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4019-4025.
28. BenAbdeljalil, C.; Cheynier, V.; Fulcrand, H.; Hakiki, A.; Mosaddak, M.; Moutounet, M. Mise en évidence de nouveaux pigments formés par réaction des anthocyanes avec des métabolites de levures. *Sciences des Aliments* **2000**, *20*, 203-220.
29. Metivier, R. P.; Francis, F. J.; Clydesdale, F. M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science* **1980**, *45*, 1099-1100.
30. Sun, B.; Spranger, M.; Ricardo da Silva, J. Extraction of grape seed procyanidins using different organic solvents. In *Polyphenols communication 96*; Vercauteren, J., Cheze, C., Dumon, M., Weber, J., Eds.; Groupe Polyphenols: Bordeaux, 1996; pp 169-170.
31. Yilmaz, Y.; Toledo, R. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 41-48.
32. Perret, C.; Pezet, R.; Tabacchi, R. Fractionation of grape tannins and analysis by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **2003**, *14*, 202-208.

33. Cheynier, V.; Osse, C.; Rigaud, J. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *Journal of Food Science* **1988**, *53*, 1729-1732.
34. Sarni, P.; Fulcrand, H.; Souillol, V.; Souquet, J.-M.; Cheynier, V. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1995**, *69*, 385-391.
35. Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 781-784.
36. Labarbe, B.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Souquet, J.-M.; Moutounet, M. Quantitative Fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 2719-2723.
37. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Silva, J. M. R. d. Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 6475-6481.
38. Souquet, J.-M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. *VIème Symposium International d'oenologie, Bordeaux, France*; Lavoisier; Vol. Actualités Oenologiques 1999, p 165-168.

Tables

N° Exp.	Time (min)		Solvent volume (mL)		Methanol (%)	
1	120	[1]	5.5	[0]	15	[0]
2	93.75	[0.5]	8.53	[0.866]	15	[0]
3	41.25	[-0.5]	8.53	[0.866]	15	[0]
4	15	[-1]	5.5	[0]	15	[0]
5	41.25	[-0.5]	2.47	[-0.866]	15	[0]
6	93.75	[0.5]	2.47	[-0.866]	15	[0]
7	93.75	[0.5]	6.51	[0.289]	27.24	[0.816]
8	41.25	[-0.5]	6.51	[0.289]	27.24	[0.816]
9	67.5	[0]	3.48	[-0.577]	27.24	[0.816]
10	93.75	[0.5]	4.49	[-0.289]	2.76	[-0.816]
11	41.25	[-0.5]	4.49	[-0.289]	2.76	[-0.816]
12	67.5	[0]	7.52	[0.577]	2.76	[-0.816]
13	67.5	[0]	5.5	[0]	15	[0]
14	67.5	[0]	5.5	[0]	15	[0]
15	67.5	[0]	5.5	[0]	15	[0]

Table 1 : Doehlert experimental design for three variables. Values in square brackets are the corresponding coordinates in a normalized space

	Skin			Flesh		Seed
	Flavanol	Anthocyanin	Phenolic acid	Flavanol	Phenolic acid	Flavanol
Main effects						
T	-0.53	-0.25	-0.04	-0.01	-0.01	3.42
V	3.86	0.06	0.08	0.01	-0.04	2.81
%MeOH	-1.44	-0.10	-0.05	0.04	0.01	-1.88
Interactions						
TxV	0.3	-0.09	-0.07	0	-0.01	-4.1
Tx%MeOH	3.04	0.46	0.46	0.09	-0.01	3.96
Vx%MeOH	0.01	0.26	0.27	0.01	0.02	-1.16
Quadratic terms						
T ²	-2.84	-0.44	-0.38	-0.05	0.00	-3.61
V ²	-3.95	-0.01	-0.27	-0.09	-0.02	-7.74
%MeOH ²	-1.58	-0.23	-0.37	-0.06	-0.05	-3.3
Coefficient variance	0.51	0.02	0.06	0.04	0.02	0.2

T : Extraction time

V : Solvent volume

% MeOH : Methanol rate

Significant terms are in bold

Table 2 : Regression coefficients of the models

	Skin			Flesh		Seed
	Flavanol	Anthocyanin	Phenolic acid	Flavanol	Phenolic acid	Flavanol
<i>Models</i>	31±2	6.55±0.01	2.16±0.05	0.42±0.08	0.33±0.02	75±1
<i>Experimental</i>	30±1	6.3±0.2	2.1±0.2	0.45±0.03	0.34±0.01	75.1±0.5

Table 3 : Amounts of phenolics extracted with the optimized set of conditions compared to the model values (results expressed in mg g⁻¹ compartment)

	Pinot noir			Pinot meunier			Chardonnay		
	Skin	Flesh	Seed	Skin	Flesh	Seed	Skin	Flesh	Seed
<i>Flavanols</i> ($\text{mg.g}^{-1}\text{f.w.}$ compartment.)	30 ± 1	0.45 ± 0.03	75.1 ± 0.5	24.0 ± 0.7	0.26 ± 0.06	101 ± 1	21 ± 1	0.36±0.03	57.6±0.6
<i>Phenolic acids</i> ($\text{mg.g}^{-1}\text{f.w.}$ compartment)	2.1±0.2	0.34±0.01	-	1.14±0.05	0.17±0.01	-	1.65±0.04	0.21±0.03	-
<i>Anthocyanins</i> ($\text{mg.g}^{-1}\text{f.w.}$ compartment)	6.3±0.2	ε	-	3.3±0.3	ε	-	-	-	-
<i>Specific rate</i> (%)	10	81.7	6.4	18.2	74.4	6.4	11.4	83.6	4.0
<i>Flavanols</i> ($\text{mg.kg}^{-1}\text{berry}$)	3000±100	370±20	4840±30	4400±100	210±40	6400±100	2400±100	320±30	2300±30
<i>aDP</i>	39±2	21±1	2.9±0.7	37±2	18±2	3.65±0.07	23±1	18.3±0.7	4.24±0.01
<i>%galloylation</i>	1.13±0.08	5.2±0.1	9.5±0.1	1.46±0.08	4.3±0.4	13.2±0.1	1.8±0.1	3.2±0.5	12.7±0.1
<i>%egc</i>	14.5±0.6	1.7±0.2	0	13.2±0.5	1.9±0.2	0	9.6±0.3	4.3±0.8	0
<i>Flavanol</i> <i>monomers</i> ($\text{mg.kg}^{-1}\text{berry}$)	ε	ε	1800	ε	ε	1100	ε	ε	250
<i>Phenolic acids</i> ($\text{mg.kg}^{-1}\text{berry}$)	211±20	276±6	-	208±9	127±15	-	190±4	174±2	-
<i>Anthocyanins</i> ($\text{mg.kg}^{-1}\text{berry}$)	632±20	ε	-	602±20	ε	-	-	-	-

Table 4 : Distribution and characteristics of polyphenols in the three major Champagne grape varieties.

Figures

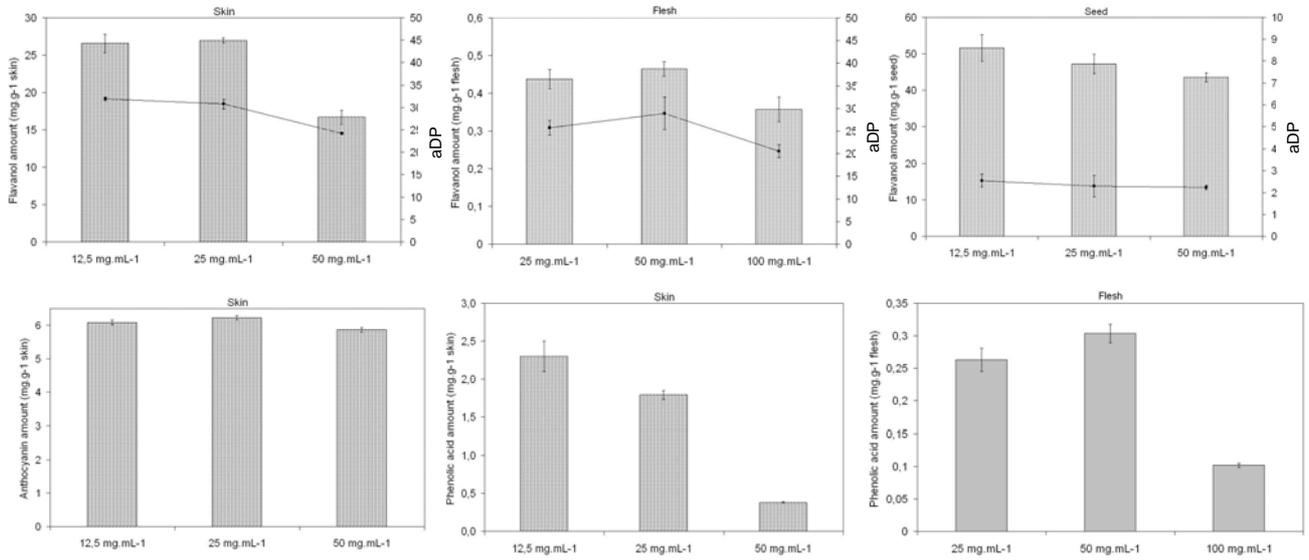


Figure 132 : Influence of solid-to-liquid ratio on flavanol, phenolic acid and anthocyanin extraction amount (histogram : amount, ■ : aDP) from skin, flesh, and skin.

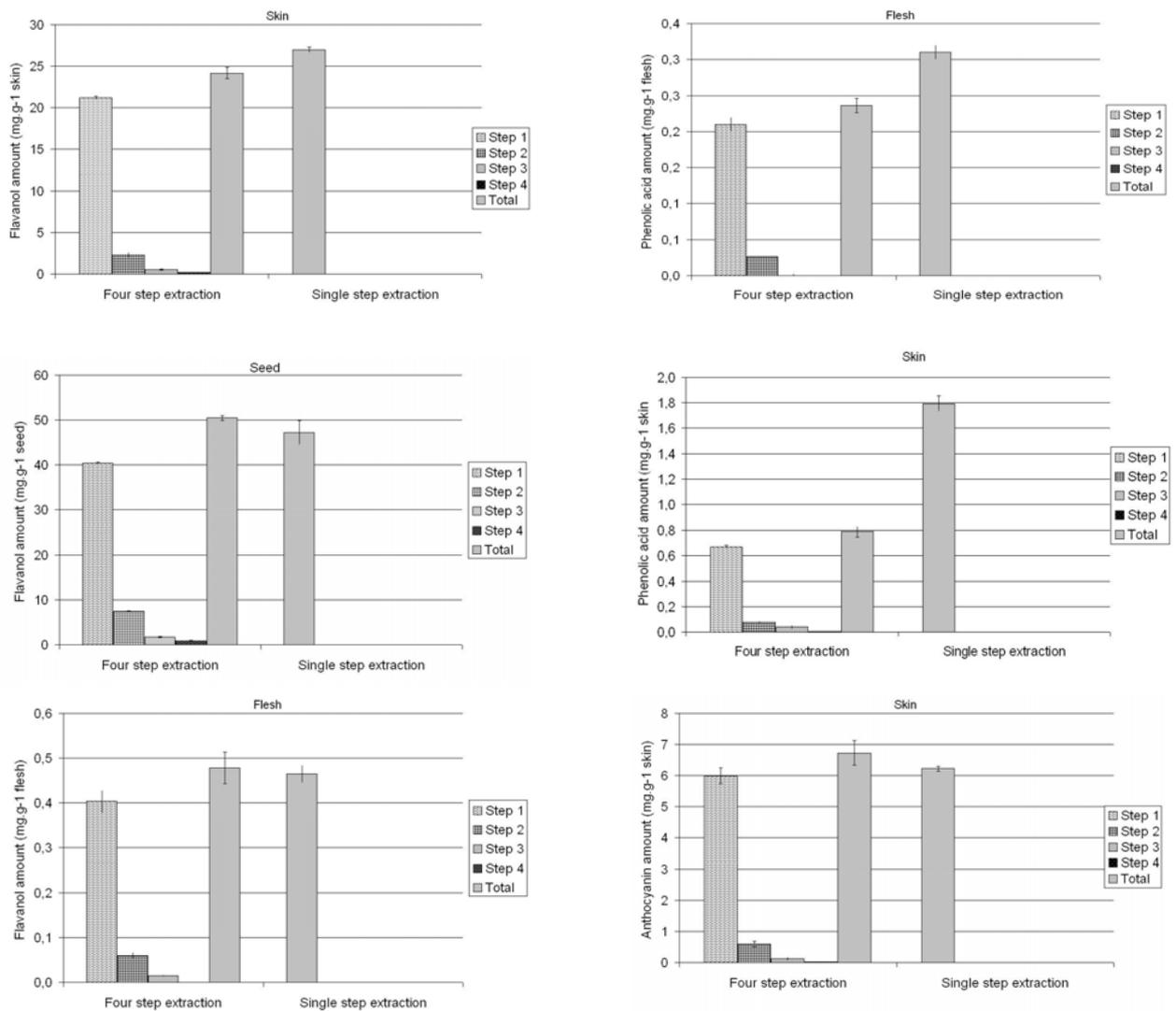
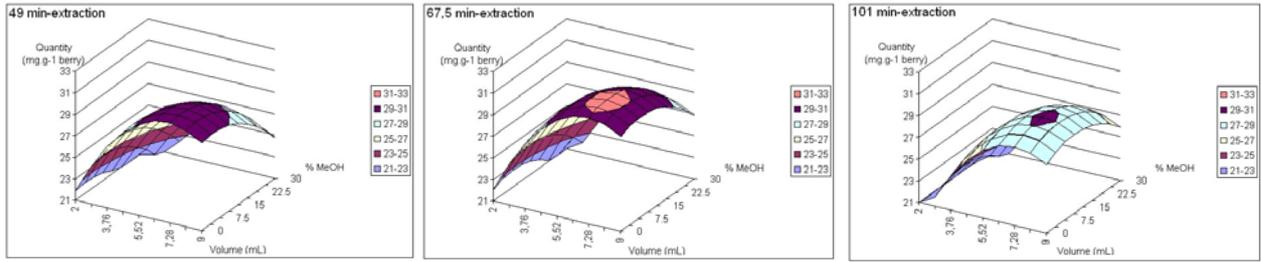
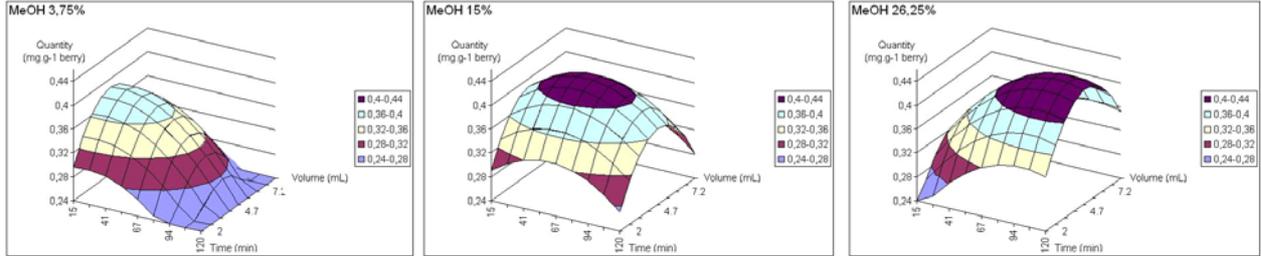


Figure 133 : Flavanol, anthocyanin and phenolic acid amounts obtained by single and four step extractions

Skin - Flavanol



Flesh - Flavanol



Seed - Flavanol

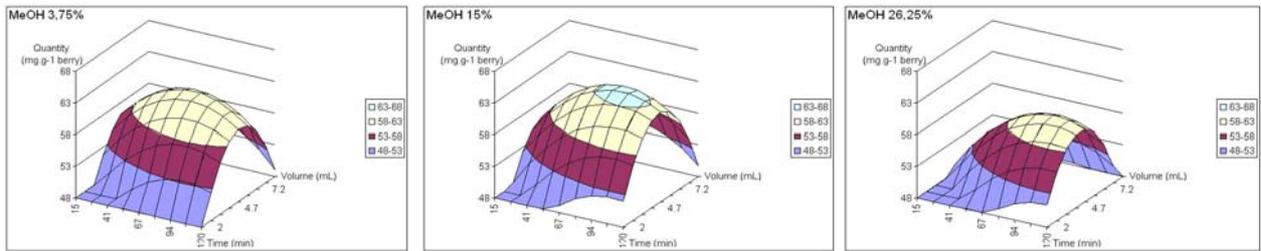


Figure 134 : Response surface curves at low, medium and high levels of time or methanol rate (factor with the lowest impact according to the compartment) for the extraction of skin, flesh and seed flavanols.

Annexe 2

Poster

Monitoring of polyphenol oxidation by NMR approaches
Mané C., Delsuc M.A., Cheynier V., Fulcrand H.
5th tannin conference, San Francisco (USA), 2006

Monitoring of polyphenol oxidation by NMR approaches

Mané C.^{1,2}, Delsuc M.A.³, Cheynier V.¹, Fulcrand H.¹

¹ INRA UMR SPO, 2 place P. Viala, Montpellier, France

² Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne, 5 rue Henri Martin, Epernay, France

³ CBS, CNRS-INSERM, 29 rue de Navacelles, Montpellier, France

Email : mane@ensam.inra.fr

Introduction

Oxidation reactions are usually monitored by liquid chromatography (coupled with spectrophotometry or mass spectrometry detection). However, this technique only provides information on the disappearance of the reactant and the formation of the lower molecular weight oligomers. Due to the lack of separation, higher oligomers and polymers cannot be analyzed.

An alternative approach based on mono and bi-dimensional NMR techniques was developed to monitor oxidation kinetics and identify the reaction products.

Materiel & Method

Catechin oxidation

Catechin 5 mM was prepared in water acidified with TFA at pH = 3

A two-hour oxidation of catechin with sodium periodate as oxidant was carried out in a 1/8 molar ratio. The reaction was stopped by addition of sulfurous acid 5%

1D/2D NMR analysis

Successive 1D ¹H experiments were performed in order to monitor the oxidation kinetics.

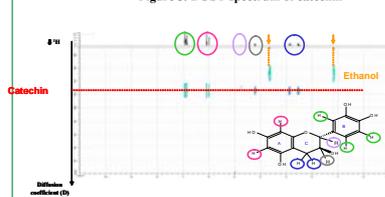
2D Diffusion Ordered SpectroscopY (DOSY) experiments were performed on the initial and the final state of kinetics study. DOSY allows the assignment of the diffusion coefficient for each component in a complex mixture and thus permits an estimate of the molecular weights. The principle of the analysis is based on the application of a coding and a decoding pulsed magnetic field gradients (PFG) separated by a delay. During this delay the compound diffuses along the PFG axis, and the signal intensity is reduced because of a partial refocusing of the magnetization. The intensity decay has an exponential dependence on the PFG intensity, and an Inverse Laplace analysis gives a precise measure of the diffusion coefficients of the various compounds.

In the present experiments, a stimulated echo was used rather than a Hahn spin echo as presented in the figure. The "excitation sculpting" method (Stott, 1995) was used for water suppression.

Results and Discussion

Standard solution of Catechin

Figure 3. DOSY spectrum of catechin



1D ¹H experiments allow the characterization of catechin by the attribution of its proton chemical shifts.

DOSY provides its diffusion coefficient from which the molecular weight is deduced

Monitoring of catechin oxidation

The monitoring of oxidation kinetics allowed the attribution of signals to catechin quinone and subsequent oxidation products particularly in the aromatic region

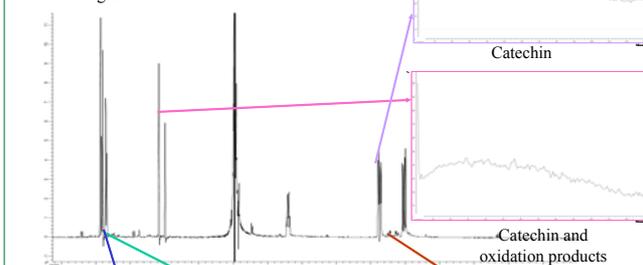


Figure 4. 1D ¹H spectrum of reactional medium after a 2 hour-oxidation

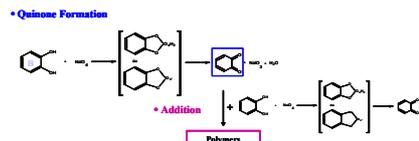
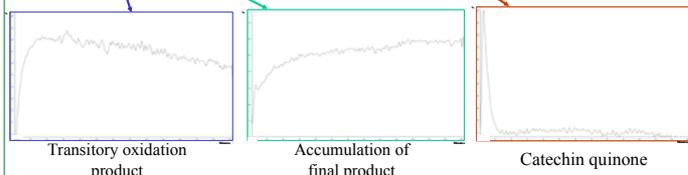


Figure 1. Mechanism of oxidation with NaIO4

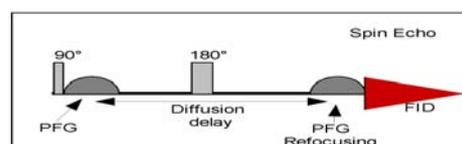


Figure 2. Principle of measurement

Characterization of oxidation products

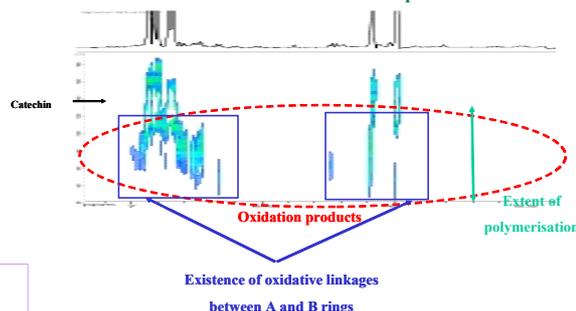


Figure 5. DOSY spectrum of reactional medium after a 2 hour-oxidation (zoom on aromatic region)

Catechin remains the major product after the oxidation reaction, due in particular to its large excess. But it is worth noticing the apparition of a range of compounds with higher molecular weights corresponding to oxidized flavanol polymers.

This is particularly shown by the changing in the ratio of the aromatic protons in polymeric products compared to that of the monomer, confirming the formation and location of oxidative covalent linkages on the A and B-rings.

Acknowledgements

This work is financially supported by the Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne (CIVC) and Moët & Chandon Company



Annexe 3

Publication

Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF
MS analysis of tannin-protein complexes
C. Mané, N. Sommerer, T. Yalcin, V. Cheynier, R.B. Cole, H. Fulcrand.
Analytical Chemistry, 2007, 79(6), 2239-2248.

Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of protein-tannin complexes

C. Mané^{1,2,*}, N. Sommerer³, T Yalcin⁴, V. Cheynier¹, R.B. Cole⁵ and H. Fulcrand¹

Abstract

An innovative mass spectrometry method was developed for determining mass distribution of tannin fractions that cannot be approached through direct MALDI-TOF analysis. It was applied to three procyanidin fractions with average degrees of polymerisation 3, 9 and 28, respectively, and one gallotannin fraction (Tara tannin). The proposed approach consists of MALDI-TOF analysis of the soluble complexes formed between these tannin fractions and Bovine Serum Albumin (BSA). Complexes were detected as an unresolved “hump” following the BSA signal and spectra were mathematically processed to determine the parameters relative to the protein-tannin complexes which are the number-average molecular weight (M_n), the weight-average molecular weight (M_w) and the Polydispersity Index (PI) for each tannin fraction. Regarding condensed tannins, results are consistent with those of the standard method (thiolysis followed by HPLC separation) for all tested fractions. The method was successfully applied to a hydrolyzable tannin fraction but no standard method is available for comparison.

VI. Introduction

Tannins are a heterogeneous group of polyphenols widely present in the plant kingdom as secondary metabolites. They occur in bark, wood, fruits, fruit pods, leaves, roots, and plant

^{1,*} INRA, UMR Sciences pour l'œnologie, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex, France, mane@ensam.inra.fr, Fax : +33499612857

² Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne, 51204 Epernay cedex, France

³ INRA, UR1199 Laboratoire de protéomique, 34060 Montpellier cedex, France

⁴ Department of Chemistry, Izmir Institute of Technology, Urla-Izmir, 35430, Turkey

⁵ Department of Chemistry, University of New Orleans, New Orleans, Louisiana, USA

galls. Tannins are classified into two groups: the hydrolyzable tannins composed of a polyol central core acylated by a variable number of gallic (Figure 1) or ellagic acid units and the proanthocyanidins, also called condensed tannins which are oligomers and polymers of flavanol units (Figure 2). The common characteristics of tannins are: i) the range of their molecular weights (usually between 500 and 20000 Da), ii) the presence of free phenolic groups within the various subunits of their structure, and iii) their ability to bind proteins and thereby form soluble and insoluble tannin-protein complexes. A growing interest has been addressed to this class of compounds because of their biological, nutritional and sensory properties¹⁻⁵. Regarding condensed tannins, their size (*i.e.* degree of polymerisation) influences many of these properties, and specifically, astringency that is a tactile sensation elicited by the precipitation of salivary proteins as a result of their binding to tannins. Recent works have actually demonstrated the increase of astringency perception with the increase of the average degree of polymerisation (aDP) of the tannin fraction tasted⁶. The determination of the aDP is quite easily achieved by standard methods referred to as thiolysis or phloroglucinolysis^{7, 8}. These methods, based on acid-catalysed cleavage of the interflavan linkages in the presence of a nucleophilic agent followed by HPLC analysis of the reaction products, give access to the nature and proportions of the different constitutive units within a condensed tannin fraction and allow calculation of its average degree of polymerisation (aDP). However, they cannot provide the molecular weight distribution of the tannin fraction since all its constitutive polymers are cleaved. Analysis of hydrolyzable tannins is usually achieved by HPLC quantification of the gallic or ellagic acid units released after mild alkaline hydrolysis, but this gives access neither to the average number of gallic acids per molecule (aDG) nor to the molecular weight distribution. Gel permeation chromatography (GPC), also called size exclusion chromatography (SEC), is the most widely used technique for the analysis of polymers because it yields the molecular weight distribution in addition to

the molecular weight averages. The molecular weight and the range of molecular weights are classically determined from a calibration plot. SEC has been applied to both condensed⁸ and hydrolyzable⁹ tannins. In the case of condensed tannins, the results are quite consistent with low molecular weights, but they become inconsistent as the degree of polymerisation increases¹⁰. This may be due to the nature of the calibrants as the polystyrene polymers used for this purpose are chemically and conformationally too different from the studied polyphenols. Therefore, GPC is primarily used as a separation technique for tannins rather than as a method to determine their molecular weight distribution, for which mass spectrometry could be an alternative approach.

Electrospray ionisation (ESI) mass spectrometry has proven to be very efficient for structural analysis of polyphenols, but it has shown limitations in the evaluation of the molecular weight distributions of tannin mixtures. That is, ESI mass spectra of tannin mixtures are always dominated by the lowest molecular weight (MW) components with peak intensities diminishing as polymer chain length increases, in a pattern resembling exponential decay¹¹,¹². This is also observed with Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry although the latter has demonstrated a better ability to detect larger polymers than the ESI systems. The fractionation of crude tannin extracts prior to mass analysis greatly improves the detection of larger molecular weight species^{11,12}.

Thus, the aim of the work presented here is to develop an original methodology to determine the molecular weight distribution of various tannin fractions through the detection of tannin-protein complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. Indeed, the main characteristic of tannins is their ability to bind proteins and protein-tannin complexes have already been observed by electrospray^{13,14} and MALDI-TOF¹⁵ mass spectrometry. The proposed approach relies upon the use of a protein to serve as a charge carrier for tannin detection as well as serving as a protective ligand against fragmentation, so as to minimize discrimination in

ionisation and reduce fragmentation of large tannin polymers. The MALDI-TOF technique has been selected because it yields mainly monocharged ions. Interpretation of tannin-protein complex spectra is thus easier than that of ESI mass spectra for which superimposition of protein charge distribution and tannin molecular weight distributions would lead to very complicated profiles of protein-tannin complexes. In addition of this, the MALDI technique does not require the polymer standards for mass calibration.

(1) Experimental section

Reagents and samples

Bovine serum albumin (BSA) (fraction V, fatty acid free, MW~66700 Da), β -casein (MW~24000 Da), equine myoglobin (Mw~17000 Da), bovine β -lactoglobulin (MW~18400 Da), as well as trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid 98%, alpha-cyano-4-hydroxycinnamic, dihydroxybenzoic acid (DHB), trans-indoleacetic acid (t-IAA), and 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid were purchased from Sigma Aldrich Co (Saint Louis, CO).

Tara tannin, which is a mixture of gallotannins with quinic acid as the central core acylated by a variable number of gallic acid units (Figure 1) was purchased from Tara Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ).

Oligomeric ProCyanidin fraction from grape seed (OPC) was purchased from Berkem (Gardonne, France). Thiolytic analysis of this fraction showed that it contained 17.5 % galloylated units and its aDP was 2.6. Two condensed tannin fractions from apple (aDP = 9.2 and aDP = 27.8, respectively, estimated by thiolytic) were kindly provided by Sylvain Guyot (Unité de Recherches Cidricoles, INRA, Rennes, France). As the nominal mass of a monomer is 290 Da, the average molecular weight (aMW) of each apple tannin fraction is given by the formula:

$$aMW = aDP * 288 + 2$$

That of the OPC fraction was calculated in the same way, but the proportion of galloylated units (%G), nominal mass 442 Da, was taken into account as follows:

$$aMW = aDP * (288 * (100 - \%G) / 100 + 440 * \%G / 100) + 2$$

Acetic acid was purchased from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) and Centricon Ultracel YM-10 regenerated cellulose membrane from Millipore (Bedford, MA).

b) Protein-tannin complexation

2 mg/mL and 20 mg/mL solutions of protein (30 μ M and 300 μ M respectively) were prepared in 1% aqueous acetic acid, as was a 9 mM solution of tannin. The molecular weight taken for calculating the molar concentration of condensed tannins was the average molecular weight determined by thiolysis. For hydrolyzable tannins, it was estimated by direct MALDI-TOF analysis. The solutions of protein and tannin were mixed for $\frac{1}{2}$ hr in four protein-to-tannin ratios 10:1, 1:1, 1:10, and 1:300. Mixtures 1:1, 1:10, and 1:300 were submitted to an additional concentration step via use of a 10 KDa centricon membrane, by centrifugation at 5000g at 5°C during 55 minutes.

Unless otherwise specified, all mixtures were diluted in order to adjust the protein concentration to about 1mg/mL before MALDI-TOF analysis.

Experiments were performed in duplicate.

General instrumentation and conditions

Analyses were performed on a BiFlex III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The mass spectra were acquired in linear mode over a mass range of 60 to 120 kDa for analyses of protein-tannin complexes and in reflectron mode for direct analyses of tannin fractions over a mass range of 500 to 5000Da, using an adjusted accelerating voltage.

MALDI-TOF spectra of tannin fractions and protein-tannin complexes were run using DHB, t-IAA, trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid 98%, alpha-cyano-4-hydroxycinnamic, and 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid 98% as matrix.

The matrix solutions were prepared at a 10mg/mL-concentration in 50% aqueous CH₃CN, acidified with 0.1% TFA and premixed with the protein-tannin solutions (50% v/v) After brief mixing of the analyte and the matrix, 1 μL of the mixture was added on the MALDI target and allowed to air-dry. Mass calibration was performed externally. In this study, 700 hundred laser shots were summed to obtain final spectrum.

c) Mathematical processing of data

The molecular weight distributions of the different tannin fractions were characterized by the classical polymer parameters as follows:

Number-average molecular weight:

$$M_n = \frac{\sum (m/z)_i * I_i}{\sum I_i}, \text{ with } I = \text{Absolute intensity}$$

Weight-average molecular weight:

$$M_w = \frac{\sum (m/z)_i^2 * I_i}{\sum (m/z)_i * I_i}$$

Polydispersity Index:

$$PI = \frac{M_w}{M_n}$$

Results and discussion

B. Direct analysis of the tannin fractions by MALDI-TOF

A series of tannin fractions both hydrolysable and condensed was chosen so as to cover a large range of average molecular weight values. Tara gallotannin was selected as the

hydrolyzable tannin fraction. Direct MALDI-TOF analysis of this fraction showed an ion series within the mass range of 500 to 1500 Th (Figure 3, top). The mass difference between two successive ion peaks was equal to 152 Th, readily assigned to an additional galloyl residue. The main series corresponds to mono sodiated adducts as shown by comparison with the expected molecular weights (Table 1). The lowest peak in the series obtained under our conditions was detected at $m/z = 519.06$ Th and attributed to a quinic acid molecule substituted by 2 galloyl groups, while the highest one was detected at 1431.2 Th and attributed to a quinic acid substituted by 8 galloyl units. Another ion series (designated by * in the spectrum presented in figure 3), accounting for approximately for 25% of the total signal was detected at 22 units more than the former one, which corresponds to the singly charged di-sodiated ion series. From this spectrum, the average number of galloyl units was estimated to be around 4-5, which corresponds to the maximum as well as to the median of the galloyl distribution. The number-average molecular weight (M_n) of this tannin fraction calculated from the intensities of each peak was 860 amu.

For condensed tannins, three fractions differing by the nature of their constitutive units and their aDP values have been selected, namely two apple proanthocyanidin fractions consisting of epicatechin polymers (aDP 9.2 and 27.8, respectively) and one grape seed OPC fraction characterised by the presence of a galloyl residue on some of the repeating (epi)catechin units (aDP = 2.6, 17.5 % galloyl residues). The ion series in the OPC spectrum corresponds to the non-galloylated, mono-galloylated and di-galloylated (epi)catechin oligomers ranging from dimer to heptamer (sodium or potassium adducts), characterized by a mass difference of 288 Th within the non-galloylated (epi)catechin oligomers and a mass difference of 152 Th within the corresponding galloylated species (Table 2). Note that the occurrence of both sodium and potassium adducts for the galloylated procyanidins complicates interpretation as the sodium adduct of a DP_n molecule with two galloyl substituents overlaps with the potassium adduct of the non galloylated DP_{n+1} species. The M_n value for this fraction was calculated from the intensities of peaks in the MALDI-TOF spectrum at 916 and is thus consistent with that estimated from thiolysis (820).

The ion series of both apple tannin fractions correspond to potassium and/or sodium adduct series of epicatechin oligomers with mass differences of 288 amu. However, no clear difference between these two fractions could be distinguished in terms of mass distribution (Figure 3). The spectrum of the aDP 9.2 fraction shows an oligomer series ranging from DP3

to DP13 while the spectrum of the aDP 27.8 fraction shows an ion series ranging from DP2 to DP15. The M_n values calculated for these apple tannin fractions were 1562 and 1908 respectively, instead of 2652 and 8008, respectively, as calculated from the thiolysis data. This suggests that the ion peak intensity may be biased toward smaller size oligomers. The lower intensities detected for large oligomers may result from preferential desorption/ionization, and/or fragmentation of larger species (in both cases leading to an overestimation of lower DP); these problems are likely more pronounced when a wide polydispersity exists for the tannin fractions. Our studies show that the discrepancy between the molecular weight distribution observed by mass spectrometry and the average molecular weight determined by thiolysis increases with the degree of polymerisation. This is in agreement with earlier studies revealing that higher molecular weight tannins are not efficiently detected by MS, especially in highly polydisperse tannin mixtures, due at least in part to fragmentation¹².

Direct analysis of tannin fractions by MALDI-TOF mass spectrometry thus appears useful to establishing mass distributions of oligomeric procyanidins, but it likely is most suitable for the lower molecular weight tannins such as Tara gallotannins; however this cannot be definitively established because of the lack of a reliable reference method. Clearly direct analysis becomes less reliable as the molecular weight increases. Therefore, we sought to employ proteins as binding agents capable of protecting tannins against fragmentation while simultaneously serving as charge carriers to allow determination of the mass distributions of higher molecular weight tannins.

C.

D. Analyses of protein- tannin complexes by MALDI-TOF

1. Selection of the protein used as a charge carrier

Tannin-protein interactions are influenced by properties of both the protein and the tannin. Protein characteristics that usually favour strong binding are large molecular size, plus open and flexible structure^{16, 17}. The first step of our study aimed at selecting proteins which have strong affinities for tannin fractions and for which complexes are readily detected by mass spectrometry. Several proteins were tested in order to examine a large range of molecular weights because the requirements for strong binding and mass spectral quality seemed *a priori* in opposition (large molecular size for binding and impeding the fragmentation of larger tannins vs small size for good resolution). Availability and cost were also essential criteria for selecting the protein. Afterwards, experimental optimization was performed by varying parameters such as protein-to-tannin ratio and the dilution rate of mixtures and matrix. Bovine serum albumin, BSA, which is known to form complexes with tannins¹⁸ was the first protein selected. Experiments were first carried out in the presence of a large excess of OPC, corresponding to a protein-to-tannin ratio of 1:300. After shaking for 30-min, mixtures of tannin and protein solutions were centrifuged thereby forming a solid pellet. The mixture of tannins and proteins in solution leads to the formation of both soluble and insoluble within pellet complexes; their relative proportion depends on the concentration and size of both molecules. Soluble complexes are favoured when protein concentration is in excess whereas insoluble complexes are formed when tannins are present in excess¹⁹. Soluble complexes represent an analytical problem because they are differentiated neither by UV-visible spectrophotometry nor by diffusion light scattering from free (unbound) tannins. For our purpose, soluble complexes can be directly analysed by MALDI-TOF MS. Supernatants were withdrawn and filtered through a 10kDa-centricon. The retentate (corresponding to the protein fraction that contains free protein and soluble tannin-protein complexes) was added to

the HCCA matrix solution. Its analysis showed a large unresolved “hump” that starts at m/z values above the BSA signal and may correspond to the molecular weight distribution of the OPC-BSA complexes. No discrete m/z values corresponding to OPC-BSA complexes can be distinguished due to the lack of resolution in this mass range. Analyses of the OPC-BSA pellets first dissolved in 30% aqueous DMSO showed a mass profile similar to that obtained with the soluble fraction and thus did not bring additional information. Moreover, the use of DMSO is not convenient for the sample preparation as it slows the drying of the deposit on the target.

Three other proteins, namely β -casein used for wine fining, equine myoglobin and bovine β -lactoglobulin known to bind to various hydrophobic molecules were also tested. Complexes resulting from interactions between OPC and β -lactoglobulin, β -casein or equine myoglobin were not detected by MALDI-TOF MS. However, OPC- β -casein complexes could be visualized by ESI MS (data not shown).

The spotting method was also evaluated for different matrixes along the different optimization steps for BSA-OPC complexes. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid, t-IAA and 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid were tested with a double-droplet or a thin-layer spotting, and an additional assay was carried out using a two-layer matrix method (first layer of 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid in methanol/acetone, 2nd layer of sinapic acid in methanol/water). The best signal-to-noise mass spectrum was obtained with alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix using a double-droplet spotting.

The same protocol was repeated except that OPC was replaced by aDP 9.2 apple tannin fraction. The MALDI-TOF mass spectra of both supernatant and pellet showed again a similar “hump” after the BSA signal. However, no significant difference could be detected in the shape of the unresolved “hump” obtained with BSA-OPC and BSA-apple tannin solutions contrary to what might be expected from their different aDP values. This observation can be

explained by the large excess of polyphenols in the mixtures for which the saturation of all the binding sites available on BSA is reached for both tannin fractions.

Optimization of the protein-to-tannin ratio.

To refine the ability to use proteins in evaluating tannin distributions, it was thus necessary to adjust the protein-to-tannin ratio in order to detect complexes with lower stoichiometries, and particularly favor those with one tannin molecule per protein molecule (1-1 stoichiometry). Therefore, 10:1, 1:1 and 1:10 protein-to-tannin molar ratios were prepared with the apple tannin fraction. The first consequence of increasing the protein-to-tannin ratio was to keep all complexes soluble regardless of the ratio, which led to a higher overall concentration of complexes in solution than that obtained with the 1:300 molar ratio. Additionally, several dilution rates of the spotted mixtures were tested. The best spectrum was obtained by lowering the BSA concentration to 1mg/mL prior to analysis and this condition was kept afterwards. Moreover, *trans*-3,5-dimethoxy-hydroxycinnamic acid was the most appropriate matrix with these new ratios. Figure 4 shows the comparison of the spectra obtained with the different molar ratios. First, the MALDI-TOF mass spectra of BSA-standard and 10:1 mixture are heavily overlapped, indicating that the 10:1 ratio was not appropriate. This does not imply that no complex is formed in the 10:1 mixture, but rather that they cannot be detected because of the lack of resolution. The mass spectra obtained from the other two ratios showed that increasing the apple tannin proportion results in the widening of the “hump” and the shift of its maximum towards higher m/z. In the case of 1:1 mixture, the mass difference between the maximum of the “hump” and the maximum of BSA signal amounts to 2672 Da and thus consistent with the value estimated by thiolysis (2652 Da) as given in Table 3.

This congruence indicates that complexes with a 1-1 stoichiometry are the major population appearing along with the free BSA and thus that the “hump” reflects the complex distribution of the tannin fraction (Figure 5). On the other hand, the shift of the «hump» towards higher molecular weights with the 1:10 mixture (tannin excess) suggests the existence of complexes

with much higher stoichiometries. Picking up the maximum of the “hump” at 81000 Th leads to an estimated average stoichiometry at five tannin molecules per protein molecule. Further experiments held the protein-to-tannin molar ratio at 1:1, because under these conditions, the mass signal of complexes is consistent with the aDP value of the tannin fraction estimated by the standard method (thiolysis).

2. Validation with other tannin fractions

In order to validate these preliminary results, other tannin fractions were analysed using the set of optimised conditions, *i.e.* 1mg/mL BSA concentration, 1:1 protein-to-tannin molar ratio, and *trans*-3, 5-dimethoxy-hydroxycinnamic acid as matrix. All MALDI-TOF spectra were recorded on the diluted complex solutions except for the aDP 27.8-fraction for which it was necessary to work on the non diluted mixture. These experiments were carried out in duplicate.

All MALDI-TOF mass spectra showed a “hump” at higher m/z values than the free BSA signal (Figure 6), with the precise shape of the “hump” varying from one spectrum to another. The signal extended over a larger mass range, and its maximum was shifted towards higher m/z values as the average degree of polymerisation of the fraction increased. For each experiment, we calculated the mass difference between the top of the “hump” and the BSA signal. The molecular weights estimated in this way were compared with the values obtained from direct MALDI-TOF analysis and, for condensed tannins, to those determined by thiolysis (Table 3).

From these values, the average degree of polymerisation (aDP), or the average number of galloyl units (aDG) can also be calculated as

$$\text{aDP} = (\text{aMW} - 2)/288 \quad \text{or} \quad \text{aDP} = (\text{aMW} - 2)/(288 * 0.825 + 440 * 0.175) \quad \text{for OPC} \quad (1)$$

$$\text{aDG} = (\text{aMW} - 192)/152 \quad (2)$$

Good reproducibility in replicate samples was obtained. The molecular weight values calculated from MALDI-TOF analysis of the BSA-tannin complexes were consistent with those estimated by thiolysis for the aDP 9.2 fraction but slightly higher than those estimated by other methods for the oligomeric fractions. For the largest polymers, however, MALDI-

TOF data yielded much lower values (11.1 instead of the expected value at 27.8). These results suggest that this raw approach has limitations for aDP estimation and it does not readily convey information concerning the polydispersity of the fractions.

Development of a processing method for aDP calculation and size distribution modelling.

Polymer parameters, *i.e.* the number average molecular weight (M_n), the weight average molecular weight (M_w), and the polydispersity index (PI) can be calculated from the mass spectra of BSA-tannin complexes. In our case, the mass spectrum directly gives access to the polymer parameters of the BSA-tannin complexes from which we deduce the corresponding parameters for the tannin fraction alone by subtracting the M_n of BSA, assuming all signals correspond to 1-1 complexes. The first step of our processing was to select properly the mass range corresponding to signal of the complexes, which can differ from the mass range acquired. The starting point was arbitrarily selected at $m/z = 61000$ Th for all experiments, whereas the end point was attributed to the m/z value corresponding to the return of the raw signal back to the baseline for each experiment.

In order to eliminate, on the one hand, the variability of the solution spotting and, on the other hand, the variability of the mass signal to noise ratio, the moving-average (smoothed) curves were first established with every 30 points of the raw mass spectra of BSA and BSA-tannin complexes. This smoothing actually reduces the noise without modifying the shape of the raw spectrum. However, to cancel out the varying baseline, the baseline at the beginning of the raw spectra (between 61000 Th and 65000 Th), was subtracted over the entire mass range considered. The value of baseline actually corresponds to the minimum of the absolute intensities read in this part of the spectrum. For illustration, comparison of the raw and processed spectra obtained from the mixture of BSA and aDP 9.2 tannin fraction is shown on figure 7. For each experiment, the mass spectrum was processed in this way, and M_n and M_w

were determined for BSA and BSA-tannin complexes. The results obtained for the duplicate series are summarized in Table 4. The average molecular weight of the corresponding tannin fraction was then calculated by subtracting the BSA M_n value from that of the complexes.

The M_n and aDP values calculated for apple condensed tannin fractions using this analysis of MALDI-TOF mass spectra are in good agreement with the values estimated by thiolysis. Concerning OPC, results are higher than those obtained by thiolysis. The OPC fraction is probably contaminated by oxidation products of tannins formed either in the course of isolation stage or storage. These oxidized tannins result from oxidative coupling of original tannins leading thus to larger polymeric chains in average that may bind to BSA as the non-oxidized ones. However, they are not actually taken into account in the thiolysis results because their biphenyl interflavan linkages are resistant to acidic cleavage²⁰ which may explain the discrepancy between MALDI-TOF and thiolysis results.

The values calculated from BSA-tara tannin complexes are slightly higher than those obtained from direct MALDI-TOF analysis. This suggests that this direct method of analysis deviates somewhat from the actual composition of the gallotannin fraction, possibly due to the occurrence of fragmentation (cleavage of the galloyl ester linkages releasing species of lower NG) or to the existence of complexes with higher stoichiometries than 1-1 are present, as observed previously for another gallotannin, pentagalloylglucose¹⁵. To better visualise the molecular weight distribution of each tannin fraction, an histogram can be built by extracting the discrete m/z values of the complexes between BSA and the different tannin fractions, measuring their respective intensities, and subtracting the contribution of BSA. The histograms of tara tannin and DP 9.2 tannin fraction are displayed on figure 8, showing the extent of galloylation (from 1 to 30) or polymerisation (1 to 52).

Conclusion

MALDI-TOF analysis of BSA-tannin complexes is a novel method for determination of the higher molecular weight tannins that are poorly detected by direct mass spectrometry analysis, due to fragmentation and tannin aggregation or “stacking”. The method has been applied and validated on condensed tannin fractions from aDP 2.6 through aDP 28, yielding M_n values consistent with those expected from the classical thiolysis analysis. The new method represents a simple and rapid alternative to standard methods involving depolymerisation in the presence of a nucleophilic agent that require HPLC separation and prior calibration of the reaction products for the determination of average molecular weight of polymeric tannin fractions. In addition to average molecular weight values, the method provides information on the polymer distribution parameters and thus can also rival time consuming methods like SEC in this respect. The MS signals of the 1:1 BSA-tannin complexes were used for modelling the size distribution of tannin fractions. However, like SEC, the method suffers from the lack of suitable calibration solutions to validate the distribution parameters of polymeric fractions.

For gallotannins, re-optimization of the protein-to-tannin ratio between 10:1 and 1:1 could be tested since larger stoichiometry complexes seem to be favored in the case of small molecules targets such as hydrolyzable tannins.

A future development of the method reported herein would be to go further in the analysis of condensed tannins presumably involved in astringency perception. Thus, protocols based on tannin precipitation with BSA have been initially developed by Hagerman¹⁸ and further improved by Adams and Habertson^{21, 22} for quantifying grape and wine tannins. However, these approaches cannot provide information on the nature of the precipitated tannins while other studies have shown that larger molecular weight tannins are selectively precipitated out by proteins²³. Our approach might give further insights into the mass distribution of these precipitated tannins.

Acknowledgements

This work is financially supported by the Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne (CIVC) and Moët & Chandon Company.

Thanks are due to Sylvain Guyot who provided the tannin fractions from apple.

References

- (1) Haslam, E.; Lilley, T.H., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1988**, *27*, 1-40.
- (2) Cao, G.; Russel, R.M.; Lischner, N.; Prior, R.L., *J. Nutr.* **1998**, *128*, 2383-2390.
- (3) Young, J.F.; Nielsen, S.E.; Haraldsdottir, J.; B.Daneshvar; Lauridsen, S.T.; Knuthsen, P.; Crozie, A.; Sandstrom, B.; Dragsted, L.O., *Am J. Clin Nutr* **1999**, *69*, 87-94.
- (4) Rein, D.; Lotito, S.; Holt, R.R.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Fraga, C.G., *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2109S-2114S.
- (5) Koga, T.; Meydani, M., *Am J. Clin Nutr* **2001**, *73*, 941-948.
- (6) Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J., *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, *83*, 564-573.
- (7) Rigaud, J.; Perez-Illzarbe, J.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Cheynier, V., *Journal of chromatography* **1991**, *540*, 401-405.
- (8) Kennedy, J.A.; Taylor, A.W., *Journal of chromatography A* **2003**, *995*, 99-107.
- (9) Viriot, C.; Scalbert, A.; Hervé-du-Penhoat, C.; Rolando, C.; Moutounet, M., *Journal of Chromatography A* **1994**, *662*, 75-85.
- (10) Nonier, M.F.; Absalon, C.; Vivas, N.; Vivas-de-Gaulejac, N., *Journal of Chromatography A* **2004**, *1033*, 291-297.
- (11) Yanagida, A.; Kanda, T.; Shoji, T.; Ohnishi-Kameyama, M.; Nagata, T., *Journal of Chromatography* **1999**, *855*, 181-190.
- (12) Taylor, A.W.; Barofsky, E.; Kennedy, J.A.; Deinzer, M.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 4101-4110.
- (13) Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V., *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37*, 609-616.
- (14) Vergé, S.; Richard, T.; Moreau, S.; Richelme-David, S.; Vercauteren, J.; Promé, J.C.; Monti, J.P., *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 2363-2366.
- (15) Chen, Y.; Hagerman, A.E., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 4008-4011.
- (16) Hagerman, A.E., In *Chemistry and significance of condensed tannins*; Hemingway, R. W., Karchesy, J. J., Eds.; Plenum Press: New York, London, 1989, pp 323-331.
- (17) Charlton, A.J.; Baxter, N.J.; Lilley, T.H.; Haslam, E.; McDonald, C.J.; Williamson, M.P., *FEBS Letters* **1996**, *382*, 289-292.
- (18) Hagerman, A.E.; Butler, L.G., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1978**, *26*, 809-812.
- (19) McManus, J.P.; Davis, K.G.; Beart, J.E.; Galffney, S.H.; Lilley, T.H.; Haslam, E., *Journal of Chemical Society Perkin Trans II* **1985**, 1429-1438.
- (20) Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V., *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1279-1288.
- (21) Harbertson, J.F.; Kennedy, J.A.; Adams, D.O., *American Journal of Enology and Viticulture* **2002**, *53*, 54-59.
- (22) Harbertson, J.F.; Picciotto, E.A.; Adams, D.O., *American Journal of Enology and Viticulture* **2003**, *54*, 301-306.
- (23) Sarni-Manchado, P.; Deleris, A.; Avallone, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M., *Am.J.Enol.Vitic.* **1999**, *50*, 81-86.

		MW	[M+Na] ⁺ calculated	[M+Na] ⁺ m/z detected
<i>Tara tannin</i>	<i>1G</i>	344.07	367.06	-
	<i>2G</i>	496.08	519.08	519.06
	<i>3G</i>	648.101	671.09	671.14
	<i>4G</i>	800.11	823.1	823.18
	<i>5G</i>	952.12	975.11	975.19
	<i>6G</i>	1104.13	1127.12	1127.2
	<i>7G</i>	1256.14	1279.13	1279.2
	<i>8G</i>	1408.15	1431.14	1431.2

G = Galloyl moiety

Table 1 : Composition of tara tannin estimated from MALDI-TOF spectrum of the fraction

	MW	OPC		DP 9,2		DP 27,8			
		[M+Na] ⁺ calculated	[M+K] ⁺ calculated	[M+Na] ⁺ m/z detected	[M+K] ⁺ m/z detected	[M+Na] ⁺ m/z detected	[M+K] ⁺ m/z detected	[M+Na] ⁺ m/z detected	[M+K] ⁺ m/z detected
<i>DP2</i>	578.13	601.12	617.22	-	X	X	-	-	-
<i>DP2 1G</i>	730.14	753.13	769.23	X	X	-	-	-	-
<i>DP3</i>	866.2	889.19	905.29	-	X	X	-	X	-
<i>DP3 1G</i>	1018.21	1041.2	1057.30	X	X	-	-	-	-
<i>DP4</i>	1154.26	1177.25	1193.35	-	X	X	-	X	X
<i>DP4 1G</i>	1306.27	1329.26	1345.36	X	X	-	-	-	-
<i>DP4 2G</i>	1458.28	1481.27	1497.37	X	X	-	-	-	-
<i>DP5</i>	1442.32	1465.31	1481.41	-	X	X	-	X	X
<i>DP5 1G</i>	1594.34	1617.33	1633.43	X	X	-	-	-	-
<i>DP5 2G</i>	1746.35	1769.34	1785.44	X	X	-	-	-	-
<i>DP6</i>	1730.39	1753.38	1769.48	-	X	X	X	X	X
<i>DP6 1G</i>	1882.4	1905.39	1921.49	-	X	-	-	-	-
<i>DP6 2G</i>	2034.41	2057.4	2073.5	X	X	-	-	-	-
<i>DP7</i>	2018.45	2041.44	2057.54	-	X	X	-	X	X
<i>DP7 1G</i>	2170.46	2193.45	2209.55	-	X	-	-	-	-
<i>DP7 2G</i>	2322.47	2345.46	2361.56			-	-	-	-
<i>DP8</i>	2306.51	2329.5	2345.60	-	-	X	-	X	X
<i>DP9</i>	2594.58	2617.57	2633.67	-	-	X	-	X	X
<i>DP10</i>	2882.64	2905.63	2921.73	-	-	X	-	X	X
<i>DP11</i>	3170.7	3193.69	3209.79	-	-	X	-	X	X
<i>DP12</i>	3458.76	3481.75	3497.85	-	-	X	-	X	X
<i>DP13</i>	3746.82	3769.81	3785.91	-	-	X	-	X	X
<i>DP14</i>	4034.88	4057.87	4073.97	-	-	-	-	X	-
<i>DP15</i>	4322.94	4345.93	4362.03	-	-	-	-	X	-

Table 2 : Composition of condensed tannin estimated from MALDI-TOF spectrum of the fractions

Direct analysis of fractions by thiolysis			Direct analysis of fractions by MALDI-TOF		Analysis of BSA-Tannin complexes by MALDI-TOF Difference between the top of the “hump” and free BSA signals			
Average molecular weight	aDP/aDG	M _n	aDP/aDG	Mean molecular weight		aDP/aDG		
				series 1	series 2	series 1	series 2	
<i>Tara tannin</i>	-	-	860	4.5	950	982	5.0	5.2
<i>OPC</i>	820	2.6	916	2.9	1552	1531	4.9	4.8
<i>DP 9,2</i>	2652	9.2	1562	5.4	2672	2894	9.3	10.0
<i>DP 27,8</i>	8008	27.8	1908	6.6	3199	3157	11.1	11.1

Table 3 : Evaluation of the aDP for each tannin fraction by observation of the signals of free BSA and complexes

	Series 1		Series 2	
	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _n (kDa)	M _w (kDa)
<i>BSA</i>	66946	66961	67197	67218
<i>BSA-tara tannin</i>	67870	67935	68235	68378
<i>BSA-OPC</i>	67961	68095	68358	68515
<i>BSA-DP 9,2</i>	69596	69759	69985	70216
<i>BSA-DP 27,8</i>	75010	76472	75008	76304

Table 4 : Number average molecular weight (M_n) and Weight average molecular weight (M_w) of BSA and BSA-tannins complexes

Direct analysis of the fractions			Analysis of BSA-Tannin complexes by MALDI-TOF Mathematical Processing					
	Average molecular weight	aDP/aDG	M _n		aDP/aDG		PI	
			series 1	series 2	series 1	series 2	series 1	series 2
<i>Tara tannin</i>	860*	4.5	924	1038	4.8	5.6	1,07	1,14
<i>OPC</i>	820**	2.6	1015	1161	3.2	3.7	1,13	1,13
<i>DP 9,2</i>	2652**	9.2	2650	2788	9.2	9.7	1,07	1,08
<i>DP 27,8</i>	8008**	27.8	8064	7811	28.0	27.0	1,18	1,17

* Direct analysis of the fraction by MALDI-TOF

** Direct analysis of the fractions by thiolysis

Table 5 : M_n, aDP and PI values determined for each tannin fraction from MALDI-TOF analysis of the BSA-tannin complexes

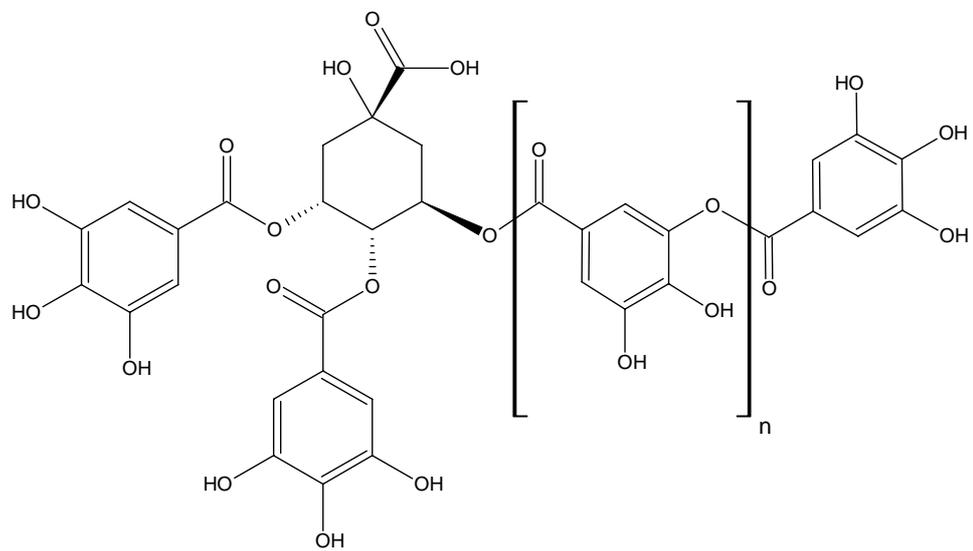
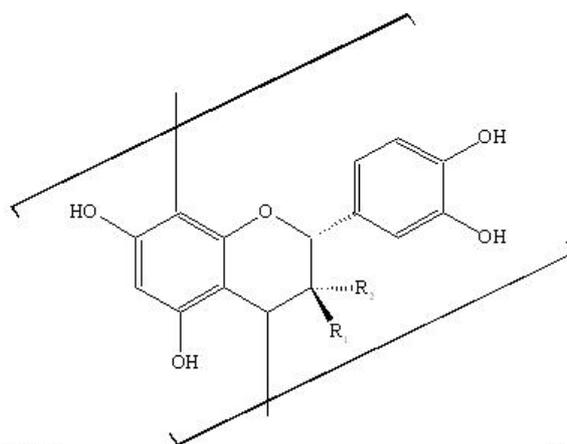


Figure 135: Tara tannin structure



Flavanol units

Catechin $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

Epicatechin $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$

Epicatechin gallate $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{O-galloyl}$

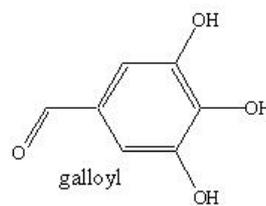


Figure 136 : Structure of condensed tannins

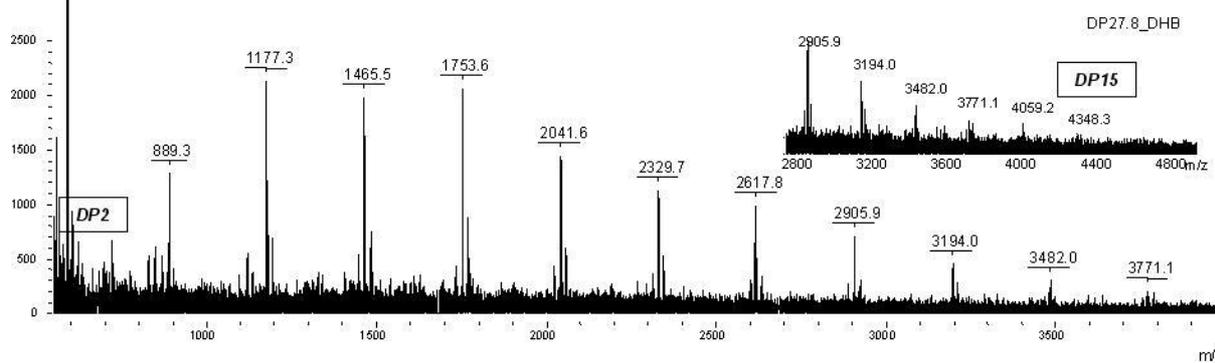
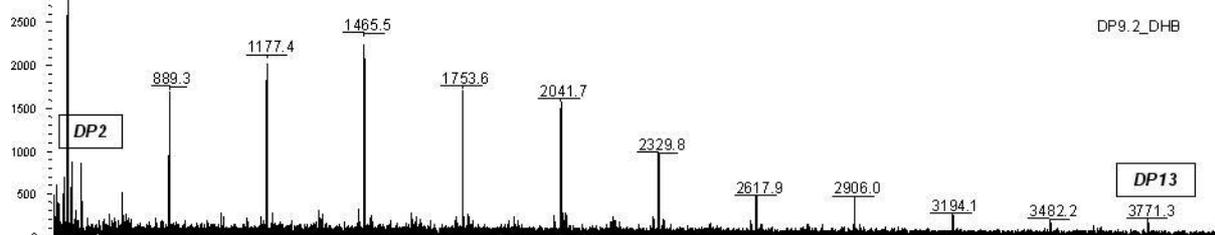
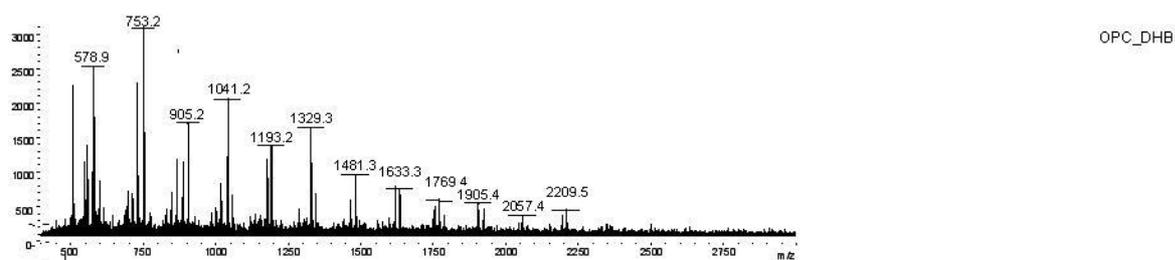
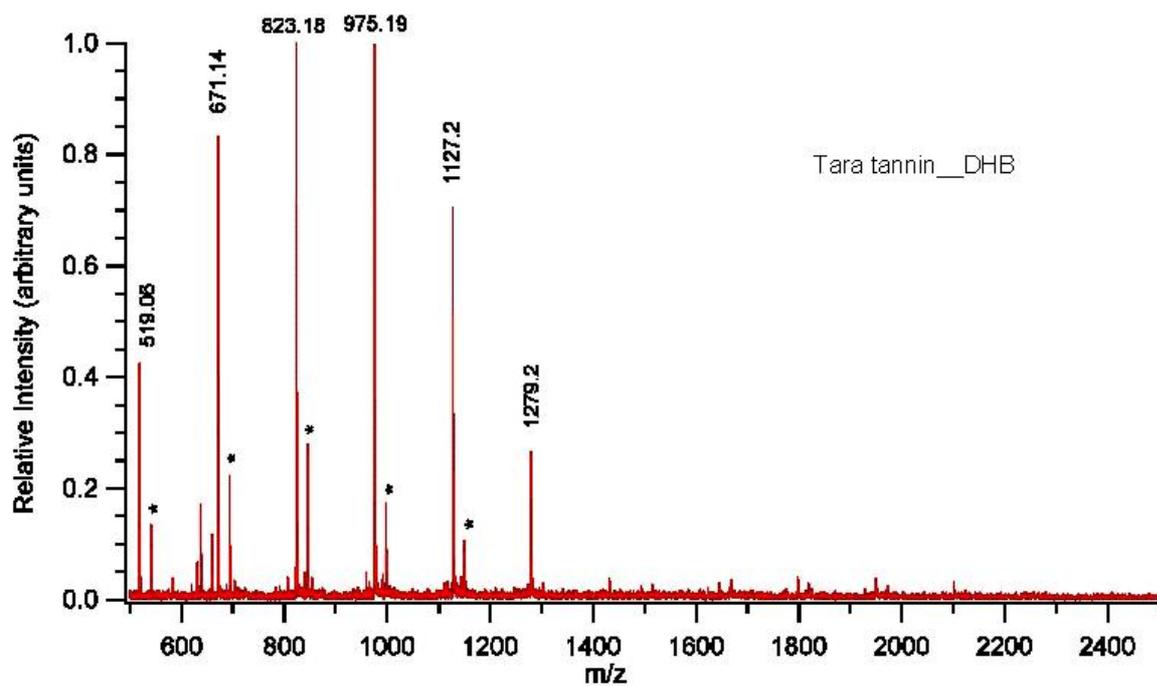


Figure 137: MALDI-TOF Spectra of Tara tannin and condensed tannins (peaks attribution is given in Table 1 and Table 2).

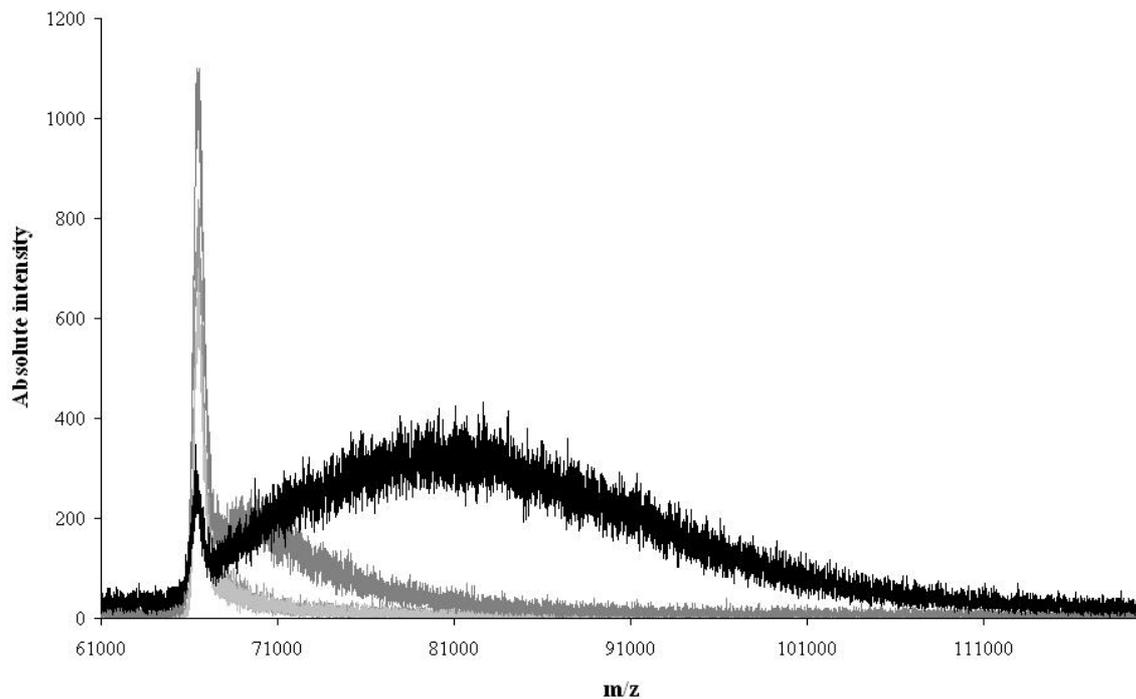


Figure 138 : MALDI-TOF mass spectra of mixtures of BSA (mean grey), BSA-DP 9,2 10:1 (pale grey), BSA-DP 9,2 1:1 (dark grey), and BSA-DP9,2 1:10 (black)

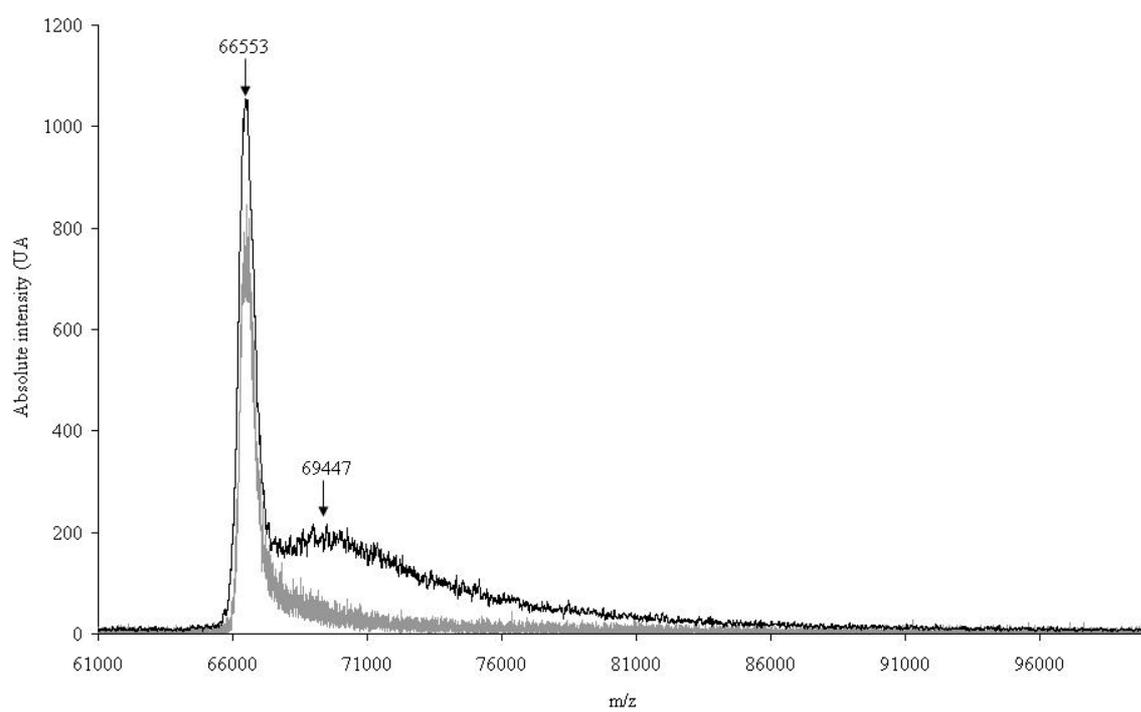


Figure 139 : MALDI-TOF mass spectra in positive linear mode of BSA (black) and BSA in presence of DP 9,2 (grey)

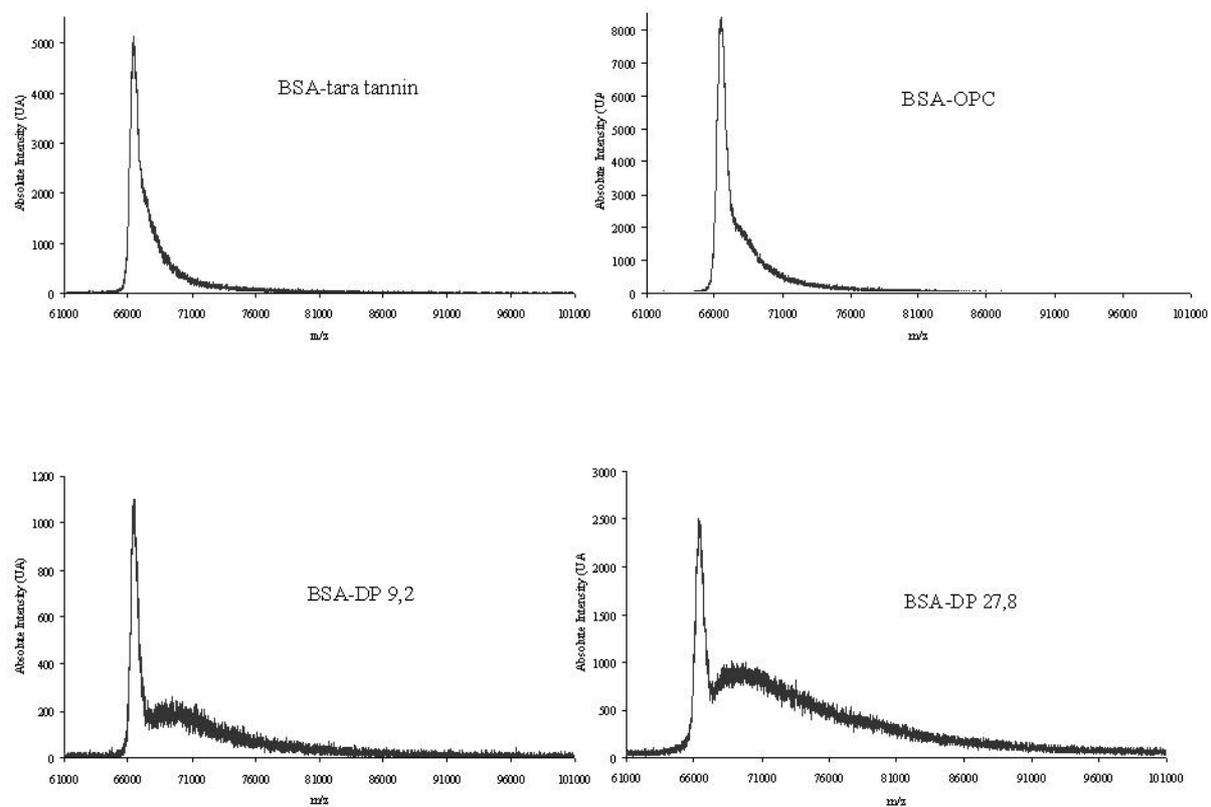


Figure 140 : MALDI-TOF spectra of complexes 1 :1 BSA-Tara tannin, BSA-OPC, BSA-DP 9,2, and BSA-DP 27,8

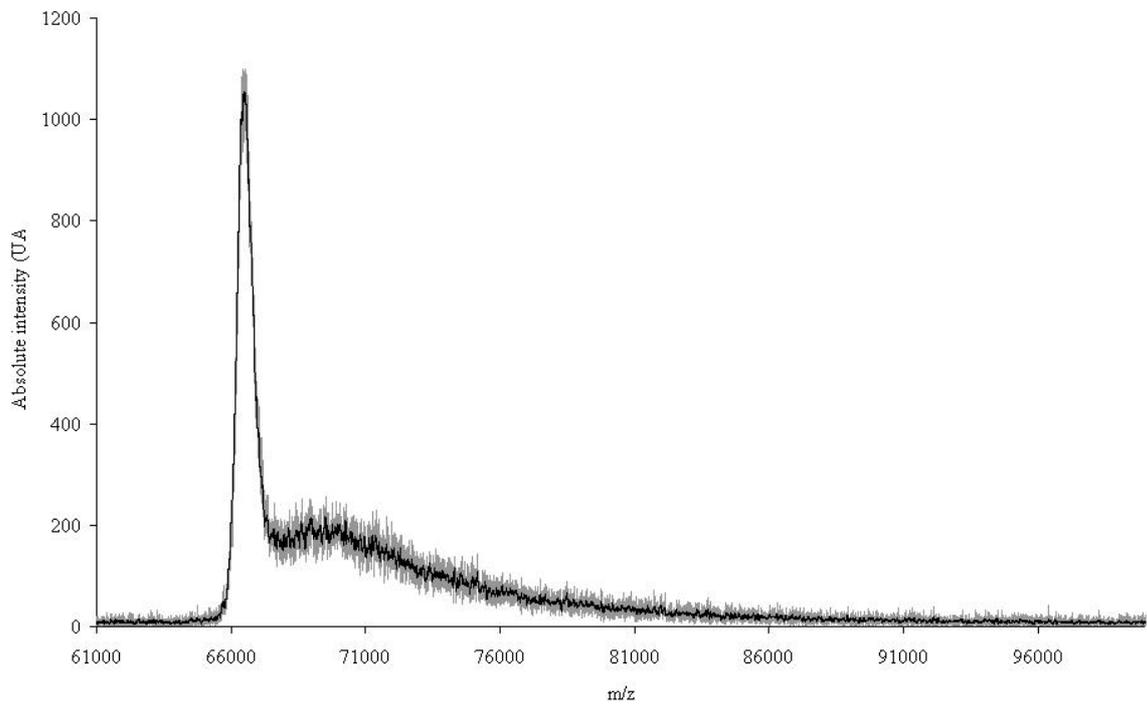


Figure 141 : Raw spectrum (grey) and processed curve (black) of BSA-DP 9,2

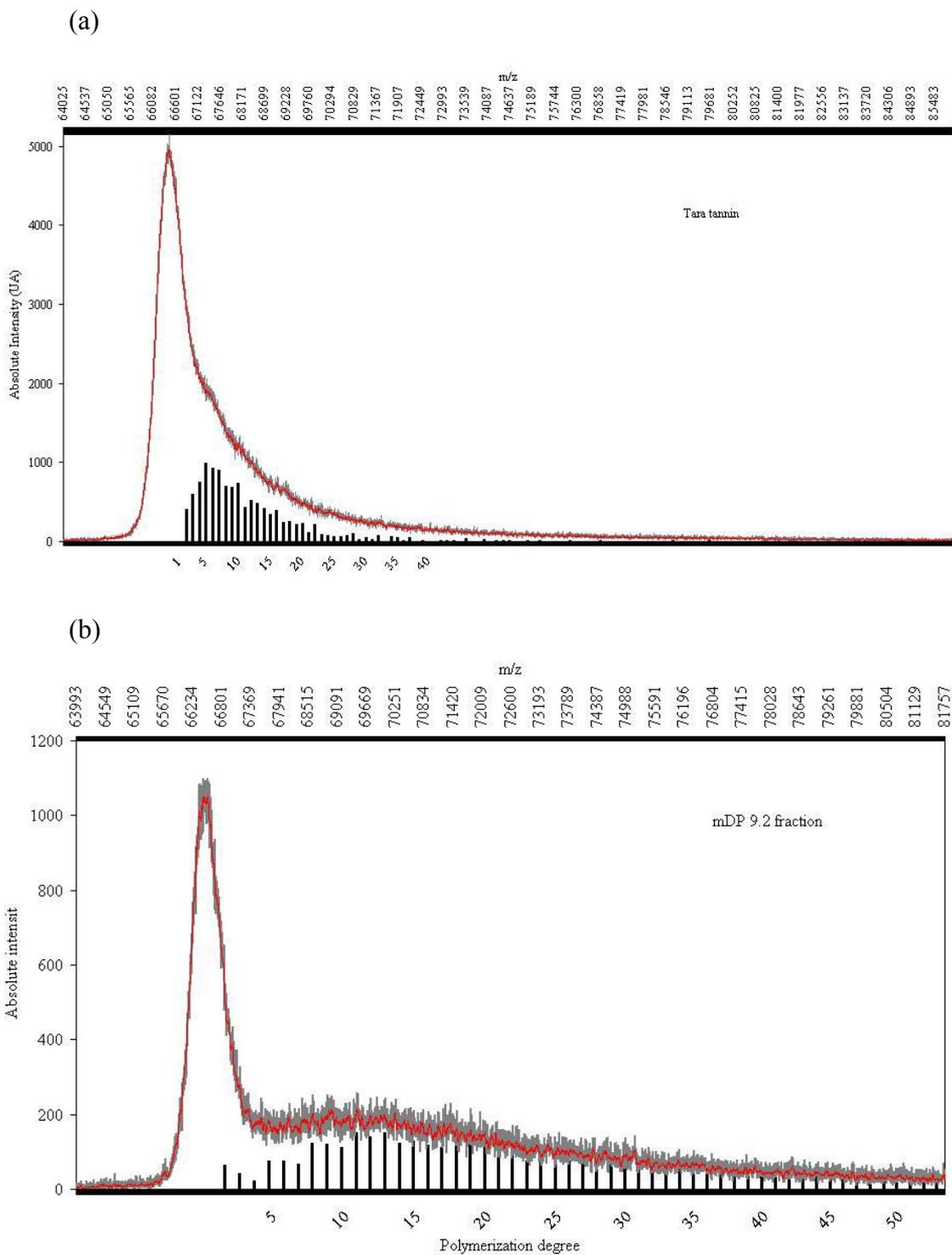


Figure 142 : Raw spectrum (dark grey), Moving-average curve with background noise suppression (red) of BSA- tannin complexes and visualisation of the size distribution of tannins (histogram) in the case of tara tannin (a) and aDP 9,2 fraction (b)

Annexe 4

Analyse sensorielle des vins blancs de Champagne monovariétaux millésimes 2002, 2003, et 2004 (modalités oxydée et non oxydée)

TEST TRIANGULAIRE

Commentaires

Numéro et nom de l'essai : 203003 - Vinothèque récolte 2002 : Trois cépages et différentes capsules

Lieu : QVC

Etape : R02 T03 (T+ 36)

11 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 7

Date : Mardi 23 octobre 2006 11h

Chardonnay

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 11	11 Test significatif	Nez plus fermé/ végétal (2), floral ?, fumé avant agitation puis fruits cuits/ à l'alcool, grillé (3) / fruits mûrs/ fruits blets, oxydation légère, réduit (8) (légumes cuits, animal, charcuterie/ choucroute/ lard cuit, soufré, putride, pneu brûlé/ plastique), bouche réduite (2) (soufré), métallique, attaque franche/ effervescent (2)/ vif (4) / amer, bon équilibre en bouche, plat/ neutre, lourd, ample, longueur moyenne, bonne longueur
Capsule TOP Lot 14		Nez intense (2), fruits cuits/ fruits confits/ confiture de fraise/ biscuit/ oxydé (10) (fruits à l'alcool (2), fruits blets (2)/ pomme coing, pomme coupée (3)/ rancio)/ lacté/ beurre (2)/ caramel (2) au lait , liqueur/ colle blanche, bouche très fruité/ compote, attaque vive/ bouche oxydée (2)/ correct mais déjà évolué peu effervescent/ souple, gras/ lourd/ finale plus acide, passé en bouche

14 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 9

Date : Lundi 6 novembre 2006 11h

Pinot noir

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 21	14 Test significatif	Fruité (2) (agrumes), premier nez très puissant et plaisant de fruits mûrs, fruits surmûris/ cire, oxydé et réduit (8) (animal (3)/ alliacé, soufré (3)/ allumette (2)/ fumé, caoutchouc brûlé)/ profil bretanomyces, croûte de fromage, chimique, peu de réduit en bouche, un peu métallique, plus effervescent, souple, plus acide (4) , plus astringent, plat, bouche élégante et longue (2), plus présent en bouche.
Capsule TOP Lot 24		Fruité (3) (fruits rouges, agrumes, jus de raisin)/ herbacé, fruits mûrs, fruits cuits(2) (compote, coing), fruits à l'alcool(4) (prune, cerise, pruneaux(2))/ amande(2) amère/ noyau fruits blets(2)/ bois humide, oxydé (5) (noix verte)/ lacté (3), beurre, caramel (3) , nez grossier, lourd, effervescence piquante, acide, manque de fraîcheur (2), rond (2), mou, plus astringent, amer, trop évolué/ lourd, bouche ample mais peu élégante, fatigué, passé, long.

12 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 8

Date : Mardi 7 novembre 2006 11h

Meunier

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 31	12 Test significatif	Fermé, nez intense (2)/ floral/ fruité (4) (fruits rouges, fruits à noyaux, pomme verte), poudré/ coing, confiture/ vanille/ noix de coco/ miellé + pain cuit, réduit (6) (soufré (2) (allumette)/ animal (2)/ venaison, laine mouillée, poisson/ caoutchouc, bouche déjà oxydée/ notes lactées, sucré/ acide (3)/ meilleur équilibre, court (2)
Capsule TOP Lot 34		Nez intense/ bergamote, fruits rouges (noyau), fruits mûrs (2)(raisin, oxydé (8) (fruits cuits (coing, compote), fruits à l'alcool (2), pomme coupée, pruneau (2) sec, raisin sec, ratafia, rancio, caramel(2), évent (éthanal, végétal)), diacétyl, lacté/ peinture, nez lourd/ écoeurant. bouche également très oxydée, très acide, plus rond, amer, vin plat/ fatigué/ passé.

TEST TRIANGULAIRE
Commentaires

Numéro et nom de l'essai : 204028 - Vinothèque récolte 2003 : Trois cépages et différentes capsules

Lieu : QVC

Etape : R03 T04 (T+ 24)

11 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 7

Date : Mardi 23 octobre 2006 11h

Chardonnay

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 11	8 Test significatif	Nez plus intense, floral (2) (fleur blanche)/ végétal, mine de crayon/ fumé au 1 ^{er} nez, grillé ensuite réduction (8) (fumé/ chou/ caoutchouc (2)/ soufré (2)/ animal/ croupi/ serpillière/ putride)/ solvant, attaque discrète/ bouche réduite, un peu métallique, plus vif (2)/ légère astringence, amertume (4) , mieux équilibré en bouche, long (2)
Capsule TOP Lot 14		Nez fermé (3) / floral (2) (fleurs blanches)/ végétal (2) (légèrement haricots verts)/ fruits rouges (fraise/ framboise)/ fruits cuits (3) (compote, confiture de fraise), fruits mûrs, nez grillé/ torréfié, nez caramel au lait, solvant, gomme, un peu réduit/ levure, vin fatigué Peu aromatique en bouche (2)/ peu de matière, fruité/ levuré, oxydé, vif, frais, moins acide, sec, légèrement astringent, amer (2), plus long.

14 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 9

Date : Lundi 6 novembre 2006 11h

Pinot noir

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 21	11 Test significatif	Notes de fruits mûrs/ fruits exotiques (ananas)/ confituré, cassis mûrs, agrumes, craie humide/ réduit (10) (alliacé/ charcuterie, entrailles/ fumé, animal/ putride, croupi/ soufré (6)/ légumes cuits/ laine mouillée/ caoutchouc/ pétrole), chimique/ plastique, note de réduction (alliacé) en bouche/ acide (5) citrique, astringent/ amer (2), plus effervescent, bouche diluée/ peu expressif/ court (2), longueur moyenne.
Capsule TOP Lot 24		Fruité (4) (agrumes)/ anis, fruits mûrs, fruits blets, noix/ pruneau/ cassis mûr, pâte de coing, un peu évolué, lacté (2) / beurré (2) / caramel (2) brûlé, craie humide même après agitation, réduit (2) (caoutchouc), miellé en bouche, fruits rouges, peu d'effervescence, souple, plus rond, plus gras, acidité/ astringence (2)/ un peu amer (3), bouche plus ample, court (3), longueur moyenne, long.

12 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 8

Date : Mardi 7 novembre 2006 11h

Meunier

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 31	10 Test significatif	Grillé (3) / torréfié/ moka/ café (2)/ fruité (2) (poire mûre, fruits rouges moins marqués)/ caramel au lait, ensuite de la réduction (7) (soufré (2)/ animal, caoutchouc, hydrocarbure, légumes cuits, chou, poireau), léger soufré en bouche, alcooléux, plus effervescent, bouche plus équilibrée.
Capsule TOP Lot 34		Fermé, fruits rouges/ vanille/ café (2)/ moka/ fruits mûrs (2)/ brioche/ caramel au lait (5) / lacté (2) (yaourt)/ beurre(2) (diacétyl intense), plus lourd au nez, moins d'effervescence (2)/ note d'oxydation (2) (pomme coupée)/ plus plat/ plus rond, pas vif/ bouche onctueuse voire crémeuse/ lourd (2), passé, un peu court.

TEST TRIANGULAIRE
Commentaires

Numéro et nom de l'essai : 205028 - Vibliothèque récolte 2004 : Trois cépages et différentes capsules

Lieu : CIVC

Etape : R04 T05 (T+ 12)

11 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 7

Date : Mardi 23 octobre 2006 11h

Chardonnay

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 11	8	Plus aromatique, notes grillées (2), moka, fruits mûrs/ citronné/ coing/ légère réduction (6) (après agitation, léger soufré (2), légumes cuits, léger putride), végétal, Peu effervescent, attaque plus franche, souple (2)/ rond (2)/ paraît plus alcooleux/ acidulé/ plus vif (2), astringent, plus sec/ plus asséchant, amer (2)
Capsule Vénus Lot 14	Test significatif	Fermé (2), premier nez mine de crayon puis fruité (4) (fruits cuits, pomme verte)/ biscuit (2)/ grillé (3) / noisette/ herbacé/ réglisse/ lacté (2), réduction (fumé/ hydrocarbure), plus fruité également en bouche, réduction en bouche, plus effervescent/ plus vif (2), très acide, acidité moyenne/ un peu plat/ un peu évolué pour 12 mois, légère amertume, plus ample, court (2).

14 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 9

Date : Lundi 6 novembre 2006 11h

Pinot noir

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 21	9	Fermé, savon/ fruité (3) (agrumes, pamplemousse, fruits rouges)/ floral/ végétal (2), grillé (2)/ craie/ terreux, un peu fumé/ note de réduction (7) (soufré (2)/ croupi, animal, caoutchouc (2)), SO2, note animale en bouche, effervescence fine, acidité (2), sécheresse (2)/ astringence/ amertume (2)/ lourd.
Capsule Vénus Lot 24	Test significatif	Nez assez fermé, floral (2) (fleurs blanches/ fruité (3) (fruits frais, fruits blancs/ à noyaux, agrumes), compote, amande, grillé (2), caramel (3) / beurré, yaourt, solvant, mentholé, végétal/ bourgeon de cassis/ léger buis, plus fruité en bouche, mousse agressive, peu d'effervescence, plus acide (2), acide et minéral, souple, plus gras, sec, astringent, amer (2), moins amer.

12 dégustateurs - seuil de signification à 5% : 8

Date : Mardi 7 novembre 2006 11h

Meunier

ECHANTILLONS	Réponses exactes	COMMENTAIRES
Capsule BO Lot 31	6	Nez plus fermé, végétal/ floral, café/ moka, pain grillé, fruité/ compote, oxydation (pomme) et réduction (5) (laine mouillée, chou/ bouillon/ caoutchouc (2)/ pneu (2) brûlé/ hydrocarbure), mentholé, fleuri/ fruité + légère réduction en bouche, acétique, vivacité, asséchant et plus amer.
Capsule Vénus Lot 34	Test non significatif	Nez fruité (2) (agrumes) et levurien, floral/ savon/ pain grillé, brioche, café/ moka/ fruits blets, bouillon/ caoutchouc, soufré, oxydation légère en bouche (noix), brioché, plus vif, sécheresse/ amertume