Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Ecole Doctorale : Sciences et Procédés Biologiques et Industriels
Formation Doctorale : Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement par

Laurent DAGAN

Le 13 juin 2006

Potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. *cv.* Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne

JURY

M. J. M. Navarro	Professeur, Université Montpellier II	Président
M. G. Versini	Directeur du Laboratoire Analyses et Recherches, Istituto Agrario di San Michele a/A (Italie)	Rapporteur
M. C. Ambid	Professeur émérite, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse	Rapporteur
M. A. Desprats	Directeur du syndicat des producteurs des Vins de Pays Côtes de Gascogne	Examinateur
M. R. Baumes	Directeur de Recherche, INRA UMR SPO Montpellier	Examinateur
M. R. Schneider	Ingénieur ITV France, Chef de projet Arômes, INRA UMR SPO Montpellier	Examinateur
M. A. Razungles	Professeur, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier	Directeur de thèse

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Ecole Doctorale : Sciences et Procédés Biologiques et Industriels
Formation Doctorale : Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement par

Laurent DAGAN

Le 13 juin 2006

Potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. *cv.* Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne

JURY

M. J. M. Navarro	Professeur, Université Montpellier II	Président
M. G. Versini	Directeur du Laboratoire Analyses et Recherches, Istituto Agrario di San Michele a/A (Italie)	Rapporteur
M. C. Ambid	Professeur émérite, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse	Rapporteur
M. A. Desprats	Directeur du syndicat des producteurs des Vins de Pays Côtes de Gascogne	Examinateur
M. R. Baumes	Directeur de Recherche, INRA UMR SPO Montpellier	Examinateur
M. R. Schneider	Ingénieur ITV France, Chef de projet Arômes, INRA UMR SPO Montpellier	Examinateur
M. A. Razungles	Professeur, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire Transformations Intégrées de l'UMR Sciences pour l'Oenologie de l'INRA de Montpellier, dans le cadre d'un contrat avec l'Institut Technique de la Vigne et du Vin.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Michel Moutounet, responsable de l'équipe Technologies Intégrées, de m'avoir accueilli au sein de cette équipe et pour l'enthousiasme qu'il a porté à ce travail.

Monsieur Raymond Baumes a dirigé ce travail de thèse avec rigueur et détermination. Qu'il soit assuré de ma sincère et profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur Alain Razungles pour avoir dirigé ce travail de thèse, pour son appui technique et personnel.

Monsieur Jean Marie Navarro, Professeur à l'Université Montpellier II, me fait l'honneur de présider ce jury. Je l'en remercie vivement.

Monsieur Giuseppe Versini, Directeur du Laboratoire d'Analyses et Recherches de l'Istituto Agrario di san Michelle all'Adige, et Monsieur Christian Ambid, Professeur émérite de l'ENSA de Toulouse, ont accepté de participer à ce jury en tant que rapporteurs. Qu'ils soient remerciés pour leur contribution à ce travail.

Je remercie Monsieur Alain Desprats, directeur du syndicat de Vins de Pays de Côtes de Gascogne, ainsi que Monsieur le président Jean Pierre Drieux, pour le soutien financier à ce projet et la confiance qu'ils nous ont accordés pendant ces 3 années.

Merci à Monsieur Jean-Luc Favarel, anciennement directeur de la station régionale ITV Midi-Pyrénées, pour la détermination dont il a fait preuve pour monter ce projet, ainsi qu'Eric Serrano, son successeur, qui a repris ce travail avec beaucoup d'intérêt.

Je remercie Monsieur Denis Dubourdieu pour son accueil au sein du Laboratoire d'Oenologie de Bordeaux, ainsi que Monsieur Takatoshi Tominaga pour m'avoir transmis avec précision son expérience des composés soufrés et pour sa participation aux comités de suivi de la thèse.

L'aboutissement de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien et la contribution quotidienne de membres de l'équipe des arômes. Je remercie chaleureusement, Danielle Mascré, Marie Ségurel, Virginie Bouckenooghe, Rémi Guérin-Schneider et Jean-Paul Lepoutre pour leur travail, mais aussi et surtout pour tous ces moments agréablement passés à leurs côtés. Sans oublier les nombreux stagiaires qui se sont impliqués avec énergie dans ce travail, Loïc Hébert-Prudhomme, Cyrielle Baroso, Tatiana Ratzimihara, Joël Cachera, Alexandre Conard et Céline Larguier.

Je remercie Thierry Dufourcq pour son appui technique, ses conseils et les moments partagés au Château de Mons.

Je remercie Messieurs Fontan, Gessler et Grassa, producteurs de Vins de Pays Côtes de Gascogne pour la mise à disposition de leurs parcelles de Petit et Gros Manseng pendant ces 3 années, ainsi que Madame Barrère et messieurs Ramonteu et Hours pour les vins qu'ils nous ont gentiment fourni.

J'adresse enfin tous mes remerciements aux membres de l'UMR Sciences pour l'œnologie, particulièrement à mes compagnons de thèse, de l'ITV, du Château de Mons, dont je garderai un très agréable souvenir.

Avant propos

Ce travail a fait l'objet des communications suivantes :

Publication

L. Dagan, R. Schneider, J. P. Lepoutre, R. Baumes. 2006.

Stability of sotolon in acidic and basic aqueous solutions. Application to the synthesis of a deuterated analogue for its quantitative determination in wine. Analytica Chemica Acta (à paraître)

Communication orale

Potentiel aromatique des raisins de Petit et Gros Manseng. Assemblée générale du Syndicat de Vins de Pays de côtes de Gascogne, Bretagne d'Armagnac, 8 novembre 2005.

Poster

L. Dagan, R. Schneider, A. Razungles, R. Baumes. 2006.

Synthesis of various S-cystein conjugates occuring in grape and other foods products, and of their deuterated analogues. Congrès *In Vino Analitica Scientia*, Montpellier (France), 7-9 juillet 2005.

L. Dagan, R. Schneider, A. Razungles, R. Baumes. 2006.

New method for the quantification of S-cystein conjugates of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one. Congrès *In Vino Analitica Scientia*, Montpellier (France), 7-9 juillet 2005.

I. INTRODUCTION 1

II. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE 3

II.1. L'arôme du vin 4

II.1.1. Généralités 4

II.1.2. Origine des composés d'arôme dans le vin 5

II.1.3. Les composés d'arômes 6

II.1.3.1. Les composés en C_6 6

II.1.3.2. C_{13}-norisoprénoïdes 6

II.1.3.3. Les monoterpènes 7

II.1.3.4. Les phénols volatils 7

II.1.3.5. Les alcools supérieurs 8

II.1.3.6. Esters et acides gras à nombre pair d'atomes de carbone 8

II.1.3.7. Les composés soufrés 9

II.1.3.8. Hétérocycles azotés et oxygénés 10

II.1.3.8.1. Les pyrazines 10

II.1.3.8.2. Les dérivés furaniques 10

II.1.4. Analyse de l'arôme du vin 11

II.1.4.1. L'analyse chimique 11

III. MATERIELS ET METHODES 15

III.1. Raisins et vins étudiés 16

III.1.1. Dispositif expérimental 16

III.1.1.1. Prélèvements 17

III.1.1.2. Vinification 17

III.1.2. Vins commerciaux 17

III.1.3. Moût et vin modèles 18

III.2. Etude de la fraction glycosylée de l'arôme 19

III.2.1. Etude de la fraction glycosylée de l'arôme des baies de Petit et Gros Manseng 19

III.2.1.1. Préparation du moût 19

III.2.1.2. Extraction des précurseurs glycosidiques 19

III.2.1.3. Hydrolyse enzymatique 19

III.2.1.4. Préparation de l'extrait 20

III.2.1.5. Analyse CPG-IE-SM 20

III.2.2. Vins enrichis en précurseurs glycosylés 21

III.2.2.1. Obtention des pools de précurseurs glycosylés 21
III.2.2.2. Préparation et traitement des vins enrichis en précurseurs glycosylés 22
III.2.2.3. Analyse sensorielle des vins enrichis en précurseurs glycosylés 22

III.3. S-conjugués à la cystéine 23

III.3.1. Synthèses chimiques 23
III.3.1.1. Addition de thiols sur la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1 (Boc-lactone) 23
III.3.1.1.1. Synthèse de la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1 (Boc-lactone) 23
III.3.1.1.2. Synthèse de la (R)-S-benzyl-N-Boc-cystéine 6a (Boc-SBC) 23
III.3.1.1.3. Synthèse de la (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine (Boc-P3MH) 8a et d'un analogue deutéré (Boc-P3MH-d_2) 8aD 24
III.3.1.1.4. Addition du 3-sulfanylhexan-1-ol 4 sur (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1 25
III.3.1.1.5. Synthèse de la (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-N-Boc-cystéine 9a (Boc-P4MMP) et d'un analogue deutéré 9aD (Boc-P4MMP-d_6) 25
III.3.1.2. Addition de (R)-N-Boc-cystéine 11a sur les composés α,β-insaturés 26
III.3.1.2.1. Synthèse du (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine 9a (Boc-P3MH) 26
III.3.1.2.2. Synthèse de la (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-N-Boc-cytéine 9a (Boc-P4MMP) 27
III.3.1.3. Déprotection de la fonction amine 27
III.3.1.4. Synthèse et purification des produits formés par dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP 28
III.3.2. Méthode de dosage des précurseurs cystéinylés 29
III.3.2.1. Préparation du moût 29
III.3.2.2. Extraction sur résine échangeuse de cations 29
III.3.2.3. Préparation de l'extrait 29
III.3.2.4. Purification sur C_{18} 30
III.3.2.5. Dérivatisation 30
III.3.2.5.1. Dérivatisation par l'éthylchloroformate 30
III.3.2.5.2. Triméthylsilylation 30
III.3.2.6. Analyse des S-conjugués à la cystéine dérivatisés 31
III.3.2.6.1. CPG-IE-SM 31
III.3.2.7. CPG-IT-SM/SM 32
III.3.2.8. Etalonnage 33

III.4. Analyse des thiols volatils 34

III.4.1. Synthèse de thiols naturels et deutérés 34
III.4.2. Analyse des thiols variétaux dans les vins expérimentaux de Petit Manseng et de Gros Manseng 34

III.4.2.1. Extraction liquide/liquide des thiols 34
III.4.2.2. Purification des thiols sur résine Affi-Gel 501 34
III.4.2.3. Analyse CPG-IT-SM/SM 35
III.4.2.4. Préparation et titration des solutions de thiols en CPG-AED 36
III.4.2.5. Etalonnage 37

III.5. Analyse du sulfure diméthyle (DMS) 38
III.5.1. Préparation des moûts 38
III.5.2. Analyse du sulfure de diméthyle libre (DMS) et potentiel (PDMS) 38
III.5.2.1. Dosage du sulfure de diméthyle libre (DMS) 38
III.5.2.2. Dosage du potentiel en sulfure de diméthyle (PDMS) 38
III.5.3. Conditions d'analyse du DMS 39
III.5.3.1. Micro-extraction par phase solide (SPME) 39
III.5.3.2. Analyse CPG-IE-SM du sulfure de diméthyle 39
III.5.4. Etalonnage 40

III.6. Etude et analyse du sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone) 42
III.6.1. Etude de la stabilité du sotolon 1 en conditions acido-basiques 42
III.6.1.1. Dégradation du sotolon 1 en milieu basique 42
III.6.1.2. Dégradation du sotolon 1 dans une solution de carbonate de sodium 42
III.6.1.3. Identification de l'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoique 11 42
III.6.1.4. Cyclisation de l'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoique 11 en sotolon 1 43
III.6.1.5. Etude de la stabilité isotopique du sotolon deutéré 1D 43
III.6.1.6. Analyse CPG-IE-SM 43
III.6.1.6.1. Analyse CPG-IE-SM des produits de dégradation 43
III.6.1.6.2. Semi-quantification des produits de dégradation 44
III.6.2. Analyse du sotolon dans le vin 44
III.6.2.1. Vins analysés 44
III.6.2.2. Extraction 44
III.6.2.3. Courbes de calibration 45
III.6.2.4. Analyse CPG-IE-SM du sotolon dans les extraits de vin 45

IV. ETUDE ET DEVELOPPEMENT DE METHODES 46

IV.1. Développement d'une méthode d'analyse directe par dilution isotopique de S-conjugués à la cystéine du raisin 47
IV.1.1. Introduction bibliographique 48
IV.1.2. Résultats et discussions 53
IV.1.2.1. Synthèse des précurseurs cystéinylés 53

IV.1.2.1.1. Addition de thiols sur la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1 53
a. Synthèse du (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine 8a 55
b. Synthèse du (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-cystéine 9b (P4MMP) 57
IV.1.2.1.2. Synthèse de S-conjugués à la cystéine par addition 1,4 de Michael 59
IV.1.2.2. Etude de la dérivatisation des précurseurs cystéinylés 61
IV.1.2.2.1. Triméthylsilylation 61
a. Dérivatisation du P3MH 61
b. Dérivatisation du P4MMP 63
IV.1.2.2.2. Dérivatisation à l'éthyl chloroformate (ECF) 65
a. Dérivatisation à l'éthylchloroformate (Kubec *et al.*, 1999) 65
b. Modification des conditions de dérivatisation à l'éthylchloroformate 71
IV.1.2.3. Extraction et purification des S-conjugués à la cystéine 76
IV.1.2.3.1. Extraction des précurseurs cystéinylés d'un moût sur résine Dowex 50wX4-100 (H^+) 76
IV.1.2.3.2. Analyse du P3MH 78
IV.1.2.3.3. Extraction du P4MMP et analyse en CPG-IT-SM/SM 79
a. Modification des conditions d'extraction sur résine Dowex et purification sur résine C_{18}. 79
b. Analyse CPG-IT-SM/SM 80
IV.1.2.3.4. Purification des extraits dérivatisés 81
IV.1.3. Conclusion 82

IV.2. Etude chimique du sotolon 84
IV.2.1. Introduction bibliographique 85
IV.2.1.1. Contribution à l'arôme de certains produits alimentaires 85
IV.2.1.2. Origine du sotolon 85
IV.2.1.3. Le sotolon dans le vin 86
IV.2.2. Analyse du sotolon 86
IV.2.3. Résultats et discussions 88
IV.2.3.1. Etude de la stabilité du sotolon en milieux acido-basique 88
IV.2.3.1.1. Dégradation en milieu basique 88
IV.2.3.1.2. Dégradation du sotolon 1 à 50°C 88
IV.2.3.1.3. Dégradation du sotolon 1 à 80°C 89
IV.2.3.2. Stabilité isotopique du sotolon 1D 94
IV.2.3.3. Extraction du sotolon 94
IV.2.3.4. Analyse du sotolon dans les vins en CPG-IE-SM 95
IV.2.4. Conclusion 96

V. ETUDE DU POTENTIEL AROMATIQUE DU PETIT ET DU GROS MANSENG 97

V.1. Dispositif expérimental 98

V.1.1. Le réseau de parcelles 99

V.1.2. Caractéristiques physico-chimiques des moûts 100

V.2. Etude des fractions glycosylée et libre de l'arôme des baies de Petit et de Gros Manseng 105

V.2.1. Introduction bibliographique 106

V.2.1.1. Structure des précurseurs glycosidiques 106

V.2.1.2. Localisation et biosynthèse des précurseurs glycosidiques 106

V.2.1.3. Hydrolyse et formation de composés odorants 107

V.2.1.4. Analyse 107

V.2.2. Résultats et discussions 109

V.2.2.1. Fraction libre 109

V.2.2.2. Composition de la fraction glycosylée 109

V.2.2.3. Influence de certains paramètres agronomiques et climatiques sur les teneurs en précurseurs glycosidiques 114

V.2.2.3.1. Etude du Petit Manseng 114

V.2.2.3.2. Etude du Gros Manseng 118

V.2.2.4. Influence de la taille des baies et du rendement en jus sur les teneurs totales en glycosides 122

V.2.2.5. Etude préliminaire de l'influence des précurseurs glycosidiques sur l'arôme des vins de Petit et Gros Manseng 123

V.2.3. Conclusion 125

V.3. Précurseurs cystéinylés et thiols volatils 126

V.3.1. Introduction bibliographique 127

V.3.1.1. Contribution des thiols volatils à l'arôme de produits alimentaires 127

V.3.1.2. Formation à partir des S-conjugués à la cystéine du raisin 128

V.3.1.2.1. Structure et localisation des précurseurs de thiols 128

V.3.1.2.2. Rôle de levure 128

V.3.1.3. Formation du 3MH à partir de l' (*E*)-2-hexénal 129

V.3.1.4. Le Petit et le Gros Manseng 129

V.3.2. Résultats et discussions 130

V.3.2.1. Méthodes 130

V.3.2.1.1. Analyse des précurseurs 130

V.3.2.1.2. Analyse des thiols 131

V.3.2.2. Analyse des vins et des raisins du dispositif expérimental 131
V.3.2.2.1. Variation du P3MH dans les raisins expérimentaux 133
V.3.2.2.2. Variations des teneurs en 3MH et en ac3MH dans les vins expérimentaux 136
V.3.2.2.3. Relation entre les teneurs en P3MH des raisins et les teneurs en thiols dans les vins 139
V.3.3. Conclusion 142

V.4. Etude du sulfure de diméthyle 144
V.4.1. Introduction bibliographique 145
V.4.1.1. Origine du DMS dans la bière 145
V.4.1.2. Origine du DMS dans le vin 145
V.4.2. Résultats et discussion 147
V.4.2.1. Méthodes d'analyse du DMS libre et du PDMS 147
V.4.2.2. Dosage du sulfure de diméthyle libre (DMS) et potentiel (PDMS) dans des vins commerciaux de Petit et de Gros Manseng 148
V.4.2.3. Analyse des vins et des jus de raisin du dispositif expérimental 152
V.4.2.3.1. Analyse des jus de raisin 152
V.4.2.3.2. Transmission du potentiel du jus au vin 160
V.4.3. Conclusion 166

V.5. Conclusion sur le potentiel aromatique du Petit et du Gros Manseng 168

VI. CONCLUSION GENERALE 172
Références bibliographiques 177
Annexes 197
Liste des figures 214
Liste des tableaux 220
Liste des abréviations 223

I. Introduction

La Gascogne est plus associée à une langue et une culture qu'à un territoire, tant l'étendue de cette région a évolué au cours des siècles au gré des invasions. Comme en témoigne la mosaïque de Séviac, la vigne est présente en Terre Gasconne depuis l'époque romaine. Au XVIIème siècle, alors que le commerce du vin est déjà développé, les vins de Bordeaux sont prioritaires à l'exportation, et c'est grâce à la distillation qu'une partie de la production Gasconne est exportée vers les pays du nord. Ainsi, le vignoble fut tout d'abord reconnu pour ses eaux de vie et au fil des siècles l'Armagnac a gagné ses lettres de noblesse.

Mais dès la fin des années 1970, la consommation des eaux de vies diminuant, la profession a dû diversifier sa production. Ainsi, près de 25 ans après le début de la reconversion, les deux tiers du vignoble Armagnacais, soit environ 13 000 ha, sont actuellement consacrés à la production de Vin de Pays de zone. Depuis le décret Fallières de 1909, la zone Armagnac a été divisée en trois territoires de géologies distinctes, le Bas-Armagnac, la Ténarèze et le Haut-Armagnac, englobant une partie des départements du Gers, du Lot et Garonne et des Landes. Définie depuis 1982, l'appellation Côtes de Gascogne, avec ses 900 000 hL agréés en 2005, représente la plus grande production française de vins blancs, exportée à 80 %, notamment vers une clientèle d'Europe du Nord toujours fidèle.

Parmi les cépages de l'appellation Côtes de Gascogne, on compte le Tannat, un cépage local qui peut être associé à d'autres cépages (Merlot, Cabernet Sauvignon et Cabernet franc) pour une production de vins rouges qui reste cependant limitée. Le Petit Manseng et le Gros Manseng font partie, avec le Colombard et l'Ugni blanc, des principaux cépages des Côtes de Gascogne blancs. Ces deux cépages d'origine béarnaise sont utilisés dans plusieurs appellations du Sud-Ouest, et sont reconnus pour la qualité aromatique de leurs vins. Traditionnellement, les vins secs sont élaborés à partir du Gros Manseng. Ces vins vifs et expressifs développent des notes d'agrumes et de fruits exotiques. L'aptitude du Petit Manseng au passerillage explique qu'il est le plus souvent utilisé pour l'élaboration de vins moelleux. L'arôme de ces vins de garde apparaît plus complexe au travers de notes de fruits secs, de fruits confits, de miel et de truffe.

Toutefois, peu de travaux ont été menés jusqu'à présent sur ces deux cépages, et la connaissance sur leur potentiel aromatique est très limitée. Ainsi, conscient de la qualité de ces cépages et soucieux d'améliorer la qualité de leur vins, le Syndicat des vins de Pays des Côtes de Gascogne, a initié en 2002, en partenariat avec ITV France et l'UMR Sciences pour l'Oenologie de l'INRA de Montpellier, une étude sur le potentiel aromatique du Petit et du Gros Manseng.

La maîtrise de la qualité et de la typicité aromatique du vin implique la connaissance des précurseurs d'arôme du raisin qui en sont en grande partie le support, ainsi que l'évaluation de l'influence de certains paramètres viticoles et œnologiques sur ces précurseurs d'arôme. Cela permettrait d'adapter la matière première à l'élaboration des différents types de vins par un choix rationnel d'itinéraires techniques viticoles et œnologiques appropriés. Dans ce but, nous avons orienté nos travaux sur ces deux cépages, vers les précurseurs d'arômes actuellement connus, dont l'importance pour l'arôme de vins issus d'autres cépages a été largement démontrée :

- les précurseurs glycosidiques (Francis *et al.*, 1992; Francis *et al.*, 1996; Schneider, 2001; Ségurel, 2005).
- les précurseurs cystéinylés (Tominaga *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 1998b).
- le potentiel en sulfure de diméthyle (PDMS ; Ségurel, 2005).

Par ailleurs, excepté pour les glycosides à l'origine d'un nombre très important de composés volatils, les marqueurs d'arômes spécifiques de ces précurseurs, 3 thiols variétaux et le sulfure de diméthyle, ainsi qu'un arôme de vieillissement, le sotolon, ont été étudiés dans différents vins. Notre travail s'articule ainsi autour de 2 axes principaux de recherche:

- le développement de méthodologies d'analyse fines de composés d'arôme : ce travail regroupe le développement de voies de synthèse et de méthodes d'analyse directe en dilution isotopique de S-conjugués à la cystéine et du sotolon.
- l'analyse de composés d'arôme d'intérêt dans les raisins (précurseurs glycosidiques, précurseurs cystéinylés et PDMS) et les vins (3MH, ac3MH, PDMS/DMS et sotolon) de Petit et Gros Manseng, issus d'un dispositif expérimental suivi pendant trois ans.
-

Mosaïque de Séviac
Montréal du Gers

II. Aperçu bibliographique

II.1. L'arôme du vin

II.1.1. Généralités

L'arôme du vin résulte d'un mélange complexe de composés volatils en interaction avec la matrice constituée de composés de natures chimiques diverses, tels les polyphénols, les protéines, l'alcool éthylique, les acides organiques et les polysaccharides.

Près de 900 composés volatils ont été identifiés dans le vin à ce jour, mais seuls 10 % environ seraient susceptibles de contribuer à l'arôme. Chaque composé odorant est caractérisé dans un milieu donné par un seuil de perception olfactive, défini par la teneur à partir de laquelle 50 % d'un jury distingue un milieu témoin du même milieu enrichi avec ce composé. La contribution d'un composé odorant à un milieu donné est généralement évaluée par le nombre d'unité d'odeurs, défini par le rapport de sa concentration et de son seuil de perception dans ce milieu. Cependant ce calcul ne tient pas compte de la Loi de Stevens, reliant l'intensité d'une odeur d'un composé avec sa concentration, qui n'est pas linéaire et qui varie d'un composé à l'autre.

L'avènement d'outils d'analyses chromatographiques et d'analyses structurales, tels que la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la spectrométrie de masse (SM), a contribué à l'approfondissement des connaissances sur la composante de l'arôme et son origine. Les composés d'arôme ainsi formés sont généralement classés selon leur origine de formation, bien que certains en aient plusieurs. On distingue ainsi 4 catégories de composés :

- **L'arôme variétal** : il se construit tout au long du procédé de vinification et du vieillissement du vin, à partir d'un ensemble de composés non odorants : les précurseurs d'arômes, dont la biogenèse dans le raisin est influencée par le cépage, le sol, le climat et les pratiques culturales. Seuls les raisins de quelques cépages dits aromatiques comportent des composés odorants appartenant à l'arôme variétal.
- **L'arôme préfermentaire** : c'est l'ensemble de composés formés entre la récolte et la fermentation alcoolique, au cours des traitements de la vendange. Ils résultent de l'activité enzymatique du raisin.
- **L'arôme fermentaire** : la levure et les bactéries, via des voies métaboliques secondaires, produisent divers composés d'arôme.

- **L'arôme de vieillissement :** la conservation du vin est le siège de profondes transformations du vin et de son arôme. Les phénomènes physico-chimiques voire biologiques impliqués, sont dépendants des conditions de conservation (durée, température, pH, 0_2, bois…).

II.1.2. Origine des composés d'arôme dans le vin

Hormis quelques variétés aromatiques de raisins (les variétés de Muscat, le Gewürztraminer, le Cabernet Sauvignon et les cépages apparentés) contenant des composés odorants, l'essentiel de l'arôme variétal du vin provient de composés odorants révélés au cours du procédé de vinification à partir de divers précurseurs inodores constituant le potentiel aromatique. Parmi les précurseurs les plus intéressants et les plus étudiés, on distingue les précurseurs glycosidiques, les précurseurs cystéinylés et plus récemment les précurseurs du DMS.

Ces composés, de natures chimiques diverses, ont des origines biosynthétiques et des rôles dans la plante encore mal connus, mais certainement très différents. La formation de composés odorants à partir de ces précurseurs implique des mécanismes chimiques particuliers, et intervient à des étapes définies du procédé de vinification. Au cours de la fermentation, les thiols variétaux sont formés par la levure à partir des précurseurs cystéinylés. En revanche c'est au cours de la conservation du vin, selon des mécanismes chimiques, que les précurseurs glycosidiques génèrent un grand nombre de composés odorants contribuant à la complexité de l'arôme et que le sulfure de diméthyle (DMS) est libéré à partir de ses précurseurs.

L'étude bibliographique de ces précurseurs et des composés odorants correspondants, est abordée plus précisément en introduction de leur étude dans les raisins de Petit et de Gros Manseng (cf. les précurseurs glycosidiques chapitre V.2 p105, les précurseurs cystéinylés chapitre V.3 p 126 et le potentiel en DMS chapitre V.4 p144).

II.1.3. Les composés d'arômes

Ce chapitre présente quelques familles de composés d'arôme formés au cours des étapes de la vinification.

II.1.3.1. Les composés en C_6

Dès le début des opérations préfermentaires, lors du pressurage des baies à l'air, l'oxydation des lipides, faisant intervenir une succession d'enzymes du raisin, conduit à la formation de composés en C_6 (Cordonnier et Bayonove, 1981; Crouzet et Seck, 1982). Les principaux composés, le (*E)*-2-hexénal, l'hexanal et les alcools correspondants sont également présents dans la baie sous forme glycosylée, mais à des teneurs très inférieures (Cordonnier et Bayonove, 1981). Les aldéhydes dont les seuils de perception sont bas (Etiévant, 1991), sont réduits durant la fermentation alcoolique principalement en hexanol, beaucoup moins odorant, ce qui limite leurs odeurs herbacées peu recherchées.

II.1.3.2. C_{13}-norisoprénoïdes

Dans le raisin, la plupart des C_{13}-norisoprénoïdes sont di- ou tri-oxygénés et sont présents sous forme de précurseurs glycosidiques (Chapitre V.2.1). Ainsi, la majeure partie des C_{13}-norisoprénoïdes contenus dans le vin provient de l'hydrolyse chimique de ces glycosides. Aucune de leurs aglycones n'est odorante, mais d'après des travaux réalisés en milieux modèles (Skouroumounis *et al.*, 1992; Sefton *et al.*, 1993; Winterhalter, 1993; Versini *et al.*, 1996), certains sont susceptibles de subir des modifications chimiques au pH du vin pour conduire à des C_{13}-norisoprénoïdes odorants, contribuant à l'arôme du vin. Parmi les nombreux composés, on distingue ainsi la β-damascénone à l'odeur complexe de fruit exotique, le 1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphtalène (TDN), caractéristique de l'odeur de kérosène des vieux Riesling, les isomères du vitispirane évoquant le camphre et l'eucalyptus et la (*E*)-1-(2,3,6-triméthylphényl)buta-1,3-diène à l'odeur d'herbe coupée (Simpson, 1978, 1979; Simpson et Miller, 1983; Strauss *et al.*, 1986).

De nombreux travaux sont en faveur d'une filiation entre C_{13}-norisoprénoïdes et caroténoïdes, pigments photosynthétiques accessoires de la baie de raisin (Razungles *et al.*, 1993; Baumes *et al.*, 1994; Baumes *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2005). Les C_{13}-norisoprénoïdes se formeraient par dégradation photochimique ou oxydation enzymatique de pigments photosynthétiques (Enzell, 1981, 1985; Winterhalter, 1992).

II.1.3.3. Les monoterpènes

Les composés de nature terpénique sont largement représentés dans le règne végétal. Néanmoins, seuls les monoterpénes et les sesquiterpènes (10 et 15 atomes de carbone) sont susceptibles d'être odorants. Dans le vin et le raisin, on trouve une majorité de monoterpènes.

Ils se présentent essentiellement sous forme d'alcools parmi lesquels les monoterpénols (comportant une seul fonction alcool) sont les plus odorants (linalol, nérol, géraniol, citronellol, α-terpinéol). Ils apportent des notes florales caractéristiques des cépages muscatés. Ils existent aussi sous des formes de degrés d'oxydation plus élevés, dont les seuils de détection olfactive sont généralement supérieurs à leurs teneurs dans les raisins (Strauss *et al.*, 1986).

Néanmoins, les polyols monoterpéniques (diols et triols), qui peuvent atteindre 1 mg/L, conduisent au pH acide du vin, à d'autres monoterpénols odorants (Williams *et al.*, 1980). Hormis les cépages aromatiques où ils sont majoritairement sous forme libre, les monoterpénols sont libérés au cours de la conservation à partir des glycosides de la baie. Les aglycones subissent les mêmes transformations chimiques que les composés libres (Usseglio-Tomasset et Di Stefano, 1980). Ainsi, les composés odorants tels : le Ho-triénol, le *cis*-rose oxyde, la wine-lactone et le 1,8-cinéole, proviennent de l'hydrolyse acide de diols (Strauss *et al.*, 1986; Güth, 1997a).

II.1.3.4. Les phénols volatils

Les phénols volatils ont deux origines. La première est la décarboxylation par la levure des acides phénols *p*-coumarique et férulique (Steinke et Paulson, 1964; Bayonove *et al.*, 1990), qui sont principalement présents sous forme d'esters de l'acide tartrique dans le raisin. Elle conduit à la formation de 4-vinylphénol et de 4-vinylgaïacol. La contamination des vins par des levures *Brettanomyces* et *Dekkera* (Heresztyn, 1986; Chatonnet, 1995) génère par réduction du groupe vinyle, des teneurs élevées en 4-éthylphénol et 4-éthylgaïacol à l'origine de défauts.

La deuxième origine est l'hydrolyse des formes glycosylées de phénols volatils appartenant aux séries du phénol, du gaïacol et du syringol. On distingue alors, les composés à noyau gaïacyle (vanilline et ses dérivés), ceux à noyaux syringyle (syringaldéhyde et ses dérivés) et les méthylphénols (Sefton, 1998; Bureau *et al.*, 2000; Wirth *et al.*, 2001). Cette voie intervient essentiellement au cours de la conservation du vin et libère de faibles quantités

de phénols volatils. Par ailleurs, le bois peut également céder au vin des phénols volatils (Chatonnet *et al.*, 1990).

Ils présentent des odeurs variées et agréables, perceptibles après quelques mois de vieillissement (Etiévant *et al.*, 1989). La modification de la composition, par ailleurs très variable d'un vin à l'autre, peut changer le caractère d'un vin (Etiévant, 1981).

II.1.3.5. Les alcools supérieurs

La production des alcools supérieurs dépend du métabolisme azoté et implique des voies de régulation complexes. Leur biogenèse suit 2 voies : la voie d'Ehrlich correspondant au catabolisme des acides aminés et la voie anabolique des acides aminés à partir des sucres (Ayrapaa, 1971; Nykänen, 1986). Excepté l'odeur de rose du 2-phényléthanol, leurs odeurs de fusel sont peu favorables à l'arôme, mais ils sont le plus souvent au-dessous de leurs seuils de perception olfactive. Le 2-phényléthanol, les alcools isoamyliques et l'alcool benzylique sont présents sous forme libre et glycosylée dans la baie de raisin, mais à de faibles concentrations.

II.1.3.6. Esters et acides gras à nombre pair d'atomes de carbone

La biogenèse des acides gras et de leurs esters dépend du métabolisme de la levure et implique l'acyl-S-CoA (Dubois, 1994). La levure génère dans le milieu des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone (10 atomes maximum ; (Torrès-Alegre, 1982), et leurs esters éthyliques, ainsi que des acétates d'alcools supérieurs. Ces esters ainsi que les esters ramifiés sont pour la plupart particulièrement importants pour l'arôme des vins jeunes auxquels ils contribuent par des notes fruitées et florales (Etiévant, 1991; Güth, 1997a, b; Kotseridis, 1999). Mais leur contribution est plus complexe car elle dépend du type de vin (Ferreira *et al.*, 1995) et implique des effets de synergie (Piggott et Findlay, 1984).

Par ailleurs, comme dans le cas des alcools supérieurs (Chapitre II.1.3.5), leur formation est fortement dépendante des conditions de fermentation. Leurs concentrations diminuent au cours du vieillissement du fait des équilibres chimiques (Bertrand *et al.*, 1995). Toutefois les esters éthyliques ramifiés, dont l'intérêt a été récemment démontré (Anderson *et al.*, 1975; Ferreira *et al.*, 1998; Kotseridis, 1999), ont des teneurs qui augmentent au cours de la conservation (Consuelo Diaz-Maroto *et al.*, 2005).

II.1.3.7. Les composés soufrés

Les composés soufrés dans le vin sont essentiellement des thiols et disulfures, des sulfures et thioesters. Leur contribution est étroitement liée à leur poids moléculaire et à leur volatilité. On distingue ainsi les composés soufrés "légers", connus pour leurs odeurs nauséabondes (Etiévant, 1991; Lavigne *et al.*, 1993; Dubois, 1994; Park *et al.*, 1994), et les composés soufrés "lourds" dont la contribution à l'arôme des vins apparaît plus complexe (Chatonnet *et al.*, 1992; Dubois, 1994; Anocibar Beloqui et Bertrand, 1995).

En dépit de leur mauvaise réputation, certains thiols contribuent à l'arôme de fruits tels le cassis (Latrasse *et al.*, 1982), le pamplemousse (Demole, 1982), le fruit de la passion (Engel et Tressl, 1991) et la goyave (Du Plessis et Augustin, 1981). Plus récemment, les travaux menés sur les vins de Sauvignon (Darriet, 1993; Darriet *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 1996; Tominaga *et al.*, 1998a) ont permis d'identifier plusieurs thiols, la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MMP) et l'alcool correspondant (4MMPOH), le 3-sulfanylhexan-1-ol (3MH) et son acétate (ac3MH). Bien qu'à très fortes concentrations ces composés développent des odeurs désagréables comme la plupart des composés soufrés, aux concentrations du vin, ils contribuent qualitativement à l'arôme. Un chapitre leur est consacré (Chapitre V.3.1 p127), comme au DMS qui occupe une place à part parmi les composés soufrés légers et dont l'origine et l'intérêt pour l'arôme du vin sont développés au chapitre V.4.1 (cf. p 145).

En fin de fermentation, le vin présente divers composés soufrés, tels l'hydrogène sulfuré, le dioxyde de soufre, le sulfure de carbonyle, le disulfure de carbone ainsi que les méthyles et éthylthiols, et les disulfures et thioéthers correspondants. Leurs concentrations ne dépassent généralement pas leurs seuils de perception olfactive, excepté dans des conditions particulières de fermentation (Chatonnet *et al.*, 1992; Lavigne *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1994; Rauhut et Kürbel, 1996). En effet, du fait de leur volatilité, ces composés soufrés légers sont entraînés en grande partie par les dégagements de CO_2 produits lors de la fermentation.

La biosynthèse de ces composés est étroitement liée au métabolisme du soufre et de l'azote. L'hydrogène sulfuré indispensable à la levure, est produit à partir de sources inorganiques (sulfates, sulfites, SO_2) par la séquence de réduction des sulfates (SRS). Les composés soufrés fermentaires supérieurs se forment à partir d'acides aminés soufrés (Schreier *et al.*, 1976; Rapp *et al.*, 1985a; Anocibar Beloqui et Bertrand, 1995). Ce sont principalement le 2-sulfanyléthanol, le 2-méthylthioéthanol, le 3-méthylthiopropanol et leurs dérivés (thioéthers, acides, aldéhydes et disulfures) ainsi que des hétérocycles.

D'autres composés soufrés possédant des seuils de perception également très bas ont été identifiés dans des vieux vins de Champagne : le benzylthiol, le 2-furaneméthanethiol et le 3-mercaptopropionate (Chatonnet *et al.*, 1990; Tominaga *et al.*, 2003b; Wilkinson *et al.*, 2004). Ils contribuent à l'arôme par des notes empyreumatiques. Le 2-furaneméthanethiol, à l'odeur de café torréfié et le benzylthiol, à l'odeur de fumée, sont également présents dans des vins de divers cépages (Tominaga, 2000; Tominaga *et al.*, 2003a). L'origine de ce dernier n'a pas été établie mais il pourrait se former par addition d'H_2S sur le benzaldéhyde selon le même mécanisme de formation du furfurylthiol à partir du furfural (Tominaga, 2000; Blanchard *et al.*, 2001; Tominaga *et al.*, 2003a).

II.1.3.8. Hétérocycles azotés et oxygénés

II.1.3.8.1. Les pyrazines

Trois pyrazines sont principalement décrites : la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine, la 2-méthoxy-3-s-butylpyrazine et la 2-méthoxy-3-isopropylpyrazine. Leurs seuils de perception olfactive varient d'un vin à l'autre mais restent très bas, de l'ordre du ng/L. Elles évoquent dans les vins des notes odorantes végétales et de poivron vert peu recherchées (Lacey *et al.*, 1991). Dans la baie, les teneurs diminuent rapidement après véraison et sont aussi influencées par les conditions climatiques.

II.1.3.8.2. Les dérivés furaniques

Les lactones résultent d'estérification intramoléculaire d'hydroxy-acides et apparaissent au stade fermentaire. Les plus abondantes sont les γ-lactones, mais excepté le sotolon dont l'origine peut être diverse (cf. chapitre IV.2), et la γ-nonalactone, leur influence sur l'arôme est faible (Etiévant, 1991).

Le furanéol à l'odeur de caramel, a été identifié dans des vins de *Vitis labrusca* (Rapp *et al.*, 1985b). Caractéristique des vins hybrides (Rapp *et al.*, 1985b), comme son isomère l'homofuranéol, il a été mis en évidence dans différents vins de *Vitis vinifera* (Güth, 1997b; Cutzach *et al.*, 1998b; Kotseridis et Baumes, 2000; Schneider, 2001). Un précurseur glycosidique du furanéol existe dans la fraise (Mayerl *et al.*, 1989) et selon plusieurs travaux, il pourrait aussi être présent dans le raisin (Guesdes de Pinho et Bertrand, 1995; Kotseridis, 1999). Le furanéol a par ailleurs été identifié parmi les aglycones d'un extrait glycosidique de baies de Syrah (Ségurel, 2005).

L'élevage en fût permet l'enrichissement du vin en β-méthyl-γ-octalactone (oak lactone), qui contribue à l'arôme des vins, par des odeurs de noix de coco (Chatonnet *et al.*, 1990; Wilkinson *et al.*, 2004).

II.1.4. Analyse de l'arôme du vin

La compréhension de l'arôme et de son origine implique un consensus entre différentes approches. Les méthodes résolutives telles que la chromatographie en phase gazeuse (CPG) permettent d'étudier individuellement les composés volatils d'un milieu complexe. Mais, ceci implique une étape d'extraction qui pose le problème de la représentativité de l'extrait.

Le couplage CPG-olfactométrie (CPG-O) permet de déterminer les caractéristiques odorantes des composés et d'évaluer leur contribution potentielle, mais ne tient pas compte des effets de matrice et de synergie. Ainsi, l'analyse sensorielle, au travers de différentes méthodes, comparatives ou descriptives, s'avère un outil de choix pour apprécier les qualités organoleptiques des vins et notamment d'étudier la perception globale de l'arôme. Bien que de plus en plus utilisée, elle reste une technique lourde à mettre en œuvre et ne renseigne pas sur l'origine de l'arôme.

Par ailleurs, l'analyse chimique apparaît comme un complément indispensable aux techniques présentées ci-dessus. En effet, elle permet d'identifier les composés d'arôme et de déterminer précisément leur concentration dans les vins, permettant ainsi d'évaluer leur contribution par le rapport de la concentration au seuil de perception olfactive. De plus, elle apparaît incontournable pour l'étude de la biogenèse de l'arôme, dont la compréhension des phénomènes est nécessaire pour maîtriser l'arôme du vin.

II.1.4.1. L'analyse chimique

Le choix des techniques d'extraction, de purification et d'analyse dépend, d'une part de paramètres directement associés aux composés à analyser : leurs propriétés physico-chimiques (polarité, fonctions chimiques, stabilité et réactivité), leurs concentrations et la nature de la matrice, et d'autre part des avantages et des inconvénients des méthodes envisageables.

Compte-tenu de la diversité des composés constituant l'arôme de produits agro-alimentaires et la complexité des matrices, l'analyse des composés d'arôme, très souvent présents à l'état de traces, nécessite une étape préalable d'extraction permettant simultanément, la récupération sélective et la concentration des composés recherchés.

Différentes techniques sont utilisées et parfois combinées pour l'extraction des composés d'arôme du vin :

- La distillation
- L'extraction par solvant, liquide ou supercritique, continue ou non
- L'extraction sur support solide (SPE, SPME, stir-bar)
- L'extraction en espace de tête, statique ou dynamique
- La démixtion

Les composés de l'extrait obtenu sont séparés par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le choix des conditions analytiques (type de colonne, programmation de température, détection) est à raisonner en fonction des propriétés physico-chimiques du ou des analytes. L'analyse CPG, adaptée à l'analyse de composés volatils, peut aussi être appliquée à l'analyse de composés plus lourds ou instables dans les conditions analytiques après leur dérivatisation (triméthylsilylation, méthylation, trifluoroacétylation, acétylation, dérivatisation par les alkylchloroformates).

Différentes techniques de détection permettent l'analyse des composés après leur séparation en CPG :

- Les détecteurs universels [détecteur à ionisation de flamme (FID) ; spectrométrie de masse en ionisation par impact électronique (SM-IE) en balayage total].
- Les détecteurs spécifiques [photométrie de flamme ; NPD ; détection d'émission atomique (DEA), SM-IE en mode de détection sélective d'ion (SIM)].
- Les détecteurs permettant une reconnaissance structurale [spectrométrie de masse, infra-rouge à transformée de Fourrier (IRTF)].
- L'olfactométrie, utilisée selon des procédures permettant d'estimer l'intensité odorante relative des composés: AEDA (Acree *et al.*, 1984), CHARM (Ullrich et Grosch, 1987), OSME (Mc Daniel *et al.*, 1996), Finger-span (Etievant *et al.*, 1999), fréquence de citation (Pollien *et al.*, 1997).

Parmi les techniques et méthodes présentées, certaines présentent des intérêts conduisant à leur large utilisation.

La spectrométrie de masse

Les informations structurales apportées par la spectrométrie de masse en font le détecteur le plus utilisé pour l'analyse des composés d'arôme. De plus, l'existence de divers modes d'ionisation (ionisation en impact électronique, ionisation chimique positive et négative) et d'analyse (SM, SM/SM, SIM, balayage total) offrent plusieurs possibilités de modes de détection, adaptables selon les problématiques. La détection sélective d'isotopomères permet de travailler en analyse par dilution isotopique.

L'analyse par dilution isotopique (SIDA)

L'analyse par dilution isotopique est une méthode de dosage dont l'étalon interne est un analogue de l'analyte, marqué par isotopes stables (^{2}H, ^{13}C, ^{15}N). Leurs propriétés physico-chimiques sont quasi identiques et leur comportement est analogue, permettant ainsi de s'affranchir des biais inhérents à l'analyse (extraction, dégradation, injection…). L'analyte et l'étalon marqué se différencient par leur masse, et leur séparation en CPG n'est possible que pour des différences de masse suffisamment importantes. Dans ce cas, tous les types de détecteurs peuvent être utilisés. Pour des faibles différences de masse, ils ne sont pas séparés en CPG et la détection nécessite l'utilisation d'un spectromètre de masse. Par ailleurs, l'étalon marqué est aisément identifiable parmi les produits naturels et facilite l'identification de l'analyte. La dilution isotopique est une méthode performante en terme de répétabilité et de justesse du dosage quelles que soient les méthodes d'extraction employées, cependant la limite de cette méthode est qu'elle ne peut tenir compte de la formation éventuelle de l'analyte au cours de l'analyse.

Malgré la contrainte de devoir disposer d'un étalon isotopiquement stable pour chaque composé à doser, et le plus souvent de devoir les synthétiser, de nombreuses applications de la dilution isotopique ont été développées en œnologie (Allen *et al.*, 1994; Pollnitz *et al.*, 1996; Aubry *et al.*, 1997; Kotseridis *et al.*, 1998; Kotseridis *et al.*, 1999a; Kotseridis *et al.*, 1999b; Kotseridis *et al.*, 2000; Belancic Majcenovic *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2003; Pollnitz *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2005; Siebert *et al.*, 2005; Dagan *et al.*, 2006). Cette technique permet d'améliorer la précision et la justesse de la quantification des composés odorants, leurs teneurs dans un milieu donné étant nécessaires pour la détermination de leur contribution à l'arôme (Grosch, 2001).

La SPME

La technique de la SPME est une méthode récente (Arthur et Pawliszyn, 1990), qui cumule de nombreux avantages conduisant à sa large utilisation pour l'analyse de composés d'arôme de divers produits agro-alimentaires notamment (Chin *et al.*, 1996; Golaszwewski *et al.*, 1998; Mestres *et al.*, 1999b; Scarlata et Ebeler, 1999; Pérès *et al.*, 2001). La SPME ne nécessite pas l'emploi de plus en plus réglementé de solvants organiques, et surtout simplifie grandement les étapes d'extraction et d'analyse, d'autant qu'elles sont automatisables. Cependant, pour certains composés très polaires ou à l'état de traces, la sensibilité constitue une limite. Comme toutes les techniques d'extraction, l'utilisation de l'analyse par dilution isotopique permet d'augmenter la qualité et la fiabilité de l'analyse. L'association des techniques de SPME et de SIDA permet de combiner tous leurs avantages et constitue une méthode de choix pour l'analyse des composés volatils dans des matrices complexes (Hofmann et Schieberle, 1996; Blanchard *et al.*, 2004; Charles-Bernard *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2005; Siebert *et al.*, 2005).

III. Matériels et méthodes

III.1. Raisins et vins étudiés

L'étude a été menée sur des raisins et des vins de Petit et de Gros Manseng. Les échantillons de raisins utilisés proviennent d'un réseau de parcelles mis en place pour les millésimes 2002, 2003 et 2004. Une partie des vins utilisés au cours de l'étude a été obtenue par mini-vinification des raisins issus du dispositif expérimental. L'autre partie étant constituée de vins commerciaux de Petit et Gros Manseng de différentes appellations.

III.1.1. Dispositif expérimental

Un réseau de parcelles a été mis en place dans le Gers avec l'aide du Syndicat des Vins de Pays de Côtes de Gascogne, de la station régionale ITV Midi-Pyrénées et de son antenne gersoise du Château de Mons. Le choix des parcelles a été établi afin, d'une part de couvrir une partie de la diversité pédologique de l'appellation Côtes de Gascogne et d'autre part, de disposer de parcelles de Petit et de Gros Manseng géographiquement proches et sur des types de sols similaires. Pour cela, 3 sites ont été choisis G, F et T, et chacun de ces sites regroupe une parcelle de chacun des deux cépages (Figure 1). Les caractéristiques de chacune des parcelles sont présentées dans le tableau 12 (p 100).

En 2002, le dispositif est constitué des 2 sites G et F regroupant chacun une parcelle de Petit Manseng et une parcelle de Gros Manseng. Pour les vendanges, 2 prélèvements de raisins ont été effectués entre septembre et novembre, à intervalles de quinze jours à un mois pour chacune des parcelles. En 2003 et 2004, un troisième site (T) est venu compléter le dispositif expérimental qui compte ainsi 6 parcelles. Pour ces 2 millésimes, 3 prélèvements de raisins à intervalles de quinze jours à un mois ont été réalisés pendant la période des vendanges.

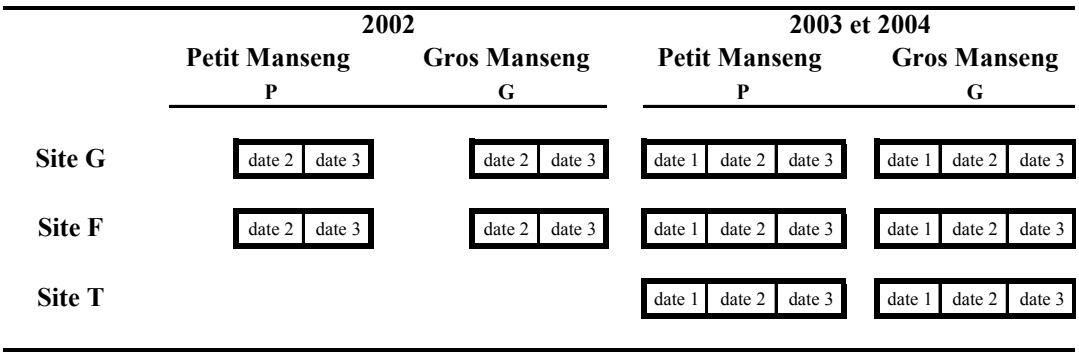


Figure 1: Dispositif expérimental du réseau de parcelles de Petit et Gros Manseng mis en place pour les millésimes 2002, 2003 et 2004.

III.1.1.1. Prélèvements

Pour chaque parcelle le prélèvement est réalisé sur 100 pieds de vigne répartis sur 4 rangées. Pour chaque échantillon (8 en 2002, 18 en 2003 et 18 en 2004), environ 40 kg de raisins sont récoltés, à partir desquels 5 kg sont prélevés au hasard, triés puis conservés à -20°C pour les analyses ultérieures sur raisins. Le reste est utilisé pour l'obtention par mini-vinification des vins correspondants.

III.1.1.2. Vinification

Les vinifications sont réalisées dans des fûts inox de 20 L et l'ensemble des échantillons du dispositif expérimental a été vinifié selon le processus suivant :

- Foulage et éraflage de la vendange
- Macération pelliculaire: 1 nuit à 4°C (en 2002 uniquement)
- Pressurage
- Sulfitage à 4 g/hL pour les 2 premières dates et 8 g/hL pour la dernière date
- Débourbage du moût pendant 7 jours à 4°C en présence d'enzymes pectolytiques à 2 g/hL
- Soutirage et ajustement de la turbidité à 150 NTU
- Levurage : levures type KD (en 2002 et 2004) et NT116 (en 2003)

Les fermentations sont suivies par prise de densité et de température quotidienne. Lorsque la concentration en sucre atteint la valeur souhaitée (concentrations comprises entre des teneurs résiduelles, jusqu'à 120 g/L selon la date de récolte), le vin est sulfité et placé à 4°C. Il est ensuite soutiré manuellement afin d'éliminer les lies grossières, puis sulfité à 5 g/hL pour les vins secs et 8 g/hL pour les vins moelleux. Les vins sont élevés sur lies pendant 4 mois en fûts inox avant d'être filtrés, mis en bouteille et conservés à 4°C.

III.1.2. Vins commerciaux

Des vins commerciaux de Petit et Gros Manseng, des millésimes 1984 à 2004, appartenant aux appellations Côtes de Gascogne et Jurançon, nous ont été gracieusement fournis par différents domaines. Ils ont servi à l'analyse du sulfure de diméthyle libre (DMS) et potentiel (PDMS), et pour les millésimes les plus anciens à l'analyse du sotolon.

III.1.3. Moût et vin modèles

Le jus de raisin modèle est obtenu en dissolvant dans 1 L d'eau Millipore :

- 220 g de glucose (Sigma, St-Quentin-Fallavier, France)
- 4 g d'acide tartrique (Fluka, St-Quentin-Fallavier, France)

Le vin modèle (solution hydroalcoolique à 12,5 % V/V) est obtenu en additionnant :

- 800 mL d'eau millipore et 120 mL d'éthanol (99,8 % ; Carlo Erba, Rodano, Italie)
- 3,5 g d'acide tartrique

Pour le moût et le vin modèle, le pH est ajusté à 3,5 par ajout de carbonate de potassium (Merck, Darmstadt, Allemagne).

III.2. Etude de la fraction glycosylée de l'arôme

III.2.1. Etude de la fraction glycosylée de l'arôme des baies de Petit et Gros Manseng

III.2.1.1. Préparation du moût

Pour chaque échantillon, 1,2 kg de raisins sont égrappés et mis à décongeler à 4°C pendant une nuit. Ils sont ensuite broyés dans un blender et le broyat obtenu est grossièrement filtré sur étamine avant d'être centrifugé à 10000 G, à 4°C, pendant 20 min. Le jus clair obtenu est filtré sur coton de verre et le volume est mesuré. Six cent millilitres de jus sont prélevés et mis sous agitation pendant 20 min en présence de 6 g de résine polyvinylpolypyrrolidinone (PVPP), préalablement hydratés (Doner *et al.*, 1993). Le PVPP est éliminée par filtrations successives sur Büchner, puis sur filtre cellulose sans cendre, puis sur membrane de nitro-cellulose 5 µm. Quatre fractions de 100 mL sont prélevées précisément pour l'extraction de la fraction glycosylée.

III.2.1.2. Extraction des précurseurs glycosidiques

Les 4 fractions de 100 mL sont percolées à l'aide d'un système de dépression (Visiprep, Supelco), sur des cartouches de 500 mg de résine C_{18} (Lichrolut RP-18, Merck), préalablement conditionnées par passages successifs de 15 mL de méthanol et 20 mL d'H_2O Millipore. Après percolation des jus (débit 1 mL/min), les cartouches sont rincées par 100 mL d'eau, puis 15 mL d'azéotrope pentane/dichlorométhane (2/1, V/V). La fraction glycosylée est éluée par 25 mL de méthanol et concentrée à sec à 40°C au rotavapor.

III.2.1.3. Hydrolyse enzymatique

La fraction glycosylée est reprise par 5 fois 1 mL de méthanol pour être transvasée puis concentrée à sec sous flux d'azote à 50°C dans des tubes à hydrolyse. Le résidu est repris par 200 µL de tampon phosphate/citrate (hydrogénophosphate de sodium 0,2 M / acide citrique 0,1 M ; pH 5), puis extrait par 5 fois 500 µL d'azéotrope pentane/dichlorométhane (2/1, V/V). 14 mg d'une préparation d'enzymes (AR2000, DSM, Delft, Pays-Bas), en solution dans 200 µL de tampon phosphate (hydrogénophosphate de sodium) sont ajoutés. Le milieu est homogénéisé avant d'être placé à 40°C pendant 15 heures.

La préparation enzymatique commerciale présente les activités glycosidasiques suivantes : β-apiosidase (546,6nkat/g), α-rhamnosidase (236,7nkat/g), α-arabinofuranosidase

(13500nkat/g), α-arabinopyranosidase (576nkat/g), β-D-galactopyranosidase (4444nkat/g), xylosidase (1760nkat/g) et β-D-glucopyranosidase (4380nkat/g).

III.2.1.4. Préparation de l'extrait

Après hydrolyse et retour à température ambiante, la fraction volatile est extraite avec 5 fois 500 µL d'azéotrope pentane/dichlorométhane (2/1, V/V). L'extrait organique est séché sur sulfate de sodium anhydre et filtré. 16,3 µg de 4-nonanol sont ajoutés pour l'étalonnage externe, puis l'extrait est concentré à 400 µL par rectification partielle à 35°C sur colonne Dufton. L'extrait est conservé à -20°C avant l'analyse en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation par impact électronique (CPG-IE-SM).

III.2.1.5. Analyse CPG-IE-SM

Les analyses sont réalisées en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation par impact électronique (CPG-IE-SM).

Descriptions générales

L'identification et la quantification des aglycones libérées à partir de la fraction glycosidique, sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890 Series II, couplé à un spectromètre de masse Hewlett Packard 5989 A, équipé d'un filtre quadripolaire. L'acquisition et le traitement des données s'effectuent à l'aide du logiciel Hewlett Packard 5989 B.05.02 MS Chemstation.

Conditions chromatographiques pour l'analyse des aglycones libérées

L'appareil est équipé d'une colonne capillaire en silice fondue (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de phase 0,5 µm) de type DB-Wax (J&W Scientific). La colonne est reliée à l'injecteur via une pré-colonne (J&W Scientific) en silice désactivée (longueur 1 m, diamètre interne 0,53 mm).

- **Gaz vecteur :** Hélium 6.0 (Linde GAZ, Marseille, France), débit 1,2 mL/min.
- **Température de l'injecteur :** programmée de 30°C à 245°C, à raison de 180°C/min, et maintenue à 245°C.
- **Température du four :** maintenue à 60°C pendant 3 min, puis programmée à 3°C/min jusqu'à 245°C et maintenue pendant 20 min à cette température.
- **Volume injecté :** 1 µL

Conditions de détection par SM

- **Mode d'ionisation :** impact électronique (IE), énergie d'ionisation 70 eV.
- **Ligne de transfert :** 250°C
- **Source :** 250°C
- **Quadripôle :** 120°C

Les spectres de masse sont enregistrés en balayage total sur une fenêtre de masse allant de m/e 29 à m/e 350. Les composés sont identifiés par leur spectre de masse et quantifiés de façon semi-quantitative à l'aide de l'étalon interne, le 4-nonanol. La concentration est déterminée sur la moyenne des 4 répétitions.

III.2.2. Vins enrichis en précurseurs glycosylés

Pour les vieillissements modèles, nous avons choisi 6 vins du millésime 2003 : 3 vins de Petit Manseng, un sec (3TP1) et 2 moelleux (3TP3, 3FP3), et 3 vins de Gros Manseng, 2 secs (3TG1, 3GG1) et un moelleux (3TG3 ; cf. codification chapitre V.1.1 p 99). Une partie du volume des vins de chaque échantillon est utilisée pour l'extraction de précurseurs glycosides, l'autre partie sert à constituer la base des vins enrichis en glycosides et les vins témoins non enrichis (Annexe 16).

III.2.2.1. Obtention des pools de précurseurs glycosylés

Pour chaque modalité, 2,3 litres de vin sont neutralisés (pH 7) à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 32%. Le titre alcoolique du vin est abaissé à 5 degrés par litre, par évaporation sous vide partiel à 45°C. Le vin est ensuite mis sous agitation pendant 20 min avec 23 g de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), puis filtré sur filtre sans cendre et sur membrane de nitrocellulose (5µm).

Le vin est alors percolé sur une colonne contenant 180 mL de résine XAD-2 (Flucka), préalablement activée par passages successifs de 760 mL de méthanol, 760 mL d'éther diéthylique et 760 mL d'eau millipore. La résine est ensuite lavée avec 4,6 L d'eau Millipore, puis avec 770 mL d'un mélange azéotropique pentane/dichlorométhane (2/1, V/V). L'élution est réalisée avec 1,53 L de méthanol. L'éluat méthanolique obtenu pour chaque échantillon est partagé en 3 fractions, qui sont concentrées à sec séparément par évaporation à 40°C au rotavapor. Les extraits secs sont lavés par 4x100 mL d'azéotrope pentane/dichlorométhane (2/1, V/V), et séchés sous flux d'azote. Les pools de précurseurs ainsi obtenus sont conservés à -20°C avant utilisation. Une fraction servira à l'analyse des précurseurs glycosidiques par hydrolyse enzymatique, les 2 autres à la constitution des vins enrichis en glycosides.

La première fraction de pool est utilisée pour l'analyse des précurseurs glycosidiques du vin. Elle est partagée en 4 fractions correspondant chacune à l'extrait de 100 mL de vin. Ces 4 fractions sont conservées à sec à -20°C, jusqu'à l'hydrolyse enzymatique. Les conditions de l'hydrolyse enzymatique et de l'analyse des aglycones libérées suivent le même protocole que celui utilisé pour l'analyse des aglycones issues des glycosides du raisin (cf. chapitres III.2.1.3 à III.2.1.5).

III.2.2.2. Préparation et traitement des vins enrichis en précurseurs glycosylés

Pour chaque modalité enrichie, la fraction de glycosides extraits sur résine XAD-2 correspondant à 1,5 L de vin, est reprise par 750 mL de ce même vin et complétée à 5 g/hL par une préparation enzymatique commerciale à activités glycosidasiques (AR2000, DSM, Delft, Pays-Bas). Pour les modalités témoins (vins non enrichis en glycosides), seule la préparation enzymatique est ajoutée. Les vins sont transvasés dans des bouteilles, préalablement inertées par du dioxyde de carbone (CO_2). Les bouteilles sont ensuite scellées par une capsule sertie et les vins sont soumis à un vieillissement modèle, pendant 3 semaines à 45°C, puis conservés à 4°C avant l'analyse sensorielle.

III.2.2.3. Analyse sensorielle des vins enrichis en précurseurs glycosylés

Les tests triangulaires ont été réalisés sur 2 séances. Les échantillons, présentés de manière aléatoire dans des verres noirs, ont été soumis à l'appréciation du jury par olfaction directe. Le jury était composé de 25 volontaires non entraînés.

III.3. S-conjugués à la cystéine

III.3.1. Synthèses chimiques

III.3.1.1. Addition de thiols sur la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1 (Boc-lactone)

III.3.1.1.1. Synthèse de la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1 (Boc-lactone)

Le protocole utilisé est celui décrit par Arnold *et al.* (1985), modifié de la manière suivante. Dans un tricol, 6,46 mg (24,65 mmol) de triphénylphosphine sont dissous sous atmosphère inerte (N_2) dans 100 mL d'un mélange acétonitrile/tétrahydrofurane (9/1, V/V). 34 mL de diéthyldiazodicaboxylate (DEAD) à 40% dans du toluène (73,2 mmol) sont ajoutés goutte à goutte dans le ballon maintenu à -50°C dans un bain éthanol/neige carbonique. Après 10 min d'agitation, 4,94 g (24,1 mmol) de (R)-Boc-sérine solubilisés dans 80 mL d'un mélange acétonitrile/tétrahydrofurane (9/1, V/V), sont ajoutés à l'aide d'une ampoule à brome en maintenant le milieu à -50°C. Après l'addition, le milieu est agité 20 min à -50°C, puis pendant une nuit avec retour à température ambiante.

Le milieu réactionnel est ensuite concentré au rotavapor jusqu'à environ 20 mL. Dix millilitres d'acétate d'éthyle sont alors ajoutés et le mélange est placé à -20°C. La réaction est suivie par CCM (gel de silice 60 F_{254}, Merck ; éluant : pentane/acétate d'éthyle, 60/40, V/V ; **1** Rf = 0,31). La révélation est réalisée par chauffage de la plaque à la flamme après pulvérisation d'une solution de ninhydrine (95 mL de butanol, 5 mL d'acide acétique 2 N et 400 mg de ninhydrine).

Après 2h sous agitation magnétique, la solution est filtrée sur Büchner puis concentrée au rotavapor. Le résidu huileux orangé obtenu est repris par 5 mL d'un mélange pentane/acétate d'éthyle (60/40, V/V), et purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice avec ce même éluant. Les fractions contenant la (R)-Boc-N-sérine-β-lactone **1** sont rassemblées, concentrées à sec et le résidu est lavé avec 3 fois 3 mL de pentane. La (R)-Boc-N-sérine-β-lactone **1** est obtenue sous la forme d'un produit cristallin blanc (1,7 g, rendement 37 %), dont la structure a été confirmée par analyse ^{1}H-RMN (Annexe 4).

III.3.1.1.2. Synthèse de la (R)-S-benzyl-N-Boc-cystéine 6a (Boc-SBC)

Le carbonate de césium (82,5 mg ; 0,254 mmol ; Cs_2CO_3) est placé dans un tricol et séché à la flamme pendant 5 min sous vide partiel. Après retour à température ambiante, 2 mL

de diméthylformamide distillé, 47 mg (0,252 mmol) de Boc-lactone **1** et 31 µL (0,263 mmol) de benzylthiol **2** sont successivement ajoutés. Le mélange est agité à température ambiante et sous azote pendant 4 heures. La réaction est suivie par CCM (gel de silice 60 F_{254}, Merck ; éluant : méthanol/dichlorométhane, 15/85, V/V ; **6a** Rf=0,24). La révélation est effectuée comme décrite pour le produit **1** (cf. chapitre III.3.1.1.1 p 23).

Le résidu ainsi obtenu après concentration sous vide, est lavé avec 10 mL de pentane puis repris par 10 mL d'acétate d'éthyle. L'extrait est acidifié à pH 6,5 par ajout de résine [Amberlyte IR-120, (H^+)], séché sur sulfate de sodium anhydre et filtré sur coton de verre. 27 mg de (R)-S-benzyl-N-Boc-cystéine **6a** (rendement 34%) sont obtenus après purification par flash-chromatographie sur gel de silice en éluant avec un mélange méthanol/dichlorométhane (15/85, V/V).

III.3.1.1.3. Synthèse de la (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine (Boc-P3MH) 8a et d'un analogue deutéré (Boc-P3MH-d_2) 8aD

1ère étape

Le carbonate de césium (Cs_2CO_3 ; 262 mg, 0,802 mmol) est préparé comme précédemment (cf. chapitre III.3.1.1.2). Six millilitres de diméthylformamide distillé, 150 mg de Boc-lactone **1** (0,802 mmol) et 150 µL (0,855 mmol) d'acétate de 3-sulfanylhexyle **3** (ac3MH) sont successivement ajoutés sous azote. L'agitation est poursuivie pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le résidu obtenu après concentration au rotavapor est lavé avec 10 mL de pentane, puis repris par 10 mL d'acétate d'éthyle. L'extrait est acidifié à pH 6,5 par ajout de résine [Amberlyte IR-120, (H^+)], séché sur sulfate de sodium anhydre et filtré sur coton de verre. Le résidu obtenu après concentration est repris par 5 mL de dichlorométhane, puis purifié par flash-chromatographie sur gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/méthanol (95/5 puis 70/30, V/V). 97 mg de (R)-S-(3-hexylacétate)-N-Boc-cystéine (Boc-Pac3MH) **7a** (rendement 34%) sont obtenus sous la forme d'un résidu amorphe après séchage sous vide.

2ème étape

Sous azote, 65 mg (0,471 mmol) de carbonate de potassium (K_2CO_3) et 54,5 mg (0,143 mmol) de Boc-Pac3MH **7a** sont solubilisés sous agitation magnétique dans 6 mL de méthanol. L'agitation est poursuivie pendant 2h à température ambiante et sous azote. Le résidu obtenu après concentration au rotavapor est repris par 10 mL d'acétate d'éthyle.

L'extrait est acidifié à pH 6,5 par ajout de résine [Amberlyte IR-120, (H^+)], séché sur sulfate de sodium anhydre et filtré sur coton de verre. Le résidu obtenu après concentration est repris par 5 mL de dichlorométhane, puis purifié par flash-chromatographie sur gel de silice, en éluant avec un mélange dichlorométhane/méthanol (65/35, V/V). 26 mg de (R)-S-(3-hexan-1-ol)-N-Boc-cystéine (Boc-P3MH) **8a** (rendement 57%) sont obtenus sous la forme d'un résidu amorphe après séchage sous vide.

Les 2 étapes sont suivies par CCM (gel de silice 60 F_{254}, Merck ; éluant : méthanol/dichlorométhane, 15/85, V/V ; **7a** Rf=0,60 ; **8a** Rf=0,42). La révélation est effectuée comme décrit pour le produit **1** (cf. chapitre III.3.1.1.1 p 23).

Dans les mêmes conditions de réaction et de purification que celles utilisées pour la synthèse du produit naturel, le [$^2H_2$]-(R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine (Boc-P3MH-d_2) **8aD** est obtenu à partir de la Boc-lactone **1** et de l'acétate de [$^2H_2$]-3-sulfanylhexyle **3D**. Les rendements sont de 48 % à la 1ère étape et de 25 % à la seconde.

III.3.1.1.4. Addition du 3-sulfanylhexan-1-ol 4 sur (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1

Les conditions générales de réaction et de purification sont identiques à celles utilisées pour l'addition de l'acétate de 3-sulfanylhexyle **3** (cf. chapitre III.3.1.1.3).

III.3.1.1.5. Synthèse de la (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-N-Boc-cystéine 9a (Boc-P4MMP) et d'un analogue deutéré 9aD (Boc-P4MMP-d_6)

Le carbonate de césium (Cs_2CO_3 ; 86 mg, 0,264 mmol) est préparé comme précédemment (cf. chapitre III.3.1.1.2). 3 mL de diméthylformamide distillé, 25 mg (0,134 mmol) de Boc-lactone **1** et 37,5 mg (0,284 mmol) de 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MMP) **5** sont successivement ajoutés. L'agitation est poursuivie pendant 1h, à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous azote. La réaction est suivie par CCM (gel de silice 60 F_{254}, Merck ; éluant : dichloromethane/méthanol, 70/30, V/V ; **9a** Rf=0,57). La révélation est effectuée comme décrit pour le produit **1** (cf. chapitre III.3.1.1.1 p 23).

Le résidu obtenu après concentration sous vide partiel, est repris par 10 mL d'acétate d'éthyle et acidifié à pH=6,5 par ajout de résine [Amberlyte IR-120, (H^+)], séché sur sulfate de sodium anhydre et filtré sur coton de verre. Le résidu obtenu après concentration est repris par 5 mL de dichlorométhane, puis purifié par chromatographie sur gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, V/V). (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-

N-Boc-cystéine (Boc-P4MMP) **9a** (rendement 40%), sont obtenus sous la forme d'un résidu amorphe après séchage sous vide.

Dans les mêmes conditions de réaction et de purification que celles utilisées pour la synthèse du produit naturel, le [$^2H_6$]-(R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-N-Boc-cystéine **9aD** (Boc-P4MMP-d_6) est obtenu à partir de la Boc-lactone **1** et du 4MMP-d_{10} **5D**. Le rendement est de 31%.

III.3.1.2. Addition de (R)-N-Boc-cystéine 11a sur les composés α,β-insaturés

III.3.1.2.1. Synthèse du (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine 9a (Boc-P3MH)

Les conditions de la réaction sont celles décrites par Wakabayashi *et al.* (2003), modifiées de la manière suivante : Sous azote, 700 mg (3,15 mmol) de Boc-cystéine **11a**, 532 µL (3,78 mmol) de triéthylamine (TEA), 422 µL (3,65 mmol) de (*E*)-2-hexénal **12** et 1 mL de dioxane sont placés sous agitation pendant 4 jours à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (gel de silice 60 F_{254}, Merck ; éluant : dichloromethane/méthanol, 70/30, V/V ; **8a** Rf=0,33). La révélation est effectuée comme pour le produit **1** (cf. chapitre III.3.1.1.1 p 23).

L'huile jaune (1,447 g) obtenue après concentration sous vide partiel, est lavée avec 3 fois 5 mL d'hexane et reprise dans 29 mL d'un tampon phosphate (KH_2PO_4/K_2HPO_4) pH=7,4. 350 mg (9,10 mmol) de borohydrure de sodium ($NaBH_4$) en solution dans 7 mL d'eau, sont ajoutés goutte à goutte à O°C pendant quelques minutes. La réaction est poursuivie pendant 1 h, puis le milieu est neutralisé (pH=7) avec une solution d'acide chlorhydrique 2 M. La phase aqueuse est extraite avec 4 fois 25 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée sur coton de verre et concentrée à sec au rotavapor.

Le résidu obtenu après concentration est repris par 5 mL de dichlorométhane, puis purifié par chromatographie sur gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/méthanol (70/30, V/V). 820 mg (2,555 mmol) de (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine (Boc-P3MH) **8a** (rendement 81%), sont obtenus sous la forme d'un résidu amorphe après séchage sous vide.

Dans les mêmes conditions de réaction et de purification que celles utilisées pour la synthèse du produit naturel, le [$^2H_8$]-(R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine (Boc-P3MH-

d_8) est obtenu à partir de la Boc-cystéine **11a** et de l'[$^2H_8$]-(*E*)-2-hexénal [synthétisé dans les conditions de Schneider *et al.* (2006)]. Le rendement est de 31%.

III.3.1.2.2. Synthèse de la (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-N-Boc-cytéine 9a (Boc-P4MMP)

La réaction est réalisée selon les conditions proposées par Starkenmann (2003), pour l'addition de la (R)-cystéine sur l'oxyde de mésityle, modifiées de la façon suivante :

201 mg (0,905 mmol) de (R)-Boc-cystéine **11a** et 70 mg de Na_2CO_3 sont dissous dans 6 mL d'H_20 millipore (pH=8). Sous agitation vigoureuse, l'oxyde de mésityle **13** est ajouté en plusieurs fois : 458 µL (3,62 mmol) au début de la réaction, 229 µL (2,41 mmol) à T0 + 5h et T0 + 6h. La réaction est poursuivit pendant la nuit. Elle est contrôlée par CCM (gel de silice 60 F_{254}, Merck ; éluant : méthanol/dichlorométhane, 30/70, V/V ; **9a** Rf=0,57). La révélation est effectuée comme pour le produit **1** (cf. chapitre III.3.1.1.1 p 23).

La phase aqueuse est extraite avec 3 fois 5 mL d'éther diéthylique et concentrée à sec à 40°C sous vide poussé. Le résidu est repris dans 20 mL d'acétate d'éthyle. Le milieu est acidifié à pH=5/6 avec de la résine [Amberlyte IR-120, (H^+)] et concentré à sec sous vide partiel. Le résidu obtenu est repris par 5 mL de dichlorométhane, puis purifié par flash-chromatographie sur gel de silice, en utilisant comme éluant un mélange dichlorométhane/méthanol (70/30, V/V). 275 mg (0,862 mmol) de (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-N-Boc-cystéine **9a** (Boc-P4MMP) sont obtenus (rendement 95%).

Dans les mêmes conditions de réaction et de purification que celles utilisées pour la synthèse du produit naturel, le [$^2H_6$]-(R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-N-Boc-cystéine **9a-D** (Boc-P4MMP-d_6) est obtenu avec un rendement de 31% par addition de la Boc-cystéine **11a** sur l'oxyde de mésityle deutéré **13-D**.

III.3.1.3. Déprotection de la fonction amine

La déprotection de l'amine des différents produits d'addition obtenus ci-dessus est réalisée dans les conditions utilisées pour la préparation de lanthionines (Arnold *et al.*, 1988). A 0°C, 500 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) sont ajoutés à 0,20 mmol de dérivé de N-Boc cystéine et 0,21 mmol d'acide *p*-toluènesulfonique (PTS). Le milieu est agité pendant 10 min à cette température puis concentré à sec sous vide pour éliminer l'acide trifluoroacétique, avant d'être lavé avec 5 fois 3 mL d'éther diéthylique. Les produits sont récupérés sous la forme de sels d'acide *p*-toluènesulfonique de couleur blanche (Tableau 1). Les structures des

produits obtenus ont été confirmées par RMN, qui permet également de déterminer la proportion d'acide PTS (cf. Annexe 2, Annexe 3 et Annexe 4).

Tableau 1 : Rendements de déprotection des S-conjugués à la N-Boc-cystéine

Produits initiaux	Produits déprotégés	Rendements
Boc-SBC **6a** 69 mg	SBC (sel de PTS) **6b** 73,8 mg	88%
Boc-P3MH **8a** 50 mg	P3MH (sel de PTS) **8a** 33 mg	54%
Boc-P3MH-d_2 **8a-D** 60 mg	P3MH-d_2 (sel de PTS) **8b-D** 24 mg	31%
Boc-P4MMP **9a** 141 mg	P4MMP (sel de PTS) **9b** 120 mg	70%
Boc-P4MMP-d_6 **9a-D** 70 mg	P4MMP-d_6 (sel de PTS) **9b-D** 60 mg	72%

III.3.1.4. Synthèse et purification des produits formés par dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP

A température ambiante, 37,5 mg de P4MMP **9b** dans 5,5 mL de pyridine sont traités sous agitation par 900 µL d'éthylchloroformate. A To + 1 min, 2,4 mL d'éthanol sont ajoutés dans le milieu et la réaction est poursuivie pendant 10 min. Le milieu est ensuite acidifié avec environ 2 g de résine [Amberlyte IR-120, (H^+)], puis extrait avec 2×25 mL de dichlorométhane. L'extrait est séché sur sulfate de sodium anhydre puis concentré au rotavapor. Le résidu obtenu (43 mg) est purifié par flash-chromatographie sur silice en utilisant successivement les éluant suivants : pentane/éther (60/40 et 20/80, V/V), puis du méthanol seul.

III.3.2. Méthode de dosage des précurseurs cystéinylés

III.3.2.1. Préparation du moût

Cinq cent grammes de raisins égrappés sont mis à décongeler à 4°C pendant une nuit. Ils sont broyés dans un blender pendant 10 s. Le broyat est grossièrement filtré sur étamine avant d'être centrifugé à 10000 G, à 4°C pendant 20 min. Le jus clair obtenu est filtré sur coton de verre et le volume mesuré.

III.3.2.2. Extraction sur résine échangeuse de cations

Pour l'analyse du P3MH seul, 25 mL de jus clair sont additionnés de 15 µL d'une solution de P3MH-d_2 dans l'eau (C=103 µg/mL ; soit C=61,5 µg/L de jus) et 40 µL d'une solution de P4MMP-d_6 dans l'eau (C=10,8 µg/mL ; soit C=17,3 µg/L de jus), puis homogénéisés. Pour l'analyse du P3MH et du P4MMP, 50 mL de jus sont utilisés et les quantités d'étalons sont doublées. Préalablement, 1 g de résine échangeuse de cations (Dowex 50wX4-100 ; Sigma Aldrich) est régénéré par agitation dans 25 mL d'une solution HCl 2 M. La résine est rincée jusqu'à neutralité par lavages successifs à l'H_2O Millipore, puis introduite dans une colonne de verre (diamètre interne de 0,5 cm). Le jus est ensuite percolé (1 mL/min). Après lavage de la résine avec 15 mL d'H_2O Millipore, la fraction cationique est éluée par 10 mL d'une solution de phosphate monoammonique ($H_2PO_4NH_4$) 2 M. L'éluat est récupéré dès que le pH atteint 2 (contrôle au papier pH) et l'élution est poursuivie jusqu'à écoulement total de l'éluant.

III.3.2.3. Préparation de l'extrait

L'éluat Dowex est concentré à sec à 40°C au rotavapor. 5 mL d'éthanol sont ajoutés et le mélange est à nouveau concentré, afin d'éliminer les traces d'eau. Le résidu salin blanc est extrait successivement par 6 mL, 2 mL et 2 mL d'éthanol, pendant 5 min sous agitation. Les 3 fractions éthanoliques sont filtrées sur disque téflon (5 µm) à l'aide d'une seringue. L'extrait éthanolique est concentré à sec soit :

- sous flux d'azote à 45°C dans un tube à hydrolyse avant la dérivatisation, pour l'analyse directe du P3MH, en CPG-IE-SM en mode SIM (cf. chapitre III.3.2.6.1).

- au rotavapor, avant d'être repris par 2 fois 500 µL de solution tampon ($H_2PO_4NH_4$) 0,1 M. Cet extrait est ensuite percolé sur C_{18} avant d'être dérivatisé pour l'analyse du P3MH et du P4MMP.

III.3.2.4. Purification sur C_{18}

Pour l'analyse du P3MH et de la P4MMP, chaque extrait Dowex est percolé sur une cartouche de 500 mg de résine C_{18} (Lichrolut RP-18, Merk) préalablement conditionnée avec 15 mL d'éthanol et rincée avec 20 mL d'eau Millipore. La cartouche est ensuite rincée avec 500 µL de solution tampon $H_2PO_4NH_4$ 0,1 M. Les précurseurs sont élués par 6 mL d'éthanol. L'extrait est concentré à sec avant la dérivatisation. L'analyse est réalisée en CPG-IT-SM/SM (cf. chapitre III.3.2.7)

III.3.2.5. Dérivatisation

III.3.2.5.1. Dérivatisation par l'éthylchloroformate

Les conditions utilisées pour la dérivatisation de l'extrait Dowex et de l'extrait C_{18} sont présentées ci-dessous.

L'extrait porté à sec puis repris par 300 µL de pyridine distillée, est mis sous agitation et 125 µL d'éthyl chloroformate (Aldrich) sont additionnés. Après 1 min d'agitation, 150 µL d'éthanol absolu sont ajoutés et la réaction est poursuivie pendant 10 min. Le milieu est ensuite acidifié avec environ 200 mg de résine [Amberlyte IR-120, (H_+)], et extrait avec 4 mL, puis 2 mL de dichlorométhane. Une fois les fractions rassemblées, la phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, décantée puis concentrée à sec sous flux d'azote à 40°C. Le résidu sec obtenu est extrait par 3 fois 1 mL de pentane. L'extrait final est concentré à sec sous flux d'azote, puis repris par 100 µL de dichlorométhane. Les échantillons dérivatisés sont conservés à -20°C avant analyse en CPG-SM.

III.3.2.5.2. Triméthylsilylation

L'extrait parfaitement sec est additionné de 20 µL de pyridine fraîchement distillée puis de 20 µL de bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) à 1% de triméthylchlorosilane TMCS (Aldrich). Le milieu est chauffé à 60°C pendant 20 min avant l'analyse directe en CPG-IE-SM.

III.3.2.6. Analyse des S-conjugués à la cystéine dérivatisés

III.3.2.6.1. CPG-IE-SM

Description générale

L'identification et la quantification des produits de dérivatisation des S-conjugués à la cystéine sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890 Series II, couplé à un spectromètre de masse Hewlett Packard 5989 A, équipé d'un filtre quadripolaire. L'acquisition et le traitement des données s'effectuent à l'aide du logiciel Hewlett Packard 5989 B.05.02 MS Chemstation.

Conditions chromatographiques

L'appareil est équipé d'une colonne en silice fondue (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de phase 0,5 µm) de phase DB5 (J&W Scientific). Elle est reliée à l'injecteur via une pré-colonne (J&W Scientific) en silice désactivée (longueur 1 m, diamètre interne 0,53 mm).

- **Gaz vecteur :** Hélium 6.0 (Linde GAZ, Marseille, France), débit 1,2 mL/min.
- **Température de l'injecteur :** programmée de 35°C à 245°C, à raison de 180°C/min, et maintenue à 245°C.
- **Température du four :** programmée de 120°C à 300°C, à 6°C/min. L'isotherme est maintenu à 300°C pendant 10 min.
- **Volume injecté :** 2 µL

Conditions de détection par SM

- **Mode d'ionisation :** impact électronique (IE), énergie d'ionisation 70 eV.
- **Ligne de transfert :** 300°C
- **Source :** 250°C
- **Quadripôle** : 120°C

La détection sélective d'ions SIM est utilisée pour le dosage du P3MH (m/e 304 et 214 pour le P3MH et m/e 306 et 216 pour le P3MH-d_2). Pour l'étude des produits de dérivatisation du P3MH et du P4MMP à l'éthylchloroformate, les analyses ont été réalisées en balayage total.

III.3.2.7. CPG-IT-SM/SM

Description générale

Le dosage de la P4MMP est réalisé sur un chromatographe en phase gazeuse Varian 3800, couplé à un spectromètre de masse Varian Saturn 2000 équipé d'une trappe d'ions. L'acquisition et le traitement des données s'effectuent à l'aide du logiciel Saturn 2000 version 5.3.

Conditions chromatographiques

L'appareil est équipé d'une colonne en silice fondue (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de phase 0,5 µm) de phase DB5 (J&W Scientific). Elle est reliée à l'injecteur via une pré-colonne (J&W Scientific) en silice désactivée (longueur 1 m, diamètre interne 0,53 mm).

- **Gaz vecteur :** Hélium 6.0 (Linde GAZ, Marseille, France), débit 1 mL/min.
- **Température de l'injecteur :** programmée de 30°C à 245°C, à raison de 200°C/min, et maintenue à 245°C.
- **Température du four :** programmée de 120°C à 270°C à 6°C/min, puis à 15°C/min jusqu'à 320°C, et l'isotherme est maintenu à 320°C pendant 10 min.
- **Volume injecté :** 2 µL

Conditions de détection par SM

- **Mode d'ionisation :** impact électronique (IE), énergie d'ionisation 70 eV.
- **Ligne de transfert :** 295°C
- **Collecteur:** 170°C
- **Trappe d'ions :** 180°C

La détection du P3MH et du P3MH-d_2 est réalisée en balayage total ou en détection sélective d'ions (SIM), respectivement sur les ions m/e 304, m/e 214 et m/e 306, m/e 216. Pour la P4MMP et son analogue deutéré, la détection est réalisée en SM/SM dans les conditions décrites dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Conditions de détection du P4MMP en CPG-IT-SM/SM

Composé	Canaux	Ion père	Fenêtre d'isolation	Mode d'excitation	Niveau d'isolation	Amplitude d'excitation	Ion fils	Ion qualificateur
P4MMP	1	228	3 m/z	non-résonnant	75,2 m/e	55	200	228
P4MM-d_6	2	234	3 m/z	non-résonnant	77,2 m/e	55	206	234

III.3.2.8. Etalonnage

Des quantités croissantes de P3MH sont dérivatisées à l'éthylchloroformate (cf. chapitre III.3.2.4.) en présence de quantités fixes de l'étalon deutéré, P3MH-d_2 (Tableau 3).

Tableau 3: Solutions étalons de P3MH/P3MH-d_2 utilisées pour la calibration

Solution étalon	**P3MH** (µg)	**P3MH-d_2** (µg)
1	0,364	1,54
2	0,729	1,54
3	1,824	1,54
4	3,645	1,54
5	10,933	1,54

Les extraits sont injectés (2 µL) en CPG-IE-SM en mode SIM. Les droites de calibration sont obtenues en traçant le rapport (Y) des aires des ions m/e 304 du P3MH et m/e 306 du P3MH-d_2, en fonction du rapport (X) de leur concentration. Les équations de droites sont obtenues par régression linéaire, avec des coefficients de corrélation (R^2) toujours supérieurs à 0,99.

III.4. Analyse des thiols volatils

III.4.1. Synthèse de thiols naturels et deutérés

Le 3-sulfanylhexan-1-ol (3MH), l'acétate de 3-sulfanylhexyle (ac3MH), la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MMP), ainsi que leurs analogues deutérés ont été synthétisés selon les conditions précédemment rapportées (Kotseridis *et al.*, 2000).

III.4.2. Analyse des thiols variétaux dans les vins expérimentaux de Petit Manseng et de Gros Manseng

L'analyse des thiols dans les vins expérimentaux utilise le protocole décrit par Schneider *et al.* (2003), modifié de la façon suivante :

III.4.2.1. Extraction liquide/liquide des thiols

A 500 mL de vin sont ajoutés les standards internes deutérés suivants:

- 375 ng de [$^2H_2$]-3-sulfanylhexa-1-nol (75 µL, C = 7,50 µg/mL ; soit C=750 ng/L)
- 37,5 ng d'acétate de [$^2H_5$]-3-sulfanylhex-1-anol (75 µL, C = 7,50 µg/mL ; soit C=75 ng/L)
- 50 ng de [$^2H_{10}$]-4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (50 µL, C =1 µg/mL ; soit C=50 ng/L)

Sous azote, le milieu est équilibré sous agitation magnétique pendant 5 min, puis extrait à 0°C avec 2 fois 100 mL d'azéotrope pentane/dichlorométhane (2/1, V/V) à 450 rpm, pendant 2 fois 20 min. La phase organique est centrifugée à 10000 G à 4°C pendant 20 min. Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée à 25°C au rotavapor jusqu'à 2 mL environ.

III.4.2.2. Purification des thiols sur résine Affi-Gel 501

L'Affi-Gel 501 a été préparé selon le protocole fourni par Bio-Rad (France) à partir de l'Affi-Gel 10 (Schneider, 2001).

Dans une pipette pasteur obturée par du coton de verre, 500 µL de résine Affi-Gel 501 sont déposés. Cette colonne est conditionnée par élution successive de 5 mL d'isopropanol et 5 mL d'azéotrope pentane/dichlorométhane (2/1, V/V). Les 2 mL d'extrait de vins sont

ensuite percolés et la colonne est lavée par 25 mL d'azéotrope. Les thiols sont ensuite élués par 5 mL d'une solution 5 mM de 1,4-dithiothréitol (Fluka) dans de l'azéotrope. L'éluat est lavé avec 1 mL d'eau millipore, séché sur sulfate de sodium anhydre, puis concentré à 500 µL à 35°C sur une colonne de Dufton, puis sous flux d'azote à 100 µL environ. L'extrait final est conservé à -20°C avant l'analyse en CPG-IT-SM/SM.

III.4.2.3. Analyse CPG-IT-SM/SM

Description générale

Le dosage de thiols est réalisé sur un chromatographe en phase gazeuse Varian 3800, couplé à un spectromètre de masse Varian Saturn 2000, équipé d'une trappe d'ions. L'acquisition et le traitement des données s'effectuent à l'aide du logiciel Saturn 2000 version 5.3.

Conditions chromatographiques

L'appareil est équipé d'une colonne en silice fondue (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de phase 0,5 µm) de phase DBWAX-ETR (J&W Scientific), elle-même reliée à l'injecteur via une pré-colonne (J&W Scientific) en silice désactivée (longueur 1 m, diamètre interne 0,53 mm).

- **Gaz vecteur :** Hélium 6.0 (Linde GAZ, Marseille, France), débit 1 mL/min.
- **Température de l'injecteur :** programmé de 20°C à 245°C, à raison de 180°C/min.
- **Température du four :** maintenu à 60°C pendant 3 min, programmé à 170°C à 3°C/min, puis à 15°C/min jusqu'à 245°C, et l'isotherme est maintenu 20 min.
- **Volume injecté :** 1 µL

Conditions de détection par SM

Les conditions de détection du 3MH et de l'ac3MH en SM/SM, sont présentées dans le Tableau 4.

- **Mode d'ionisation :** ionisation chimique au méthane
- **Ligne de transfert :** 145°C
- **Collecteur:** 170°C
- **Trappe d'ions :** 180°C

Tableau 4 : Conditions de détection du 3MH, de l'ac3MH et de leurs analogues deutérés en spectrométrie de masse.

Composé	Canal	Ion père	Fenêtre d'isolation	Mode d'excitation	Niveau d'isolation	Amplitude d'excitation	Ion fils	Ion qualificateur
3MH	1	83	3 m/e	non-résonnant	35 m/z	28	55	83 - 117
3MH-d_2	2	119	3 m/e	non-résonnant	39,1 m/z	28	56	85 - 119
ac3MH	1	117	3 m/e	non-résonnant	38,4 m/z	26	55	83 - 117
ac3MH-d_5	2	119	3 m/e	non-résonnant	39,1 m/z	28	56	85 - 119

III.4.2.4. Préparation et titration des solutions de thiols en CPG-AED

A partir de solutions mères de chacun des thiols commerciaux (Interchim, Montluçon France) et de synthèse, des solutions diluées dans l'éthanol contenant 50 µg/mL d'éthoxythiazole choisi comme étalon interne (Aldrich, St Quentin Fallavier, France), sont préparés et injectées en CPG-AED pour leur titration. Le titre déterminé, ces solutions mères seront utilisées pour préparer les solutions étalons de la calibration.

Description générale

La titration des solutions mères de thiols est conduite avant chaque série d'analyses, à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890 Series II, couplé à un détecteur d'émission atomique Hewlett Packard 5921.

Conditions chromatographiques

L'appareil est équipé d'une colonne capillaire de silice fondue (longueur 30 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de phase 0,5 µm) de phase DB-Wax (J&W Scientific), elle-même reliée à l'injecteur via une pré-colonne (J&W Scientific) de silice désactivée (longueur 1 m, diamètre interne 0,53 mm).

- **Gaz vecteur :** Hélium 6.0 (Linde GAZ, Marseille, France), débit 1,5 mL/min.
- **Température de l'injecteur :** programmée de 30°C à 250°C, à raison de 180°C/min, et maintenue à 245°C.
- **Température du four :** programmée de 30°C jusqu'à 60°C, à 70°C/min, puis à 4°C/min jusqu'à 245°C. L'isotherme est maintenu pendant 10 min à 245°C.
- **Ligne de transfert :** 250°C
- **Volume injecté :** 1 µL

Conditions du détecteur d'émission atomique

- **Gaz réactants :** O_2 (25 psi) et H_2 (70 psi)
- **Détection :** signal carbone à 193 nm et signal soufre à 181 nm
- **Cavité :** 300°C
- **Plasma d'hélium :** pression 60 psi

Les composés sont identifiés par leur temps de rétention et quantifiés à l'aide de l'étalon interne, en utilisant les aires du signal du soufre des analytes de l'étalon, leurs réponses étant estimées égales.

III.4.2.5. Etalonnage

Des solutions de concentrations croissantes en 3MH et ac3MH sont préparées dans l'éthanol. A chaque solution est ajoutée une quantité fixe de chacun des étalons deutérés, 3MH-d_2 et ac3MH-d_5 (Tableau 5). Les analyses CPG-IT-SM/SM sont réalisées dans les conditions ci-dessus (cf. chapitre III.4.2.3).

Tableau 5 : Solutions éthanoliques des étalons utilisés pour les calibrations 3MH/3MH-d_2 et ac3MH/ac3MH-d_5.

	3MH (ng/mL)	**3MH-d_2** (ng/mL)	**ac3MH** (ng/mL)	**ac3MH-d_5** (ng/mL)
1	50	400	10	100
2	150	400	25	100
3	250	400	50	100
4	350	400	75	100
5	500	400	100	100

Les droites de calibration sont obtenues en traçant d'une part le rapport des aires des ions m/e 83 du 3MH et m/e 119 du 3MH-d_2, et d'autres part celui des ions m/e 117 de l'ac3MH et m/e 119 de l'ac3MH-d_5, en fonction du rapport des concentrations. Les équations de droite et les coefficients de corrélation sont obtenus par régression linéaire. Un exemple de calibration est donné dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Droites de calibrations et coefficients de corrélation pour les couples 3MH/3MH-d_2 et ac3MH/ac3MH-d_5.

	Equation de droite de calibration	**Coefficients de corrélation** (R^2)
Calibration 3MH/3MH-d_2	Y = 0,8342 X + 0,0649	0,9878
Calibration ac3MH/ac3MH-d_5	Y = 0,579 X - 0,007	0,9793

III.5. Analyse du sulfure diméthyle (DMS)

III.5.1. Préparation des moûts

Cinq cent grammes de raisins égrappés sont mis à décongeler à 4°C pendant une nuit. Ils sont broyés dans un blender pendant 10 s et le broyat obtenu est grossièrement filtré sur étamine avant d'être centrifugé à 10000 G à 4°C pendant 20 min. Le jus clair est filtré sur coton de verre et le volume mesuré. L'échantillon est conservé à -20°C avant analyse.

III.5.2. Analyse du sulfure de diméthyle libre (DMS) et potentiel (PDMS)

III.5.2.1. Dosage du sulfure de diméthyle libre (DMS)

Dix millilitres d'échantillon de vin ou de moût sont introduits dans un flacon de 15 mL, avec 1,75 g de chlorure de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne) et 50 µL d'une solution éthanolique de DMS-d_6 à 100,4 µg/mL (soit 500 µg/L de vin). Le flacon est immédiatement serti. Le chlorure de sodium est dissout par agitation au Vortex. L'échantillon est ensuite placé sur l'automate (Autotrace SPE Workstation) pour l'analyse par SPME-CPG-IE-SM.

III.5.2.2. Dosage du potentiel en sulfure de diméthyle (PDMS)

Dix millilitres d'échantillon de vin ou de moût sont introduits dans un flacon SPME de 15 mL, avec 1,75 g de chlorure de sodium (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le DMS libre présent initialement dans l'échantillon est éliminé par bullage à l'azote (débit de 100 mL/min environ) pendant 10 minutes. Successivement, 65 µL d'une solution aqueuse à 204 µg/mL d'acide propanoïque diméthylsulfonium deutéré (DMSPA-d_6) et 3 pastilles (environ 300 mg, soit environ 0,5 mol/L) d'hydroxyde de sodium anhydre (Carlo Erba, Rodano, Italie) sont ajoutés à l'échantillon. Le flacon est immédiatement serti et le sel est dissout par agitation au Vortex. Le flacon est ensuite chauffé à 100°C pendant 1h dans une étuve, puis placé sur l'automate d'analyse SPME (Autotrace SPE Workstation), après avoir été ramené à température ambiante.

III.5.3. Conditions d'analyse du DMS

III.5.3.1. Micro-extraction par phase solide (SPME)

L'extraction est réalisée à l'aide d'un module SPME automatisé AOC-5000 Auto Injector (Shimadzu), équipé d'une fibre en silice fondue recouverte de 75 µm de phase Carboxen^{TM}/polydiméthylsiloxane (CAR/PDMS ; Supelco, Bellefonte, États-Unis).

Avant l'étape d'extraction, la fibre est chauffée à 250°C pendant 5 min dans l'injecteur du CPG. L'échantillon est agité à 30°C pendant 10 min, puis la fibre est exposée dans l'espace de tête du flacon SPME durant 1 min. Elle est ensuite introduite dans l'injecteur du CPG, pour la désorption à 245°C.

III.5.3.2. Analyse CPG-IE-SM du sulfure de diméthyle

Description générale

L'identification et la quantification du sulfure de diméthyle libre ou potentiel, est conduite sur un chromatographe en phase gazeuse Varian 3800, couplé à un spectromètre de masse Saturn 2000, à trappe d'ions. L'acquisition et le traitement des données s'effectuent à l'aide du logiciel Saturn 2000 version 5.3.

Conditions chromatographiques

L'appareil est équipé d'une colonne capillaire en silice fondue (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de phase 0,5 µm) de phase DB-Wax (J&W Scientific). Elle est reliée à l'injecteur via une pré-colonne (J&W Scientific) en silice désactivée (longueur 1 m, diamètre interne 0,53 mm).

- **Température de l'injecteur (splitless):** 245°C
- **Température du four :** maintenue à 50°C pendant 3 min, programmée jusqu'à 245°C à 4°C/min et l'isotherme est maintenu pendant 10 min.
- **Gaz vecteur :** Hélium 6.0 (Linde GAZ, Marseille, France), débit 1 mL/min.
- **Ligne de transfert :** 270°C

Conditions de détection par SM

Les spectres de masse sont enregistrés sur une fenêtre allant de m/e 29 à m/e 100.

- **Mode d'ionisation :** impact électronique (IE), énergie d'ionisation 70 eV.
- **Trappe d'ions :** 190°C
- **Collecteur** : 120°C

Le DMS et le DMS deutéré sont identifiés à l'aide de spectres de référence et quantifiés en focalisant la détection sur les ions suivants (Tableau 7).

Tableau 7 : Ions du DMS et du DMS-d_6 utilisés pour l'analyse en CPG-SM.

	DMS	**DMS-d_6**
ions quantificateurs	62,00	68,00
ions qualificateurs	45, 45, 61	48, 50, 66

III.5.4. Etalonnage

Des solutions modèles de vin et de moût (cf. chapitre III.1.3) sont préparées avec des quantités croissantes de DMS et une quantité fixe de l'étalon deutéré, DMS-d_6 (Tableau 8).

Tableau 8: Concentration des solutions modèles de vins et de moût contenant le DMS et le DMS-d_6 utilisées pour la calibration

Solutions étalons	**DMS** (µg/L)	**DMS-d_6** (µg/L)
1	5	500
2	10	500
3	20	500
4	50	500
5	100	500
6	300	500
7	600	500

Les droites de calibration sont obtenues en traçant le rapport des aires des ions m/e 62 du DMS et m/e 68 du DMS-d_6, en fonction du rapport de leurs concentrations respectives. Les équations de droite de calibration et les coefficients de corrélation sont obtenus par régression linéaire (Tableau 9).

Tableau 9 : Exemples d'équations de droites et de coefficients de corrélation des calibrations DMS/DMS-d_6 utilisées pour l'analyse dans les moûts et dans les vins.

	Equation de droite	**Coefficient de corrélation** R^2
Calibration en solution modèle de moût	Y=0,9014X-0,0074	0,9996
Calibration en solution modèle de vin	Y=1,1089X+0,0084	0,9996

III.6. Etude et analyse du sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone)

III.6.1. Etude de la stabilité du sotolon 1 en conditions acido-basiques

III.6.1.1. Dégradation du sotolon 1 en milieu basique

La dégradation de 50 mg de sotolon **1** est réalisée en milieu basique, à l'abri de la lumière et sous azote. Après retour à température ambiante, le milieu est acidifié jusqu'à pH 1 avec une solution d'acide chlorhydrique 5 M. Les produits de dégradation sont extraits avec 2×20 mL d'éther diéthylique. La phase organique est séparée, séchée sur sulfate de sodium anhydre. L'extrait est analysé en CPG-IE-SM pour l'identification des produits de dégradation et en CPG-FID pour la semi-quantification en utilisant le BHT contenu dans l'éther diéthylique comme standard interne.

III.6.1.2. Dégradation du sotolon 1 dans une solution de carbonate de sodium

A l'abri de la lumière et sous azote, 50 mg de sotolon **1** sont dissous dans 1,5 mL d'une solution aqueuse de carbonate de potassium, avec ou sans cristaux de cuivre (5 % de **1**). La réaction est poursuivie à température ambiante. Le suivi de la réaction est réalisé en CPG-IE-SM, à T0 + 4 h et T0 + 68 h.

III.6.1.3. Identification de l'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoique 11

Ce produit **11** est obtenu par dégradation du sotolon en milieu basique (NaOH 0,5 M) à 80°C pendant 4 h. Après retour à température ambiante, le milieu est neutralisée avec une solution d'acide chlorhydrique 1 M et lavé avec 20 mL d'éther diéthylique. La phase aqueuse est acidifiée à pH 1 avec une solution d'acide chlorhydrique 2 M. Le composé est extrait avec 2×20 mL d'éther diéthylique. La phase organique est séparée, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et concentrée au rotavapor. Le [$^{2}H_{4}$]-3-méthyl-2-oxopent-3-énoique **11D** est obtenue dans les mêmes conditions en utilisant de l'hydroxyde de sodium dans de l'eau lourde (D_2O). Les produits purs ont été analysés en ^{1}H-RMN et ^{13}C-RMN (Annexe 5) et CPG-IE-SM.

III.6.1.4. Cyclisation de l'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoique 11 en sotolon 1

La phase aqueuse contenant l'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoique **11D**, obtenue après lavage par 20 mL d'éther diéthylique, est acidifiée à pH 1 avec une solution d'acide sulfurique 5 M, puis laissée sous agitation pendant 48 h à température ambiante. Le sotolon **1** est extrait comme précédemment par 2×20 mL d'éther diéthylique. Le 3-hydroxy-4-méthyl-5-[$^2H_3$]-methyl-2(5H)-furanone **1D** est obtenue à partir de l'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoique deutéré **11D** en utilisant l'acide sulfurique deutéré (D_2SO_4) 5 M et échange du deutérium en position énolique par de l'éthanol.

III.6.1.5. Etude de la stabilité isotopique du sotolon deutéré 1D

Cinquante milligrammes de sotolon **1D** sont chauffés pendant 4 h à 100°C, sous azote et à l'abri de la lumière dans une solution aqueuse (H_2O) d'acide sulfurique deutéré 5 M. Après retour à température ambiante, le milieu est extrait avec 2×20 mL d'éther diéthylique. La phase organique est séparée, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et analysée en CPG-IE-SM.

III.6.1.6. Analyse CPG-IE-SM

III.6.1.6.1. Analyse CPG-IE-SM des produits de dégradation

Description générale

L'identification des produits de dégradation, est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890 Series II, couplé à un spectromètre de masse Hewlett Packard 5989 A, équipé d'un filtre quadripolaire. L'acquisition et le traitement des données s'effectuent à l'aide du logiciel Hewlett Packard 5989 B.05.02 MS Chemstation.

Conditions chromatographiques

L'appareil est équipé d'une colonne capillaire en silice fondue (longueur 60 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de phase 0,1 µm) de phase DB-5 (J&W Scientific). Elle est reliée à l'injecteur via une pré-colonne (J&W Scientific) en silice désactivée (longueur 1 m, diamètre interne 0,53 mm).

- **Température de l'injecteur :** programmée de 30°C à 250°C, à raison de 180°C/min, et maintenu à 250°C.

- **Température du four :** programmée à 3°C/min de 60°C jusqu'à 165°C puis à 6°C/min jusqu'à 245°C et maintenue pendant 20 min à cette température.
- **Gaz vecteur :** Hélium 6.0 (Linde GAZ, Marseille, France), débit 1,2 mL/min.
- **Volume injecté :** 1 µL

Conditions de détection par SM

Les spectres de masse sont enregistrés en balayage total sur une fenêtre de masse m/e 29 à m/e 250.

- **Mode d'ionisation :** impact électronique (IE), énergie d'ionisation 70 eV.
- **Ligne de transfert :** 250°C
- **Source :** 250°C
- **Quadripôle :** 120°C

III.6.1.6.2. Semi-quantification des produits de dégradation

Le chromatographe en phase gazeuse est un Varian 3300 est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID ; 250°C). Les conditions d'analyse chromatographique sont identiques à celles du chapitre III.6.1.6.1. Pour la semi-quantification des produits de dégradation du sotolon en milieu basique, le BHT présent dans l'éther diéthylique, utilisé comme solvant d'extraction, sert d'étalon interne pour la semi-quantification des produits de dégradation du sotolon en milieu basique.

III.6.2. Analyse du sotolon dans le vin

III.6.2.1. Vins analysés

Un Vin Doux Naturel de Muscat de l'appellation Rivesaltes a été utilisé pour déterminer la répétabilité et la sensibilité du dosage. 8 vins commerciaux de Petit et Gros Manseng de l'appellation Jurançon ont été analysés pour déterminer leur teneur en sotolon.

III.6.2.2. Extraction

Cent cinquante microlitres d'une solution à 248 µg/mL de sotolon deutéré dans l'acide chlorhydrique 1mM sont ajoutés à 410 mL de chaque vin. Deux fois 200 mL sont prélevés et complétés avec 5 g de sulfate d'ammonium, puis extrait sous azote par 80 mL de dichlorométhane. La phase organique est séparée, séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée à 1 mL au rotavapor. Cet extrait est acidifié avec 4,4 mL d'une solution 0,5 N

d'acide sulfurique dans l'eau. La phase aqueuse acide est lavée par 5 mL de pentane et passage sur résine Amberlite XAD-2. L'éluat aqueux est extrait par 20 mL d'éther diéthylique. Cette phase organique est séparée, séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée à 1 mL au rotavapor. L'extrait est conservé à -20°C avant analyse.

III.6.2.3. Courbes de calibration

Plusieurs solutions de sotolon **1** dans l'éthanol de concentrations comprises entre 0,4 µg/mL et 20,3 µg/mL (10 µL à 500 µL d'une solution éthanolique à 40,65 µg/L de **1**) sont additionnées de 100 µL d'une solution d'acide chlorhydrique de sotolon **1D**. Le rapport (Y) des aires sotolon **1** /sotolon **1D** en fonction du rapport (X) de leurs concentrations conduit par régression linéaire à la courbe de calibration suivante (Y=0,82X-0,00001 ; R^2 = 1).

III.6.2.4. Analyse CPG-IE-SM du sotolon dans les extraits de vin

Les conditions générales d'analyses sont celles développées au chapitre III.2.1.5

L'appareil est équipé d'une colonne capillaire de silice fondue (longueur 30 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de phase 0,25 µm) de phase DB-Wax (J&W Scientific). Elle est reliée à l'injecteur via une pré-colonne (J&W Scientific) de silice désactivée (longueur 1 m, diamètre interne 0,53 mm).

- **Température de l'injecteur (splitless):** programmée de 30°C à 245°C, à raison de 180°C/min
- **Température du four :** programmée à 6°C/min de 60°C jusqu'à 245°C et maintenue pendant 20 min à cette température
- **Gaz vecteur :** Hélium 6.0 (Linde GAZ, Marseille, France), débit 1,2 mL/min.
- **Volume injecté :** 1 µL

Conditions de détection par SM

La détection du sotolon **1** et du sotolon **1D** est réalisée en mode sélection d'ions (SIM), en utilisant respectivement, les ions m/e 128 et 131 pour la quantification, et les ions m/e 83 et 86 comme ions qualificateurs.

IV. Etude et développement de méthodes

IV.1. Développement d'une méthode d'analyse directe par dilution isotopique de S-conjugués à la cystéine du raisin

IV.1.1. Introduction bibliographique

Depuis leur découverte dans le raisin (Tominaga *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 1998b) et dans d'autres fruits (Tominaga et Dubourdieu, 2000), les précurseurs cystéinylés font l'objet d'une attention particulière, car ils sont à l'origine de composés d'arôme extrêmement odorants (Tominaga *et al.*, 2000; Huyng-Ba *et al.*, 2003; Wakabayashi *et al.*, 2004). Parmi ces précurseurs, le 3-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-cystéine (P3MH) et le 4-S-(4-méthyl-2-oxopentan-4-yl)-cystéine (P4MMP) sont à l'origine de thiols, parmi les plus intéressants pour l'arôme du vin. Ces précurseurs cystéinylés sont présents à l'état de traces dans les jus de raisin, ce qui explique que peu de méthodes de dosage aient été développées à ce jour. Par contre, de nombreuses méthodes sont disponibles pour le dosage de S-conjugués à la cystéine sulfoxyde (Whitaker, 1976; Yoo et Pike, 1998; Kubec *et al.*, 1999). Ces dérivés, apparentés à ceux trouvés dans le raisin, ont été identifiés en abondance dans plusieurs variétés d'ail et d'oignon, à des concentrations jusqu'à mille fois supérieures à celles des précurseurs cystéinylés dans le raisin.

Toutefois, l'aptitude de certaines enzymes ou préparations enzymatiques à libérer des thiols (Tominaga *et al.*, 1998b; Wakabayashi *et al.*, 2004) à partir des précurseurs cystéinylés (activité β-lyase), a permis le développement d'une méthode de dosage indirecte de ces composés par voie enzymatique (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000). Le passage d'un moût tamponné à pH=8, sur une colonne immobilisée de tryptophanase possédant une activité β-lyase permet la libération des thiols à partir des précurseurs cystéinylés correspondants. Ceux-ci sont directement complexés dans le moût percolé, par une solution de *p*-hydroxymercuribenzoate (pHMB), purifiés sur résine échangeuse de cations et analysés en CPG-SM en mode SIM. Pour le P3MH, présent en plus grande concentration dans les raisins, une méthode de dosage directe et plus rapide a été publiée (Murat *et al.*, 2001b). Elle consiste à purifier 500 µL de moût par chromatographie d'affinité, sur un gel de chelating sepharose 4B. L'élution par une solution d'HCl (1M) conduit à un extrait de P3MH qui est dérivatisé par triméthylsilylation après concentration, puis analysé en CPG-IE-SM en mode SIM (Murat *et al.*, 2001b).

Ces deux méthodes de dosage sont réalisées en dilution isotopique et utilisent différents isotopomères du P3MH et du P4MMP, obtenus selon les voies de synthèse de S-conjugués à la cystéine les plus employées. Celles-ci impliquent des additions nucléophiles sur des composés carbonylés α,β-insaturés selon des réactions d'addition 1,4 de Michael. Initialement, le P3MH et le P4MMP, ainsi que leurs analogues marqués ont ainsi été

synthétisés par addition de la (R)-cystéine **11b** sur l'(*E)*-2-hexénal **12** et l'oxyde de mésityle **13** respectivement (Tominaga *et al.*, 1998b ; Figure 2 et Figure 3). Cependant, ni les produits intermédiaires, ni les produits finaux ont été caractérisés en RMN. De plus, la pureté du P3MH ainsi synthétisé a été estimée à 4 % (Wakabayashi *et al.*). Par ailleurs, il a été démontré que l'addition de (R)-cystéine **11b** sur l'(*E)*-2-hexénal **12** en milieu aqueux à pH=7,4 ne s'arrête pas aux (R)-S-[(3R,3S-1-oxohex-3-yl]-cystéine **15b**, qui correspondent aux monoadduits en 1,4. La cystéine réagit à nouveau avec l'aldéhyde du monoadduit **15b**, conduisant à la formation des acides (4R,2''R)-2-[2'-(2''-amino-2''-carboxyéthylthio)-pentyl]-1,3-thiazolidine-4-carboxyliques **16** (Figure 2). Les rendements de formation de ces dérivés thiazolidines sont encore plus importants lorsque la réaction est réalisée dans un mélange eau/éthanol (40/60, V/V). Mais dans ces conditions, le P3MH **8b** n'est pas observé (Wakabayashi *et al.*, 2004). Cette réaction de la cystéine avec le produit d'addition de Michael est connue pour d'autres aldéhydes α,β-insaturés (Esterbauer *et al.*, 1976), et la formation d'acide thiazolidine-4-carboxylique a été observée pour l'addition de cystéine sur des composés carbonylés non conjugués (Lieberman *et al.*, 1948; Scholka et Spoerri, 1957; Kubec *et al.*, 2002). Ce même diadduit **16** est le produit majoritaire (80 %) formé par l'addition de la (R)-cystéine **11b** sur l'(*E)*-2-hexénal **12** à pH=1, suivie d'une réduction au $NaBH_4$. Dans ces conditions, le second produit est le P3MH **8b**, formé avec 13 % de rendement (Starkenmann, 2003 ; Figure 2). En revanche, l'addition en milieu basique suivie d'une réduction au $NaBH_4$, conduit à un seul produit, l'acide (3R,7R,7S)-7-propylhexahydro-1,4-thiazepine-3-carboxylique **14**, obtenu par addition 1,4 de la cystéine suivie d'une cyclisation intramoléculaire du monoadduit par formation d'une base de Shiff réduite par $NaBH_4$ (Starkenmann, 2003).

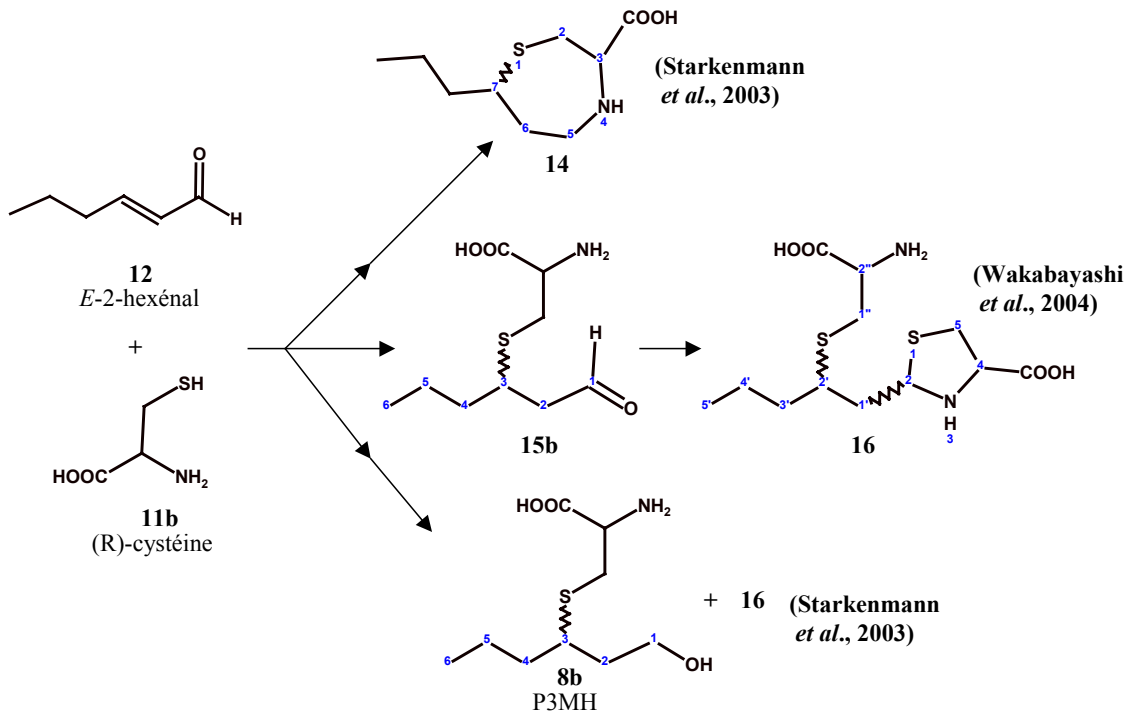


Figure 2 : Résultats de l'addition de la (R)-cystéine **11b** sur le (*E)*-2-hexénal **12** (Starkenmann, 2003; Wakabayashi *et al.*, 2004).

Ces différents travaux montrent que la formation des produits d'addition de la cystéine sur l'(*E)*-2-hexénal **12**, mono- ou di-adduit, dépend du milieu réactionnel qui conditionne la réactivité de la fonction amine. Le blocage de cette fonction par l'utilisation de la (R)-N-Boc-cystéine **11a** est donc particulièrement adapté à la synthèse des dérivés N-Boc protégés **15a** [Boc-P3MHal ; (R)-S-[(3R,3S-1-oxohex-3-yl]-N-Boc-cystéine] et **8a** [Boc-P3MH ; et (R)-S-[(3R,3S-1-hydroxyhex-3-yl]-N-Boc-cystéine]. Le produit **15a** conduit après réduction et déprotection au (R)-S-[(3R,3S-1-oxohex-3-yl]-cystéine (P3MH) **8b** (Wakabayashi *et al.*, 2004).

Par ailleurs, l'addition de la cystéine **11b** sur l'oxyde de mésityle **13** conduit en milieu acide, avec un très faible rendement, au monoadduit réduit seul **9b**, qu'il est difficile de séparer de la quantité majeure de cystéine qui n'a pas réagi. De plus, en milieu basique, il est obtenu en mélange avec l'acide (3R,5R,5S)-hexahydro-5,7,7-triméthyl-1,4-thiazepine-3-carboxylique **17**, résultant de la cyclisation intramoléculaire du monoadduit en base de Shiff réduite par $NaBH_4$ (Figure 3). Ainsi, là encore l'utilisation de la (R)-N-Boc-cystéine **11b** permettrait une synthèse univoque par blocage de la fonction amine. L'obtention de produits N-Boc protégés, solubles dans les solvants organiques et peu réactifs, faciliterait également leur purification. Ainsi, la réaction de déprotection de la fonction amine conduirait à des

composés suffisamment purs pour leur utilisation ultérieure, évitant une étape de purification problématique pour des composés aussi réactifs.

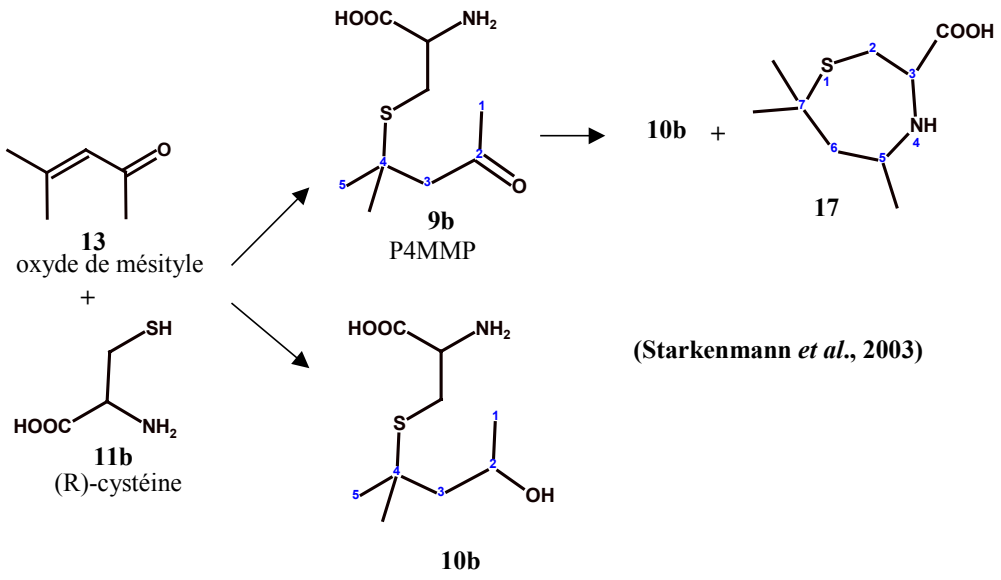


Figure 3 : Résultats de l'addition de la (R)-cystéine **11b** sur l'oxyde de mésityle **13** (Starkenmann, 2003).

La synthèse de S-conjugués à la cystéine peut également être envisagée via d'autres voies. En effet, plusieurs méthodes ont ainsi été développées pour la synthèse de dérivés d'acides aminés et pourraient être envisagées pour synthétiser les S-conjugués à la (R)-cystéine identifiés dans le raisin, à partir des thiols correspondants. Ces réactions impliquent une addition nucléophile du thiol sur divers dérivés d'acides aminés : β-haloalanines, sérine β-tosylée, aminoacrylates, aziridines (Baldwin *et al.*, 1993). Mais ces différentes voies présentent peu d'intérêt, compte tenu des difficultés d'obtention des produits de départ, du nombre important d'étapes impliquées, ainsi que des faibles rendements et de l'absence de contrôle de la stéréosélectivité.

Toutefois, parmi ces voies alternatives de synthèse, l'addition nucléophile de thiols sur la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone (Boc-lactone), pourrait conduire aux S-conjugués à la (R)-N-Boc-cystéine analogues aux monoadduits en 1,4 décrits ci-dessus. Cette voie, décrite pour la synthèse de lanthionines et de S-benzylcystéine (Arnold *et al.*, 1985; Arnold *et al.*, 1987; Arnold *et al.*, 1988), est donc envisageable pour transformer en une seule étape les thiols variétaux en leurs S-conjugués à la (R)-N-Boc-cystéine, cela à partir du même synthon, la Boc-lactone (Figure 4).

Le chapitre qui suit traite de l'optimisation et de la comparaison des 2 voies de synthèse, pour l'obtention de S-conjugués à la cystéine naturels et deutérés (Figure 4). Ces précurseurs synthétisés seront ensuite utilisés pour le développement d'une méthode d'analyse par dilution isotopique, afin de pouvoir étudier le P3MH et le P4MMP, dont les origines et l'implication dans la genèse de l'arôme du vin ne sont pas complètement élucidées.

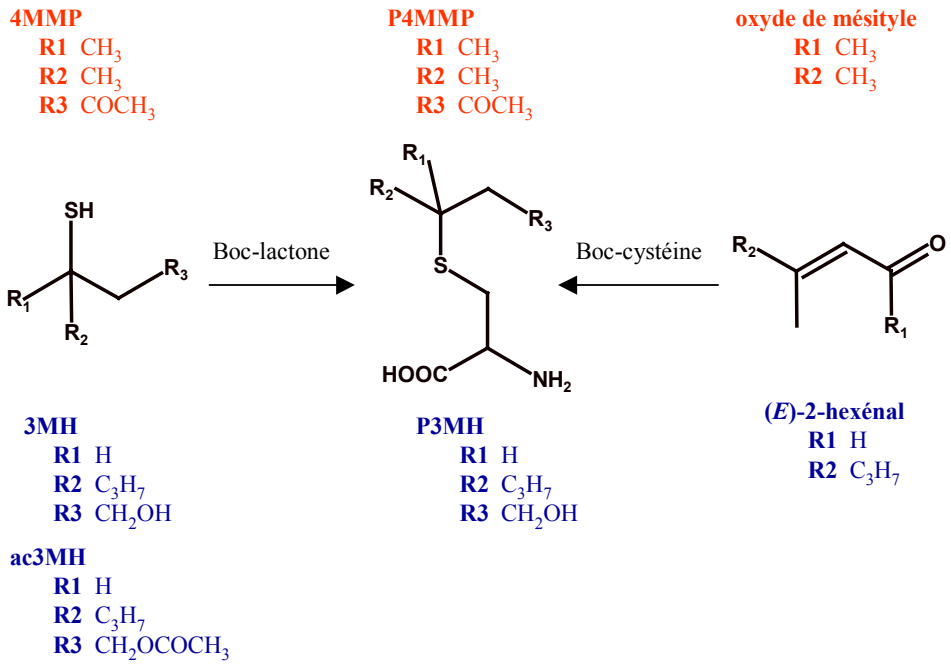


Figure 4 : Voies de synthèse étudiées pour l'obtention du P4MMP, du P3MH et de leurs analogues deutérés.

IV.1.2. Résultats et discussions

IV.1.2.1. Synthèse des précurseurs cystéinylés

IV.1.2.1.1. Addition de thiols sur la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1

Les travaux d'Arnold *et al.* (1987) ont montré que différents nucléophiles peuvent s'additionner sur des (R)-sérine-β-lactones N-protégées, soit sur le carbone en β, soit sur le carbonyle. La protection de la fonction amine de ces synthons par un groupement encombrant comme le Boc, oriente régiosélectivement l'addition de nucléophiles sur le carbone en β. De plus, ce carbone étant plus mou que celui du carbonyle, l'addition de nucléophiles mous tel que les thiols est préférentielle sur ce carbone. La (R)-N-Boc-sérine-β-lactone (Boc-lactone) **1** est obtenue aisément à partir de la (R)-N-Boc-sérine par une réaction de Misunobu (Figure 5). L'activation de la fonction hydroxyle de la (R)-N-Boc-sérine en présence de triphénylphosphine et de diéthylazodicarboxylate (DEAD) permet, à très faible température (-78°C), de limiter la formation de produits secondaires (Arnold *et al.*, 1985). La Boc-lactone **1** ainsi obtenue est purifiée par flash-chromatographie, afin de la séparer de l'hydrazine dicarboxylate formée à partir du diéthylazodicarboxylate (DEAD). Le produit cristallin blanc obtenu est conservé sans dégradation à -20°C (Arnold *et al.*, 1985). Cette Boc-lactone **1** a été utilisée comme synthon commun dans la synthèse des S-conjugués à la cystéine identifiés dans les jus de raisin, à partir des thiols variétaux correspondants (Figure 5).

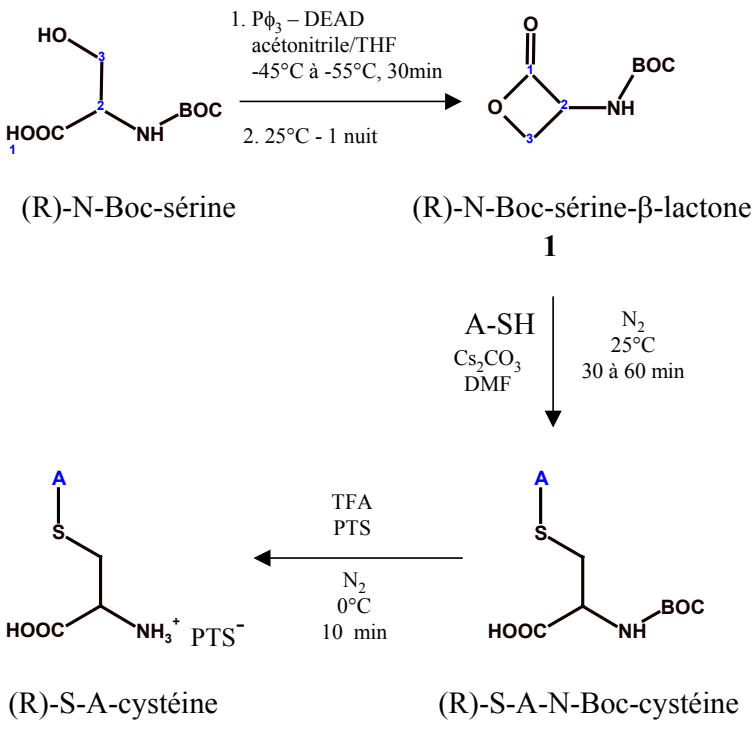


Figure 5 : Voie de synthèse de S-conjugués à la cystéine par addition de thiols sur la Boc-lactone **1**.

La faisabilité de cette voie a déjà été décrite pour la synthèse du (R)-S-benzyl-N-benzyloxycarbonyl-β-lactone (Z-SBC) par addition du benzylthiol sur la (R)-N-benzyloxycarbonyl-β-lactone (Arnold *et al.*, 1985). Dans ces conditions, le carbonate de césium permet la formation de thiolates suffisamment solubles dans le DMF et permet d'accroître le pouvoir nucléophile du thiol vis à vis de la β-lactone. Ainsi, l'addition du benzylthiol **3** sur la Boc-lactone **1** conduit au (R)-S-benzyl-N-Boc-cystéine (Boc-SBC) **6a** (Figure 6). Après purification par flash-chromatographie, le Boc-SBC **6a** est obtenu avec un rendement de 62 % proche du rendement publié (78 %) pour le Z-SBC. Sa structure a été vérifiée par ^{1}H-RMN (Annexe 4).

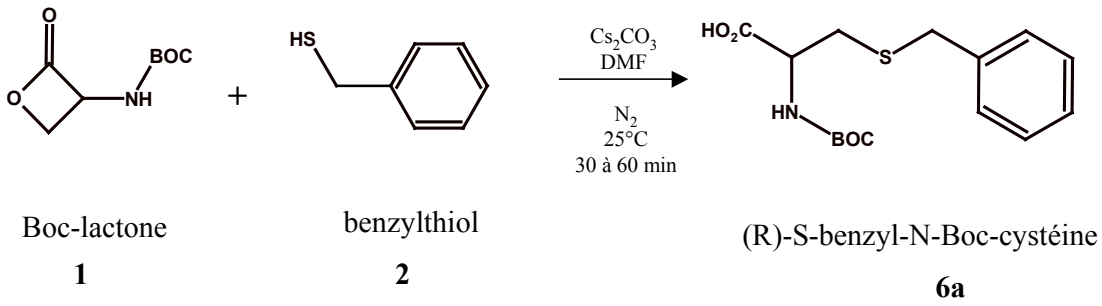


Figure 6 : Addition du benzylthiol **2** sur la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone **1**.

a. Synthèse du (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine 8a

Pour la synthèse du (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-N-Boc-cystéine (Boc-P3MH) **8a**, l'addition directe du 3MH **4** sur la Boc-lactone **1** (Figure 9) est délicate du fait de la présence d'un centre nucléophile supplémentaire, la fonction alcool. Le groupement hydroxyle est un nucléophile dur qui pourrait s'additionner sur le carbone électrophile le plus dur de la lactone, celui du groupe carbonyle. D'autre part, la fonction alcool n'est pas toujours stable en milieu acide qui est le milieu utilisé pour l'élimination du groupement protecteur Boc. La réaction de déshydratation du 3MH **4** en 3-sulfanylhexène **18,** caractérisé en CPG-IE-SM, dans des conditions similaires à celles de la déprotection (TFA, 1h, température ambiante), illustre parfaitement cette réactivité (Figure 7).

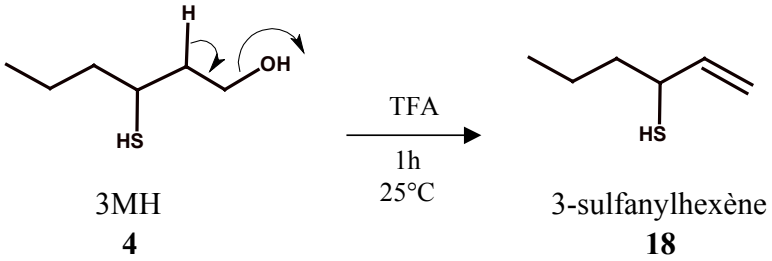


Figure 7 : Déshydratation du 3MH **4** en milieu acide (TFA, 1h, température ambiante).

Pour ces raisons, dans un premier temps, nous avons utilisé le 3MH acétylé sur la fonction alcool, c'est à dire l'ac3MH **3**, pour l'addition sur la Boc-lactone **1**. Contrairement au benzylthiol **2**, il conduit à la formation de 3 produits secondaires révélés à la ninhydrine sur chromatographie sur couche mince (CCM). La réaction est traitée après disparition de la totalité de la Boc-lactone **1** et les produits sont purifiés par flash-chromatographie puis identifiés par ^{1}H-RMN et ^{13}C-RMN. Les proportions de chacun de ces 3 produits sont variables d'une réaction à l'autre, mais le produit attendu, le (R)-S-(hexylacétate)-N-Boc-cystéine (Boc-Pac3MH) **7a** est toujours le produit majoritaire, représentant environ 50 % en poids des produits purifiés. Les 2 autres composés sont respectivement le (R)-S-[(3R,3S)-1-acétoxyhex-3-yl]-N-Boc-sérine **20**, résultant de l'attaque de l'ac3MH **3** sur le carbonyle de la Boc-lactone **1**, et le (R)-S-[(3R,3S)-1-acétoxyhex-3-yl]-N-Boc-sérine-[(3R,3S)-1-acétoxyhex-3-yl]-thioester **21** qui provient de la double addition de l'ac3MH **3** sur la Boc-Lactone **1** (Figure 8).

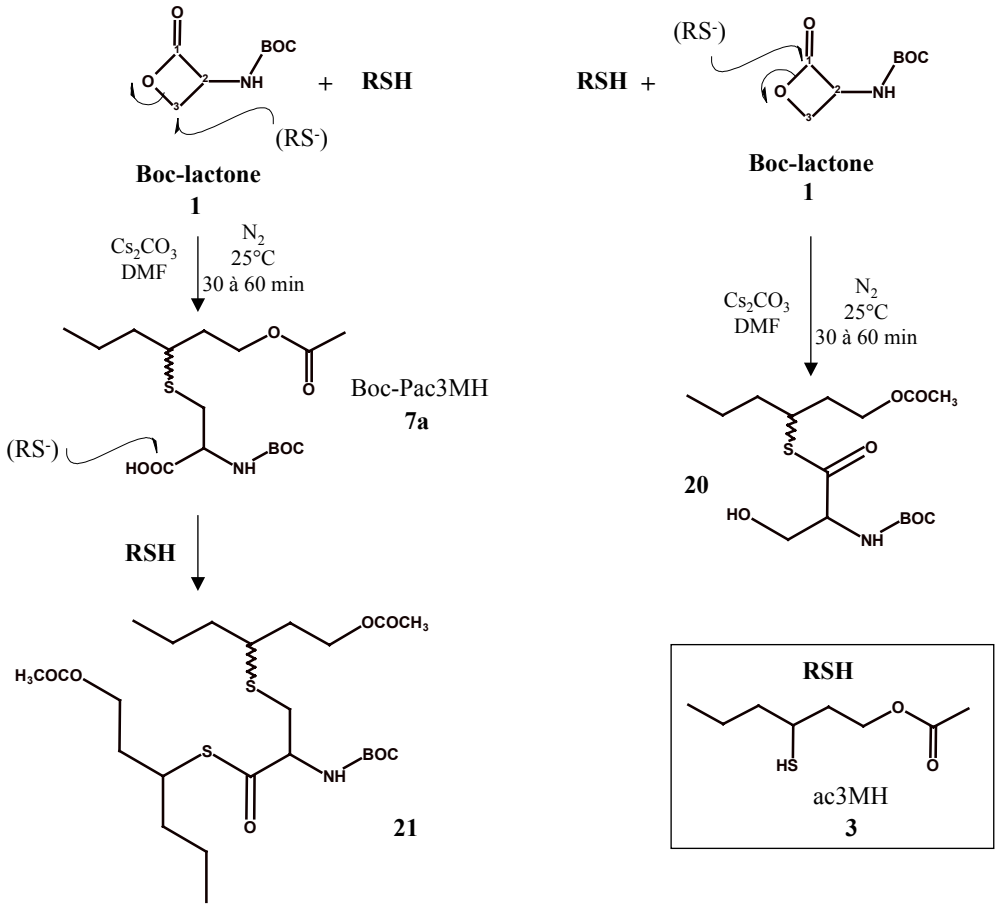


Figure 8 : Produits formés par l'addition de l'ac3MH **4** sur la Boc-lactone **1** selon les conditions d'Arnold e*t al.* (1985).

Le Boc-Pac3MH **7a** est aisément désacétylé dans le méthanol en présence de carbonate de potassium, mais le Boc-P3MH **8a** n'est pas obtenu avec une pureté suffisante et doit être purifié avant la dernière étape de déprotection (Figure 9).

Afin d'éviter une possible déshydratation du P3MH dans les conditions de déprotection, comme observé pour le 3MH **4** dans l'acide trifluoroacétique (TFA) à température ambiante, la déprotection a été effectuée dans le TFA en présence d'acide *p*-toluènesulfonique (PTS), permettant d'effectuer le déblocage dans des conditions plus douces (0°C, 10 min). Dans ces conditions, aucune déshydratation n'a été observée Ces conditions de déprotection permettent l'élimination rapide du groupement protecteur (Boc) de la fonction amine. Le Boc-SBC **6a** et les différents S-conjugués à la cystéine N-Boc protégés obtenus dans ce chapitre, ont été déprotégés dans ces conditions. Les S-conjugués à la cystéine obtenus après déprotection se présentent sous la forme de sels blancs d'acide *p*-toluènesulfonique stables et plus facilement manipulables que les huiles obtenues lorsque la déprotection est réalisée dans du dioxane/HCl (Wakabayashi *et al.*, 2004). Les réactions de déprotection des différents composés ont été réalisées sur de faibles quantités et donnent des rendements en sels isolés d'environ 50 %. Par

ailleurs, l'élimination complète du TFA est indispensable pour obtenir un produit cristallin après le lavage à l'éther.

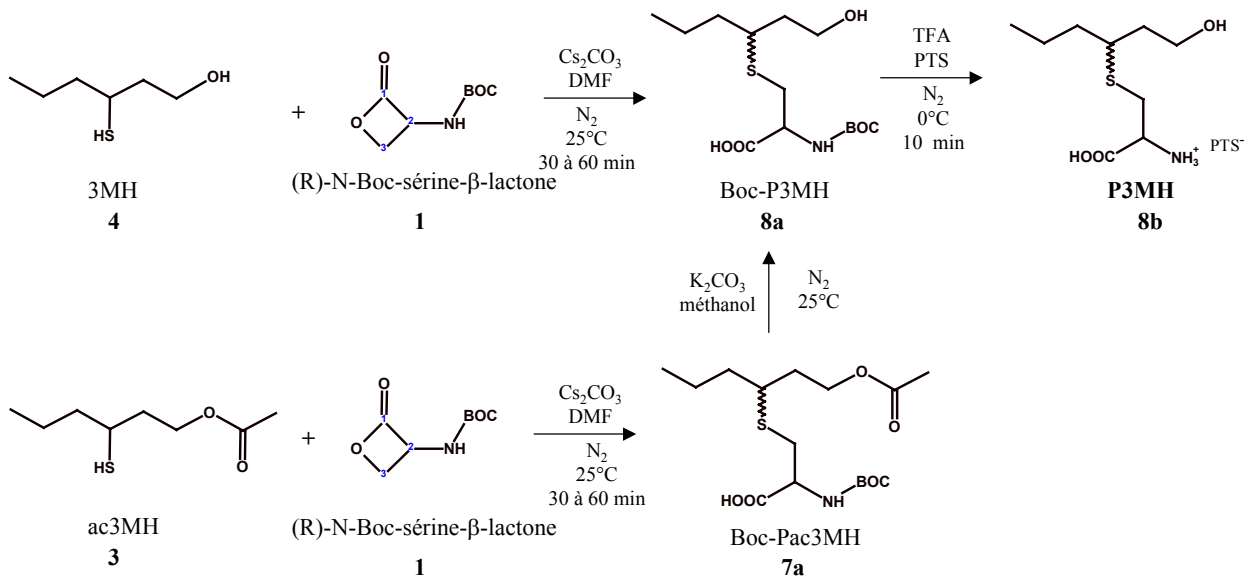


Figure 9 : Voies de synthèse du (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-cystéine **8b** à partir de la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone **1**.

L'intérêt de la voie d'addition de thiols sur la Boc-lactone **1** est de permettre également l'obtention d'isotopomères deutérés à partir des thiols variétaux deutérés synthétisés précédemment (Kotseridis *et al.*, 2000). Ainsi, l'addition de l'ac3MH-d_2 **3D** sur la Boc-lactone **1** nous a permis d'obtenir après désacétylation et déprotection, le P3MH-d_2 **8bD.** La structure du produit a été contrôlée par ^{1}H-RMN. La position du marquage et la pureté isotopique ont été vérifiées par l'absence complète du massif correspondant aux signaux à 3,75 ppm des protons du C n°1 porteurs du groupement hydroxyle, et la modification du massif des signaux des protons du C n°2 (Annexe 2).

b. Synthèse du (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-cystéine 9b (P4MMP)

L'addition de la 4MMP **5** sur la Boc-lactone **1** est réalisée dans les mêmes conditions que pour la synthèse du P3MH **8b** (Figure 10). La structure du produit majoritairement observé en CCM a été déterminée par ^{1}H-RMN, après purification par flash chromatographie, et correspond au Boc-P4MMP **9a** (Annexe 3).

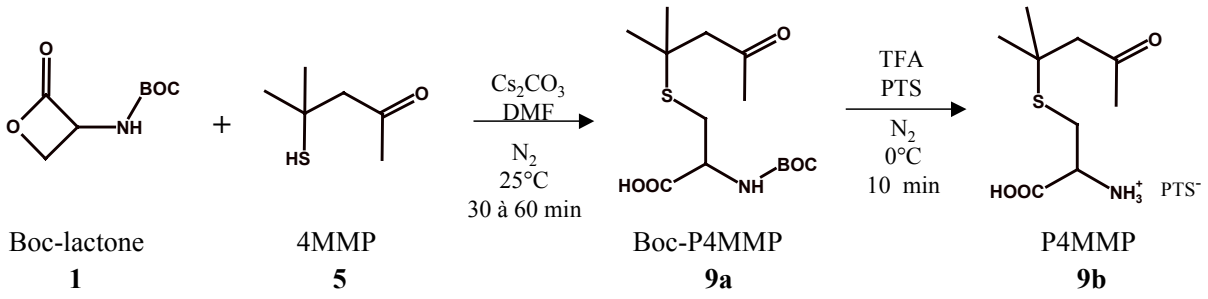


Figure 10 : Voie de synthèse du (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-cystéine (P4MMP) **9b** à partir de la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone **1**.

La synthèse du P4MMP deutéré **9bD** fait intervenir la 4MMP-d_{10} **5D** également synthétisée d'après les conditions de Kotseridis *et al.* (2000), mais le produit **9bD** obtenu après l'élimination du groupement protecteur de la fonction amine (Boc), comporte seulement 6 deutériums, situés sur les C n°5 et C n°6. La structure et la pureté isotopique du P4MMP-d_6 **9bD** ont été vérifiées par ^{1}H-RMN, dont les enregistrements témoignent de la présence du marquage sur les C n°5 et C n°6, par la perte des signaux des protons correspondants à 1,4 ppm (Annexe 3). Parmi les 10 deutériums de la 4MMP **5D**, ceux portés par les carbones n°1 et n°3 (Figure 11), sont en position énolisable et donc échangeables dans des conditions fortement acides ou basiques. Ainsi, à la première étape, cette perte de marquage ne peut s'effectuer que partiellement dans les conditions basiques de l'addition, du fait de la quantité limitée de source de protons (RSH, -NH). Elle intervient par contre fortement dans les conditions acides de la déprotection sur l'adduit deutéré **9aD**, où le TFA constitue une source importante de protons. L'intérêt de cet échange est de conduire à un composé isotopiquement stable, car les six deutériums portés par les C n°5 et C n°6 du composé **9bD** ne sont pas en position échangeable (Figure 11). L'analyse CPG-IE-SM confirme la présence d'un seul isotopomère, dont la plupart des fragments de haute masse se différencient de ceux du composé naturel par 6 unités de masse supplémentaires (cf. chapitre IV.1.2.2.2).

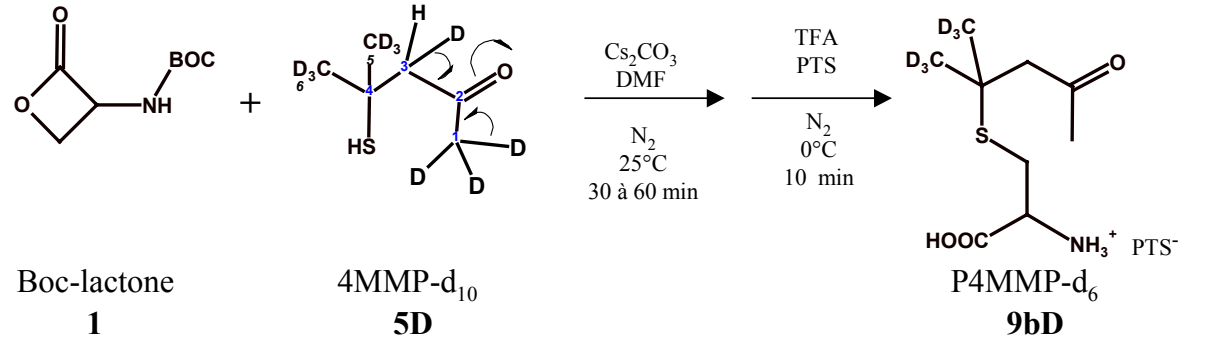


Figure 11 : Perte partielle du marquage au cours de la synthèse du [$^2H_6$]-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-cystéine (P4MMP-d_6) **9bD**.

IV.1.2.1.2. Synthèse de S-conjugués à la cystéine par addition 1,4 de Michael

L'addition de la (R)-cystéine **11b** sur l'(*E*)-2-hexénal **12** et l'oxyde de mésityle **13**, selon la réaction en 1,4 de type Michael, est la voie la plus utilisée pour la synthèse du P3MH et du P4MMP (Tominaga *et al.*, 1998b; Wakabayashi *et al.*, 2004). Cependant l'utilisation de la Boc-cystéine **11a** pour l'addition sur l'(*E*)-2-hexénal **12** présente 2 avantages (Figure 12). D'une part, cela permet d'éliminer la réactivité de l'amine entraînant la formation de produits secondaires majoritaires, et d'autre part ce groupement protecteur permet de solubiliser le produit d'addition dans les solvants organiques et de le stabiliser, ce qui facilite sa purification (Wakabayashi *et al.*, 2004).

Ainsi l'addition de la (R)-Boc-cystéine **11a** commerciale sur l'oxyde de mésityle **13** en milieu basique permet d'obtenir le Boc-P4MMP **9a** (Figure 12). La réaction à partir de la cystéine est décrite comme lente (Starkenmann, 2003), ainsi l'oxyde de mésityle **13**, peu stable en milieu basique est régulièrement rajouté dans le milieu jusqu'à disparition de la Boc-cystéine **11a** contrôlée par CCM.

L'addition en 1,4 de Michael permet d'obtenir le Boc-P3MH **8a** et le Boc-P4MMP **9a** avec de meilleurs rendements que via l'addition de thiols sur la lactone. En revanche, elle est limitée pour la synthèse des analogues marqués qui nécessitent l'utilisation de l'(*E*)-2-hexénal et l'oxyde de mésityle marqués. Or à notre connaissance, ces produits ne sont pas commerciaux et leur synthèse est délicate (Kotseridis *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2006), ce qui est d'autant plus problématique pour l'oxyde de mésityle utilisé en large excès.

Toutefois, la synthèse de l'[$^2H_8$]-(*E*)-2-hexénal selon les conditions décrites par Schneider *et al.* (2006), nous a permis d'obtenir le Boc-P3MH-d_8, par addition de la Boc-cystéine **11a** et réduction au $NaBH_4$. Le spectre de masse de son dérivé majoritairement obtenu par dérivatisation à l'éthyl chloroformate, montre que l'[$^2H_8$]-(*E*)-2-hexénal de départ est un mélange des isotopomères M+8 et M+7, qui se retrouve sur le produit d'addition. Néanmoins, le Boc-P3MH-d_8 est isotopiquement stable, car les deutériums ne sont pas en position échangeable dans ce composé. Après l'étape de déprotection, le P3MH-d_8 obtenu sous forme de sels de PTS, peut être utilisé de la même manière que le P3MH-d_2 pour le dosage en dilution isotopique.

Par ailleurs, la réduction en milieu deutéré de l'adduit **15a**, le Boc-P3MHal, permet d'obtenir le Boc-P3MH-d_1, utilisé précédemment comme standard interne deutéré (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000), mais la différence de masse avec le produit naturel n'est que d'une

unité de masse. Les ions du P3MH-d_1 obtenu après dérivatisation sont donc naturellement présents dans le spectre de masse du composé naturel, ce qui implique une calibration non linéaire, rendant la quantification plus délicate.

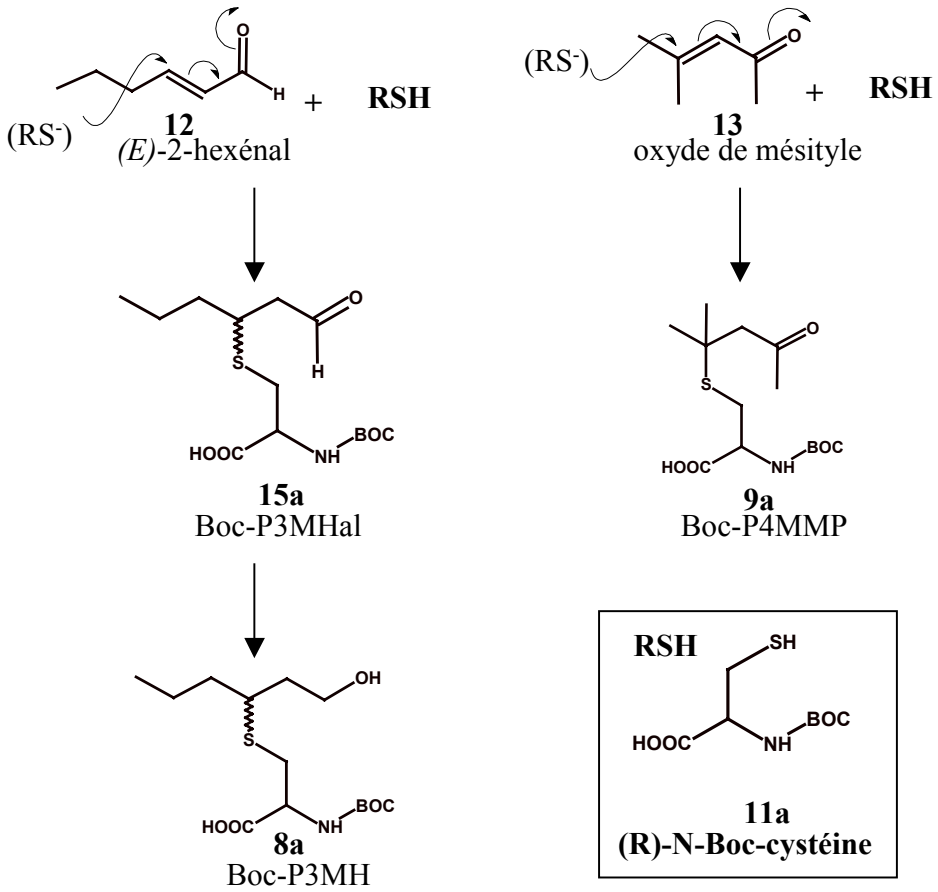


Figure 12 : Voie de formation du Boc-P3MH **8a** et du Boc-P4MMP **9a** par addition de la Boc-cystéine **11a** sur l'(*E*)-2-hexénal **12** et l'oxyde de mésityle **13**.

IV.1.2.2. Etude de la dérivatisation des précurseurs cystéinylés

Des dérivés analogues aux S-conjugués à la cystéine du raisin existent chez certains végétaux. Ainsi, chez différentes espèces d'alliacées, on trouve une grande diversité de S-alk(en)ylcystéine sulfoxydes (Kubec *et al.*, 1999, 2000; Kubec et Musah, 2001; Kubec *et al.*, 2002; Lee et Harnly, 2005), qui sont également des précurseurs d'arômes. Parmi les méthodes disponibles pour leur dosage, comme pour la P4MMP et le P3MH, on distingue les méthodes indirectes et les méthodes directes. Ces dernières utilisent la CPG, dont la résolution et la sensibilité constituent un véritable avantage pour l'analyse de composés à l'état de traces (Kubec *et al.*, 1999; Murat *et al.*, 2001b). Ces méthodes impliquent alors une étape de dérivatisation qui permet d'analyser en CPG des composés initialement non volatils et thermosensibles.

Dans ce travail, différentes méthodes ont été testées pour dérivatiser le P3MH, le P4MMP et le SBC. Puis, les conditions de dérivatisation à l'éthylchloroformate retenues ont été modifiées pour la dérivatisation du P3MH et de la P4MMP, afin d'augmenter la sensibilité de la détection.

IV.1.2.2.1. Triméthylsilylation

a. Dérivatisation du P3MH

La caractérisation des dérivés triméthylsilylés du P3MH et du P4MMP a déjà été décrite (Tominaga et Dubourdieu, 2000; Starkenmann, 2003), cependant nous avons observé certains problèmes lors de la dérivatisation par triméthylsilylation de ces 2 composés.

Ainsi, la dérivatisation du P3MH **8** par triméthylsilylation conduit dans nos conditions à 2 dérivés majeurs (Figure 13A et B). Le premier dérivé TMS **8-1$_{TMS}$** est un mélange de diastéréoisomères presque coélués. Le deuxième dérivé **8-2$_{TMS}$** correspond au dérivé triméthylsilylé du P3MH déjà décrit (Tominaga *et al.*, 1998b; Wakabayashi *et al.*, 2004). Le premier dérivé **8-1$_{TMS}$** est nécessairement un dérivé du P3MH **8** car l'utilisation du P3MH-d$_2$ **8D**, conduit à la formation de son analogue deutéré **8D-1$_{TMS}$** (Figure 15B et C).

La comparaison des proportions des dérivés formés par triméthylsilylation du P3MH **8** montre que d'une dérivatisation à l'autre, les proportions entre les deux dérivés du P3MH, **8-1$_{TMS}$** et **8-2$_{TMS}$**, peuvent largement varier (Figure 13). De plus, compte tenu de la fragmentation de la molécule (Figure 14), dans le cas du P3MH-d$_2$ **8D** que nous avons synthétisé, le marquage n'est pas présent sur l'ion parent 218, mais seulement sur des ions

dont l'abondance est faible en comparaison de celle du fragment 218. Ceci limite la sensibilité de détection du composé en CPG-IE-SM.

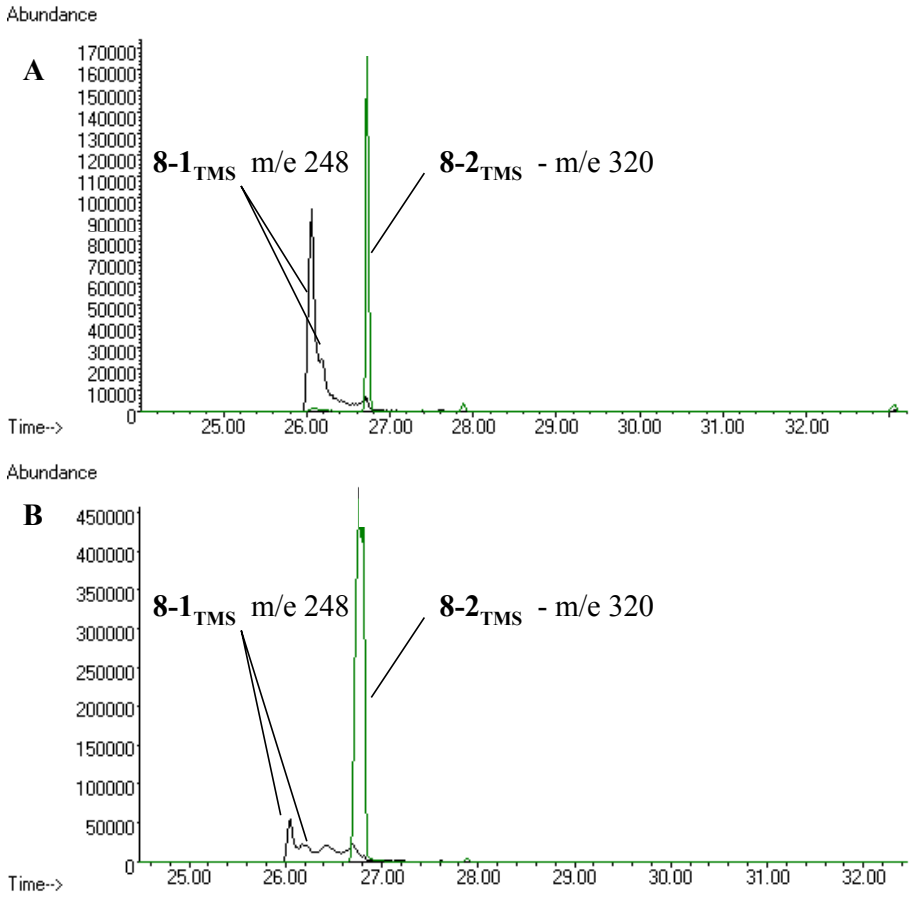


Figure 13 : Chromatogrammes (extraction des ions m/e 248 et m/e 320) en CPG-IE-SM de 2 essais dans les mêmes conditions de triméthylsilylation du P3MH **8**.

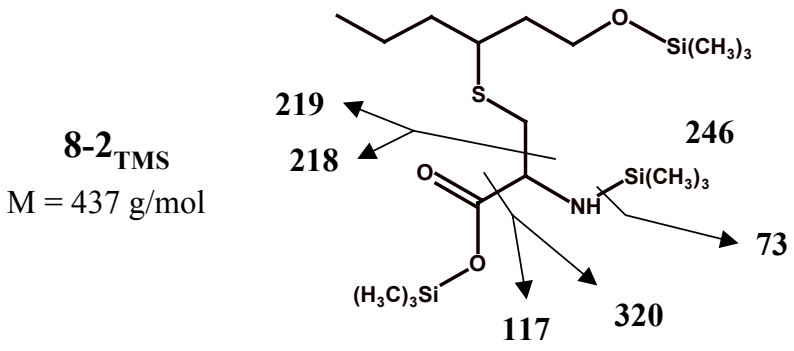


Figure 14 : Schéma de fragmentation du dérivé **8-2**$_{TMS}$ issu de la dérivatisation par triméthylsilylation du P3MH **8**.

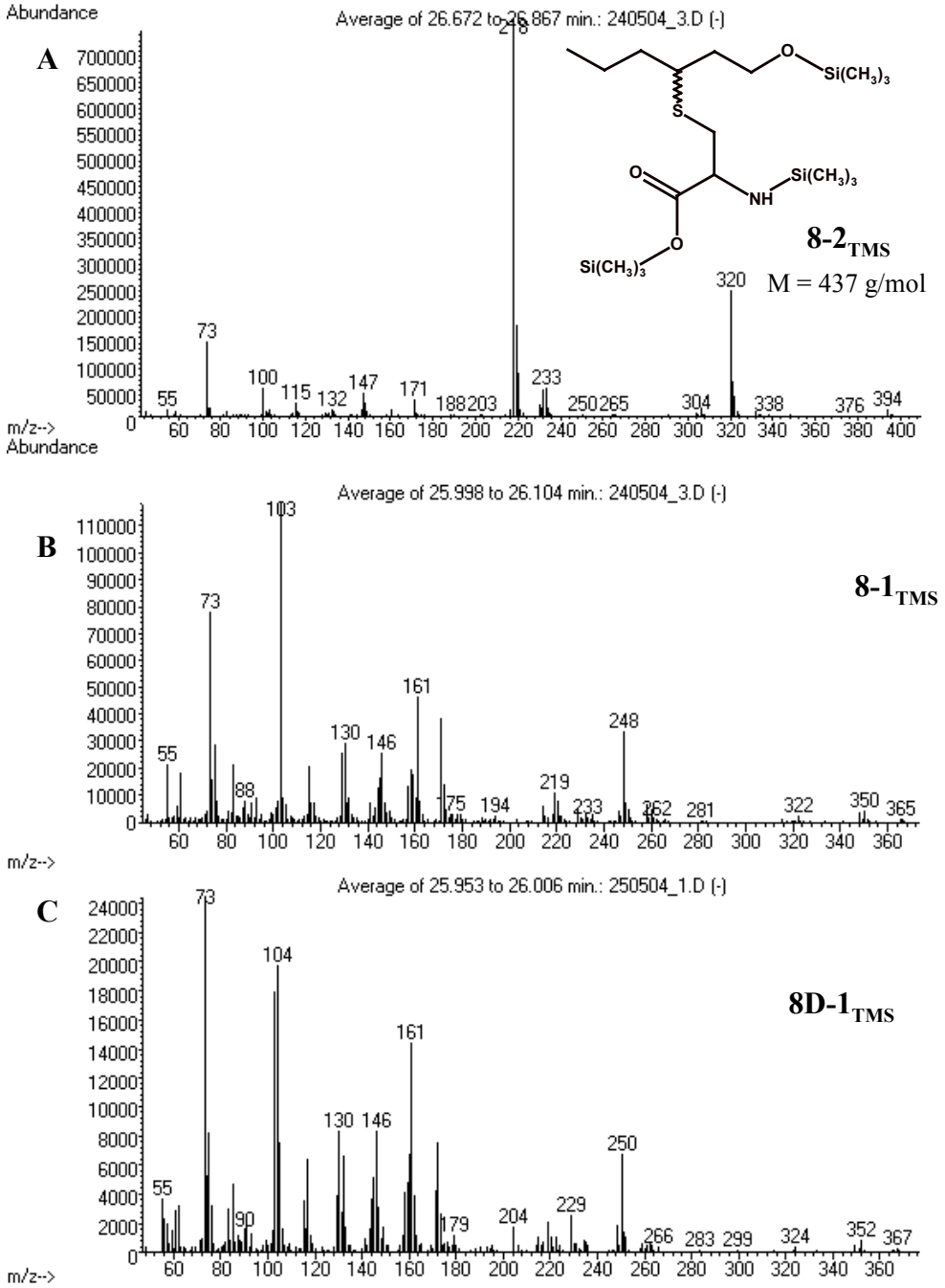


Figure 15 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés **8-1$_{TMS}$, 8D-1$_{TMS}$** et **8-2$_{TMS}$**, issus de la dérivatisation par triméthylsilylation du P3MH **8**.

b. Dérivatisation du P4MMP

Deux spectres de masse différents ont été décrits dans la littérature pour le dérivé triméthylsilylé de la P4MMP **9**, pourtant obtenus dans les mêmes conditions. Le premier, présenté dans la Figure 16A, a été publié par Tominaga *et al.* (1998b), qui lui a attribué la structure **9-2$_{TMS}$** (Figure 17). Le second (**9-1$_{TMS}$**), présenté dans la Figure 17, a été publié plus récemment par Starkenmann *et al.* (2003), qui n'a pas souligné la différence du spectre obtenu à ce celui décrit par Tominaga *et al.* (1998b ; Figure 16B).

En ce qui nous concerne, des conditions de dérivatisation similaires du P4MMP **9** que nous avons synthétisé ont conduit à la formation simultanée de 2 dérivés, dont les spectres de masse correspondent aux 2 dérivés TMS décrits ci-dessus (**9-1$_{TMS}$**, **9-2$_{TMS}$**), démontrant la difficulté d'une dérivatisation univoque du P4MMP. De plus, le dérivé **9-1$_{TMS}$** est composé de 2 isomères (7 % / 93 %), mal séparés dans nos conditions chromatographiques.

L'étude des spectres de masse montre que le dérivé **9-2$_{TMS}$** correspond au dérivé triméthylsilylé du P4MMP **9**, sans modification du squelette initial, comme décrit par Tominaga *et al.* (1998 ; Figure 16A). En revanche, le produit **9-1$_{TMS}$** pourrait correspondre au produit de cyclisation proposé ci-dessous (Figure 16B). Ce produit résulterait de l'addition nucléophile intramoléculaire de l'amine sur le carbonyle, comme cela a été décrit par Starkenmann *et al.* (2003) lors de la réduction en milieu basique du P4MMP **9**.

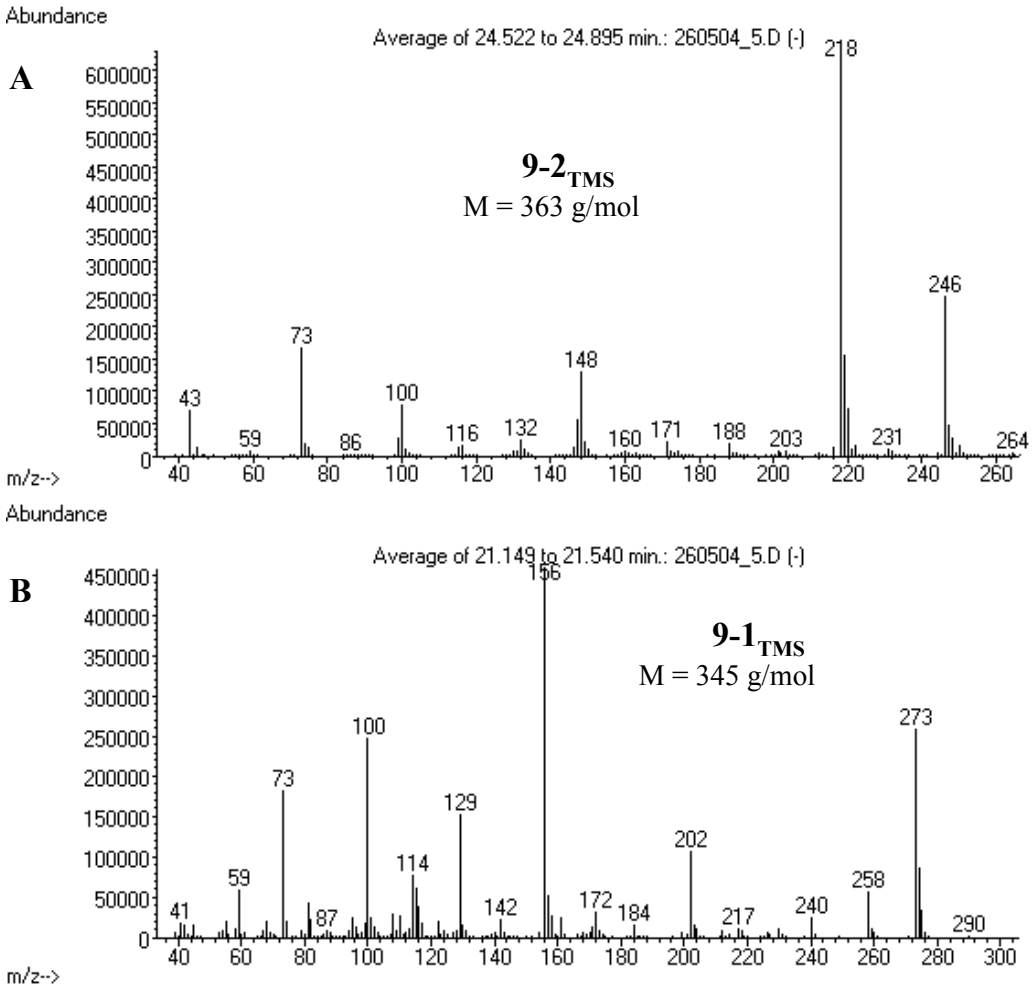
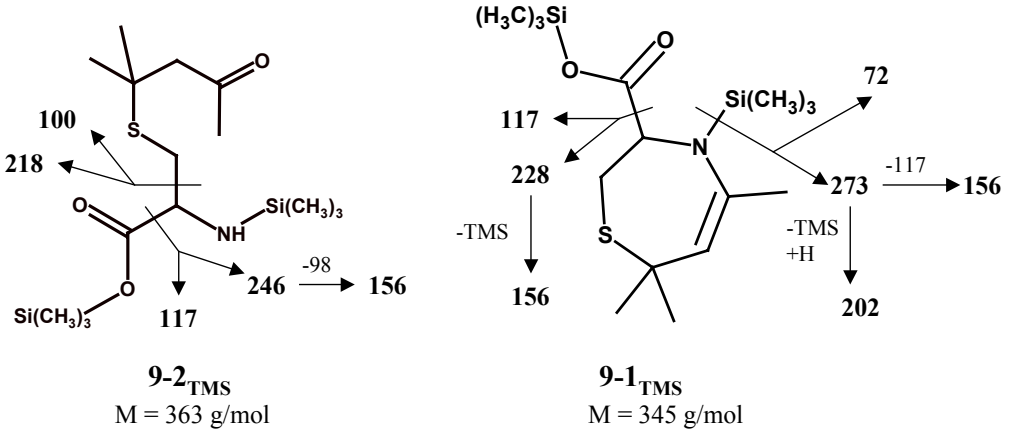


Figure 16 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés **9-1$_{TMS}$** et **9-2$_{TMS}$** issus de la dérivatisation par triméthylsilylation du P4MMP **9**.



9-2$_{TMS}$
M = 363 g/mol

9-1$_{TMS}$
M = 345 g/mol

Figure 17 : Schéma de fragmentation des dérivés **9-1$_{TMS}$** et **9-2$_{TMS}$** issus de la dérivatisation par triméthylsilylation du P4MMP **9**.

Ainsi, la triméthylsilylation de la P4MMP et du P3MH n'est pas répétable, et comme cela a été signalé pour d'autres dérivés d'acides aminés, les sensibilités et la résolution obtenues sont moins performantes en triméthylsilylation qu'en dérivatisation à l'éthylchloroformate (Hayashi *et al.*, 1993). De plus, les composés triméthylsilylés obtenus sont très sensibles à la présence d'eau, particulièrement en présence de traces d'acide, contrairement aux dérivés obtenus à l'éthylchloroformate.

IV.1.2.2.2. Dérivatisation à l'éthyl chloroformate (ECF)

a. Dérivatisation à l'éthylchloroformate (Kubec *et al.*, 1999)

Les conditions initiales de dérivatisation à l'éthylchloroformate pour l'analyse de S-alk(en)ylcystéines sulfoxydes (Husek, 1991), ont été reprises pour la dérivatisation de divers dérivés d'acides aminés (Kubec *et al.*, 1999, 2000; Kubec et Musah, 2001; Lee et Harnly, 2005). Pour la dérivatisation du P4MMP et du P3MH, nous avons utilisé dans un premier temps, les conditions de dérivatisation à l'éthylchloroformate/éthanol proposées par Kubec *et al.* (1999), dont le schéma réactionnel est présenté Figure 18. Dans ces conditions, la fonction acide activée en anhydride mixte par le chloroformate est estérifiée par l'éthanol, et la fonction amine est transformée en éthyluréthane par réaction avec le chloroformate.

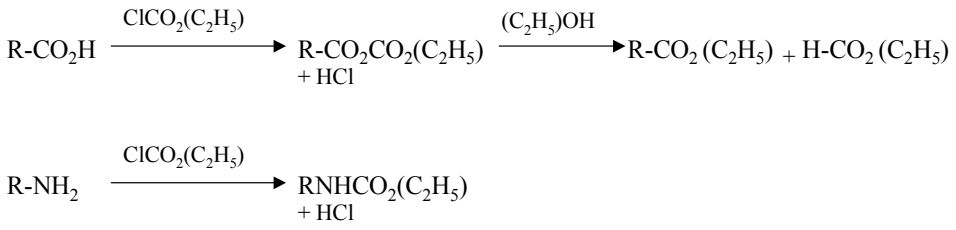


Figure 18 : Réactivité des fonctions amine et acide carboxylique avec l'éthylchloroformate

Dans ces conditions, le P4MMP et son isotopomère (P4MMP-d_6) conduisent à la formation d'un seul dérivé, **9-3$_{ECF}$** et **9D-3$_{ECF}$**, partiellement résolus en CPG (Figure 19). La structure du dérivé naturel **9-3$_{ECF}$** a été déterminée par ^{1}H-RMN (cf. Annexe 3), après dérivatisation d'une quantité préparative de P4MMP et purification par flash-chromatographie. Le dérivé **9-3$_{ECF}$** correspond au P4MMP dérivatisé sans modification du squelette de base (Figure 21). Le P4MMP-d_6 conduit de la même façon au produit **9D-3$_{ECF}$**, qui n'est pas complètement séparé du dérivé **9-3$_{ECF}$** dans nos conditions chromatographiques. Leurs spectres de masse présentés sur la Figure 20A et la Figure 20B, sont compatibles avec la structure proposée (Figure 21).

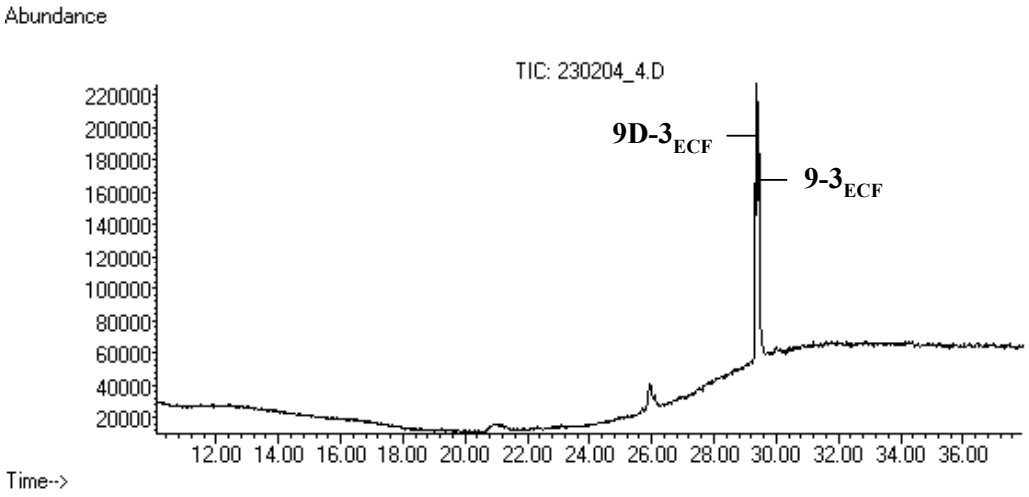


Figure 19 : Chromatogramme des dérivés **9-3$_{ECF}$** et **9D-3$_{ECF}$** issu de la dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP **9** et du P4MMP-d_6 **9D** dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

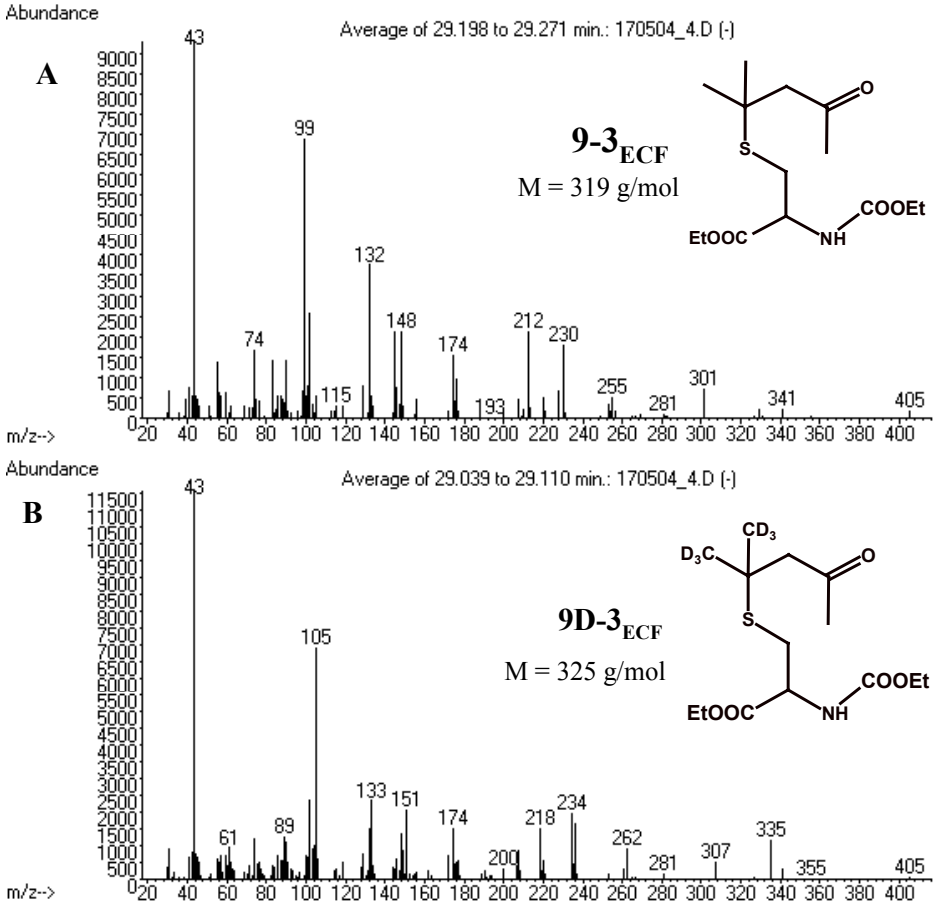


Figure 20 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés **9-3$_{ECF}$** et **9D-3$_{ECF}$** formés respectivement par dérivatisation du P4MMP **9** et du P4MMP-d$_6$ **9D** à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

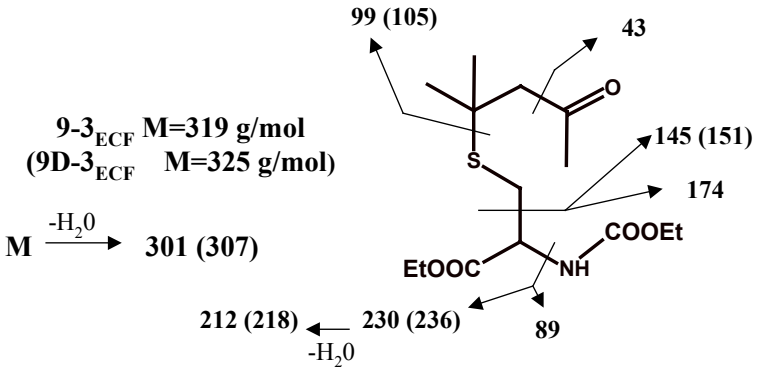


Figure 21 : Schéma de fragmentation des dérivés **9-3$_{ECF}$** et **9D-3$_{ECF}$** issus de la dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP **9** et du P4MMP-d$_6$ **9D** formés par dérivatisation à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

Dans les mêmes conditions, à partir du P3MH **9** et de son analogue deutéré (P3MH-d_2 **9D)**, l'analyse chromatographique révèle pour chacun des isotopomères, les deux mêmes dérivés: les isomères du dérivé **8-1$_{ECF}$** (**8D-1$_{ECF}$** pour l'analogue deutéré) et le dérivé **8-2$_{ECF}$** (**8D-2$_{ECF}$** pour l'analogue deutéré). Le dérivé**8-2$_{ECF}$** est largement majoritaire et correspond d'après son spectre de masse au P3MH dérivatisé sans modification du squelette de base, comme pour le dérivé **9-3$_{ECF}$** du P4MMP (Figure 22 et Figure 23).

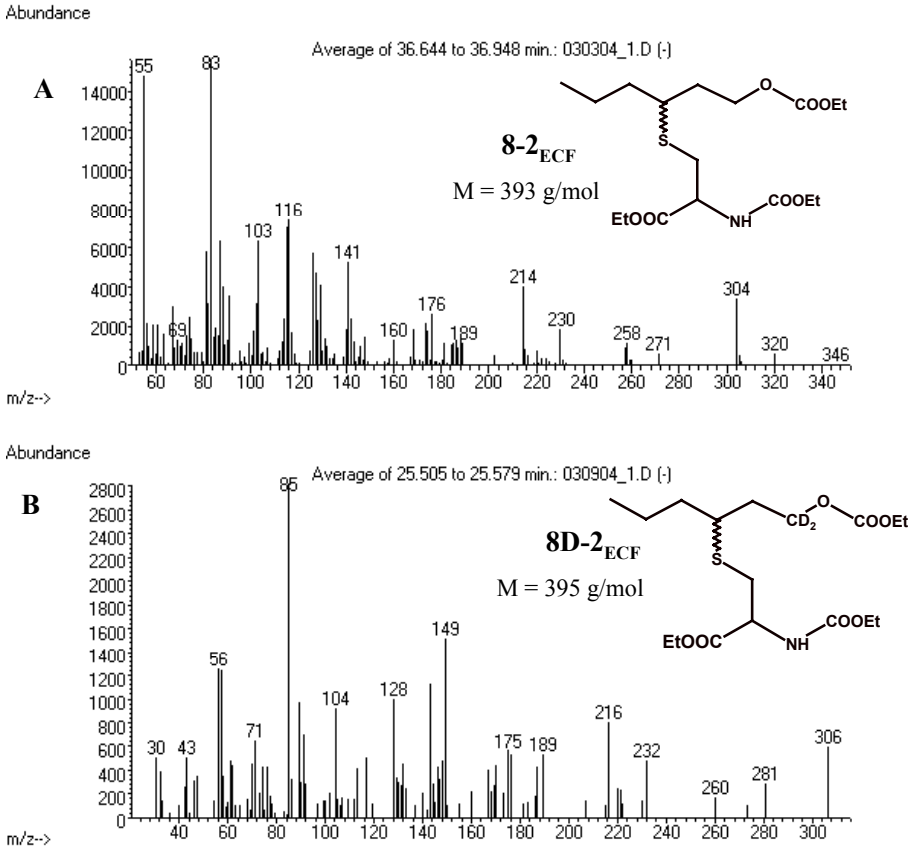


Figure 22 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés **8-2$_{ECF}$** et **8D-2$_{ECF}$** formés respectivement par dérivatisation du P3MH **8** et du P3MH-d_2 **8D** à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

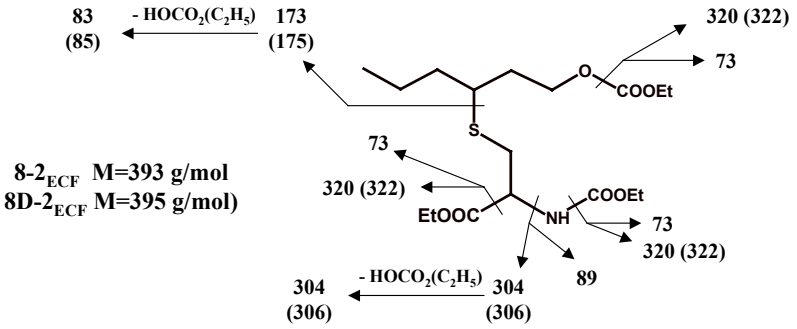


Figure 23 : Schéma de fragmentation des dérivés **8-2$_{ECF}$** et **8D-2$_{ECF}$** formés respectivement par dérivatisation à l'éthylchloroformate du P3MH **8** et du P3MH-d_2 **8D**, dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

Les 2 isomères du dérivé naturel **8-1$_{ECF}$** et deutéré **8D-1$_{ECF}$** correspondent à 2 diastéréoisomères dont les spectres de masse sont compatibles avec les structures cycliques proposées (Figure 24). Ils seraient obtenus par estérification intramoléculaire de la fonction acide activée par l'anhydride mixte, par la fonction alcool (Figure 25). Les 2 isomères **8-1$_{ECF}$** pourraient correspondre à des diastéréoisomères. Ils sont séparés dans nos conditions chromatographiques, ce qui n'est pas le cas des diastéréoisomères du composé **8-2$_{ECF}$**, qui sont coélués.

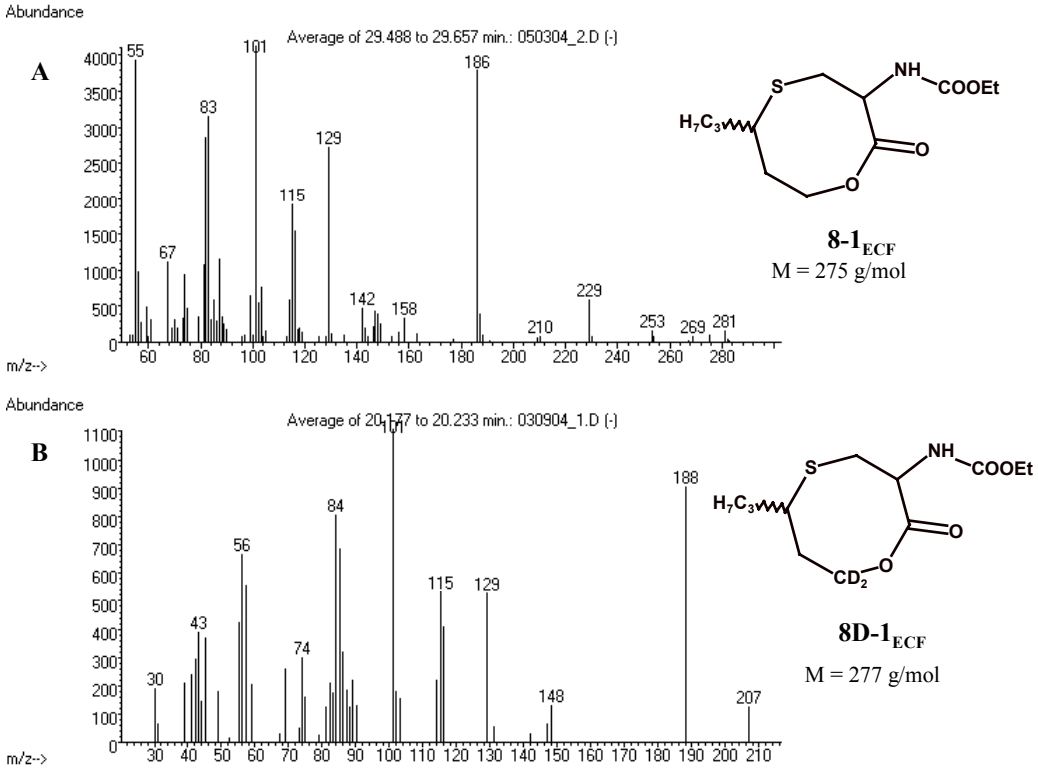


Figure 24 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés **8-1$_{ECF}$** et **8D-1$_{ECF}$** formés respectivement par dérivatisation du P3MH **8** et du P3MH-d$_6$ **8D** à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

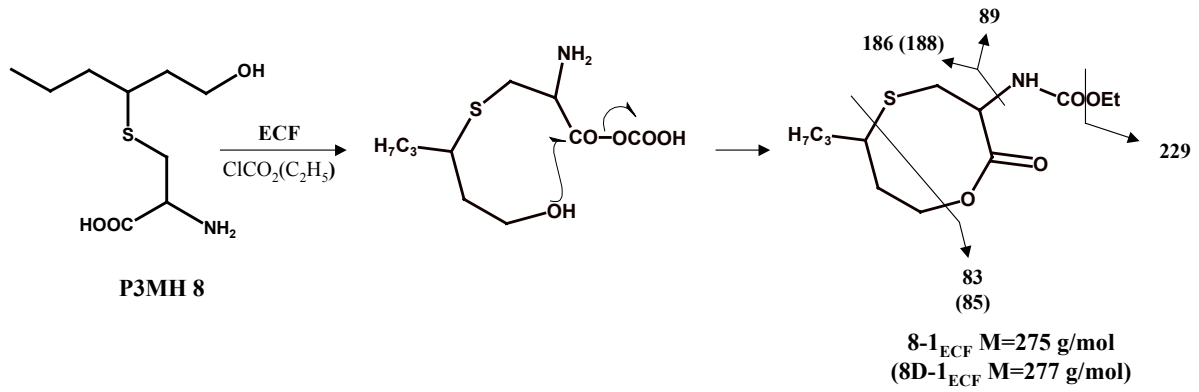


Figure 25 : Schéma réactionnel et fragmentation des dérivés **8-1$_{ECF}$** et **8D-1$_{ECF}$** formés respectivement par dérivatisation à l'éthylchloroformate du P3MH **8** et du P3MH-d_2 **8D** dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

Comme attendu, un seul dérivé est obtenu par dérivatisation du (R)-S-benzylcystéine **6b** (Figure 27). Son spectre de masse se distingue par la présence des ions m/e 91 et m/e 222 très abondants (Figure 26).

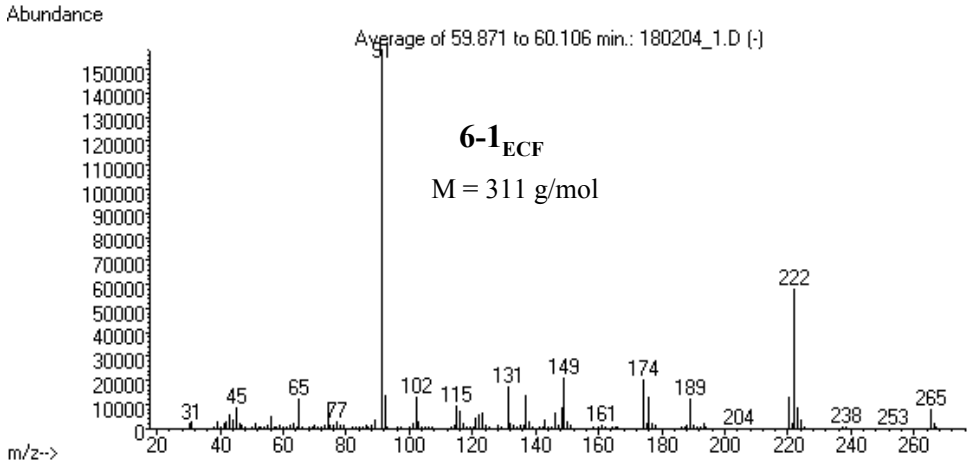


Figure 26 : Spectre de masse en impact électronique (IE) du dérivé **6-1$_{ECF}$** formé par dérivatisation du SBC **6** à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

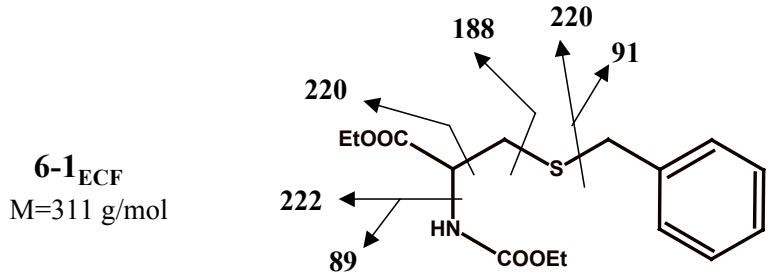


Figure 27 : Schéma de fragmentation du dérivé **6-1$_{ECF}$** formés par dérivatisation à l'éthylchloroformate du SBC **6** dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999).

La dérivatisation à l'éthylchloroformate est utilisée pour la dérivatisation de S-alk(en)ylcystéine sulfoxydes présents dans diverses espèces végétales, et dont les teneurs totales représentent jusqu'à 1 % en poids du matériel végétal frais (Kubec *et al.*, 2000; Kubec et Musah, 2001). En comparaison, le P3MH et le P4MMP, dosés dans des jus de raisin sont à l'état de traces, ce qui nécessite de modifier les conditions de dérivatisation pour l'amélioration des rendements et donc de la sensibilité de détection des produits dérivatisés. Pour cela, nous avons modifié le milieu de la réaction, notamment en jouant sur les quantités d'eau et de pyridine.

b. Modification des conditions de dérivatisation à l'éthylchloroformate

Les principales conditions testées sont présentées dans le Tableau 10, ci-dessous.

Tableau 10 : Comparaison des différentes conditions de dérivatisation du P3MH et du P4MMP à l'éthylchloroformate (% = aire d'un dérivé/somme des aires de tous les dérivés)

	Conditions de dérivatisation	**P3MH (8)**		**P4MMP (9)**		
		dérivé 8-1$_{ECF}$	**dérivé 8-2$_{ECF}$**	**dérivé 9-1$_{ECF}$**	**dérivé 9-2$_{ECF}$**	**dérivé 9-3$_{ECF}$**
1	H_2O/éthanol/pyridine (300 µL; 60/32/8) (Kubek, *et al.,* 1999)	10%	90%	-	-	100%
2	pyridine seule (300 µL)	34%	66%	46%	32%	22%
3	pyridine seule (300 µL) et ajout de 64 µL d'éthanol à T0+1min	34%	66%	24%	67%	9%

Par rapport aux conditions 1 (Kubec *et al.*, 1999), l'utilisation de la pyridine seule (conditions 2) entraîne la formation d'autres dérivés du P4MMP, **9-1$_{ECF}$** et **9-2$_{ECF}$**, différents du dérivé **9-3$_{ECF}$** qui devient minoritaire (Figure 28). Pour le P3MH **8**, les mêmes composés observés dans les conditions 1 sont formés, mais les isomères du dérivé **8-1$_{ECF}$** représentent 34 % des dérivés formés au lieu de 10 % dans les conditions 1 (Figure 29).

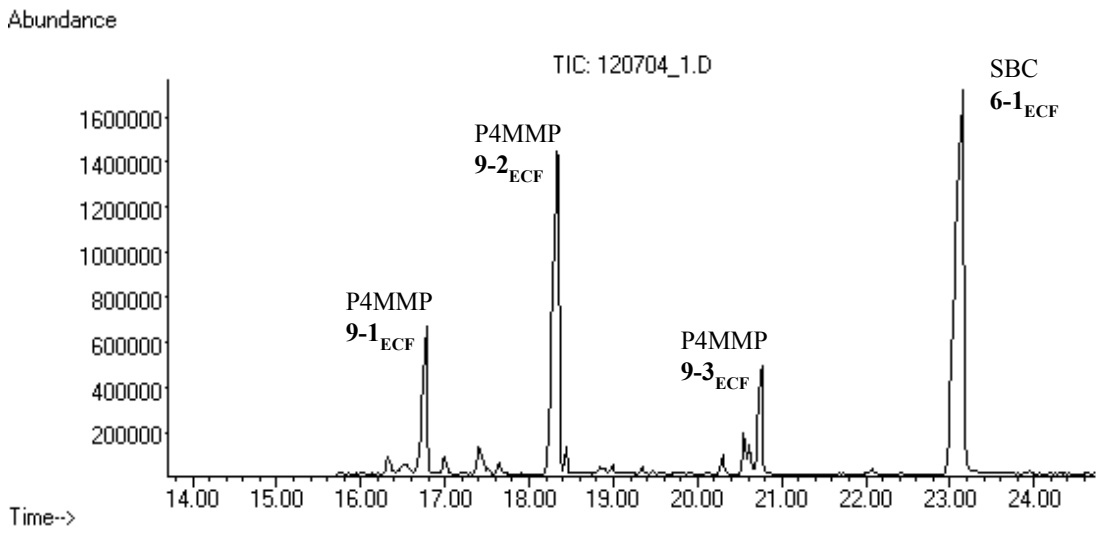


Figure 28 : Chromatogramme des dérivés issus de la dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP **9** et du dérivé du SBC **6** utilisé comme étalon (conditions 2).

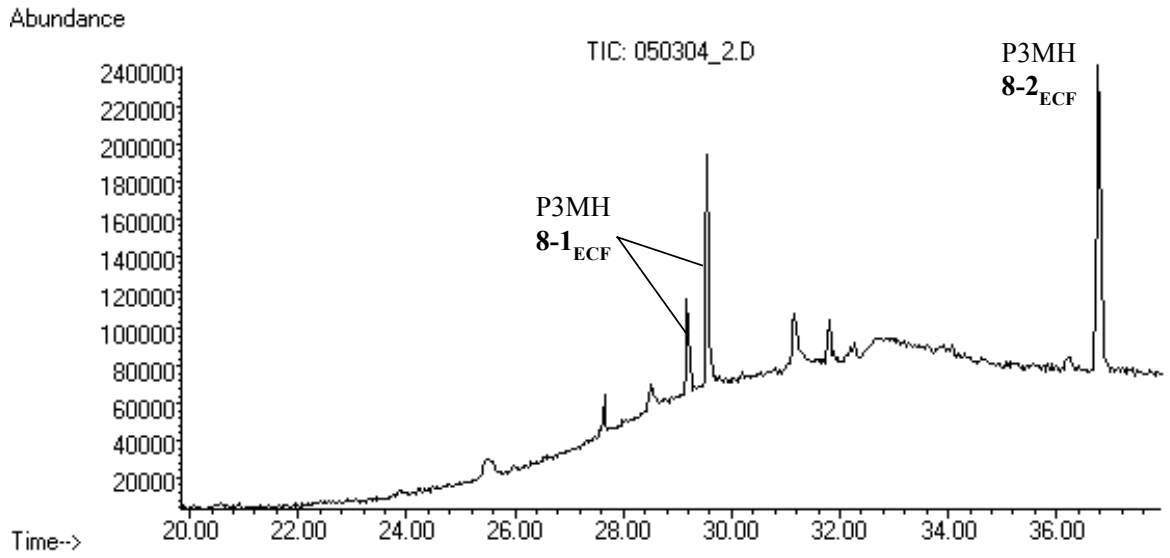


Figure 29 : Chromatogramme des dérivés **8-1$_{ECF}$** et **8-2$_{ECF}$** issus de la dérivatisation à l'éthylchloroformate du P3MH **8** (conditions 2 et 3).

Dans les conditions 2, l'absence d'éthanol et la basicité du solvant de dérivatisation limitent l'estérification de l'acide par l'éthanol, et favorisent l'addition nucléophile intramoléculaire de l'amine sur le groupe carbonyle, conduisant au dérivé **9-2$_{ECF}$** dont le spectre de masse est présenté Figure 30, avec celui de son isotopomère. Cette structure thiazépine est par ailleurs compatible avec son spectre de masse (Figure 31). Il faut noter que l'estérification conduisant au dérivé **9-3$_{ECF}$** est possible car l'éthanol se forme dans le milieu par dégradation de l'éthylchloroformate avec l'eau générée par la formation de l'imine. L'autre produit formé est le dérivé **9-1$_{ECF}$**, qui regroupe 2 isomères coélués (Figure 32). Sa structure correspond à une thiazolidine, qui proviendrait soit d'un réarrangement

intramoléculaire de la 1,4 thiazépine, soit d'une réaction rétro-Michael libérant de la cystéine et de l'oxyde de mésityle à partir de la forme ouverte et addition de cette cystéine sur le groupe carbonyle de l'oxyde de mésityle. Parallèlement, la même répartition des dérivés formés est observée pour la dérivatisation du P4MMP-d_6 **9D**, ce qui nous a permis de proposer des structures chimiques pour chacun des dérivés, à partir de leurs spectres de masse.

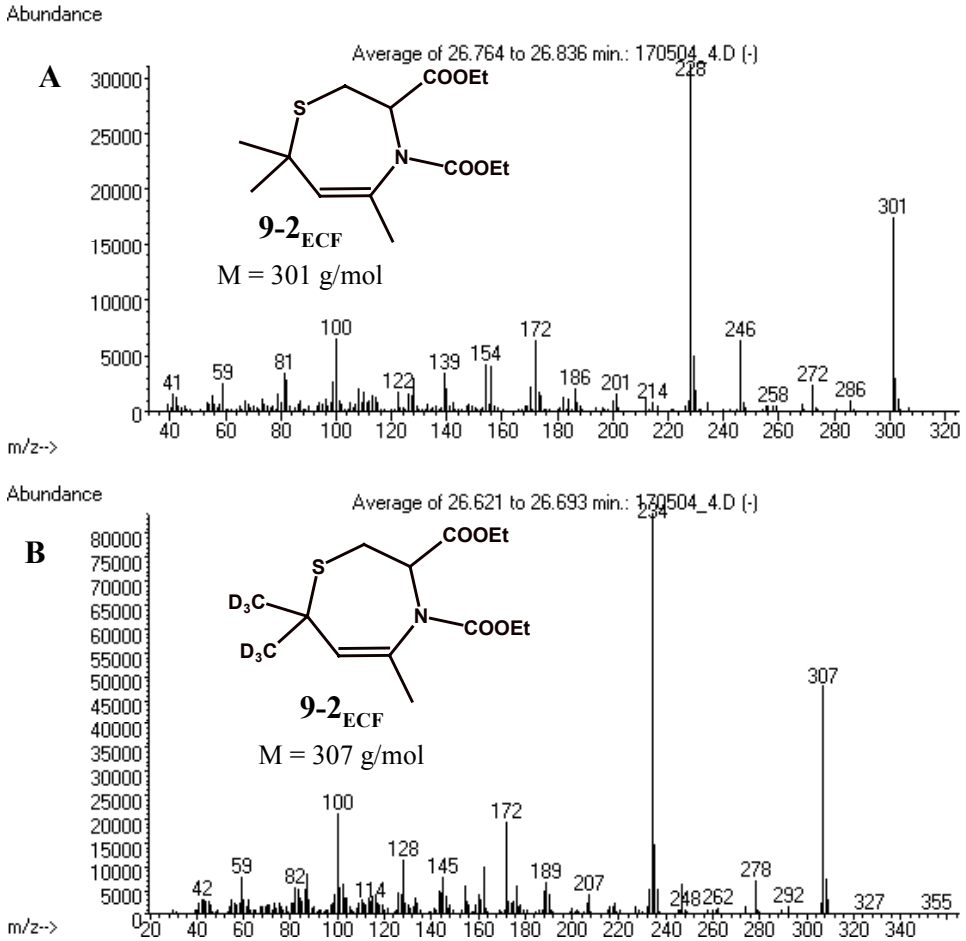


Figure 30 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés **9-2$_{ECF}$** et **9D-2$_{ECF}$** formés par dérivatisation du P4MMP **9** et du P4MMP-d_6 **9D** à l'éthylchloroformate (conditions 2 et 3).

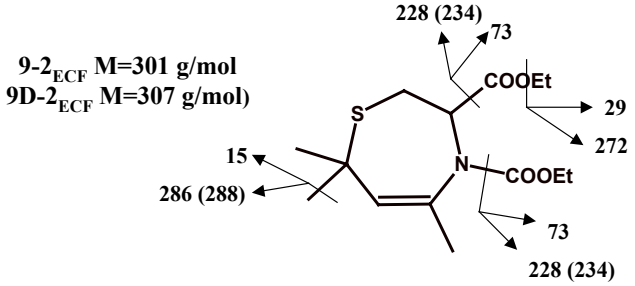


Figure 31 : Schéma de fragmentation des dérivés **9-2$_{ECF}$** et **9D-2$_{ECF}$** formés par dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP **9** et du P4MMP-d_6 **9D** (conditions 2 et 3).

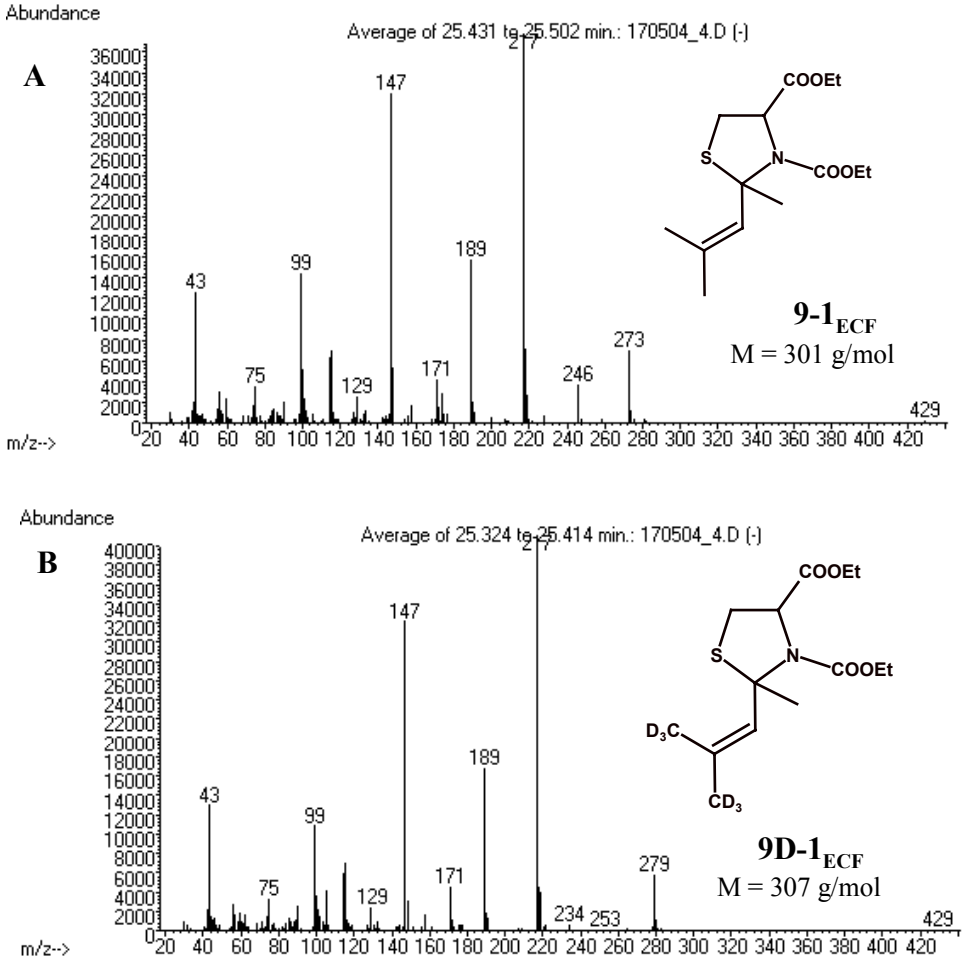


Figure 32 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés **9-1$_{ECF}$** et **9D-1$_{ECF}$** formés par dérivatisation du P4MMP **9** et du P4MMP-d$_6$ **9D** à l'éthylchloroformate (conditions 2 et 3).

A priori, la formation de dérivés multiples n'est pas favorable puisqu'elle limite la sensibilité de l'analyse en CPG-SM. Cependant le dérivé **9-2$_{ECF}$** présente plusieurs avantages d'un point de vue analytique. Son spectre de masse est caractérisé par la présence de 2 ions majoritaires, m/e 228 et m/e 301, entièrement marqués dans le spectre de masse de son isotopomère **9D-2$_{ECF}$** (m/e 234 et m/e 307). Quant au spectre du dérivé **9-3$_{ECF}$**, les ions majoritaires m/e 43 et m/e 99 sont de faibles masses et non spécifiques, ce qui limite les possibilités de leur détection sélective dans un milieu complexe. Quant aux ions de haute masse, ils sont de faible abondance, ce qui serait défavorable à la sensibilité de détection. Ainsi, le dérivé **9-2$_{ECF}$** apparaît le plus intéressant pour envisager le dosage de la P4MMP, aux faibles teneurs observées dans les moûts (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000; Murat *et al.*, 2001a; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002a).

Ainsi, les conditions de dérivatisation ont été encore modifiées de façon à favoriser la formation du dérivé **9-2$_{ECF}$**. Pour cela, l'ajout d'éthanol au cours de la réaction de

dérivatisation du P4MMP permet de doubler les quantités formées du dérivé **9-2$_{ECF}$**, tout en réduisant de moitié la formation des dérivés **9-1$_{ECF}$** et **9-2$_{ECF}$** (Tableau 10). Par ailleurs, par rapport aux conditions 2, ces dernières conditions n'affectent pas les rendements de formation du dérivé **8-2$_{ECF}$** du P3MH. Les impératifs de sensibilité concernant le P3MH du moût, environ 50 fois plus abondant que le P4MMP, sont moins restrictifs que pour la P4MMP, ainsi nous avons décidé de choisir les conditions 3 pour la dérivatisation des extraits de moût.

IV.1.2.3. Extraction et purification des S-conjugués à la cystéine

La méthode de dosage des précurseurs cystéinylés développée dans ce travail comporte 3 étapes : l'obtention d'un extrait de ces précurseurs à partir du moût, la dérivatisation de cet extrait permettant une analyse CPG et l'analyse en CPG-SM. L'utilisation des précurseurs naturels et deutérés synthétisés au chapitre IV.1.2.1 a permis d'étudier tout d'abord les étapes de dérivatisation et d'analyse pour leur mise au point. Disposant d'une méthode de suivi des extraits, les rendements d'extraction et surtout la sensibilité globale de l'analyse ont pu ainsi être améliorés.

Pour comparer les rendements d'extraction et de purification obtenus sur les résines Dowex (Dowex 50wX4-100, Sigma Aldrich) et C_{18} (Lichrolut RP-18, Merk) que nous avons testées, nous avons procédé de la façon suivante : les échantillons de départ (moût, solution modèle de moût…) sont enrichis en précurseurs naturels (P3MH et P4MMP) et extraits sur ces résines. Leurs analogues deutérés (P3MH-d_2 et P4MMP-d_6) sont ensuite ajoutés dans l'extrait obtenu, juste avant la dérivatisation. Pour chaque précurseur (P3MH et P4MMP), le rapport des aires des composés naturels et deutérés est comparé à celui des aires obtenues par dérivatisation d'une solution contenant les mêmes quantités de départ de précurseurs naturels et deutérés. De cette manière, nous avons pu estimer le rendement de récupération du P3MH et du P4MMP et comparer ainsi les différents essais entre eux.

IV.1.2.3.1. Extraction des précurseurs cystéinylés d'un moût sur résine Dowex 50wX4-100 (H^+)

Les précurseurs cystéinylés sont des dérivés de la cystéine chargés positivement au pH du moût. Ainsi, leur extraction du moût a été réalisée sur une résine cationique forte, chargée en protons (Dowex 50wX4-100 - H^+). Ce type de résine a été utilisé pour l'extraction d'acides aminés (Drawert *et al.*, 1976) et en particulier celle de S-conjugués à la cystéine sulfoxyde (Kubec et Musah, 2001) dont les structures sont proches de celles des composés étudiés. L'extraction sur résine cationique permet, au pH acide du moût, de retenir les précurseurs cystéinylés ainsi que les autres cations du moût et d'éliminer les autres espèces chimiques. L'élution des composés retenus peut être effectuée avec des contre-ions plus spécifiques, en excès, ou en modifiant le pH afin de neutraliser ou charger négativement les précurseurs. Ainsi, différentes conditions ont été testées afin d'améliorer le rendement et la sélectivité de la récupération, dont dépendent respectivement l'intensité des signaux des analytes et l'intensité du bruit de fond de l'analyse CPG-SM. La sensibilité de l'analyse résulte donc d'un compromis trouvé entre ces 2 critères.

L'extraction a d'abord été étudiée sur des solutions modèles de moût en essayant plusieurs éluants. L'utilisation de solutions d'acide chlorhydrique 1 M (HCl), d'ammoniaque 1 M (NH_4OH) et de NaOH (1M), communément employées pour l'élution d'acides aminés et de conjugués à la cystéine sulfoxyde (Drawert *et al.*, 1976; Kubec et Musah, 2001) n'est pas favorable à la détection simultanée du P3MH et du P4MMP, mais nous n'avons pas déterminé quelle était l'étape limitante (extraction ou dérivatisation). Néanmoins, dans le cas de l'élution à l'ammoniaque, le rendement de récupération du P3MH en solution modèle est de 86 %, mais seulement de 1 % pour le P4MMP. Ce très faible rendement pourrait s'expliquer par la dégradation du P4MMP également constatée lors d'essais de stabilité dans l'ammoniaque (99 % de dégradation). Dans ces mêmes conditions, la stabilité du P3MH est cohérente avec les bons rendements obtenus lors de son élution à l'ammoniaque. L'instabilité du P4MMP, observée en milieu basique, est probablement due à la présence de la fonction carbonyle susceptible de réagir en milieu basique (énolisation, formation d'imines...) et favorisant l'élimination du groupe cystéiné du précurseur par une réaction rétro-Michael.

Ainsi, dans le but de pouvoir éluer les 2 composés de façon satisfaisante, l'utilisation de solutions aqueuses salines permettrait une élution des précurseurs par compétition avec les contres-ions de l'éluant, tout en évitant des pH extrêmes. Parmi les différents éluants testés, nous avons retenu une solution d'hydrogénophosphate d'ammonium ($NH_4H_2PO_4$) 1M (pH=4), qui permet une récupération de 24 % du P4MMP et de 63 % du P3MH (Tableau 11).

Tableau 11 : Comparaison des rendements de récupération du P4MMP et du P3MH sur résine Dowex 50wX4-100 à partir solutions modèles, obtenus avec différents éluants.

	Rendements de récupération	
	P4MMP	P3MH
$CaCl_2$ 1 M	0%	0%
KCl 1 M	5%	15%
NaCl 1 M	12%	38%
$NH_4H_2PO_4$ 1 M	24%	63%

L'inconvénient de l'éluant choisi est que son sel précipite après concentration de l'extrait Dowex sous vide, ce qui nécessite une extraction supplémentaire à l'éthanol pour séparer les précurseurs du sel. Afin de limiter les contraintes de cette extraction supplémentaire, le volume d'élution a été fixé à 10 mL. En effet, nous avons vérifié qu'au-delà de 10 mL, les 20 mL suivants ne contiennent que 20 % des précurseurs récupérés dans les 10 premiers mL. Cela permet également de limiter la récupération d'impuretés susceptibles de perturber l'analyse CPG-SM.

IV.1.2.3.2. Analyse du P3MH

Les conditions définies ci-dessus en solution modèle de moût ont été appliquées à des moûts naturels de Petit et de Gros Manseng. Elles permettent de doser le P3MH directement après dérivatisation de l'extrait final obtenu et analyse en CPG-SM. Les conditions chromatographiques sont identiques à celles décrites au chapitre IV.1.2.2, excepté le mode d'ionisation utilisé ici en détection sélective d'ions (SIM). Les ions utilisés pour la quantification sont les ions m/e 304 et m/e 306, et les ions qualificateurs m/e 214 et m/e 216, pour le P3MH naturel et deutéré respectivement. Les ions m/e 304 et m/e 306 ne sont pas les plus abondants, mais ils sont spécifiques car de haute masse, contrairement aux ions parents m/e 83 et m/e 85. Ces derniers sont abondants, mais trop communs pour envisager le dosage du P3MH dans les extraits de moût, où il est à l'état de traces en comparaison des autres composés récupérés, essentiellement des acides aminés.

Par ailleurs, le dosage d'un moût enrichi en étalons deutérés (P3MH-d_2 et P4MMP-d_6) avec 3 répétitions nous a permis d'évaluer la répétabilité de la réaction de dérivatisation. Premièrement, l'aire obtenue pour le dérivé du SBC utilisé en externe (juste avant la dérivatisation) est quasiment identique d'une dérivatisation à l'autre. Le coefficient de variation de 2 % montre que la dérivatisation du SBC, qui ne possède pas de fonctions secondaires réactives pouvant entraîner la formation d'autres dérivés, est répétable dans des conditions données. Ce n'est pas le cas du P3MH et du P4MMP qui, dans ces mêmes conditions de dérivatisation, peuvent générer plusieurs dérivés chacun en proportions variables. Le rapport des aires de chacun des dérivés utilisés pour le dosage (P3MH **8-2$_{ECF}$** et P4MMP **9-2$_{ECF}$**) à celle du dérivé du SBC utilisé comme étalon, a été mesuré sur 3 répétitions et donnent des coefficients de variation de 10 % et 29 % respectivement. La variabilité de la dérivatisation est donc satisfaisante. En revanche, d'une analyse à l'autre, l'aire de l'étalon deutéré, utilisé toujours à la même concentration, peut varier d'un facteur 1 à 5. La variabilité des conditions globales (extraction et dérivatisation) dépend donc de la nature du moût et entraîne des variations de la sensibilité du dosage d'un échantillon à un autre.

Malgré cela, les conditions d'analyse permettent une limite de détection (rapport signal/bruit=3) estimée pour le P3MH à 1µg/L, avec une prise d'essai de 25 mL de moût. Compte tenu de la variabilité intrinsèque de ces résultats, l'utilisation d'un étalon interne deutéré s'avère indispensable et permet d'obtenir un coefficient de variation de 1,5 % pour 3 répétitions d'analyse du P3MH à 15 µg/L dans un moût naturel.

IV.1.2.3.3. Extraction du P4MMP et analyse en CPG-IT-SM/SM

a. Modification des conditions d'extraction sur résine Dowex et purification sur résine C_{18}.

L'analyse du P4MMP directement après l'étape d'extraction sur résine Dowex conduit à une limite de détection estimée à 3 µg/L de moût, trop élevée pour espérer le détecter dans des moûts de Sauvignon, où les concentrations maximales rapportées sont comprises entre 50 ng/L et 3 µg/L (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000).

Pour ces raisons, les conditions d'extraction ont été modifiées. Premièrement, nous avons constaté que les premiers millilitres de l'éluat Dowex sont très acides (pH 1). Compte tenu des inconvénients d'un pH très acide pour la dérivatisation du P4MMP, l'éluat est entièrement récupéré sur 1 g de $NH_4H_2PO_4$, afin de tamponner le milieu. Ensuite, la purification sur Dowex de volumes de moût supérieurs à 25 mL conduit à des extraits très concentrés en divers composés, ne permettant pas une analyse de précurseurs à l'état de traces. Pour remédier à ces difficultés, une étape supplémentaire de purification est réalisée sur résine C_{18} (Lichrolut RP-18, Merk) qui a déjà été utilisée pour la purification du P3MH et du P4MMP (Darriet, 1993; Tominaga *et al.*, 1995). En effet, la partie des précurseurs correspondant aux thiols libérés contient 6 atomes de carbone, ce qui diminue l'hydrophilie des précurseurs par rapport à celles de certains acides aminés naturels. Ainsi, le passage de l'extrait sur cartouches C_{18} et l'élution des précurseurs à l'éthanol permet d'obtenir un extrait purifié, en éliminant les composés polaires dont certains acides aminés polaires. L'utilisation d'un volume de moût de 50 mL devient alors possible et permet d'augmenter la sensibilité.

Des essais modèles de percolation de précurseurs dans différentes solutions tampons (pH=7,7 ; pH=5,3 et pH= 4) ont montré que la récupération des précurseurs était la meilleure lorsque la solution de précurseurs percolée est à pH=4. Ainsi, l'extrait Dowex concentré à sec est repris avec 2 fois 500 µL d'une solution 0,1 M de $NH_4H_2PO_4$. La résine est rincée avec 500 µL d'eau Millipore. L'élution est réalisée avec de l'éthanol absolu et les 6 premiers millilitres d'élution contiennent près de 5 fois plus de précurseurs que les 10 mL suivants. L'élution au-delà de la première fraction, ne permettant pas de récupérer beaucoup plus de précurseurs et pouvant générer du bruit de fond, le volume d'élution a été fixé à 6 mL.

b. Analyse CPG-IT-SM/SM

La détection en analyse SM/SM consiste à isoler un ion (ion père) parmi les fragments ionisés de l'analyte, afin de le fragmenter à son tour. La détection est alors réalisée sur un des ions ainsi formés (ions fils). Ceci permet d'une part, d'améliorer la sensibilité de la détection en réduisant le bruit de fond, et d'autre part d'augmenter la sélectivité du dosage tout en conservant une information structurale sur le composé dosé, ce qui augmente la fiabilité du dosage en comparaison d'une détection sélective d'ions (SIM). Ces conditions sont particulièrement intéressantes pour l'analyse des précurseurs cystéinylés, présents à l'état de traces dans les extraits obtenus sur résine C_{18}, en comparaison aux acides aminés également présents. En effet, les acides aminés dont l'hydrophilie est comparable à celle des précurseurs cystéinylés (proline, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine), identifiés par l'étude de leurs spectres de masse, sont les plus abondants (Figure 33).

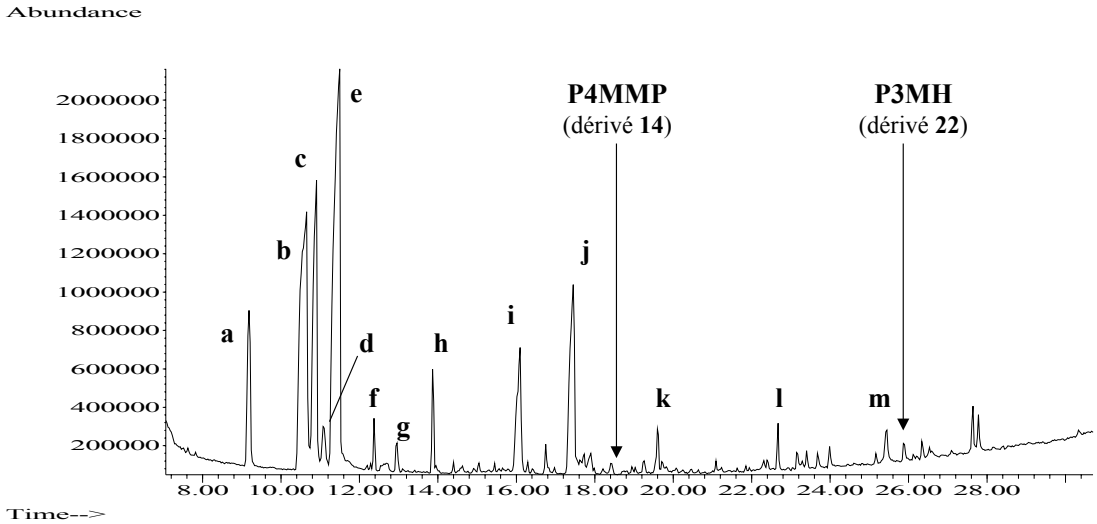


Figure 33 : Chromatogramme d'une analyse en CPG-IE-SM d'un extrait de moût purifié sur Dowex et C_{18}, puis dérivatisé à l'éthylchloroformate. (composés dérivatisés : [a] valine ; [b] leucine ; [c] isoleucine ; [d] acide glutarique ; [e] proline ; [f] 5-oxo-proline ; [g] isomère de la leucine ; [h] dérivé proline ; [i] 4-hydroxyproline; [j] phénylalanine; [k] et [l] esters éthyliques ; [m] tyrosine).

Conformément à l'étude présentée précédemment (cf. chapitre IV.1.2.2.2), la fragmentation en ionisation par impact électronique du dérivé **9-2$_{ECF}$** du P4MMP conduit à la formation de l'ion m/e 228 majoritaire. Cet ion de haute masse et spécifique permet de différencier le composé naturel (m/e 228) du deutéré (m/e 234). Les ions fils obtenus à partir des ions pères m/e 228 et m/e 234 sont respectivement de masses m/e 200 et m/e 206 également spécifiques. Les conditions de refragmentation (énergie d'ionisation et mode de fragmentation) ont été optimisées afin qu'ils soient majoritairement formés et qu'une partie des ions pères ne soit pas fragmentée pour qu'ils servent en même temps d'ions qualificateurs

pour le dosage. L'analyse du P4MMP dans un extrait de moût naturel enrichi en P4MMP et purifié sur Dowex puis sur C_{18}, permet d'obtenir une sensibilité estimée à 50 ng/L pour ce précurseur. Bien que les conditions de purification sur C_{18} soient difficiles à maîtriser et entraînent des variations de sensibilité d'une analyse à l'autre, cette limite de détection permet d'envisager le dosage de la P4MMP dans certains moûts sachant que les teneurs publiées dans les moûts de Sauvignon peuvent atteindre 3 µg/L (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000, 2002a).

Pour le P3MH, les conditions d'analyse du dérivé **8-2$_{ECF}$** en CPG-IT-SM/SM doivent être améliorées car la résolution obtenue n'est pas satisfaisante, ce qui limite la sensibilité. Les conditions de température de la ligne de transfert et de la trappe n'ont pas été optimisées, ce qui est probablement à l'origine des mauvaises conditions de détection du dérivé **8-2$_{ECF}$** du P3MH qui sort à la température très élevée de 280°C. Par ailleurs, la fragmentation de ce dérivé en CPG-SM en impact électronique n'est pas intéressante pour envisager une détection en SM/SM. En effet, les ions m/e 214 et m/e 304 sont peu abondants. D'autres conditions pourront être envisagées pour la détection du P3MH. L'ionisation chimique, qui limite la fragmentation et favorise les ions de haute masse, pourra être testée avec divers gaz ionisants (méthane, isobutane, ammoniaque). De plus, lors de la dérivation du P3MH à l'éthylchloroformate, le 2ème dérivé formé (**8-1$_{ECF}$**) présente un spectre de masse plus adapté à l'analyse en CPG-IT-SM/SM. En effet, les ions m/e 186 du dérivé naturel et m/e 188 de l'analogue deutéré sont les plus abondants et sont spécifiques. Bien que ce dérivé soit formé en quantité moindre, le dosage du P3MH pourrait être envisagé sur ce dérivé cyclique, comme c'est le cas pour le P4MMP. Cependant, bien que les conditions présentées au chapitre IV.1.2.3.2 permettent une analyse très satisfaisante du P3MH naturel des moûts de Petit et Gros Manseng, ces travaux n'ont pas été poursuivis.

IV.1.2.3.4. Purification des extraits dérivatisés

L'extrait au dichlorométhane obtenu après dérivatisation contient encore de nombreux composés. Ainsi, une extraction supplémentaire au pentane du résidu sec obtenu après concentration sous azote, permet d'éliminer de nombreuses impuretés, particulièrement celles provenant de la dérivatisation elle-même. A partir d'un extrait de moût de Manseng, le bruit de fond généré par l'extrait est diminué par 2 après l'extraction au pentane. La qualité des conditions chromatographiques, dont dépend la sensibilité de l'analyse, est alors conservée pour un nombre d'injections beaucoup plus élevé (environ 40 analyses).

IV.1.3. Conclusion

Ce travail nous a permis, en adaptant les conditions de 2 voies de synthèse de S-conjugués à la cystéine, d'obtenir le P3MH et le P4MMP, ainsi que leurs analogues deutérés.

La 1ère voie permet à partir d'un même synthon, la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone, d'obtenir les précurseurs naturels et deutérés N-Boc protégés, directement par addition des thiols correspondants. L'intérêt de cette voie est qu'elle peut être envisagée avec d'autres nucléophiles pour la synthèse régiosélective d'autres S-conjugués à la cystéine. La 2ème voie consiste à additionner la (R)-Boc-Cystéine sur l'(*E*)-2-hexénal et l'oxyde de mésityle, conduisant aussi aux S-conjugués à la cystéine N-Boc protégés. Si cette voie permet de meilleurs rendements, la synthèse des analogues deutérés nécessite celles de l'(*E*)-2-hexénal et l'oxyde de mésityle deutérés, qui sont délicates. Dans tous les cas, l'utilisation de produits N-Boc protégés est d'un grand intérêt pour synthétiser, purifier et conserver ces précurseurs particulièrement réactifs. De plus, ils conduisent en une étape rapide de déprotection aux précurseurs cystéinylés naturellement présents dans le raisin, et à leurs analogues deutérés. Le choix de l'une ou l'autre de ces 2 voies dépendra surtout de la disponibilité et du coût des produits de départ.

Afin d'analyser ces S-conjugués à la cystéine en CPG-SM, nous avons tout d'abord étudié plusieurs conditions de dérivatisation. Dans nos conditions, la triméthylsilylation n'a pas donné de résultats satisfaisants. Pour ces raisons, nous avons choisi la dérivatisation à l'éthylchloroformate, dont la sensibilité et la stabilité des produits ont été démontrées. De plus, cette méthode rapide conduit à la formation de dérivés stables. Disposant des produits de synthèse, les conditions de dérivatisation ont été étudiées afin de favoriser la formation et la récupération des dérivés du P3MH et du P4MMP, les plus intéressants parmi ceux formés, pour envisager la détection en CPG-SM.

Dans un deuxième temps, des conditions de purification ont été adaptées pour ces précurseurs, car leur présence à l'état de traces dans les raisins constitue une contrainte majeure. Ainsi, l'extraction sur résine cationique forte conduit à un extrait suffisamment pur pour envisager le dosage du P3MH en CPG-IE-SM en mode SIM, avec une sensibilité estimée à 1 µg/L. En revanche, pour le P4MMP, présent à des concentrations encore plus faibles que le P3MH, le dosage n'est envisageable qu'après une étape supplémentaire de purification sur C_{18} associée à une détection en IT-SM/SM.

Ce travail permet donc de disposer de méthodes d'analyse permettant de doser le P3MH dans les jus de raisin. Les performances pour l'analyse du P4MMP apparaissent suffisantes, mais devront être confirmées par l'analyse du P4MMP, car il n'a pas été détecté dans les échantillons de Petit et de Gros Manseng. Par ailleurs, la variabilité des rendements des étapes d'extraction et de dérivatisation nécessite d'utiliser des analogues marqués par des isotopes stables pour le dosage du P3MH et du P4MMP.

IV.2. Etude chimique du sotolon

IV.2.1. Introduction bibliographique

La 4,5-diméthyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone est une lactone énolique dont le nom courant sotolon, fait référence à la présence d'une fonction énolique et au sucre de canne non raffiné dans lequel elle a été identifiée pour la première fois (Kobayashi, 1989). Ce composé d'arôme est remarquable par son odeur puissante et tenace évoquant le curry. La présence d'une fonction céto-énolique et la structure possédant à la fois des centres hydrophiles et hydrophobes seraient à l'origine de ses propriétés olfactives (Kobayashi, 1989). Il en résulte un seuil de détection très bas : 0,02 ng/L dans l'air et 0,3 µg/L dans l'eau (Blank *et al.*, 1993). Endogène ou résultat de procédés particuliers, cette molécule contribue largement à l'arôme des produits qui la contiennent.

IV.2.1.1. Contribution à l'arôme de certains produits alimentaires

Le sotolon dégage des odeurs épicées dans la graine de Fenugrec. Cette graine, couramment utilisée dans l'industrie agroalimentaire comme condiment, entre notamment dans la composition du curry (Girardon *et al.*, 1986; Mazza *et al.*, 2002). Si le sotolon apporte des odeurs le plus souvent recherchées, il peut parfois entraîner des défauts d'arôme dans certains produits. Ainsi, les odeurs peu appréciées de "sucré-brûlé", apparaissant dans les vieux sakés (Takahashi *et al.*, 1976) et des boissons à base d'agrumes (König *et al.*, 1999), sont dues à l'apparition de sotolon. Il a également été trouvé dans plusieurs autres produits essentiellement alimentaires, notamment dans le pain grillé (Schieberle et Grosch, 1994), dans la viande (Güth et Grosch, 1994), dans le café (Blank *et al.*, 1992; Semmelroch *et al.*, 1995), dans l'extrait d'une variété de céleri (Blank et Schieberle, 1993; Blank *et al.*, 1993) et dans la fumée de tabac (Matsukara *et al.*, 1985).

IV.2.1.2. Origine du sotolon

Plusieurs origines ont été proposées pour la formation du sotolon, mais dans des conditions de formation plus ou moins éloignées de celles du vin (Sauvaire *et al.*, 1984; Blank *et al.*, 1992; Blank *et al.*, 1996; Hofmann et Schieberle, 1996; König *et al.*, 1999). Sa formation a également été envisagée à partir de la thréonine et d'acides organiques dans de vieux saké (Takahashi *et al.*, 1976), et lors de la fabrication du sucre de canne non raffiné, à partir des acides pyruvique et oxoglutarique (Kobayashi, 1989). Mais ce dernier mécanisme n'a pas été démontré dans le vin, où plusieurs autres voies de formation du sotolon ont été proposées. Dans les vins élevés sous voile de levures, tels que les Vins Jaunes du Jura et les Xérès, les levures transforment la thréonine en acide α-cétobutyrique par désamination et

déshydratation (Sulser *et al.*, 1967; Pham *et al.*, 1996), et oxydent l'éthanol en éthanal. Cet acide se condense sur l'éthanal pour conduire au sotolon. Dans les Vins Doux Naturels obtenus après un élevage oxydatif, les levures à voile sont absentes, mais la formation du sotolon à partir des même composés a également été proposée. Dans ces vins, l'éthanal serait formé par oxydation chimique de l'éthanol (Wildenradt et Singleton, 1974), mais le mécanise chimique de la formation du sotolon n'a pas été élucidé, bien qu'il serait lié à la présence de sucre et aux phénomènes oxydatifs (Cutzach *et al.*, 1998b; Silva Ferreira *et al.*, 2003a; Sousa Camara *et al.*, 2004).

IV.2.1.3. Le sotolon dans le vin

Initialement, le sotolon a été mis en évidence dans les Vins Jaunes du Jura (Dubois *et al.*, 1976), mais ce n'est qu'avec la mise au point plus récente d'une méthode de dosage du sotolon en CPG-2D (Martin *et al.*, 1990) que l'influence du sotolon sur l'arôme de ces vins a pu être démontrée. Les teneurs peuvent atteindre jusqu'à 500 µg/L, et avec un seuil de détection de 15 µg/L (Martin *et al.*, 1990; Etiévant, 1991; Martin *et al.*, 1992), il contribue ainsi à l'odeur de noix, typique de ces vins. De plus, l'influence du sotolon a été démontrée sur l'arôme de vins botrytisés et de vins neutres dans lesquels il a été ajouté (Masuda *et al.*, 1984). Présent à des concentrations de l'ordre de 5 à 25 µg/L, il évoque des notes "sucré" et "caramel", mais il a été décrit comme un des composés responsables de défauts oxydatifs, présentés au vieillissement par certains vins blancs (Escudero *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2000; Silva Ferreira *et al.*, 2003b).

Identifié également dans des vins de Madère (Sousa Camara *et al.*, 2004), des vins de Porto (Silva Ferreira *et al.*, 2003a; Sousa Camara *et al.*, 2004) et des Vins Doux Naturels (VDN) blancs et rouges du Roussillon (Cutzach *et al.*, 1998a, b; Cutzach *et al.*, 1998c; Schneider *et al.*, 1998; Silva Ferreira *et al.*, 2003a; Sousa Camara *et al.*, 2004), le sotolon apporte, selon sa concentration, différentes notes essentielles à leur qualité et à leur spécificité aromatique. A moins de 300 µg/L, il apporte le caractère "pruneau". Il développe ensuite des caractères "fruits secs", et au-delà de 600 µg/L, il est responsable du caractère "rancio" typique des vieux VDN (Cutzach *et al.*, 1998b).

IV.2.2. Analyse du sotolon

Différents travaux mettent en avant les difficultés rencontrées lors de l'analyse du sotolon ou de composés de structures analogues, tel que le furanéol (Dubois *et al.*, 1976; Takahashi *et al.*, 1976; Girardon *et al.*, 1986; Kobayashi, 1989; Blank *et al.*, 1992; Blank *et*

al., 1997). En effet, certains travaux ont montré l'instabilité des lactones énoliques notamment en milieu basique et dans des solvants organiques (Kobayashi, 1989; Martin *et al.*, 1990). De plus, la détection du sotolon est délicate car c'est un constituant minoritaire d'aliments généralement complexes comme le vin et le café. Etant donné son affinité pour l'eau et sa thermosensibilité (Girardon *et al.*, 1986; Martin *et al.*, 1990), son extraction est difficile et chaque étape de l'analyse constitue autant d'occasions de dégrader et de perdre ce composé. De plus son facteur de réponse en chromatographie, en fonction de sa concentration, n'est pas toujours linéaire selon le type de phase utilisée. Ainsi son analyse est peu fiable même avec l'utilisation d'un étalon interne classique.

Le dosage par dilution isotopique, décrit comme sensible, fiable et précis, a été utilisé pour l'analyse de composés d'arôme à l'état de traces (Schieberle et Grosch, 1987; Güth et Grosch, 1990). Cette technique s'avère indispensable pour l'analyse du sotolon et a d'ailleurs déjà été utilisée pour son dosage dans des graines de Fenugrec et la sauce soja (Schieberle et Grosch, 1987; Güth et Grosch, 1990; Blank et Schieberle, 1993; Blank *et al.*, 1993), utilisant le [^{13}C]-sotolon comme étalon interne.

IV.2.3. Résultats et discussions

Bien que la formation de quantités importantes de sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone) est associée à un élevage oxydatif, certains Vins Doux Naturels (VDN) rouges, conservés essentiellement en bouteille, peuvent présenter des teneurs en sotolon supérieures à son seuil de perception olfactive (15 µg/L). Par ailleurs, les VDN blancs présentent des teneurs en sotolon toujours supérieures aux VDN rouges conservés dans les mêmes conditions. Ces observations nous ont conduit à nous intéresser au sotolon dans des vieux vins de Petit et Gros Manseng, car une partie de la production est vinifiée en vins moelleux, particulièrement appréciés après un long vieillissement.

Toutefois, la recherche de la contribution du sotolon à l'arôme des vins nécessite une méthode de dosage adaptée, car les propriétés physico-chimiques rendent son analyse délicate (Girardon *et al.*, 1986; Martin *et al.*, 1990). Ainsi, nous avons développé une nouvelle méthode de dosage, utilisant la technique de la dilution isotopique.

IV.2.3.1. Etude de la stabilité du sotolon en milieux acido-basique

IV.2.3.1.1. Dégradation en milieu basique

Des études chimiques menées sur le sotolon ont permis d'évaluer le comportement du sotolon dans différents milieux (Martin *et al.*, 1990). Stable au pH du vin, le sotolon se dégrade en solution organique et en milieu basique (Kobayashi, 1989). L'objectif étant d'obtenir le sotolon deutéré en échangeant en milieu basique ses protons énoliques ou vinylogues, nous avons testé initialement les conditions utilisées pour le marquage du furanéol (Kotseridis *et al.*, 1999b; Schneider, 2001). Le principe consiste à échanger les protons énolisables d'une molécule par des deutériums.

IV.2.3.1.2. Dégradation du sotolon 1 à 50°C

A 50°C, en milieu aqueux basique, le sotolon **1** est à peine dégradé (3 %) après 4 h de réaction. Le produit formé est l'acétoïne, composé déjà observé avec son analogue oxydé, le diacétyle, comme produit de dégradation du sotolon (Kobayashi, 1989). Pour comprendre les mécanismes de réaction, la même réaction a été réalisée dans D_2O. L'analyse CPG-SM révèle de l'[$^2H_3$]-acétoïne, obtenue par l'échange des protons énoliques et du proton de la fonction hydroxyle. En revanche, pour le sotolon seul le proton énolique a été échangé. Les protons des carbones n°5 et n°4, en positions énolisables, n'ont pas été échangés ce qui est en accord avec les travaux décrivant les difficultés d'énolisation d'une lactone (March, 1985).

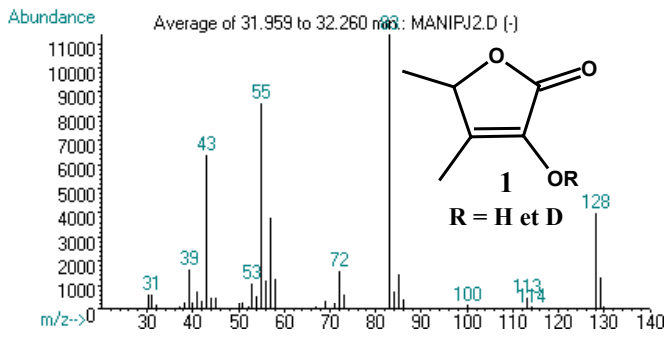


Figure 34 : Spectre de masse en impact électronique (IE) du sotolon **1** partiellement deutéré après traitement en milieu basique à 50°C.

IV.2.3.1.3. Dégradation du sotolon 1 à 80°C

L'augmentation de la température de réaction à 80°C conduit à la dégradation quasi complète (97 %) du sotolon **1** après 4h. Plusieurs produits de dégradation se sont formés (Figure 35), dont les mécanismes réactionnels ont été décrits (Dagan *et al.*, 2006).

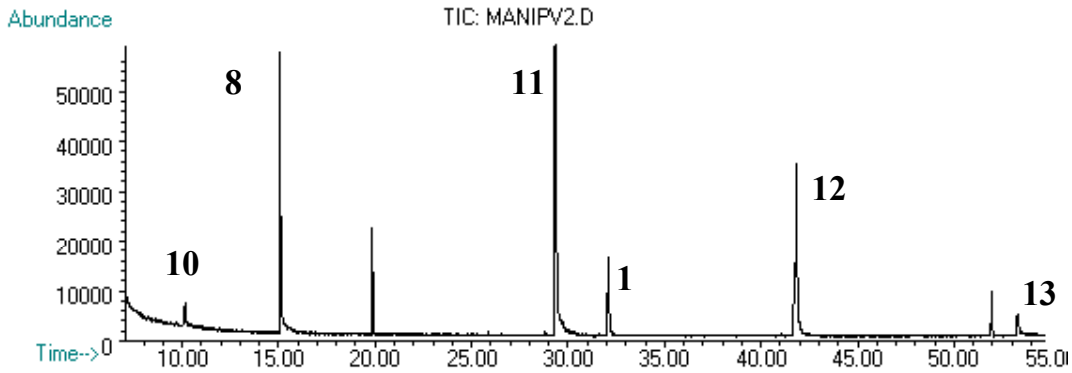


Figure 35 : Analyse CPG-SM (colonne apolaire DB5) des produits issus de la dégradation du sotolon **1** en milieu basique à 80°C.

L'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoïque 11

Le produit majoritaire **11** (49,5 %) est un nouveau composé dont le spectre de masse est extrêmement proche de celui du sotolon **1**. Il présente les mêmes ions caractéristiques m/e 55, m/e 83 et m/e 128 et il est coélué avec le sotolon **1** sur colonne DB-Wax, ce qui peut expliquer qu'il n'a jamais été observé auparavant (Figure 36A). Il est par contre totalement séparé du sotolon sur DB-5, ce qui justifie l'utilisation de ce type de phase pour l'analyse des produits de dégradation, alors qu'elle n'est pas recommandée pour son analyse (Dubois *et al.*, 1976; Takahashi *et al.*, 1976).

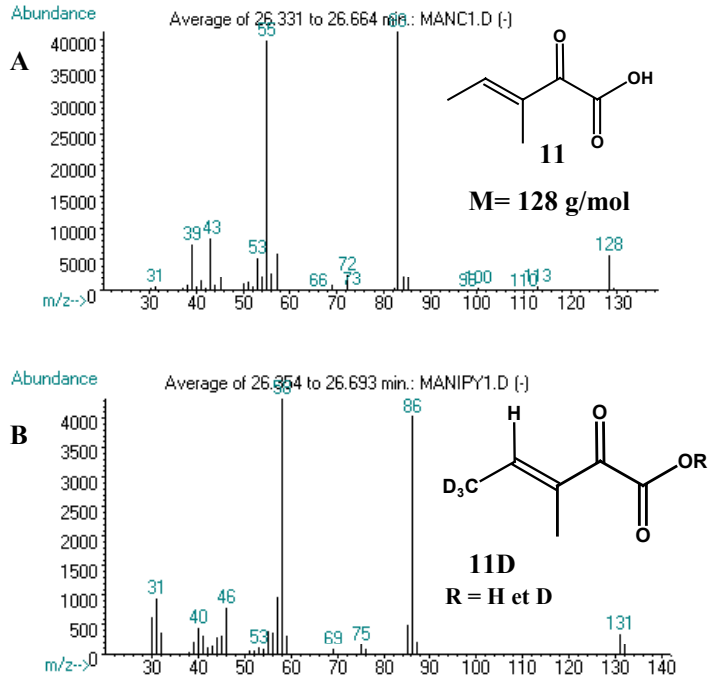


Figure 36 : Spectres de masse en impact électronique (IE) de l'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoïque naturel **11** et deutéré, issus de la dégradation du sotolon **1** en milieu basique à 80°C.

L'analyse ^{1}H-RMN et ^{13}C-RMN du composé isolé a permis d'identifier l'acide 2-méthyl-4-oxopent-2-énoïque **11**, résultat de la déshydratation de l'acide 4-hydroxy-3-méthyl-2-oxopentanoïque **11** (Figure 36A). Ce dernier, produit d'ouverture du sotolon a déjà été identifié sous forme de sel de sodium dans des graines de Fenugrec et de Q. funebris. Il serait le résultat d'une désamination oxydative de la L-4-hydroxyisoleucine par voie enzymatique (Lerch et Ambühl, 1995).

La dégradation du sotolon en milieu deutéré conduit à l'acide [$^{2}H_4$]-3-méthyl-2-oxopent-3-énoïque **11D**. Ce dernier a échangé le proton de la fonction acide carboxylique et les protons énolisables du carbone n°5 (Figure 36B). La position du marquage a été confirmée par la perte du signal de ces protons en analyse ^{1}H-RMN (Annexe 5). Par ailleurs, l'analyse CPG-SM révèle du sotolon résiduel, présent sous la forme d'un pic dédoublé (Figure 37A), constitué de 4 isotopomères, le sotolon-d_3 et -d_4 (m/e 131 et m/e 132 ; Figure 37B), et le sotolon-d_1 avec le sotolon non marqué (m/e 129 et m/e 128 ; Figure 37C). L'absence de l'ion m/e 130 implique deux origines distinctes pour ces isotopomères. Le sotolon-d_1 provient de l'échange du proton énolique comme observé précédemment à 50°C. Le sotolon-d_4 pourrait se former à partir de l'acide [$^{2}H_4$]-3-méthyl-2-oxopent-3-énoïque **11D**, mais en milieu basique cette réaction de cyclisation n'est pas possible. En revanche, l'acidification de l'échantillon au cours du traitement effectué pour le suivi de la réaction, entraîne la cyclisation d'une partie de cet acide, pour former du sotolon-d_4 qui, de la même façon, échange son proton énolique pour

conduire au sotolon-d_3 **1D**. Ainsi une nouvelle voie de synthèse permet d'obtenir du sotolon-d_3 **1D**, à partir du produit naturel commercial, ouvert en milieu basique deutéré puis cyclisé en milieu acide deutéré.

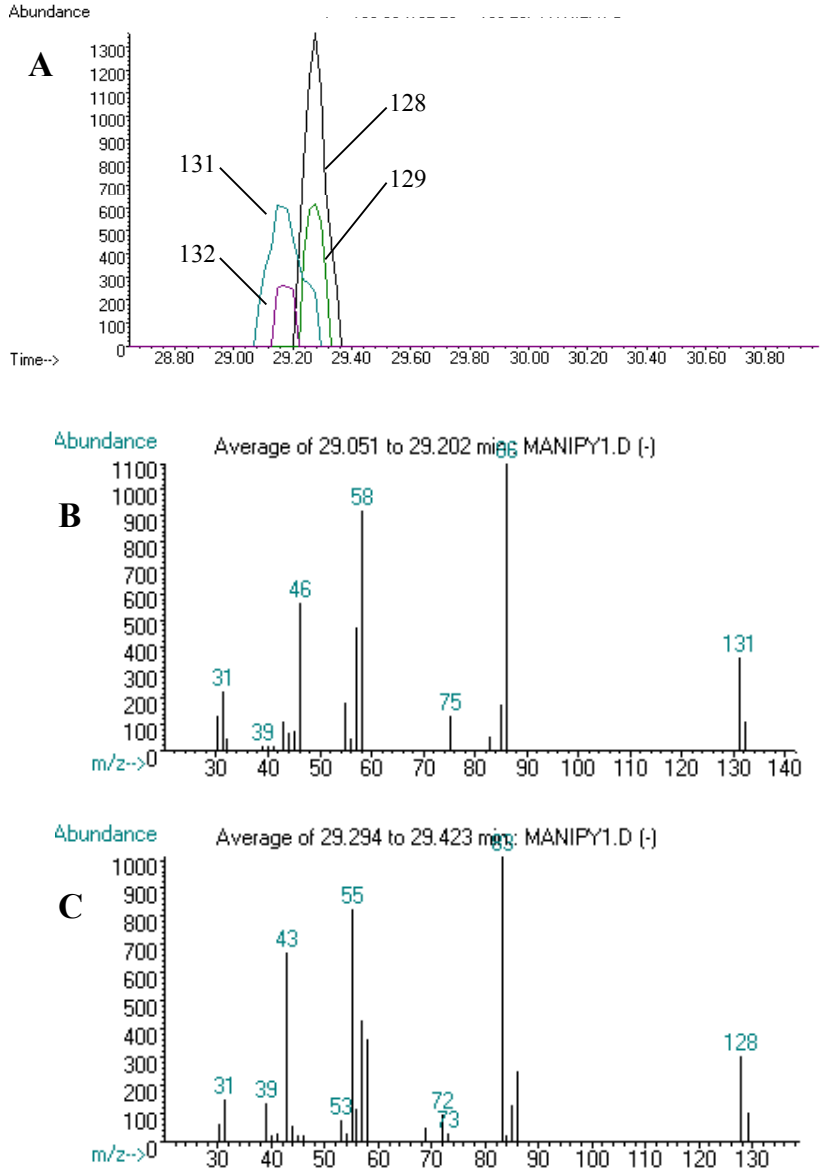


Figure 37 : A Chromatogramme (extraction des ions m/e 128 à 132) des 4 isotopomères formés par dégradation du sotolon **1** en milieu basique deutéré à 80°C. Spectres de masse en impact électronique (IE) de isotopomères du sotolon : M+1 et M+2 (**C**) et M+3 et M+4 (**B**).

L'acide α-cétobutyrique et l'acide propionique

En milieu basique à 80°C, l'acide α-cétobutyrique **8** et l'acide propionique **10** sont 2 autres produits mineurs de dégradation du sotolon (1,2 % et 10,5 % respectivement), identifiés par comparaison de leurs temps de rétention et de leurs spectres de masse avec les références commerciales. On notera que le spectre de masse de l'acide propionique est très

proche de celui du pentène-3-ol observé comme produit de dégradation du sotolon en solution organique (Martin *et al.*, 1990).

En milieu deutéré, la même réaction conduit au à l'acide3,3-[$^2H_2$]-α-cétobutyrique **8D** et à l'acide 2,2-[$^2H_2$]-α-propionique **10D**. L'acide α-cétobutyrique **8**, qui peut se former à partir de l'acide 2-méthyl-4-oxopent-2-énoïque **11** par une réaction de rétroaldolisation, échange ses protons énoliques en milieu deutéré. En revanche, l'acide propionique ne peut être énolisé dans ces conditions. Ainsi, la présence de 2 deutériums (Figure 39B) confirme qu'il provient de la décarbonylation oxydative de l'acide α-cétobutyrique **8**. De plus, la totalité de l'acide propionique est marqué, montrant que le marquage de l'acide α-cétobutyrique **8** est rapide et précède la décarbonylation oxydative.

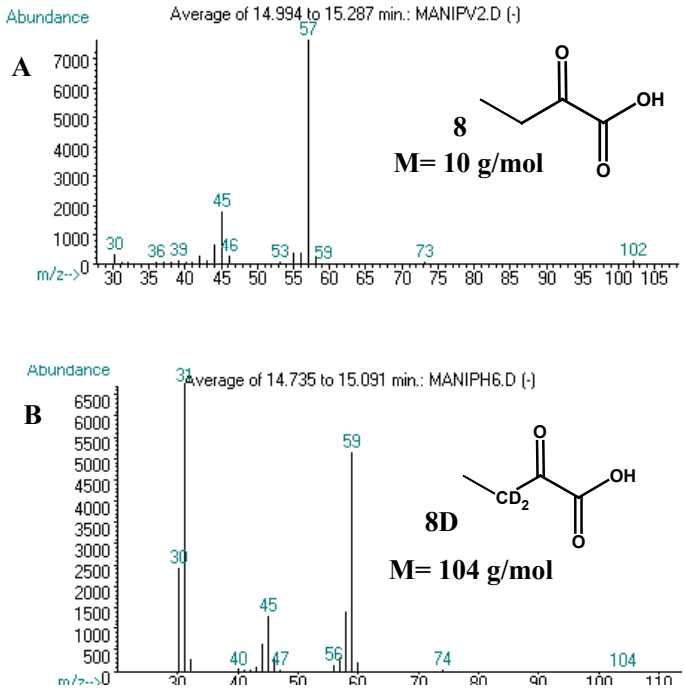


Figure 38 : Spectres de masse en impact électronique (IE) de l'acide α-cétobutyrique naturel **8** et deutéré **8D**, issus de la dégradation du sotolon **1** en milieu basique à 80°C.

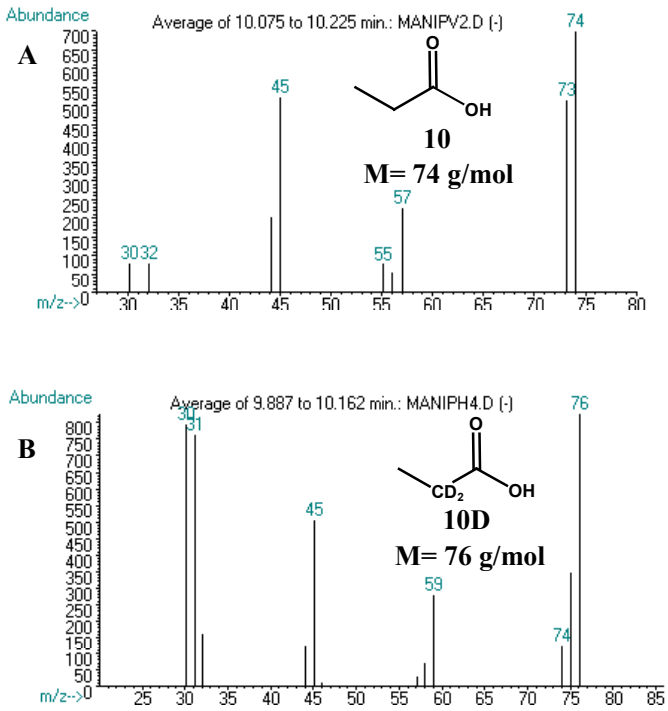


Figure 39 : Spectres de masse en impact électronique (IE) de l'acide propionique naturel **10** et deutéré **10D**, issus de la dégradation du sotolon **1** en milieu basique à 80°C.

Deux composés inconnus (12 et 13)

Parmi les produits de dégradation, 2 autres composés inconnus sont observés (**12** et **13**). D'après son spectre de masse, le produit **12** serait l'acide 3-méthyl-2-oxohepta-3,5-diénoïque **12a** ou son analogue cyclique **12b** (Figure 40). Pour confirmer sa structure, l'acide α-cétobutyrique et le crotonaldéhyde sont mis à réagir dans les mêmes conditions. Mais le produit obtenu avec un rendement très faible de 3 %, n'a pas permis son analyse en ^{1}H-RMN. Pour le produit **13**, aucune structure hypothétique n'a pu être proposée (Figure 41).

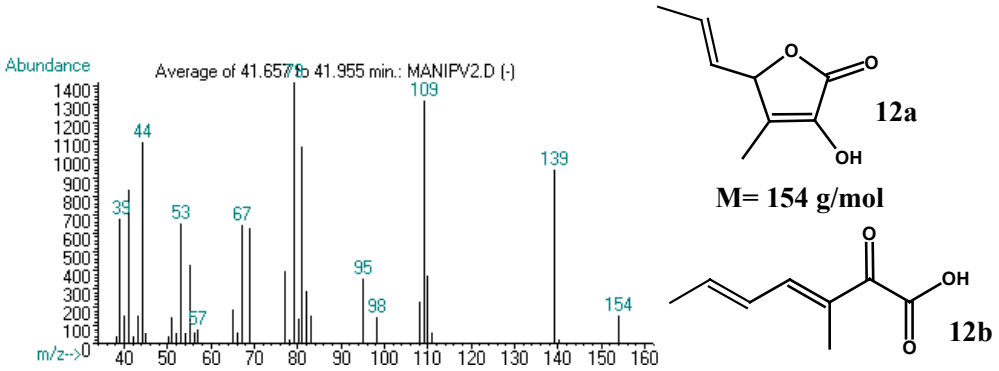


Figure 40 : Spectre de masse en impact électronique (IE) du produit **12**, issus de dégradation du sotolon **1** en milieu basique à 80°C.

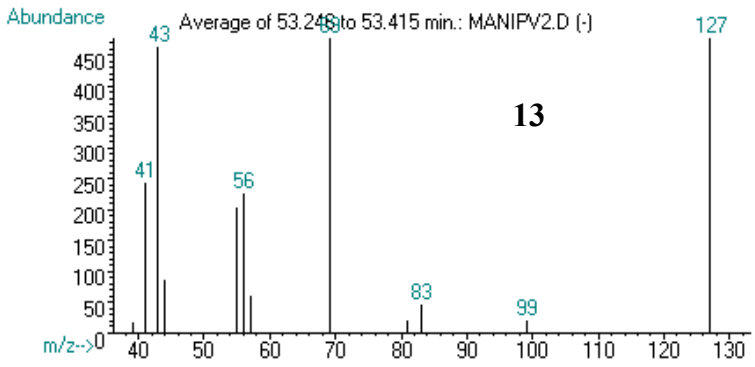


Figure 41 : Spectres de masse en impact électronique (IE) du produit **13**, issus de dégradation du sotolon **1** en milieu basique à 80°C.

IV.2.3.2. Stabilité isotopique du sotolon 1D

Le sotolon **1D**, préparé précédemment a été traité en milieu acide (pH 1) pendant 63 h et à température ambiante pour tester sa stabilité chimique et isotopique. Aucune dégradation n'est observée et aucun échange de deutérium n'est observé en CPG-SM. Par ailleurs, le sotolon traité dans les mêmes conditions de pH et à 100°C, est très peu dégradé (5 % d'acétoïne). Dans les 2 cas, seul le proton énolique peut être échangé. L'échange des protons énolisables conduirait à l'épimérisation du carbone 5, ce qui n'est pas observé au pH du vin (Guichard *et al.*, 1992).

IV.2.3.3. Extraction du sotolon

Le sotolon **1D** a donc été utilisé pour le dosage du sotolon naturellement présent dans des vins. La première étape reprend l'extraction du vin au dichlorométhane proposé par (Cutzach *et al.*, 1998b). Cependant l'analyse de ces extraits montre que le sotolon est coélué avec d'autres composés dont le plus abondant, le 4-vinylguaiacol, gêne sa détection. Une partie du 4-vinylguaiacol observé provient de la dégradation thermique au cours de l'analyse de ses dérivés éthoxylés (Dugelay *et al.*, 1995). Afin d'éliminer les interférences, l'extrait au dichlorométhane est à nouveau extrait avec une solution aqueuse diluée d'acide chlorhydrique, afin d'extraire le sotolon ainsi que les autres composés très polaires et les séparer ainsi des composés ayant plus d'affinité pour le dichlorométhane. Cet extrait aqueux est de plus purifié par lavage et passage sur résine XAD-2. La phase aqueuse percolée est ensuite extraite à l'éther diéthylique. Tout au long de l'extraction, le sotolon reste donc à pH acide où il est stable. Ces conditions sont donc préférables à celles précédemment décrites en milieu basique (Blank et Schieberle, 1993; Blank *et al.*, 1993), susceptibles de dégrader le sotolon.

IV.2.3.4. Analyse du sotolon dans les vins en CPG-IE-SM

L'extrait éthéré de sotolon est analysé en CPG-SM en mode sélection d'ions. Le dosage est réalisé sur les ions 128 pour le sotolon naturel et 131 pour l'étalon deutéré. A partir de 200 mL de vin, la limite de quantification estimée pour un rapport signal sur bruit de 3, de 0,7 µg/L et est inférieure au seuil de perception olfactive de la molécule dans le vin (15 µg/L ;(Martin *et al.*, 1992) et dans l'eau (0,7 µg/L ; (Kobayashi, 1989). La répétabilité (4 analyses) réalisée sur un vin doux de Muscat de Rivesaltes, donne un coefficient de variation de 0,9 % pour une concentration en sotolon de 63,5 µg/L. Cette méthode a permis de doser le sotolon dans différents vins vieux de 7 à 25 ans, secs et moelleux, élaborés à partir du Petit Manseng et du Gros Manseng. Les concentrations sont comprises entre 3,8 et 10,8 µg/L (Figure 42). Le coefficient de variation de 3,2 %, supérieur à celui de la répétabilité, peut s'expliquer par les teneurs en sotolon (7,7 µg/L en moyenne) plus proches de la limite de détection. Les concentrations en sotolon rencontrées dans ces vins sont inférieures au seuil de perception dans le vin. Il n'y a donc pas de contribution directe de ce composé à l'arôme de ces vins élevés en bouteille, en conditions non oxydatives. Ceci est en accord avec les travaux précédents décrivant la formation du sotolon en conditions oxydatives (Cutzach *et al.*, 1998a, b; Cutzach *et al.*, 1998c; Schneider *et al.*, 1998; Silva Ferreira *et al.*, 2003a; Sousa Camara *et al.*, 2004) ou dans des vins botrytisés (Masuda *et al.*, 1984). Toutefois, du fait des teneurs observées, voisines du seuil de perception, le sotolon pourrait indirectement participer à l'arôme de ces vins par des effets de synergie avec d'autres molécules. Ce phénomène est connu pour d'autres composés analogues, tels le furanéol, l'homofuranéol et le cyclotène (Blank et Schieberle, 1993; Ferreira *et al.*, 2003).

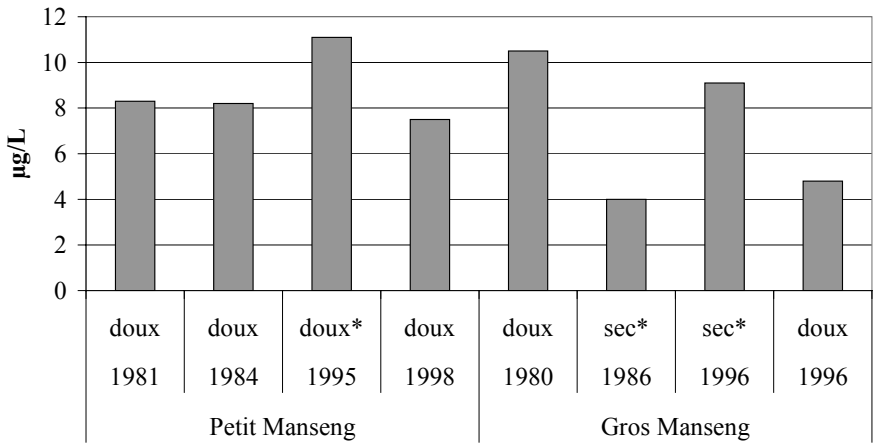


Figure 42 : Teneurs en sotolon de différents vins commerciaux de Petit et Gros Manseng (* passés en fûts).

IV.2.4. Conclusion

La dégradation du sotolon en milieu basique à 80°C conduit majoritairement à la formation d'un nouveau composé, l'acide 3-méthyl-2-oxopent-3-énoïque. D'un point de vu analytique, il présente de fortes similitudes avec le sotolon : leurs spectres de masse sont quasi identiques et ils sont coélués en CPG sur des phases polaires. Cependant son analyse en CPG-O n'a pas révélé d'odeur particulière.

La compréhension des mécanismes de dégradation du sotolon et de cyclisation de l'acide 2-méthyl-4-oxopent-2-énoïque en milieu acido-basique, nous a permis de synthétiser simplement et à moindre coût un analogue deutéré du sotolon, pur et isotopiquement stable. Son utilisation comme étalon interne a permis de développer une méthode fiable de dosage du sotolon par dilution isotopique dans le vin, et pourra être envisagée pour l'étude du sotolon dans divers produits alimentaires.

Au pH du vin, l'acide 2-méthyl-4-oxopent-2-énoïque ne peut exister compte tenu de son aptitude à se cycliser en milieu acide pour conduire au sotolon. Il pourrait être en revanche un précurseur du sotolon en milieu acide. Ainsi, sa présence dans d'autres milieux à pH plus élevés pourra être étudiée.

Toutefois, quelle que soit son origine, les teneurs en sotolon dans les vieux vins de Petit et Gros Manseng montrent qu'il n'est pas un marqueur de l'arôme de ces vins, mais qu'il pourrait tout de même y contribuer indirectement.

V. Etude du potentiel aromatique du Petit et du Gros Manseng

V.1. Dispositif expérimental

V.1.1. Le réseau de parcelles

Un réseau de parcelles a été mis en place dans le Gers, avec l'aide du Syndicat des Vins de Pays de Côtes de Gascogne, de la station régionale ITV Midi-Pyrénées et de son antenne gersoise du Château de Mons. Nous avons sélectionné 3 sites différents, G, F et T, afin de couvrir une partie de la diversité pédologique de la zone de production des Côtes de Gascogne. Chaque site regroupe une parcelle de Petit Manseng et une parcelle de Gros Manseng, géographiquement proches et plantées sur des sols similaires (Figure 43). Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 12. Le dispositif est ainsi constitué de 6 parcelles (GP, GG, FP, FG, TP et TG), suivies au cours de 3 millésimes (2002, 2003 et 2004), excepté TP et TG qui n'ont pas été suivies en 2002. Pour chacune des parcelles, 40 kg de raisins ont été récoltés à 3 stades de maturité différents. En 2002 cependant, seules 2 dates de récolte ont été réalisées. Pour des raisons pratiques, pour un même cépage les vendanges ont été fixées à la même date. Cependant afin d'éviter des écarts de maturité trop importants entre parcelles, en 2003, les dates de récolte ont été fixées indépendamment pour presque toutes les parcelles (Tableau 13).

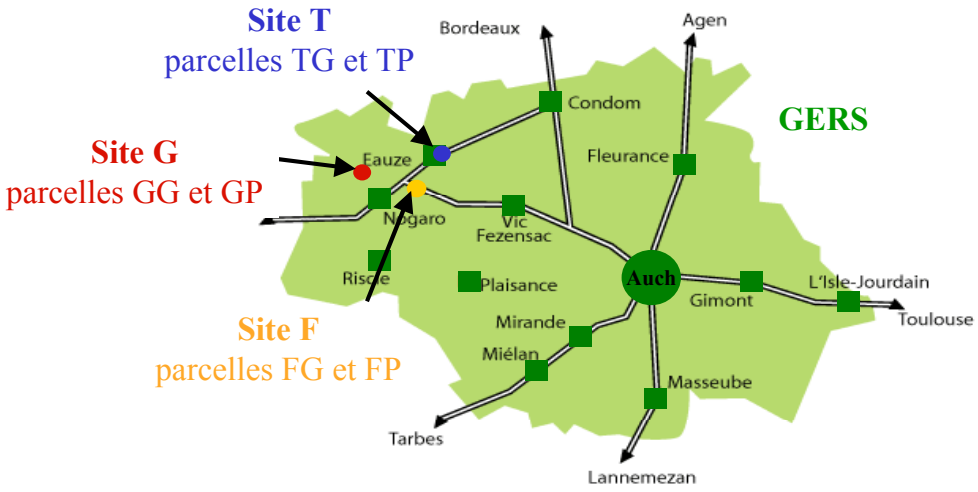


Figure 43 : Situation géographique des 6 parcelles du dispositif expérimental

Tableau 12 : Caractéristiques des 6 parcelles du dispositif expérimental.

SITE	G		F		T	
PARCELLE	GP	GG	FP	FG	TP	TG
Lieu	Panjas		Noulens		Eauze	
Cépage	Petit Manseng	Gros Manseng	Petit Manseng	Gros Manseng	Petit Manseng	Gros Manseng
Porte-greffe	Gravesac	Gravesac	3309	SO4	Riparia	SO4
Pédologie	sable-argile	sable-argile	limon-argile	argile	limon-argile	sable-argile
Année de plantation	1998	1995	1992	1994	2000	1990
Orientation des rangs	NE / SO	E / O	E / O	E / O	NE / SO	E / O
écartement entre rang (m)	2,8	2,8	3	3	2,5	3
écartement entre pieds (m)	1	1	1	1,2	0,8	1
densité (ceps/ha)	3572	3571	3333	2779	5000	3334
entretien du sol	enherbement total	enherbement total	enherbement total	enherbement1/3	enherbement1/2	enherbement1/3

Pour chacun des 44 échantillons de raisins, (18 échantillons en 2003, 18 en 2004 et 8 en 2002), une partie a été congelée et l'autre vinifiée selon un schéma classique de vinification en blancs (cf. chapitre III.1.1.2 p 17). Les vins ont été soutirés, sulfités à 5 g/hL pour les vins secs et 8 g/hL pour les vins moelleux, puis élevés sur lies fines pendant 4 mois à 4°C, avant d'être mis en bouteille. La conservation est effectuée à 4°C avant l'analyse.

Une codification, valable pour les échantillons de raisins et les vins correspondants, permet d'identifier chacun des 44 échantillons, par le millésime, le site, le cépage et la date de récolte (Figure 44).

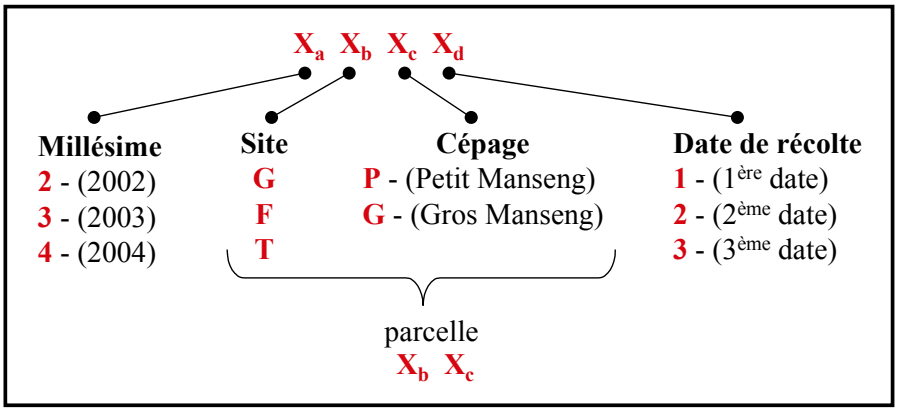


Figure 44 : Codification des 44 échantillons de Petit et Gros Manseng.

V.1.2. Caractéristiques physico-chimiques des moûts

Les dates de récolte et les mesures de sucres et d'acidité totale des moûts sont présentées pour l'ensemble des échantillons du dispositif expérimental dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Paramètres physico-chimiques des 44 moûts expérimentaux.

Code	Variété	Millésime	Parcelle	Date de récolte	Acidité totale (g H_2SO_4/L)	Sucres (g/L)
2GP1	Petit Manseng	2002	GP	**1-** 8-oct	5,2	245
2GP2	Petit Manseng	2002	GP	**2-** 24-oct	5,4	242
2GG1	Gros Manseng	2002	GG	**1-** 8-oct	6,2	220
2GG2	Gros Manseng	2002	GG	**2-** 24-oct	6	234
2FP1	Petit Manseng	2002	FP	**1-** 8-oct	5,7	222
2FP2	Petit Manseng	2002	FP	**2-** 24-oct	6,1	218
2FG1	Gros Manseng	2002	FG	**1-** 8-oct	6	250
2FG2	Gros Manseng	2002	FG	**2-** 24-oct	6,2	260
3GP1	Petit Manseng	2003	GP	**1-** 4-sept	4,3	245
3GP2	Petit Manseng	2003	GP	**2-** 24-sept	3,2	274
3GP3	Petit Manseng	2003	GP	**3-** 24-oct	2,3	255
3GG1	Gros Manseng	2003	GG	**1-** 12-sept	5,5	215
3GG2	Gros Manseng	2003	GG	**2-** 25-sept	4,7	244
3GG3	Gros Manseng	2003	GG	**3-** 16-oct	4	263
3FP1	Petit Manseng	2003	FP	**1-** 4-sept	5,3	240
3FP2	Petit Manseng	2003	FP	**2-** 24-sept	4	280
3FP3	Petit Manseng	2003	FP	**3-** 16-oct	3,5	285
3FG1	Gros Manseng	2003	FG	**1-** 12-sept	6	156
3FG2	Gros Manseng	2003	FG	**2-** 29-sept	4,4	208
3FG3	Gros Manseng	2003	FG	**3-** 16-oct	3,9	223
3TP1	Petit Manseng	2003	TP	**1-** 15-sept	5,2	243
3TP2	Petit Manseng	2003	TP	**2-** 24-sept	3,6	277
3TP3	Petit Manseng	2003	TP	**3-** 24-oct	3,4	277
3TG1	Gros Manseng	2003	TG	**1-** 15-sept	6,7	211
3TG2	Gros Manseng	2003	TG	**2-** 25-sept	4,7	248
3TG3	Gros Manseng	2003	TG	**3-** 24-oct	3,7	252
4GP1	Petit Manseng	2004	GP	**1-** 20-sept	-	247
4GP2	Petit Manseng	2004	GP	**2-** 6-oct	5,8	287
4GP3	Petit Manseng	2004	GP	**3-** 3-nov	5,1	292
4GG1	Gros Manseng	2004	GG	**1-** 30-sept	9,3	191
4GG2	Gros Manseng	2004	GG	**2-** 14-oct	7,5	232
4GG3	Gros Manseng	2004	GG	**3-** 3-nov	5,6	240
4FP1	Petit Manseng	2004	FP	**1-** 20-sept	8,6	238
4FP2	Petit Manseng	2004	FP	**2-** 6-oct	7,2	285
4FP3	Petit Manseng	2004	FP	**3-** 3-nov	4,6	286
4FG1	Gros Manseng	2004	FG	**1-** 30-sept	8	174
4FG2	Gros Manseng	2004	FG	**2-** 14-oct	6	214
4FG3	Gros Manseng	2004	FG	**3-** 3-nov	5,2	217
4TP1	Petit Manseng	2004	TP	**1-** 20-sept	8,2	240
4TP2	Petit Manseng	2004	TP	**2-** 6-oct	6,6	288
4TP3	Petit Manseng	2004	TP	**3-** 3-nov	5,5	287
4TG1	Gros Manseng	2004	TG	**1-** 30-sept	8,6	190
4TG2	Gros Manseng	2004	TG	**2-** 14-oct	6,5	237
4TG3	Gros Manseng	2004	TG	**3-** 3-nov	5,2	233

Marqué par des pluies fréquentes, le millésime 2002 est tardif et les raisins sont peu matures, particulièrement pour les 2 parcelles de Petit Manseng, GP et FP. Pour toutes les parcelles (GP, GG, FP et FG), l'état de maturation des raisins est équivalent entre les 2 dates de récolte suivies.

La sécheresse et les températures exceptionnellement élevées en 2003 en font un millésime atypique. Très précoce et peu productif (Tableau 14), il est aussi caractérisé par une maturité importante, marquée par une acidité très basse.

Le millésime 2004 est tardif et très productif. La différence de maturité avec 2003 est essentiellement due à une acidité beaucoup plus élevée.

Tableau 14 : Rendements moyens par millésime et par cépage.

	Rendements moyens (tonnes/ha)	
	Petit Manseng	Gros Manseng
2002	11	6
2003	6	11
2004	14	21

L'évolution du rapport sucres/acidité totale permet de visualiser les différences de maturité entre les échantillons et permettra par la suite de comparer des échantillons de maturités équivalentes pour d'autres paramètres mesurés. Excepté en 2002, la 1ère date de récolte pour les parcelles de Petit Manseng est en avance d'environ 7 à 10 jours sur celles des parcelles de Gros Manseng des sites correspondants. Malgré cela, en première date de récolte, les teneurs en sucres sont plus importantes pour les raisins de Petit Manseng, ce qui leur confère un niveau de maturité plus élevé que ceux du Gros Manseng (Figure 45 et Figure 46).

Par ailleurs, excepté en 2002, les différences de maturité sont plus importantes entre les parcelles de Petit Manseng qu'entre celles de Gros Manseng et ces différences sont accentuées en 2003 pour les 2 cépages (Figure 45 et Figure 46).

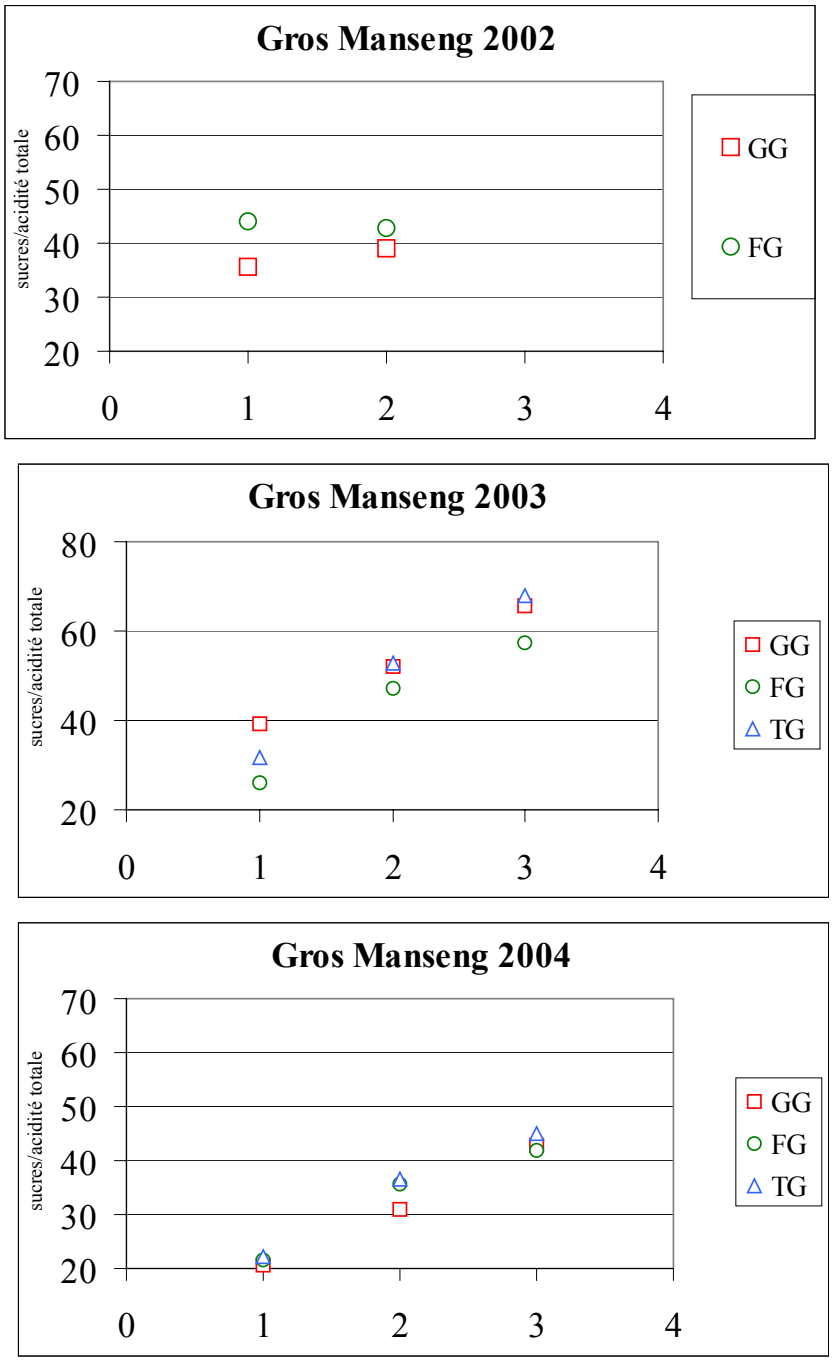


Figure 45 : Evolution du rapport sucres/acidité totale des 3 parcelles de Gros Manseng pour les millésimes 2002, 2003 et 2004.

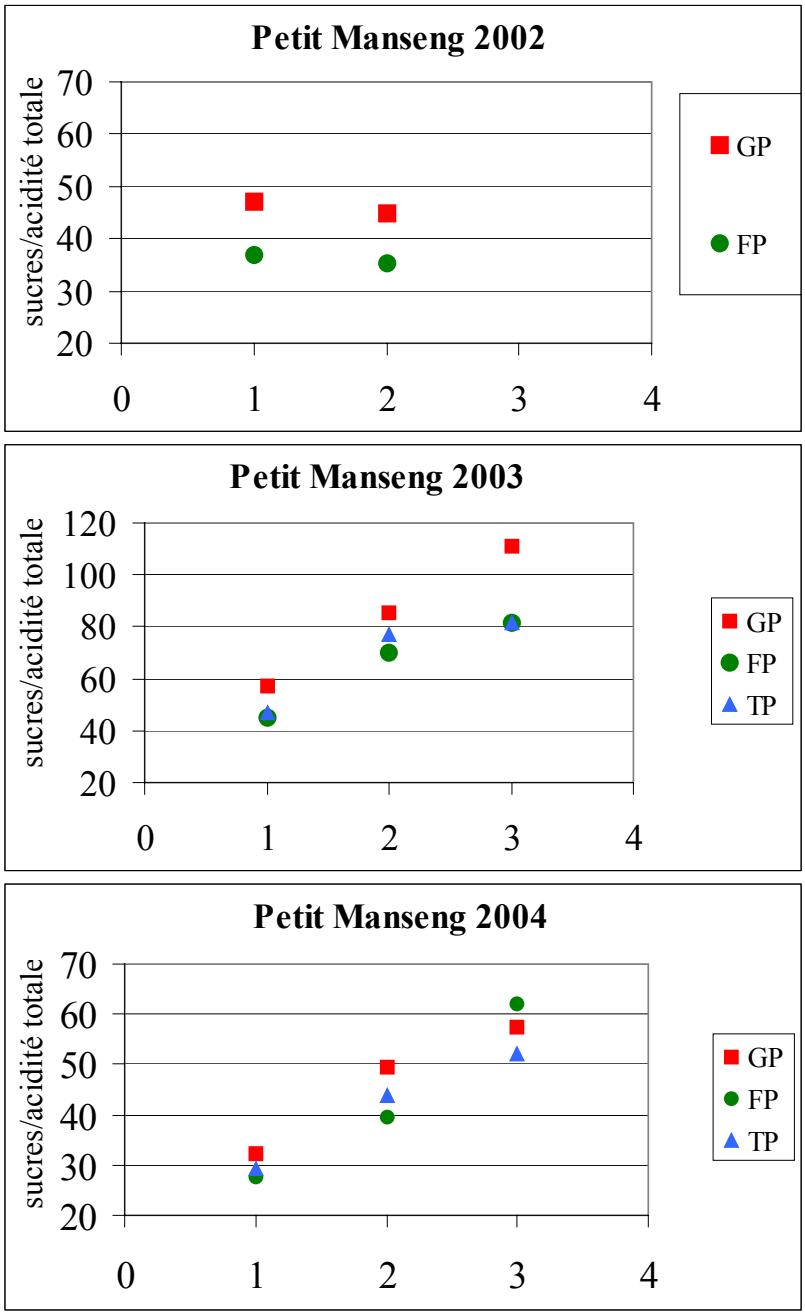


Figure 46 : Evolution du rapport sucres/acidité totale des 3 parcelles de Petit Manseng pour les millésimes 2002, 2003 et 2004.

V.2. Etude des fractions glycosylée et libre de l'arôme des baies de Petit et de Gros Manseng

V.2.1. Introduction bibliographique

Les précurseurs glycosidiques constituent un ensemble très varié de composés inodores identifiés initialement dans le raisin (Cordonnier et Bayonove, 1974). Ils sont à l'origine d'un ensemble de composés volatils, connus pour leur contribution globale à l'arôme du vin (Francis *et al.*, 1992; Francis *et al.*, 1996; Kotseridis, 1999; Schneider, 2001).

V.2.1.1. Structure des précurseurs glycosidiques

Ces composés sont constitués d'une unité osidique liée par une liaison β-glucosidique à un composé volatil appelé aglycone. Le sucre peut être constitué d'une ou deux unités oses (mono et diglycoside). Plusieurs classes ont ainsi été identifiées (Williams *et al.*, 1982a; Voirin, 1990; Voirin *et al.*, 1990):

- β-D-glucopyranosides
- 6-O-(α-L-arabinofuranosyl)-β-D-glucopyranosides
- 6-O-(α-L-rhamnopyranosyl)-β-D-glucopyranosides
- 6-O-(β-D-apiofuranosyl)-β-D-glucopyranosides

Dans le raisin, les précurseurs glycosidiques, excepté ceux de C_{13}-norisoprénoïdes actuellement connus (Skouroumounis, 1997), sont des diglucosides. La partie aglycone est constituée de composés volatils appartenant aux classes chimiques des alcools non terpéniques, des composés en C6, des phénols, des monoterpénols et des C_{13}-norisoprénoïdes. Ces classes chimiques regroupent des composés présentant nécessairement une fonction alcool ou acide pour établir la liaison glycosidique.

V.2.1.2. Localisation et biosynthèse des précurseurs glycosidiques

Dans le cas de la vigne, les glycosides sont présents dans différents organes. Les feuilles en contiennent près de 10 fois plus que la baie, et leur composition est également différente (Wirth *et al.*, 2001). La concentration dans le raisin est de l'ordre du mg/L pour les cépages dit neutres (Schneider *et al.*, 2002; Ségurel, 2005), mais peut atteindre plusieurs dizaines de mg/L dans les jus de Muscat pour lesquels la classe des monoterpénols est largement dominante (Voirin *et al.*, 1990). Pour différents cépages, rouges ou blancs, la répartition dans les différentes parties de la baie est variable, mais la pellicule en contient la plus grande partie, entre 60 % et 75 % (Wilson *et al.*, 1984; Günata *et al.*, 1985a; Gomez *et al.*, 1994), d'où l'importance des étapes pré-fermentaires et de macération sur l'extraction de ces précurseurs (Mc Mahon *et al.*, 1999).

Plusieurs travaux (Stahl-Biskup *et al.*, 1993; Winterhalter et Skouroumounis, 1997) suggèrent que la glycosylation est un moyen de stockage de composés volatils, limitant ainsi la toxicité de certains d'entre eux. Les glycosides apparaissent dans la baie au moment de la véraison et s'accumulent au cours du processus de maturation (Williams *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1986; Marais, 1987; Park *et al.*, 1991). Cependant, il n'y a pas de relation simple entre les paramètres classiques de suivi de la maturité du raisin (sucres et acidité totale) et les teneurs en glycosides, notamment en fin de maturation (Schneider, 2001). Par ailleurs, l'accumulation des glycosides et des composés d'arôme libres est significative au stade de maturation avancée, alors que l'accumulation des sucres ralentit (Gholami *et al.*, 1995). De même, les teneurs en glycosides de la baie sont plus affectées par la modification de l'environnement lumineux de la grappe que celui des feuilles (Bureau *et al.*, 2000). Ainsi, l'ensemble de ces travaux est en faveur d'une biosynthèse des glycosides dans la baie.

V.2.1.3. Hydrolyse et formation de composés odorants

L'hydrolyse des glycosides, conduisant à la formation de composés odorants, peut être enzymatique ou chimique. La libération des aglycones par hydrolyse enzymatique s'effectue soit directement par l'action de disaccharidase (Günata *et al.*, 1998; Sarry, 2003), soit via une séquence d'enzymes libérant l'ose terminal puis l'unité β-D-glucopyranosidique (Günata *et al.*, 1998). Mais l'acidité des moûts et la faible stabilité des enzymes en conditions oenologiques limitent les activités enzymatiques au cours du procédé de vinification. Seules les bactéries lactiques pourraient, au cours de la fermentation malolactique, hydrolyser une partie des glycosides (Ugliano *et al.*, 2003).

En revanche, le pH acide des moûts et des vins permet une hydrolyse chimique des glycosides. Ce processus, le plus souvent lent et dépendant de la température, se produit essentiellement au cours du vieillissement du vin en bouteille (Marais, 1983; Voirin *et al.*, 1990; Winterhalter, 1993; De La Presa-Owens et Noble, 1997). Les aglycones ainsi libérées contribuent directement ou après transformation chimique, à l'arôme du vin (Francis *et al.*, 1992; Francis *et al.*, 1996; Schneider, 2001; Ségurel, 2005).

V.2.1.4. Analyse

Les réactions d'hydrolyse chimique et enzymatique ont permis le développement de méthodologies d'analyse permettant de mesurer ce potentiel aromatique (Williams *et al.*, 1982b; Günata *et al.*, 1985b; Voirin *et al.*, 1992) et d'évaluer les composés formés au cours du vieillissement du vin à partir de ces mêmes précurseurs (Francis *et al.*, 1992, 1994; Francis

et al., 1996; Kotseridis, 1999; Schneider, 2001; Ségurel, 2005). Progressivement, le besoin de simplifier et de réduire la durée de l'analyse a conduit à optimiser les étapes d'extraction (Palma *et al.*, 2000) et d'analyse. Ainsi, la méthode du glucosyl-glucose (G-G) permet d'estimer globalement la fraction liée de l'arôme par dosage enzymatique du glucose libéré par hydrolyse chimique (Williams *et al.*, 1995; Iland *et al.*, 1996). Récemment, une méthode d'analyse par infra-rouge à transformé de Fourrier (IRTF) d'extraits glycosidiques obtenus sur résine C_{18}, a été mise au point. Associée aux techniques de chimiométrie, elle permet de déterminer les teneurs de chaque classe chimique de glycosides (Schneider *et al.*, 2005).

Pour étudier la composition des baies de Petit et Gros Manseng en précurseurs glycosidiques, nous avons utilisé la méthode de référence qui consiste à analyser les composés volatils issus de l'hydrolyse enzymatique de précurseurs glycosidiques extraits à partir du moût sur résine C_{18} (Williams *et al.*, 1982b). Cette méthode de dosage indirect est semi-quantitative, mais réalisée avec 4 répétitions pour chaque échantillon, elle a une valeur comparative. Les concentrations sont exprimées en µg équivalents de 4-nonanol (étalon externe) par litre de jus.

V.2.2. Résultats et discussions

L'étude de l'arôme variétal du Petit et du Gros Manseng porte d'une part, sur la caractérisation de la composition des baies en composés volatils libres (fraction libre) et en précurseurs glycosidiques (fraction liée), et d'autre part sur l'influence de certains paramètres agro-climatiques sur ce potentiel aromatique.

Pour cette étude, l'ensemble des 44 échantillons issus du réseau de parcelles mis en place pour les millésimes 2002, 2003 et 2004 (Chapitre V.1 p 98) ont été analysés et les résultats sont regroupés en annexe (Annexe 6 à Annexe 13).

V.2.2.1. Fraction libre

Le Petit et le Gros Manseng font partie des cépages dits neutres, qui regroupent les variétés dont les raisins sont pauvres en composés volatils. A partir des échantillons de raisins du millésime 2002, nous avons obtenu les fractions libres de l'arôme par extraction des jus au dichlorométhane. L'analyse en CPG-SM de ces extraits a confirmé la pauvreté de ces 2 cépages en composés volatils. Plusieurs composés en C6 (alcools : hexanol, (*E)*-2-hexénol et (*Z)*-3-hexénol ; aldéhydes : (*E)-2*-hexénal, hexanal) connus pour se former majoritairement au cours du broyage (Cordonnier et Bayonove, 1981), sont présents. Leurs teneurs sont très dépendantes des conditions d'obtention des moûts à partir des raisins. Comme dans les raisins d'autres cépages, le 2-phényléthanol et l'alcool benzylique sont aussi présents, mais à des teneurs de quelques dizaines de µg/L, bien en dessous de leurs seuils de perception. Ainsi, la fraction libre contribue peu à l'arôme.

V.2.2.2. Composition de la fraction glycosylée

Le Petit Manseng et le Gros Manseng présentent des teneurs totales en aglycones qui sont très proches, 1099 µg/L et 1081 µg/L respectivement (moyennes sur l'ensemble des échantillons des 3 millésimes). Les deux classes d'aglycones les plus abondantes sont les monoterpénols et les C_{13}-norisoprénoïdes, représentant 80 % de l'ensemble (Figure 47 et Figure 48). La répartition de ces 2 familles permet de les distinguer l'un de l'autre, la teneur en monoterpénols étant deux fois plus élevée dans le Petit Manseng que dans le Gros Manseng. Elle permet aussi de les différencier d'autres cépages tels le Melon B, le Grenache, la Syrah (Kotseridis, 1999; Schneider, 2001; Ségurel, 2005), pour lesquels la proportion de chacune de ces 2 classes est à peu près équivalente (32 % à 37 %), ou encore les variétés de

Muscat, dont la classe des monoterpénols est prédominante. Les 20 % restant sont constitués des classes suivantes : les alcools non terpéniques, les composés en C_6 et les phénols.

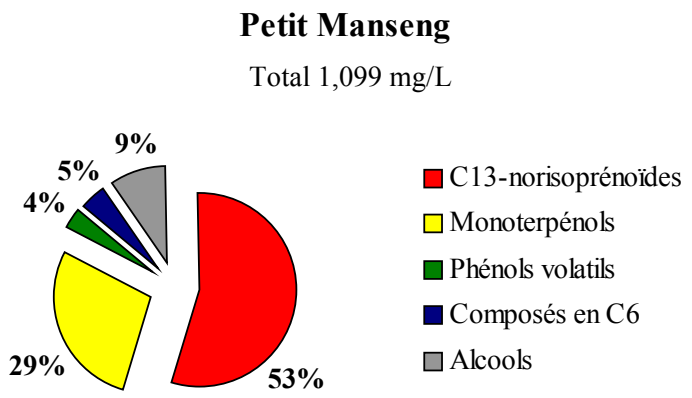


Figure 47 : Répartition des précurseurs glycosidiques par classes chimiques dans les baies de Petit Manseng (moyenne des 22 échantillons)

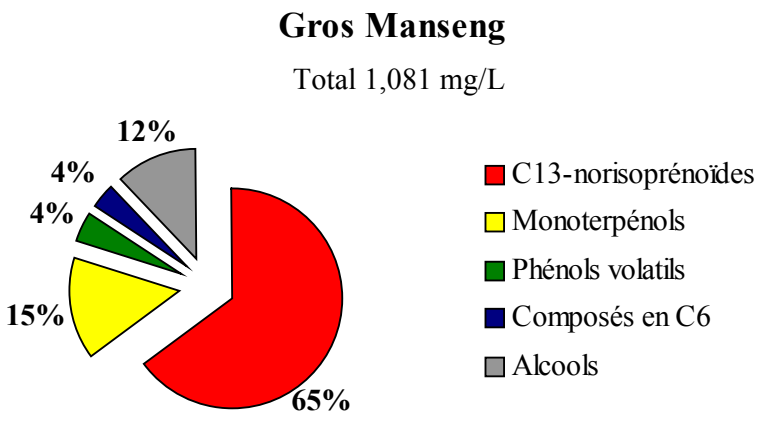


Figure 48 : Répartition des précurseurs glycosidiques par classes chimiques dans les baies de Gros Manseng (moyenne des 22 échantillons)

Pour chacun des cépages, 60 aglycones ont été détectées et quantifiées dans l'hydrolysat enzymatique des fractions glycosidiques de baies : 22 C_{13}-norisoprénoïdes, 22 monoterpénols, 6 phénols volatils, 3 composés en C_6 et 7 alcools non terpéniques (Tableau 15).

Les C_{13}-norisoprénoïdes

Pour ces deux cépages, la classe des C_{13}-norisoprénoïdes est de loin la plus abondante. Les teneurs, comprises entre 600 µg/L et 700 µ/L, sont particulièrement plus élevées que pour d'autres cépages tels que le Melon B., le Grenache et la Syrah. Ces composés issus de la dégradation régiosélective des caroténoïdes dans la baie (Winterhalter, 1992), sous l'influence

d'une dioxygénase (Mathieu *et al.*, 2005), sont connus pour générer des composés très odorants dans des jus de fruit (Skouroumounis *et al.*, 1992) et au cours du vieillissement des vins (Winterhalter, 1993).

Les monoterpénols

La majorité des monoterpénols identifiés sont des monoterpènediols. Plus abondants que les monoterpénols, et peu odorants, ils peuvent être à l'origine d'autres composés d'arôme par transformation chimique dans le vin (Williams *et al.*, 1980). Les teneurs moyennes dans les raisins de Petit Manseng (300 µg/L) sont 2 fois supérieures à celles des raisins de Gros Manseng. Parmi les 10 composés discriminants ces cépages, 6 d'entre eux [(α-terpinéol, 2-hydroxy-*exo*-cinéole, les diols (58-81-140) et (71-109-152), le *p*-menth-1-ène-7,8-diol et un autre dérivé menthène (59-109-138)] sont quasiment absents dans le Gros Manseng. Ces composés de structure menthénique, sont en partie responsables de la différenciation variétale des 2 cépages. Leur influence sur l'arôme du vin est inconnue sauf dans le cas du *p*-menth-1-ène-7,8-diol. Ce monoterpénol et ses dérivés, peu odorants, ne contribuent pas à l'arôme du vin (Schneider, 2001).

Les phénols volatils

Parmi les 5 phénols identifiés (Tableau 15), 4 discriminent les 2 cépages. Toutefois, leurs concentrations sont faibles, alors que leurs seuils de perception olfactive sont élevés. Seul l'eugénol, à l'odeur de clou de girofle, plus abondant dans le Petit Manseng que dans le Gros Manseng, dépasse son seuil de perception (11 µg/L ; Etiévant, 1991).

Les composés en C_6

La classe des composés en C6 regroupe le (*Z)*-3-hexénol, le (*E)*-2-hexénol et l'hexanol, ce dernier étant largement majoritaire (Tableau 15). La présence de ces composés sous forme glycosylée est connue (Cordonnier et Bayonove, 1981), mais comme dans la majorité des cépages, ces teneurs sont très faibles par rapport à celles des composés libres correspondants formés par oxydation enzymatique des lipides du raisin, au cours des opérations préfermentaires. Dans tous les cas, leur contribution aromatique est très limitée.

Les alcools non terpéniques

Les plus abondants sont l'alcool benzylique et le 2-phényléthanol. Ce dernier est également formé au cours de la fermentation en quantités bien plus élevées que celles mesurées sous forme glycosylée. Les teneurs des 5 autres alcools non terpéniques sont toutes très faibles (Tableau 15).

Tableau 15 : Composition en aglycones de la fraction glycosylée des baies de Petit et Gros Manseng (moyenne de tous les échantillons de chaque cépage ; en µg/L de jus ; [a] composés non détectés en 2002 ; cf. Annexe 6 à Annexe 13)

	Petit Manseng	Gros Manseng
C_{13}-norisoprénoïdes		
3,4-dihydro-3-oxo-actinidol I	7,3	8,1
3,4-dihydro-3-oxo-actinidol II et III	19,3	24,5
3-hydoxy-β-damascone + 3,4-dihydro-3-oxo-actinidol IV	41,9	48,7
3-hydroxy-7,8-dihydro-β-ionone	11,0	16,3
3-hydroxy-5,6-dihydro-β-ionol	82,3	64,6
inc. (109-125-208)	10,5	7,4
acétovanillone + 3-oxo-α-ionol + 4-oxo-β-ionol	180,1	263,7
inconnu (119-159-177)	41,5	42,8
3-hydroxy-7,8-dihydro-β-ionol	31,5	37,2
3-hydroxy-β-ionone + 4-oxo-7,8-déhydo-β-ionol	39,3	51,4
3-oxo-7,8-dihydro-α-ionol	34,3	44,8
3-hydroxy-5,6-époxy-β-ionone	6,4	5,6
3-oxo-α-retro-ionol	22,8	21,6
3-hydroxy-7,8-déhydro-β-ionol	24,1	18,3
3-hydroxy-4-oxo-β-ionol[a]	7,1	11,6
déhydrovomifoliol[a]	9,5	9,7
vomifoliol	22,2	26,9
Somme	**588,3**	**699,0**
Monoterpénols		
oxyde de linalol furanique *trans*	4,9	5,0
oxyde de linalol furanique *cis*	9,5	11,7
linalol	0,6	0,6
α-terpinéol	30,6	0,6
oxyde de linalol pyranique *trans*	6,4	8,0
oxyde de linalol pyranique *cis*	5,1	7,2
nérol	4,7	5,7
géraniol + acide hexanoïque	16,8	14,7
2-hydroxy-*exo* -hydroxycinéole	6,9	0,4
3,7-diméthyl-1,5-octadièn-3,7-diol	2,4	2,2
8-hydroxy-6,7-dihydrolinalol	5,0	6,1
hydrate de nérol	7,9	7,5
E -8-hydroxylinalol	41,9	32,6
hydrate de géraniol + *Z* -8-hydroxylinalol	38,1	34,2
acide géranique	20,4	12,1
dérivé menthène (59-109-138)[a]	7,1	0,4
diol (58-81-140)[a]	9,7	0,0
diol (71-109-152)	8,2	0,3
p-menth-1-ène-7,8-diol	88,0	6,7
diol	6,3	4,5
E -8-hydroxygeraniol	6,1	4,5
Somme	**322,4**	**163,8**
Phénols volatils		
salicylate de méthyle[a]	0,4	2,3
eugénol	8,6	6,5
vanillate de méthyle	8,5	12,7
3,4-triméthoxybenzylalcool + 3-oxo-retro-α-ionol	17,4	20,0
syringoate de méthyle	2,9	6,9
Somme	**37,7**	**47,9**
Composés en C_6		
hexanol	45,0	36,5
Z -3-hexénol	1,3	2,3
E -2-hexénol	1,7	2,2
Somme	**48,0**	**41,0**
Alcools		
heptan-2-ol	2,8	2,8
octén-3-ol	3,3	3,9
heptanol	2,6	3,9
octanol	2,9	4,1
oct-2-énol[a]	2,7	3,3
alcool benzylique	23,6	44,2
2-phényléthanol	64,7	67,5
Somme	**102,2**	**129,0**
Total	**1098,6**	**1080,7**

Des analyses de variance testant l'effet cépage en 2003 et 2004, ont été réalisées en utilisant les différentes parcelles de chaque cépage comme répétitions (Tableau 16). Ces résultats permettent de comparer la composition en précurseurs glycosidiques du Petit et du Gros Manseng, pour 2 millésimes très différents, 2003 et 2004. En 2003, les différences entre les cépages ne concernent que la classe des monoterpénols. En 2004, les classes des C_{13}-norisoprénoïdes, des monoterpénols et des phénols volatils discriminent les 2 cépages. Ceci confirme que le Petit Manseng se distingue du Gros Manseng par des teneurs en monoterpénols systématiquement plus abondantes. L'analyse de variance montre également l'importance de l'effet millésime, puisque toutes les classes discriminent les millésimes 2003 et 2004.

Tableau 16 : Analyses de variance de l'effet cépage sur les teneurs (µg/L) en aglycones des jus des échantillons de date 2. (ANOVA selon le modèle 1 facteur (cépage) [a] et 2 facteurs (cépages×millésime) [b] ; les différentes parcelles sont prises comme répétitions. [c] probabilité associée à l'existence d'un effet, * P<0,05 ; ** P<0,005 ; ns non significatif ; Hiérarchie des effets significatifs A>B ; P).

	2003[a]			**2004[a]**			**2003 et 2004[b]**		
	Cépage[c]	**P**	**G**	**Cépage[c]**	**P**	**G**	**Millésime[c]**	**Cépage[c]**	**Interaction[c] Millésime x Cépage**
C_{13}-norisoprénoïdes	ns			*	B	A	**	*	ns
Monoterpénols	**	A	B	**	A	B	**	**	ns
Phénols volatils	ns			*	B	A	**	*	ns
Composés en C_6	ns			ns			*	ns	ns
Alcools	ns			ns			*	ns	ns
Somme	ns			ns			**	ns	ns

V.2.2.3. Influence de certains paramètres agronomiques et climatiques sur les teneurs en précurseurs glycosidiques

V.2.2.3.1. Etude du Petit Manseng

Afin d'évaluer l'influence du millésime, de la parcelle et de la maturité sur le potentiel en précurseurs glycosidiques des baies de Petit Manseng, une analyse en composante principale a été réalisée sur les 22 échantillons de ce cépage, en utilisant comme variables les 5 classes chimiques d'aglycones (exprimées en µg/L de jus) : les C_{13}-norisoprénoïdes (C13), les monoterpénols (TER), les phénols volatils (PHE), les composés en C_6 (C6) et les alcools (ALC) (Figure 49 et Figure 50). Par ailleurs les données de sucres et d'acidité totale des moûts correspondants sont ajoutées à la matrice des corrélations des données glycosides (Tableau 17). De plus, pour appuyer les observations avec des données chiffrées, la répartition des glycosides par classe chimique est détaillée dans la Figure 51.

Ainsi, le plan dessiné par les 2 premier axes restitue 86 % de l'information (Figure 49 et Figure 50). Le tableau des corrélations montre que les classes des C_{13}-norisoprénoïdes et des monoterpénols sont positivement corrélées entre elles, ainsi que celles des composés en C_6 et des alcools (Tableau 17). La disposition de ces 4 classes sur le cercle de corrélation montre qu'elles contribuent positivement à l'axe 1 essentiellement. L'axe 2 est négativement corrélé à la classe des phénols volatils.

La disposition des 22 échantillons sur le plan formé par les axes 1 et 2 nous permet de regrouper les différentes dates de récolte d'une même parcelle pour les 3 millésimes (Figure 50). Ainsi, en rouge est représentée la parcelle GP en 2002, 2003 et 2004. Les groupes jaune et bleu correspondent respectivement aux parcelles FP et TP.

Influence du millésime

Le millésime a une influence majeure sur les teneurs en glycosides (Figure 51). Pour les 3 parcelles (GP, FP et TP), les teneurs varient avec le millésime d'un facteur 1,5 à 2 selon les classes chimiques, mais cette influence est différente en qualité et en quantité selon les parcelles, ce qui témoigne de l'interaction millésime/parcelle. Ainsi, en 2003, les échantillons de la parcelle GP sont fortement corrélés à l'axe 1, ce qui traduit une augmentation globale des teneurs en glycosides. Effectivement, pour cette parcelle les 2 classes majeures, les C_{13}-norisoprénoïdes et les monoterpénols, sont à des teneurs 2,5 et 2,2 fois plus élevées en 2003 qu'en 2004 (Figure 51). Par ailleurs, pour les 2 autres parcelles FP et TP, les teneurs

sont plus élevées en 2003, mais dans une moindre mesure. Pour TP, les teneurs en C_{13}-norisoprénoïdes sont seulement 1,2 fois supérieures en 2003 qu'en 2004 (Figure 51). De plus, pour ce même millésime 2003, les échantillons des 2 parcelles (FP et TP) sont négativement corrélés à la classe des PHE selon l'axe 2 (Figure 50). En effet, la classe des phénols est plus abondante en 2004 qu'en 2003, pour les échantillons des 3 parcelles, et particulièrement pour FP et TP (Figure 51).

Les longues et fortes chaleurs de 2003, associées à une sècheresse générale, ont entraîné une maturité très avancée des raisins, surtout marquée par une acidité très faible. A titre d'exemple, pour la parcelle GP, les rapports sucres/acidité des échantillons de la date 1 en 2003 et de la date 3 en 2004, sont très proches, mais les teneurs en glycosides restent 2,5 fois supérieures en 2003. Ceci montre que d'un millésime à l'autre le rapport sucres/acidité totale caractérisant l'état de maturité des baies ne peut pas être utilisé pour déterminer les teneurs en glycosides. Toutefois, dans le cas du Petit Manseng, l'acidité totale des jus est négativement corrélée (R=-0,86) aux teneurs totales en glycosides de C_{13}-norisoprénoïdes (Tableau 17).

Influence de la parcelle et de la maturité

En 2003, GP présente la maturité la plus avancée pour les 3 dates de récolte et les échantillons présentent les teneurs en C_{13}-norisoprénoïdes les plus fortes (Figure 51). GP se différencie donc des parcelles FP et TP, dont l'état de maturité et les teneurs en glycosides sont plus faibles. Pour les 3 dates de récolte, les valeurs de sucres et d'acidité totale sont très proches pour ces 2 parcelles, traduisant un état de maturité similaire. Cependant, les teneurs en glycosides suivent des évolutions opposées au cours de la maturité, puisqu'elles augmentent pour la parcelles FP et diminuent significativement pour la parcelle TP.

En 2004, les parcelles FP et GP suivent une maturation similaire. Néanmoins, l'évolution des teneurs en glycosides pour GP atteint un plateau en 2ème date, alors que la progression se poursuit en 3ème date pour la parcelle FP, comme en 2003. Ces 2 exemples, en 2003 et 2004, montrent que le rapport sucres/ acidité totale ne constitue pas un bon indicateur du potentiel glycosidique.

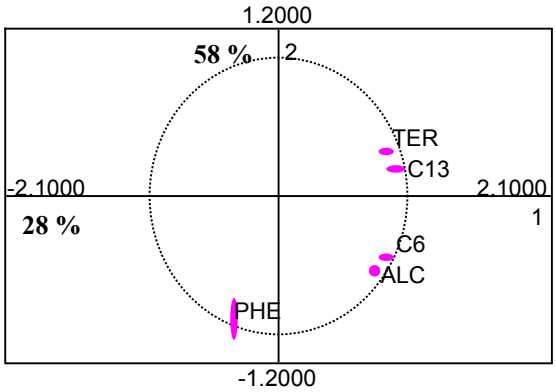


Figure 49 : Répartition des teneurs des 5 classes chimiques de glycosides sur le cercle des corrélations. ACP réalisée avec les teneurs (µg/L) des 5 classes de glycosides et les 22 échantillons de Petit Manseng.

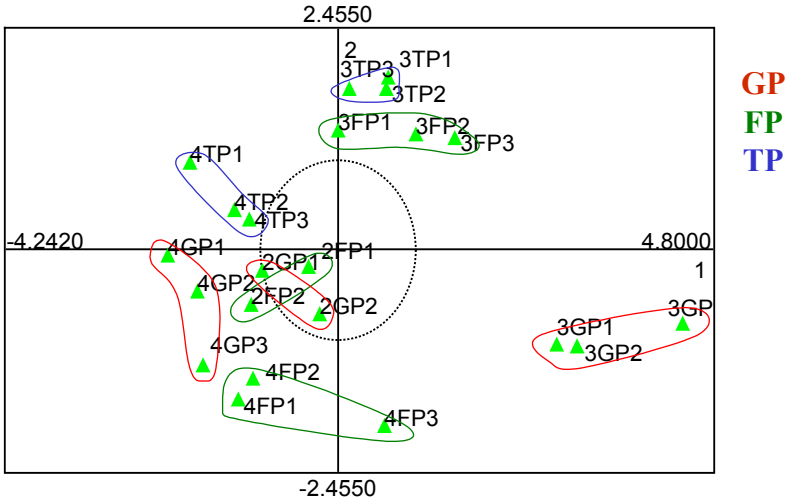


Figure 50 : Répartition des 22 échantillons de Petit Manseng sur le plan formé par les axes 1 et 2 (86%). ACP réalisée avec les teneurs (µg/L) des 5 classes de glycosides de Petit Manseng.

Tableau 17 : Matrice des corrélations des données des échantillons de Petit Manseng

	acidité totale	sucres	C13	TER	PHE	C6	ALC	TOTAL
acidité totale	1,00							
sucres	-0,54	1,00						
C13	-0,68	0,01	1,00					
TER	-0,55	0,23	**0,80**	1,00				
PHE	0,36	-0,04	-0,49	-0,36	1,00			
C6	-0,60	0,48	0,45	0,63	0,11	1,00		
ALC	-0,30	-0,02	0,28	0,23	0,03	0,59	1,00	
TOTAL	-0,69	0,05	**0,95**	**0,83**	-0,35	0,64	0,54	1,00

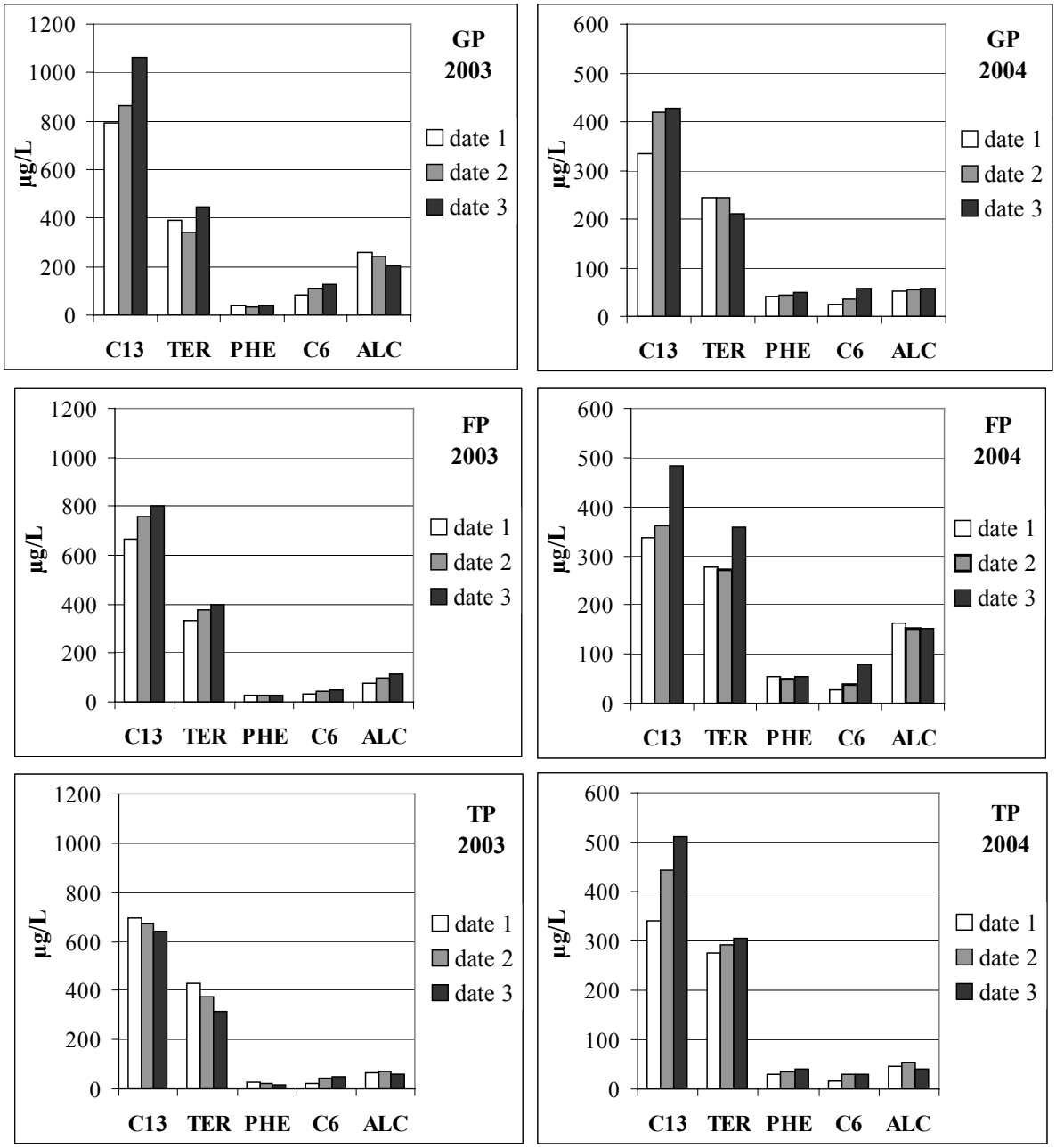


Figure 51 : Teneurs des 5 classes chimiques d'aglycones dans les échantillons des 3 parcelles de Petit Manseng pour les millésimes 2002, 2003 et 2004, et évolution au cours de la maturité (teneurs exprimées en µg équivalents de 4-nonanol/L de jus ; moyenne de 4 répétitions)

V.2.2.3.2. Etude du Gros Manseng

Selon le même principe que pour le Petit Manseng, afin d'évaluer l'influence des différents paramètres du dispositif expérimental sur le potentiel en précurseurs glycosidiques des jus, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée sur les 22 échantillons de Gros Manseng (Chapitre V.1) en utilisant les mêmes variables que précédemment, les 5 classes chimiques d'aglycones (exprimée en µg/L de jus) : les C_{13}-norisoprénoïdes (C13), les monoterpénols (TER), les phénols volatils (PHE), les composés en C_6 (C6)] et les alcools (ALC). Par ailleurs les données de sucres et d'acidité totale des moûts correspondants sont ajoutées à la matrice des données glycosides utilisées pour l'ACP afin d'établir la matrice des corrélations (Tableau 18). De plus, pour appuyer les observations avec des données chiffrées, la répartition des glycosides par classe chimique est détaillée dans la Figure 54.

Ainsi, le plan de l'ACP constitué par les 2 premiers axes restitue 80 % de l'information (Figure 52 et Figure 53). La disposition des variables est analogue à celle obtenue pour le Petit Manseng, toutefois la classe des alcools est cette fois négativement corrélée à l'axe 2. Le tableau des corrélations montre que les classes des C_{13}-norisoprénoïdes et des monoterpénols sont corrélées entre elles et avec les teneurs totales de glycosides (Tableau 18). Il n'y a pas de corrélation entre les classes des composés en C_6 et des alcools comme c'était le cas pour le Petit Manseng. Les classes des C_{13}-norisoprénoïdes et des monoterpénols contribuent positivement à l'axe 1 et comme pour le Petit Manseng, l'axe 2 est porté par la classe des phénols volatils (Figure 52).

De la même manière que pour les échantillons de Petit Manseng, la disposition des 22 échantillons de Gros Manseng (Chapitre V.1) sur le plan formé par les axes 1 et 2 nous permet de regrouper les différentes dates de récolte d'une même parcelle pour les 3 millésimes. Le code couleur a été conservé pour les ACP et permet de distinguer la parcelle GG en rouge, FG en vert et TG en bleu.

Influence du millésime

L'analogie de répartition sur le plan de l'ACP (Figure 53) des 3 parcelles de Gros Manseng pour les millésimes 2002, 2003 et 2004, avec celle des parcelles correspondantes de Petit Manseng (cf. Figure 50 p 116) montre que le millésime a une influence similaire quel que soit le cépage, sur les échantillons de parcelles géographiquement proches et situées sur des types de sols similaires. Ce qui témoigne de l'absence d'interaction millésime×cépage.

Ainsi, comme c'était le cas pour les échantillons de la parcelle de Petit Manseng (GP), plantée sur le même site (G), les échantillons de la parcelle de Gros Manseng (GG) du millésime 2003 se distinguent des autres millésimes par des teneurs en glycosides particulièrement élevées (Figure 53). De la même manière, les parcelles FG et TG sont corrélées négativement aux phénols, comme les parcelles de Petit Manseng correspondantes (Figure 52 et Figure 53). Effectivement, les teneurs en phénols volatils sont 2 fois moins élevées en 2003 qu'en 2004 (Figure 54).

Influence de la parcelle et de la maturité

En 2003, bien que les indices de maturité des raisins en 2ème et 3ème dates de récolte soient proche entre les 3 parcelles GG, FG et TG, les teneurs totales en glycosides sont très différentes d'une parcelle à l'autre (Figure 54). Cette variabilité est surtout due aux différences de teneurs en C_{13}-norisoprénoïdes. De plus en 2004, l'effet parcelle est observé pour TG qui se distingue des 2 autres parcelles par des teneurs en C_{13}-norisoprénoïdes, mais aussi en terpènes plus élevés. Par ailleurs, en 2004 également, alors que les évolutions de la maturité pour les parcelles FG et TG sont analogues, l'optimum des teneurs en glycosides est atteint en 2ème date de récolte pour TG et en 3ème date pour FG.

Ces observations sur les variations et les évolutions des teneurs en glycosides dans les jus de Gros Manseng montrent, comme pour les observations faites sur le Petit Manseng, qu'il y a un effet parcelle et qu'il est variable d'un millésime à l'autre. Par ailleurs, les paramètres de suivi de maturité ne sont pas adaptés à l'estimation du potentiel glycosidique, d'autant que pour le Gros Manseng, aucune corrélation n'est observée avec l'acidité totale des jus, à l'inverse du Petit Manseng.

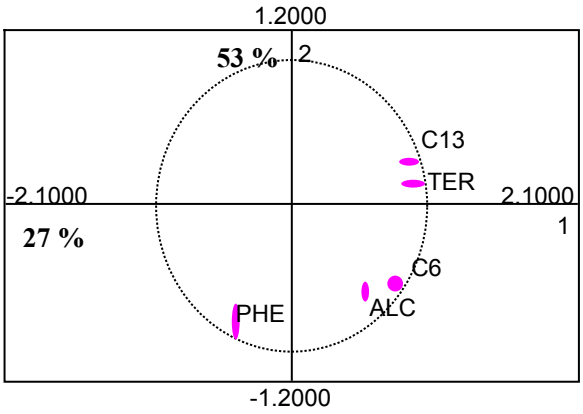


Figure 52 : Répartition des teneurs des 5 classes chimiques de glycosides sur le cercle des corrélations. ACP réalisée avec les teneurs (µg/L) des 5 classes de glycosides et les 22 échantillons de Gros Manseng.

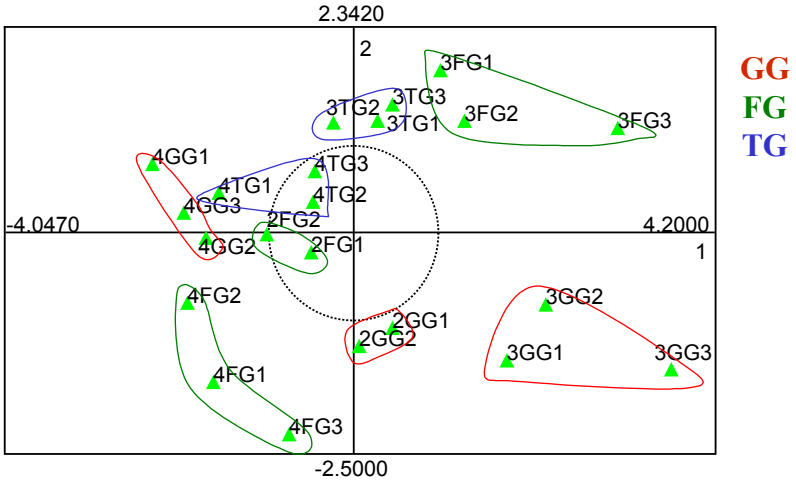


Figure 53 : Répartition des 22 échantillons de Gros Manseng sur le plan formé par les axes 1 et 2 (80%). ACP réalisée avec les teneurs (µg/L) des 5 classes de glycosides de Gros Manseng.

Tableau 18 : Matrice des corrélations des données des échantillons de Gros Manseng.

	acidité totale	sucres	C13	TER	PHE	C6	ALC	TOTAL
acidité totale	1,00							
sucres	-0,31	1,00						
C13	**-0,86**	0,02	1,00					
TER	-0,66	-0,07	**0,76**	1,00				
PHE	0,43	-0,11	-0,43	-0,47	1,00			
C6	-0,70	0,16	0,70	0,46	0,06	1,00		
ALC	-0,33	-0,03	0,46	0,46	0,13	**0,76**	1,00	
TOTAL	**-0,81**	0,00	**0,95**	**0,82**	-0,30	**0,81**	0,68	1,00

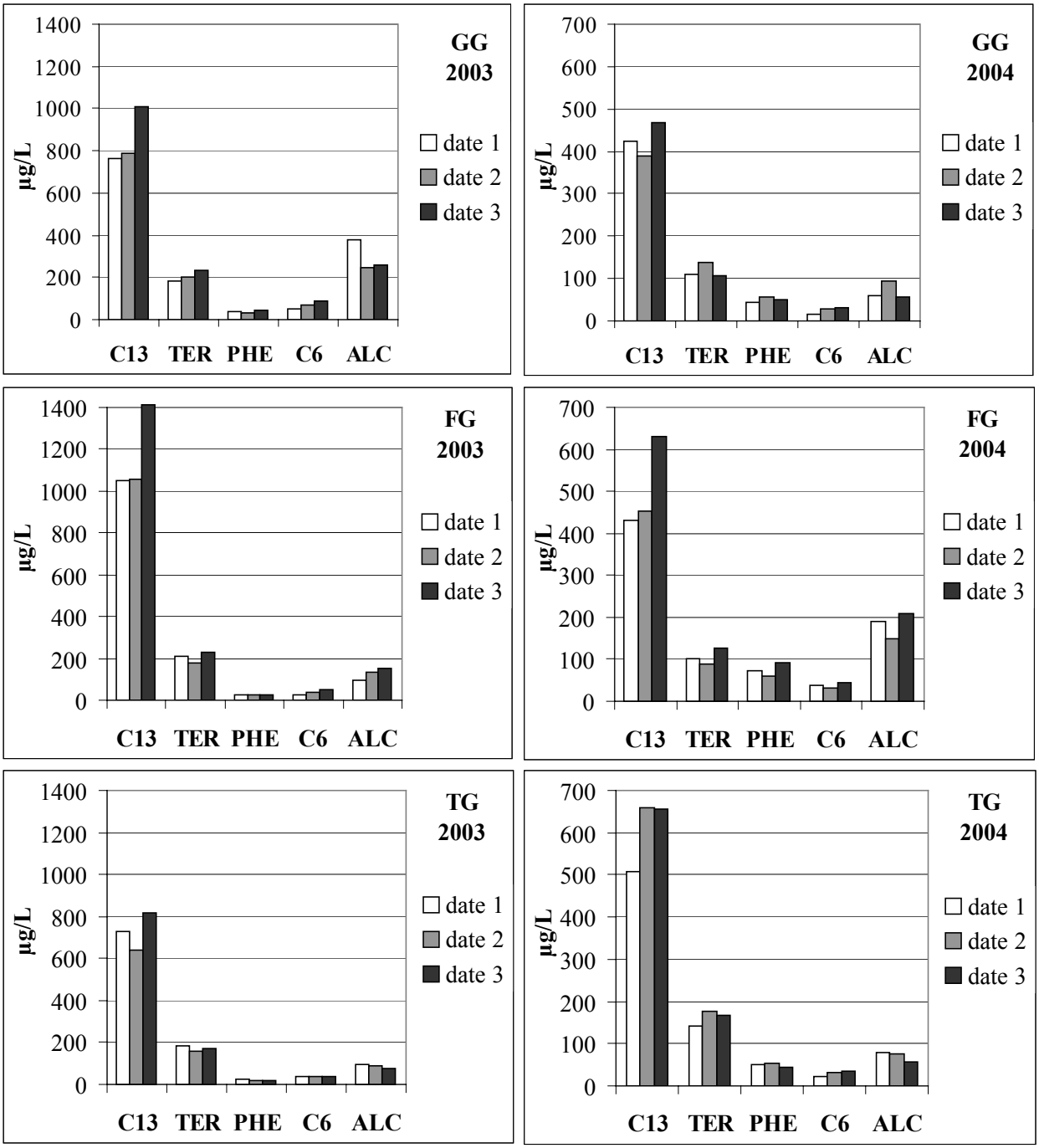


Figure 54 : Teneurs des 5 classes chimiques d'aglycones dans les échantillons des 3 parcelles de Gros Manseng pour les Millésimes 2002, 2003 et 2004, et évolution au cours de la maturité (teneurs exprimées en µg équivalents de 4-nonanol/L de jus ; moyenne de 4 répétitions)

V.2.2.4. Influence de la taille des baies et du rendement en jus sur les teneurs totales en glycosides

Le Petit Manseng se distingue du Gros Manseng par des baies plus petite, et à la pellicule plus épaisse, ce qui conditionne généralement des rendements en jus plus faibles. De plus, les 44 échantillons du dispositif expérimental (Chapitre V.1) présentent des tailles de baies différentes, selon les parcelles et l'état de maturité. Afin d'évaluer l'importance de ces différences, pour quelques échantillons représentatifs, les teneurs en précurseurs glycosidiques ont été exprimées parallèlement, en µg/L de jus, valeurs qui intéressent le technologue en µg/kg de raisins afin de s'affranchir des différences de volume de jus obtenu à partir d'une même quantité de raisins, puis en µg/1000 baies pour s'affranchir en plus de la taille des baies.

Pour la parcelle TG en 2004, quelle que soit l'unité choisie, la hiérarchie des teneurs totales en glycosides au cours de la maturité est conservée (Figure 55).

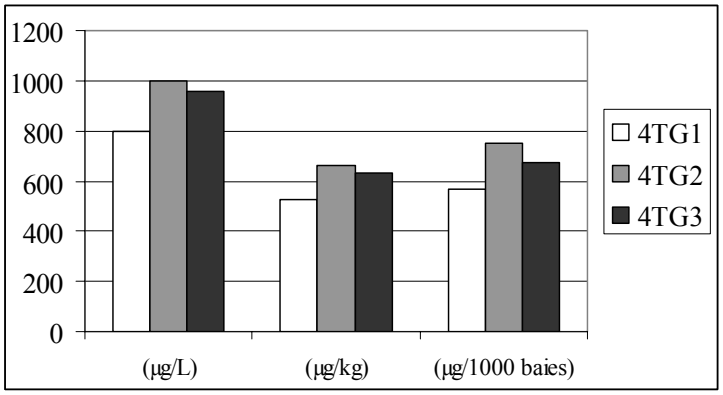


Figure 55 : Variations des teneurs totales en glycosides selon la maturité (4TG1, 2 et 3). Concentrations exprimées en µg/L, µg/kg et µg/ 1000 baies.

Le même constat est fait lorsque l'on compare l'effet du millésime (**3**TG3/**4**TG3), et l'effet de la parcelle (4**T**G3/4**F**G3), la hiérarchie est toujours conservée. Même pour l'effet cépage, l'expression de la teneur en glycosides des échantillons 4T**G**3 et 4T**P**3 en µg/L plutôt qu'en µg/kg, réduit la différence entre les cépages sans modifier la hiérarchie (Figure 56).

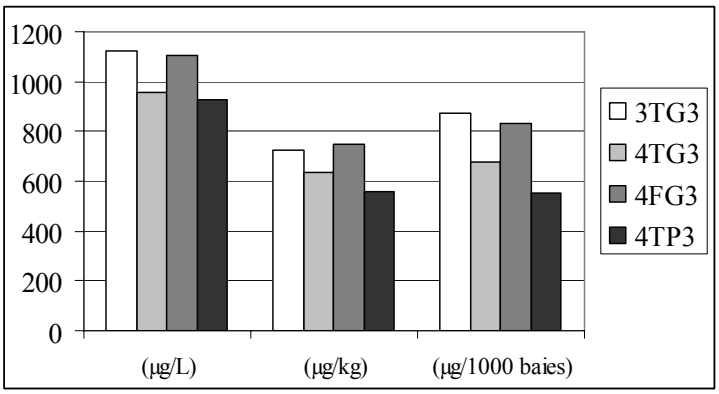


Figure 56 : Variations des teneurs totales en glycosides selon le millésime (3TG3/4TG3), le cépage (4TG3/4TP3) et la parcelle (4TG3/4FG3). Concentrations exprimées en µg/L, µg/kg et µg/ 1000 baies.

V.2.2.5. Etude préliminaire de l'influence des précurseurs glycosidiques sur l'arôme des vins de Petit et Gros Manseng

Comme consigné dans le schéma en Annexe 16, 3 vins de Petit Manseng et 3 vins de Gros Manseng issus des mini-vinification expérimentales (millésime 2003) ont été enrichis par 2 équivalents supplémentaires de leurs propres précurseurs glycosidiques, extraits sur résine XAD-2. Parmi ces vins, 2 vins secs (date 1 : 3TP1 et 3TG1) ont également été enrichis en précurseurs glycosidiques provenant des vins moelleux (date 3) des parcelles correspondantes. L'ensemble des 8 modalités enrichies, ainsi que les 6 vins de départ, ont été soumis à un vieillissement modèle de 3 semaines à 45°C. Ces conditions, proposées pour modéliser les réactions acido-catalysées intervenant au cours du vieillissement du vin (Francis *et al.*, 1994), permettent de libérer les aglycones et des composés odorants, à partir des précurseurs glycosidiques. Elles ont été appliquées avec succès pour démontrer la contribution de précurseurs glycosidiques à l'arôme des vins de Grenache et de Syrah de la vallée du Rhône (Ségurel, 2005).

Une analyse sensorielle descriptive (QDA) a été envisagée pour caractériser les vins de l'essai. Cependant, cette analyse nécessite des moyens importants, notamment un jury formé à l'analyse sensorielle des ces vins. Par manque de temps, l'analyse QDA n'a pu être réalisée dans des conditions satisfaisantes et l'influence des précurseurs glycosidiques sur l'arôme des vins de Petit et Gros Manseng a été étudiée à travers une série de tests triangulaires, soumis à l'appréciation, par olfaction directe, d'un jury constitué de 25 dégustateurs (Tableau 19).

Tableau 19 : Résultats des tests triangulaires (ns non significatif ; ** seuil 1%, *** seuil 1‰).

Objectif	n° test	Modalités comparées	Signification
Comparaison des vins enrichis/non enrichis	1	3TG1-ND / 3TG1-D1	***
	2	3TP1-ND / 3TP1-D1	***
	3	3TG3-ND / 3TG3-D3	ns
	4	3TP3-ND / 3TP3-D3	**
Comparaison des vins de Petit et de Gros Manseng	5	3TG1-ND / 3TP1-ND	ns
	6	3TG1-D1 / 3TP1-D1	ns
	7	3TG3-ND / 3TP3-ND	ns
	8	3TG3-D3 / 3TP3-D3	ns
Comparaison des vins de différentes parcelles	9	3TG1-D1 / 3GG1-D1	**
	10	3TP3-D3 / 3FP3-D3	***

Les tests 1 à 4 consistent à comparer un vin enrichi en précurseurs glycosidiques, avec le même vin témoin, non enrichi. Ces tests mettent en évidence l'influence des composés libérés à partir des glycosides, qui modifient la perception aromatique globale des vins de Petit et Gros Manseng. Cependant, parmi les tests 3 et 4, concernant des vins moelleux, un seul est significatif. On peut émettre l'hypothèse que les sucres présents dans les vins peuvent, dans les conditions de vieillissement modèle, générer des composés odorants masquant l'effet de l'enrichissement.

Les tests 5 et 7, comparant des vins témoins de Petit et de Gros Manseng (non enrichis en glycosides), ne sont pas significatifs. De plus, les modalités enrichies correspondantes, comparées dans les tests 6 et 8, ne permettent pas non plus de différencier les vins de Petit et Gros Manseng. Les analyses du potentiel glycosidique des raisins ont permis de mettre en évidence des différences variétales entre le Petit et le Gros Manseng, qui ne semblent pas contribuer à la différenciation sensorielle des vins de ces 2 cépages.

Par ailleurs, les tests 9 et 10, montrent que des vins d'un même cépage mais provenant de parcelles différentes sont perçus différemment.

V.2.3. Conclusion

Plus de 80 % du potentiel glycosidique des raisins de Petit et de Gros Manseng est constitué par des glycosides de C_{13}-norisoprénoïdes et de monoterpénols. Ces 2 classes de glycosides, particulièrement abondantes pour ces 2 cépages, sont à l'origine d'aglycones reconnues comme les plus intéressantes pour l'arôme du vin. Par ailleurs, si les teneurs totales en glycosides sont identiques pour les 2 cépages, la répartition des C_{13}-norisoprénoïdes et des monoterpénols permet de différencier le Gros et le Petit Manseng. Ce dernier est systématiquement deux fois plus riche en monoterpénols. Le monoterpénol le plus abondant qui discrimine les 2 cépages est le *p*-menthène-7,8-diol, mais son intérêt pour l'arôme du vin est très limité. D'ailleurs, les analyses sensorielles n'ont pas permis de différencier les vins de Gros Manseng et de Petit Manseng, enrichis en leurs glycosides, ce qui semble montrer que les différences de potentiel glycosidique entre ces 2 cépages, ne suffisent pas à différencier l'arôme des vins correspondants.

Hormis les différences variétales, le facteur prépondérant sur la variabilité du potentiel glycosidique, est le millésime. Toutefois, les variations importantes relevées d'une année sur l'autre sont exacerbées par les teneurs particulièrement élevées, notamment en glycosides de C_{13}-norisoprénoïdes, du millésime 2003. Mais les données climatiques de 2003, exceptionnelles à ce jour, pourraient être dans la moyenne des prochaines décennies.

Pour chaque cépage pris séparément, les variations entre les sites sont importantes, mais elles sont variables d'un millésime à l'autre, ce qui traduit une interaction cépage×millésime. Cependant, l'absence d'interaction site×cépage montre combien les paramètres pédoclimatiques, différents pour chaque site, sont très influents sur le potentiel glycosidique. Ceci est d'ailleurs confirmé par la comparaison de vins d'un même cépage mais de sites différents, enrichis ou non en glycosides, qui sont perçus très différemment à l'analyse sensorielle.

Une analyse sensorielle descriptive est nécessaire pour déterminer avec précision quelle est la contribution des composés volatils issus des précurseurs glycosidiques, à l'arôme des vins de Petit et de Gros Manseng. D'une manière générale, les essais préliminaires montrent que l'enrichissement des vins en glycosides modifie l'arôme de ces vins. La date de récolte devra donc être raisonnée afin d'établir l'optimum du potentiel glycosidique, dont la progression au cours de la maturation est variable d'une parcelle à une autre et indépendante des paramètres classiques de suivi de la maturité. Ainsi, la recherche de l'optimum du potentiel glycosidique doit être envisagée pour chaque parcelle en utilisant des outils d'analyse rapides adaptés.

V.3. Précurseurs cystéinylés et thiols volatils

V.3.1. Introduction bibliographique

V.3.1.1. Contribution des thiols volatils à l'arôme de produits alimentaires

La 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MMP), le 3-sulfanylhexan-1-ol (3MH) et l'acétate de 3-sulfanylhexyle (ac3MH) ont fait l'objet de nombreuses études ces dix dernières années. L'intérêt pour ces composés réside dans leur contribution à l'arôme de nombreux produits alimentaires, même à très faibles concentrations. En effet, avec des seuils de perception extrêmement bas, de 0,8 ng/L, 60 ng/L et 4,2 ng/L respectivement en solution hydroalcoolique (Tominaga *et al.*, 2000), ils développent des odeurs particulièrement puissantes.

La 4MMP est tout d'abord connue pour son odeur désagréable d'urine de chat (Pearce *et al.*, 1967). L'hypothèse de sa contribution à l'arôme des vins de Chardonnay et de Colombard (Du Plessis et Augustyn, 1981) et de Sheurebe (Rapp et Pretorius, 1989) a été confirmée plus tard par son identification formelle dans des vins de Sauvignon et de Sheurebe. Avec des concentrations comprises entre quelques ng/L et 50 ng/L, la 4MMP contribue à l'arôme de ces vins par des odeurs de buis et de bourgeon de cassis (Darriet *et al.*, 1993; Darriet *et al.*, 1995; Güth, 1997a), et entre également dans la composition aromatique de certaines variétés de buis et de genêt (Tominaga et Dubourdieu, 1997).

C'est dans le fruit de la passion que le 3MH, aux odeurs de pamplemousse et de fruit de la passion, et l'ac3MH à l'odeur de fruits exotiques, ont été mis en évidence et étudiés pour la première fois (Engel et Tressl, 1991; Weber *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1995; Werkhoff *et al.*, 1998). Ils ont été depuis rapportés dans des vins de divers cépages (Tominaga *et al.*, 1996; Güth, 1997a; Bouchilloux *et al.*, 1998; Kotseridis et Baumes, 2000; Tominaga *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2003; Murat *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2003; Fretz *et al.*, 2005) et dans différentes variétés d'agrumes (Buettner et Schieberle, 1999, 2001; Buettner *et al.*, 2003). Dans les vins leur concentration est comprise entre quelques dizaines de ng/L et quelques centaines de ng/L pour l'ac3MH et quelques µg/L pour le 3MH (Tominaga *et al.*, 2000).

Le 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-ol (4MMPOH) et d'autres thiols ont aussi été identifiés dans les vins, mais ils sont d'un intérêt limité pour l'arôme compte tenu de leurs seuils de perception olfactive beaucoup plus élevés (Tominaga, 1998; Tominaga *et al.*, 1998b).

V.3.1.2. Formation à partir des S-conjugués à la cystéine du raisin

V.3.1.2.1. Structure et localisation des précurseurs de thiols

La 4MMP, le 3MH et le 4MMPOH existent dans la baie de raisin sous la forme de S-conjugués à la cystéine : le S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine (P3MH), le S-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine (P4MMP) et le S-4-(4-méthylpentan-2-ol)-L-cystéine (P4MMPOH ; (Tominaga *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 1998b). Le P3MH est également présent sous cette forme dans le fruit de la passion (Tominaga et Dubourdieu, 2000). Au sein de la baie de raisin, la P4MMP et le 4MMPOH se répartissent également dans la pellicule et la pulpe, en revanche le P3MH est majoritairement présent dans la pellicule (Murat *et al.*, 2001b; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002a). Ainsi, l'influence de la macération pelliculaire affecte essentiellement le P3MH dont les quantités récupérées dans le jus sont multipliées par 2,5 par rapport à une vinification classique (Murat *et al.*, 2001b; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002a).

Un autre précurseur du 3MH a été identifié par CLHP-SM dans des jus de raisin de Sauvignon et de Gros Manseng (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b). Il s'agit du S-3-(hexan-1-ol)glutathion (PP3MH). L'estimation des teneurs présentes dans le raisin tend à montrer que la répartition entre le P3MH et le PP3MH varie selon le cépage. Le PP3MH apparaît 5 fois plus abondant que le P3MH dans un jus de Gros Manseng, et seulement 1,5 fois dans ceux de Sauvignon. Il serait précurseur du P3MH libéré sous l'influence de γ-glutamyltranspeptidase et de carboxypeptidase (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b), mais ces enzymes n'ont pas été identifiées dans le raisin.

V.3.1.2.2. Rôle de levure

C'est au cours de la fermentation que la levure, à l'aide d'enzymes de type S-β-lyase libère les thiols odorants de la partie cystéine par rupture de la liaison C-S des précurseurs (Tominaga *et al.*, 1998b). Les rendements de transformation des précurseurs cystéinylés par la levure sont faibles : 0,06 % à 0,6 % pour la P4MMP (Murat *et al.*, 2001a), 0,7 % à 2,5 % pour le P3MH (Tominaga et Dubourdieu, 2000; Murat *et al.*, 2001b). C'est également la levure qui est à l'origine de l'ac3MH par acétylation du 3MH. La libération du 3MH à partir du précurseur glutathioné (PP3MH) est encore moins importante qu'à partir du P3MH (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b).

La libération de thiols à partir de S-conjugués à la cystéine est variable selon la souche de levure et les conditions de fermentation (pH, concentration en substrat, température)

(Murat *et al.*, 2001a; Huyng-Ba *et al.*, 2003). Il semblerait que des gènes spécifiques de la levure influencent la libération des thiols (Howell *et al.*, 2004), néanmoins les enzymes impliquées dans cette réaction ne semblent pas avoir d'activités spécifiques (Huyng-Ba *et al.*, 2003).

V.3.1.3. Formation du 3MH à partir de l' (*E*)-2-hexénal

Une seconde voie de formation des thiols volatils au cours de la fermentation a été démontrée par ajout du [$^2H_8$]-(*E*)-2-hexénal dans un moût avant la fermentation et la détection de 3MH-d_8 dans le vin obtenu (Schneider, 2001; Schneider *et al.*, 2006). Cependant, les composés impliqués dans l'addition de type Michael avec l'(*E*)-2-hexénal restent indéterminés. D'une part, compte tenu de la réactivité des acides aminés soufrés sur les composés carbonylés (Marchand *et al.*, 2000), l'addition de la cystéine conduirait à des composés analogues à ceux identifiés dans la baie (Tominaga *et al.*, 1998b) ou à des composés cycliques de nature thiazolidine, qui seraient métabolisés par la levure (Wakabayashi *et al.*, 2002; Huyng-Ba *et al.*, 2003). D'autre part, l'addition d'H_2S formé par la levure au cours de la fermentation pourrait s'additionner en 1,4 sur l'(*E*)-2-hexénal (Schneider, 2001; Schneider *et al.*, 2006).

Cette voie de formation a d'ailleurs été démontrée dans les mêmes conditions pour la 4MMP via l'oxyde de mésityle, mais ce composé n'a jamais été identifié dans le vin (Schneider, 2001), contrairement à son hydrate (Escudero *et al.*, 2002) qui pourrait également conduire à la formation de la 4MMP.

V.3.1.4. Le Petit et le Gros Manseng

L'analyse des thiols variétaux dans des vins de différents cépages a permis d'identifier dans des vins de Petit Manseng, des teneurs suffisantes en ac3MH et 3MH pour contribuer à l'arôme (Tominaga *et al.*, 2000). Par ailleurs, les notes d'agrumes attribuées à ces thiols volatils dans d'autres vins décrivent souvent l'arôme des vins de Manseng. Plus récemment, le P3MH a été dosé dans des moûts de Gros Manseng et l'existence d'un précurseur glutathioné du 3MH a été démontrée (Peyrot des Gachons, 2000; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b). Compte tenu de l'intérêt de ces composés pour l'arôme du vin, nous avons initié une étude afin d'évaluer leur importance pour les raisins et les vins de Petit et Gros Manseng.

V.3.2. Résultats et discussions

Disposant de méthodologies adaptées à l'analyse de ces composés, les objectifs de ce travail étaient :

- de rechercher ces thiols volatils et d'évaluer leur contribution dans les différents vins expérimentaux obtenus en 2003 et 2004 (cf. chapitre V.1 p 98).
- de rechercher les précurseurs cystéinylés dans les raisins.
- d'évaluer l'influence de paramètres culturaux sur ce potentiel dans le raisin et sur les teneurs en thiols des vins.
- d'étudier la relation entre ce potentiel du raisin et les thiols correspondants dans les vins.

V.3.2.1. Méthodes

V.3.2.1.1. Analyse des précurseurs

L'analyse des précurseurs cystéinylés a été réalisée à l'aide des méthodes développées et discutées au chapitre IV.1.2.3.2 p 78. Dans ce travail, seul le P3MH a fait l'objet d'une étude dans les jus de raisin de Petit et Gros Manseng, utilisant une méthode de dosage direct. En effet, la P4MMP n'a pas été détectée par analyse directe dans nos jus de raisins malgré une limite de détection de notre méthode estimée à environ 500 ng/L.

A notre connaissance, la P4MMP a seulement été détectée par une méthode indirecte dans les jus de Sauvignon (Tominaga *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 1998b). Par ailleurs, les teneurs en P3MH rapportées dans des jus de raisin de Gros Manseng, sont comprises entre 4 µg/L et 20 µg/L. De plus, l'utilisation d'une méthode indirecte pour le dosage du P3MH dans quelques échantillons de Gros Manseng a permis de mettre en évidence la présence du précurseur glutathioné (PP3MH ; (Peyrot des Gachons, 2000; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b). Les raisins de Gros Manseng contiendraient environ 15 % à 20 % de P3MH et 80 % à 85 % de PP3MH, mais les rendements de libération du 3MH à partir du PP3MH sont inférieurs à 0,3 % (Peyrot des Gachons, 2000; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b).

V.3.2.1.2. Analyse des thiols

Les conditions d'analyses utilisées (Schneider *et al.*, 2003) sont particulièrement adaptées à l'analyse de ces molécules, présentes à l'état de traces. Ainsi, plusieurs étapes d'extraction et de purification permettent l'obtention d'un extrait enrichi. L'extraction liquide-liquide en batch, à O°C et sous azote, permet de limiter les phénomènes d'oxydation auxquels ces composés sont sensibles (Hofmann et Schieberle, 1996; Blanchard *et al.*, 2004; Charles-Bernard *et al.*, 2005). La purification utilise une résine Affi-Gel 501, déjà utilisée pour la purification du 8-sulfanyl-*p*-menthan-3-one présent dans des huiles essentielles de pamplemousse (Full et Schreier, 1994). D'autres méthodes utilisent également la chromatographie covalente (Bouchilloux *et al.*, 1998; Tominaga *et al.*, 1998a), mettant à profit l'affinité des thiols pour les dérivés mercuriques afin d'enrichir sélectivement l'extrait.

Le 3MH et l'ac3MH ont été dosés en CPG-IT-SM/SM dans les conditions proposées par Schneider (Schneider *et al.*, 2003). L'utilisation d'une détection en SM/SM permet d'augmenter la spécificité de la détection et de limiter le bruit de fond. L'ionisation au cours de l'analyse conduit à une fragmentation des analytes qui dépend entre autre, de la structure chimique du composé. Pour la 4MMP, les fragments spécifiques formés par divers modes d'ionisation sont d'intensité très faible et ne permettent pas une détection de la 4MMP en dessous de 20 ng/L. Cette valeur est élevée par rapport à son seuil de perception de l'ordre du 1 ng/L.

V.3.2.2. Analyse des vins et des raisins du dispositif expérimental

La méthode d'analyse du P3MH ayant été développée au cours de la première moitié de cette thèse, ce précurseur n'a été dosé que dans les échantillons de raisins des parcelles du dispositif expérimental des millésimes 2003 et 2004. Parallèlement, les vins obtenus à partir de ces mêmes lots de raisins, ont fait l'objet des analyses de 3MH et d'ac3MH. Les résultats sont présentés dans le Tableau 20, où le rendement (exprimé en pourcentage) correspond au nombre de moles de thiols dosés dans les vins (n_{3MH} + n_{ac3MH}), sur le nombre de moles de précurseurs dosés dans les jus de raisin correspondants.

Tableau 20 : Teneurs en P3MH dans les jus de raisins, teneurs en 3MH et ac3MH dans les vins correspondants et rendements de libération associés (valeurs en gras : valeurs obtenues par extrapolation de la courbe de calibration).

Millésime	Variété	Parcelle	Date de récolte	P3MH (µg/L)	ac3MH (ng/L)	3MH (ng/L)	Rendement %
2003	Petit Manseng		1		24	595	-
2003	Petit Manseng	GP	2		nd	528	-
2003	Petit Manseng		3		22	917	-
2003	Petit Manseng		1	20,4	50	356	3%
2003	Petit Manseng	FP	2	16,3	58	561	6%
2003	Petit Manseng		3	nd	28	947	-
2003	Petit Manseng		1	32,8	11	193	1%
2003	Petit Manseng	TP	2	27,3	18	204	1%
2003	Petit Manseng		3	70,1	12	376	1%
2003	Gros Manseng		1		18	1060	-
2003	Gros Manseng	GG	2		41	832	-
2003	Gros Manseng		3		10	628	-
2003	Gros Manseng		1	12,2	27	274	4%
2003	Gros Manseng	FG	2	**1,9**	31	323	**30%**
2003	Gros Manseng		3	6,5	21	565	15%
2003	Gros Manseng		1	12,0	20	402	6%
2003	Gros Manseng	TG	2	10,0	45	533	9%
2003	Gros Manseng		3	29,1	5	354	2%
2004	Petit Manseng		1	61,5	229	3216	9%
2004	Petit Manseng	GP	2	39,4	102	1724	8%
2004	Petit Manseng		3	122,7	84	1372	2%
2004	Petit Manseng		1	66,9	77	633	2%
2004	Petit Manseng	FP	2	24,1	39	263	2%
2004	Petit Manseng		3	92,0	84	1354	3%
2004	Petit Manseng		1	45,8	90	826	3%
2004	Petit Manseng	TP	2	65,2	25	468	1%
2004	Petit Manseng		3	37,4	114	982	5%
2004	Gros Manseng		1	**11,0**	64	1807	**28%**
2004	Gros Manseng	GG	2	**2,6**	108	363	**29%**
2004	Gros Manseng		3	25,3	47	1046	7%
2004	Gros Manseng		1	**0,3**	64	717	**441%**
2004	Gros Manseng	FG	2	**1,4**	101	1853	**231%**
2004	Gros Manseng		3	10,8	nd	nd	-
2004	Gros Manseng		1	8,1	18	560	12%
2004	Gros Manseng	TG	2	12,2	72	810	12%
2004	Gros Manseng		3	2,1	29	503	41%

V.3.2.2.1. Variation du P3MH dans les raisins expérimentaux

Effet maturité

Le premier constat est la variabilité de l'évolution des teneurs en P3MH au cours de la maturation, observée pour chacune des parcelles (Figure 57, Figure 58 et Tableau 20). Parmi les parcelles étudiées en 2003 et 2004, TG et TP en 2003, puis GG, FG, GP et FP en 2004 présentent les teneurs en P3MH les plus élevées en 3ème date de récolte. Pour les parcelles TG et TP en 2004, l'optimum est atteint en 2ème date de récolte. Pour toutes les parcelles, l'évolution du P3MH est discontinue et indépendante des paramètres de maturité. De plus, excepté pour TG et TP en 2004, les teneurs sont les plus basses en 2ème date de récolte. Malgré la préparation des jus dans des conditions identiques, ces écarts sont considérables pour des raisins récoltés sur une même parcelle, à environ 3 semaines d'intervalle.

Peyrot des Gachons a identifié le PP3MH dans le jus de raisin et ce précurseur conduirait au P3MH sous l'action conjuguée de γ-glutamyltranspeptidase et de carboxypeptidase (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b). Bien que les conditions d'analyse du P3MH dans le moût suivent un protocole précis notamment pour la préparation du moût (4°C), ce type de réaction pourrait se produire au cours de la préparation de l'extrait, et de manière irrégulière d'un échantillon à l'autre. Ainsi, l'utilisation du P3MH deutéré comme étalon interne ne permettrait pas de s'affranchir des erreurs dues à la formation du P3MH au cours de l'analyse. Ceci pourrait expliquer les différences de teneurs entre les raisins d'une même parcelle à différents stades de maturité. Néanmoins, une étude de la stabilité du P3MH dans un moût conservé à température ambiante pendant 24 h montre que les teneurs n'évoluent pas (Tableau 21). Ces résultats sont à confirmer, notamment sur des durées plus longues, et surtout à partir d'un moût fraîchement préparé. Celui-ci a été congelé immédiatement après sa préparation et utilisé ultérieurement. Par ailleurs, même si ces enzymes étaient présentes dans le moût, elles ne sont pas forcement actives au pH acide du moût. En effet, l'hypothèse de la formation du P3MH à partir du PP3MH via ces enzymes a été décrite dans un moût tamponné à pH=8 (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b), mais n'a pas été démontrée dans les conditions très différentes d'un moût naturel.

Tableau 21 : Evolution des teneurs en P3MH à 20°C pendant 24 h (CV : coefficient de variation).

	T0	T0 + 4 h	T0 + 8 h	T0 + 24 h	moyenne	écartype	CV %
P3MH (µg/L)	10,9	11,7	11,9	11,3	11,4	0,4	3,7%

Effet du site et de la parcelle

Alors que les évolutions discontinues au cours de la maturité semblent propres à chaque parcelle, on observe une même tendance pour les parcelles de Petit et de Gros Manseng plantées sur un même site (Figure 57 et Figure 58). Ainsi pour le site T en 2003, TG et TP présentent des teneurs en P3MH un peu plus faibles en date 2 qu'en date 3 où l'optimum est atteint. En 2004, l'évolution est différente puisque l'optimum est atteint en 2ème date et les valeurs en surmaturité sont les plus faibles. Les teneurs en P3MH pour les raisins des 2 cépages sur ce même site suivent la même évolution en 2003 et 2004. Ceci met en évidence l'influence de l'environnement (nature des sols et conditions météorologiques locales) sur les teneurs en P3MH.

Par ailleurs, l'importance des différences observées entre les échantillons d'un même cépage sur des sites différents dépend aussi de la date de récolte considérée, car la maturité apporte davantage de variabilité. En 2004, les raisins de la 1ère date de récolte des parcelles GP, FP et TP présentent des teneurs en P3MH proches, comprises entre 40 et 65 µg/L. En 3ème date, les différences sont accentuées, les teneurs variant de 40 µg/L à 120 µg/L. Cette observation est également valable pour les parcelles de Gros Manseng en 2003 et 2004. Ainsi, la variabilité inter-parcelle, faible en 1ère date (facteur 1,02 à 1,3) augmente en surmaturité (facteur 1,5 à 5).

Effet du cépage

La comparaison des teneurs en P3MH des jus de Petit Manseng et Gros Manseng issus d'un même site montre que celles de Petit Manseng sont toujours 2 à 5 fois plus riches que celles de Gros Manseng (Figure 57 et Figure 58). Il existe donc une différence variétale, car les variations de la taille des baies et des rendements en jus ne suffisent pas à expliquer de telles différences.

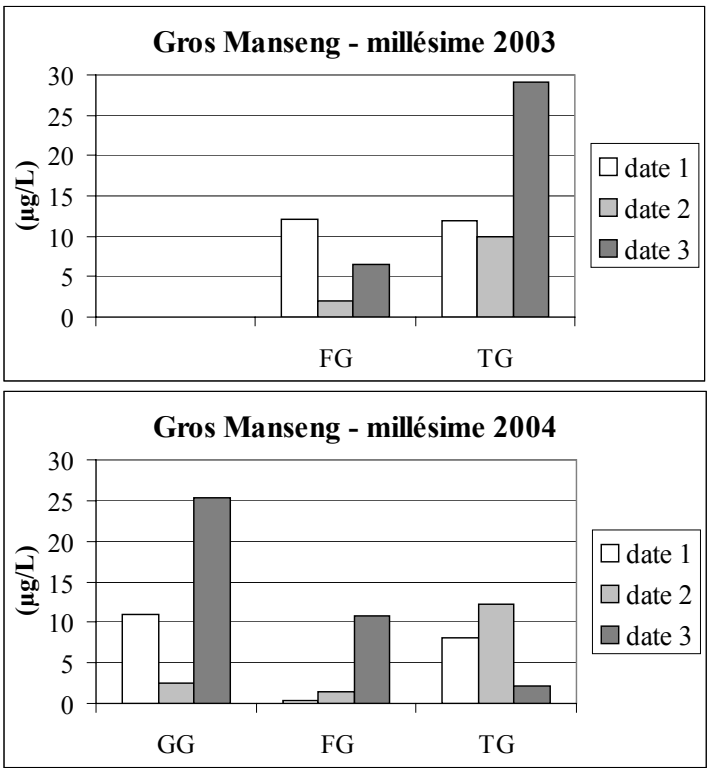


Figure 57 : Teneurs en P3MH des jus de raisins des 3 parcelles de Gros Manseng pour les millésimes 2003 et 2004.

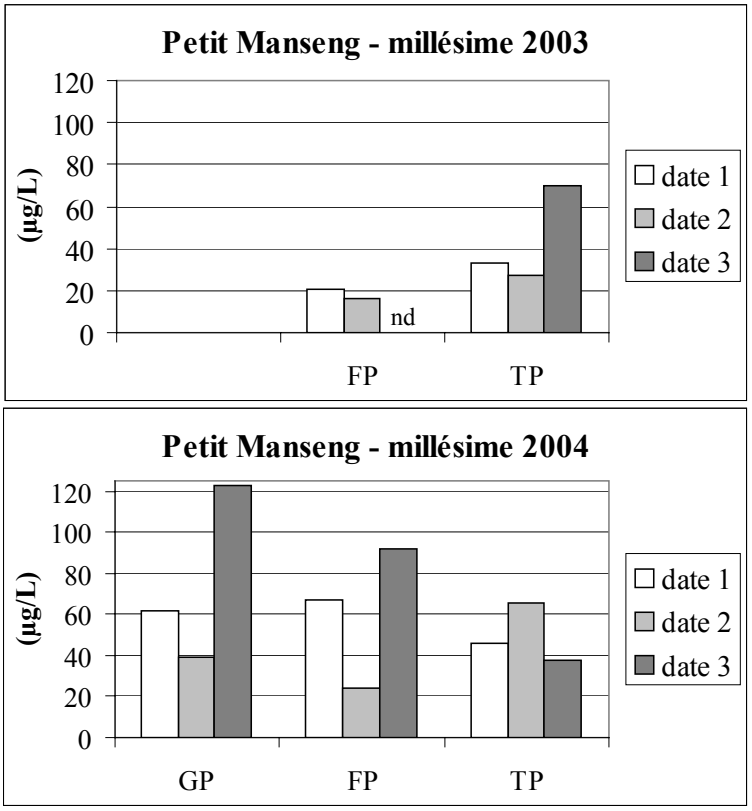


Figure 58 : Teneurs en P3MH des jus de raisins des 3 parcelles de Petit Manseng pour les millésimes 2003 et 2004 (nd : non dosé).

V.3.2.2.2. Variations des teneurs en 3MH et en ac3MH dans les vins expérimentaux

Dans les 36 vins des millésimes 2003 et 2004 (cf. chapitre V.1), on constate que le 3-sulfanylhexan-1-ol et son acétate sont toujours au-dessus de leurs seuils de perception olfactive, contribuant ainsi à l'arôme de ces vins (Tableau 20, Figure 59 et Figure 60). En revanche, dans nos conditions d'analyse la 4MMP n'a pas été détectée. Elle est soit absente des vins de Petit et Gros Manseng, soit ses teneurs sont inférieures à notre limite de détection de 20 ng/L.

Les teneurs en 3MH et en ac3MH ne permettent pas de différencier les vins des deux cépages, par contre les vins de chacune des 6 parcelles présentent des teneurs en thiols plus élevées en 2004 qu'en 2003 (Figure 59 et Figure 60). Il faut noter que la souche de levure utilisée en 2003 est différente de celle utilisée en 2004. Ainsi, le millésime comme la souche de levure pourraient expliquer ces différences, puisque la levure influence aussi la formation de thiols volatils (Murat *et al.*, 2001a; Howell *et al.*, 2004).

Pour une même parcelle, les vins correspondants aux 3 dates de récolte présentent des teneurs variables, sans lien avec un paramètre particulier, sauf en 2003 pour les vins de Petit Manseng dont les teneurs en 3MH augmentent avec la maturité des raisins correspondants (Figure 59). Malgré cela, ces résultats montrent l'importance des paramètres relatifs à la qualité du moût et aux conditions de fermentation sur la libération des thiols.

L'acétate de 3-sulfanylhexyle est formé par la levure à partir du 3-sulfanylhexan-1-ol. En 2004, pour chacune des parcelles, on observe une corrélation entre les teneurs en 3MH et en ac3MH des vins, excepté pour 4GG2 (Figure 59 et Figure 60). Ceci tend à montrer que la quantité d'ac3MH produite par la levure dépendrait de la quantité initiale en 3MH. Mais les résultats sont différents en 2003. Ils peuvent également être attribués à l'utilisation de souches de levures différentes en 2003 et 2004, mais l'intervention d'autres paramètres sur la formation d'ac3MH au cours de la fermentation, ainsi que leur interaction avec la souche de levure pourraient également expliquer ces différences.

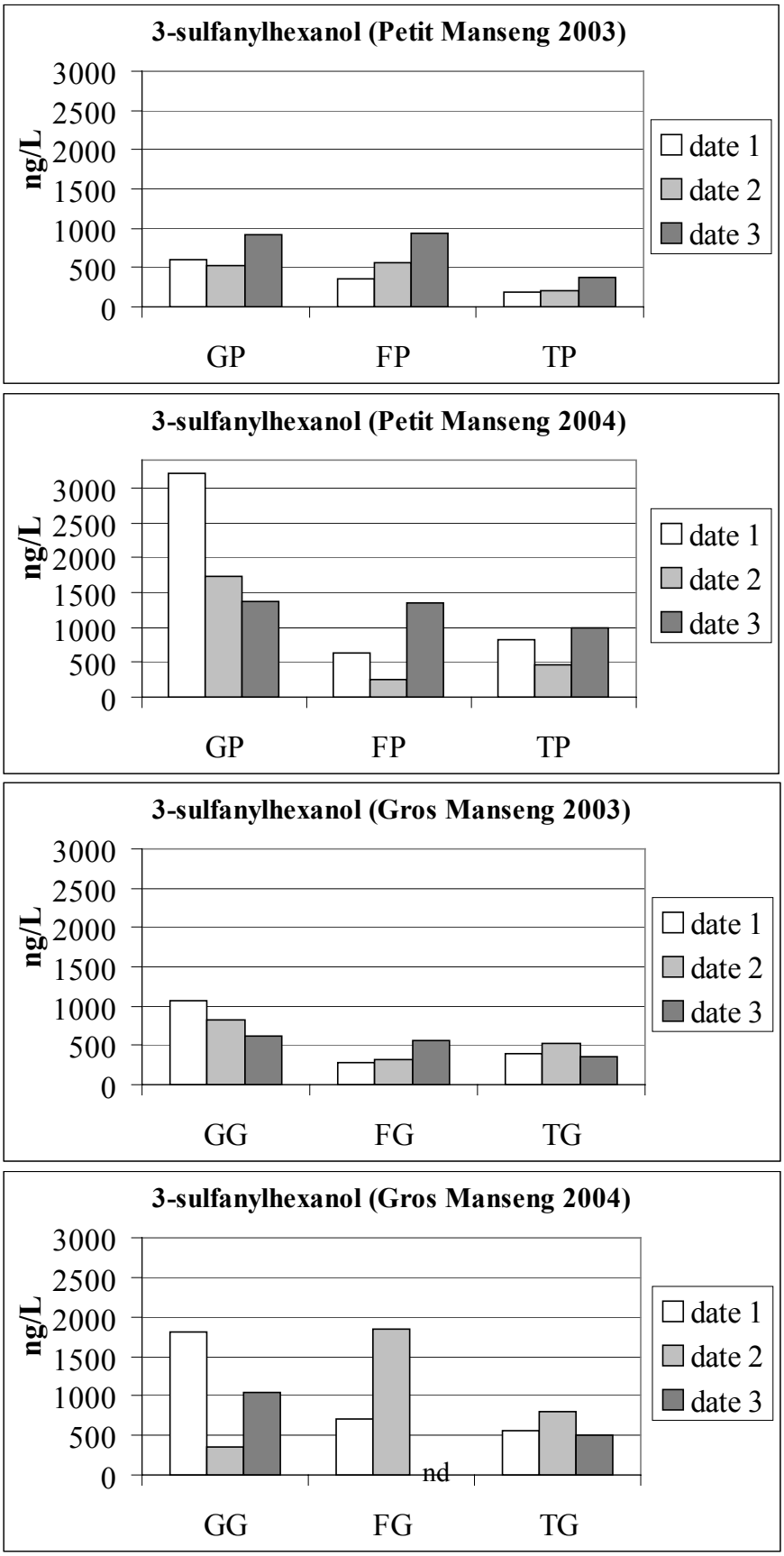


Figure 59 : Teneurs (exprimées en ng/L de vin) en 3-sulfanylhexyle (3MH) dans les vins expérimentaux des millésimes 2003 et 2004 (cf. chapitre V.1) de Gros et Petit Manseng (nd : non dosé).

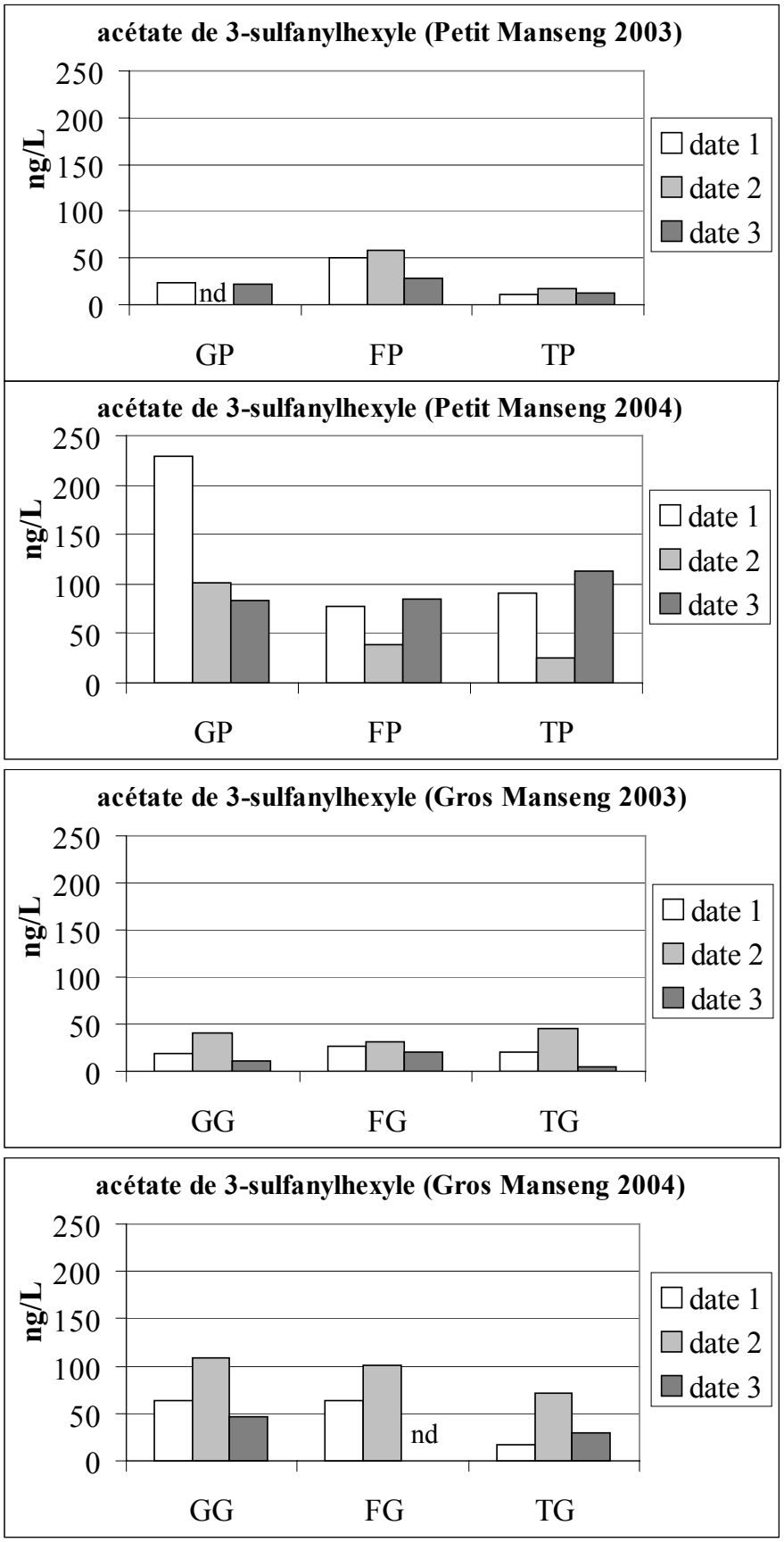


Figure 60 : Teneurs (exprimées en ng/L de vin) en acétate de 3-sulfanylhexanol (ac3MH) dans les vins expérimentaux des millésimes 2003 et 2004 (cf. chapitre V.1) de Gros et Petit Manseng (nd : non dosé).

V.3.2.2.3. Relation entre les teneurs en P3MH des raisins et les teneurs en thiols dans les vins

La représentation de la somme des concentrations en 3MH et ac3MH (en nmol/L) dans les vins, en fonction des concentrations en P3MH (en nmol/L) dans les jus correspondants ne permet pas d'établir de relation directe entre précurseurs dans les raisins et thiols volatils dans les vins, ni en 2003 ni en 2004 (Figure 61). Les résultats de 2003 et 2004 ont été séparés, car les souches de levures utilisées sont différentes d'une année sur l'autre.

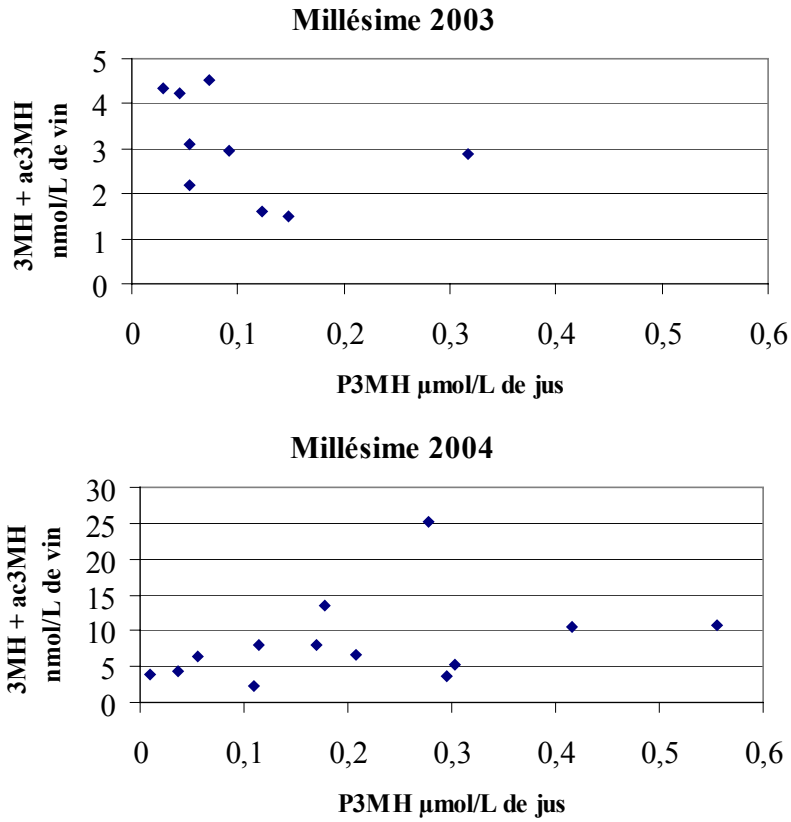


Figure 61 : Représentation des concentrations en 3MH et ac3MH (en nmol/L) dans les vins, en fonction des concentrations en P3MH (en µmol/L) dans les jus correspondants, pour 29 des 36 modalités.

Le rapport de ces 2 mesures définit le rendement de transformation des précurseurs en composés volatils. Les rendements présentés dans le Tableau 20 montrent la grande variabilité d'une modalité à une autre, mais sans lien avec la maturité, le site ou le cépage. De plus, pour une même parcelle, l'évolution des thiols en fonction de la maturité est le plus souvent indépendante de celle du P3MH dans les raisins, bien que dans certains cas (parcelle FP en 2004) il y ait une tendance commune.

Les teneurs en P3MH correspondent à celles d'autres cépages, comprises entre 5 µg/L et 78 µg/L (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000; Peyrot des Gachons *et al.*, 2005). En revanche, les rendements rapportés dans la littérature pour différents cépages, compris entre 0,6 % et 2,5 % (Tominaga *et al.*, 1998b; Murat *et al.*, 2001b; Huyng-Ba *et al.*, 2003), sont inférieurs à certains des rendements observés dans le Tableau 20.

Beaucoup d'éléments restent encore inconnus sur l'origine de formation des thiols variétaux, de leurs précurseurs, sur leur filiation et leur transformation au cours de la fermentation (Figure 62). Dans nos conditions, le P3MH est dosé immédiatement après la préparation du jus obtenu par broyage des raisins à 4°C. Ces conditions de préparation des moûts en laboratoire favorisent l'extraction des précurseurs en comparaison aux conditions technologiques, pendant lesquelles le moût peut en plus évoluer. Ainsi, les conditions utilisées sont très différentes des conditions technologiques et l'on ne connaît pas l'influence de ces traitements. Par ailleurs, le calcul du rendement de transformation à partir des teneurs en P3MH mesurées sur des jus et des teneurs en thiols des vins, ne tient pas compte de la formation éventuelle dans le moût de P3MH, ni de la formation de 3MH à partir d'autres composés que le P3MH (produits de simple ou double addition de la cystéine sur l'(*E*)-2-hexénal…). De plus, les rendements de transformation les plus élevés sont généralement associés aux teneurs en P3MH les plus faibles. Malgré l'imprécision du dosage pour certaines de ces valeurs (3FG2, 3FG3, 4GG2, 4FG1 et 4FG2) déterminées par extrapolation de la droite de calibration, elles restent néanmoins faibles. En revanche, la formation de thiols au cours de la fermentation de ces moûts ne semble pas affectée par ces faibles teneurs en P3MH et reste tout aussi importante, renforçant ainsi l'hypothèse de l'existence d'autres origines de formation des thiols volatils.

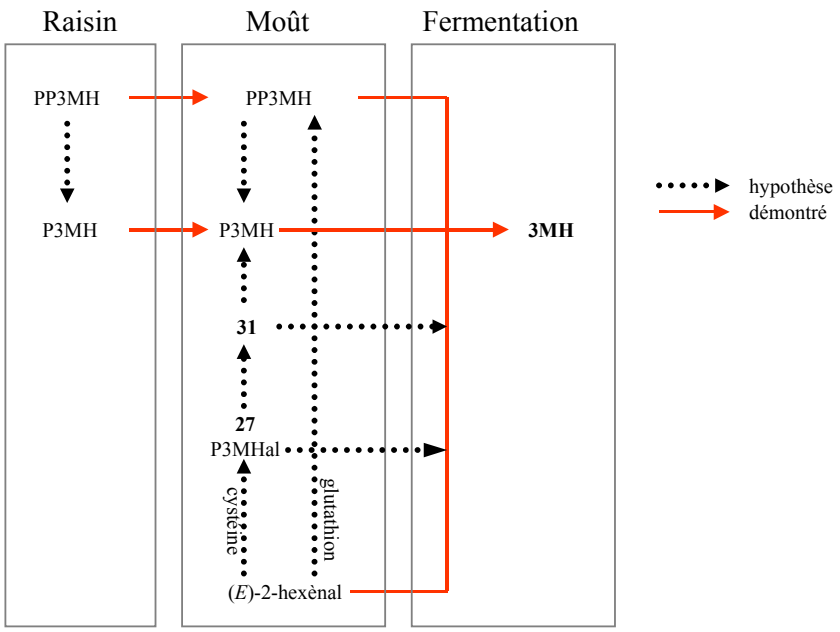


Figure 62 : Origines établies et hypothétiques de la formation du 3MH dans le vin (Tominaga *et al.*, 1998b; Huyng-Ba *et al.*, 2003; Wakabayashi *et al.*, 2004).

Par ailleurs, l'intérêt du PP3MH pour l'arôme du futur vin serait limité car la capacité de la levure à libérer du 3MH est plus importante à partir du P3MH (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002b). Toutefois, la répartition du 3MH sous la forme de précurseurs inodores serait différente selon le cépage. Pour le Sauvignon, environ 30 % des précurseurs de thiols seraient sous la forme glutathionée. Pour le Gros Manseng, pour lequel un seul échantillon a été étudié, environ 85 % du 3MH seraient sous cette forme dans le jus. Actuellement, l'absence de méthode permettant de doser le PP3MH explique le peu d'informations publiées sur ce composé. Ainsi, on connaît peu son implication dans les mécanismes de formation des thiols volatils dans les vins.

V.3.3. Conclusion

L'étude du potentiel des raisins de Petit et Gros Manseng en S-conjugués à la cystéine montre que les teneurs en P3MH observées varient selon les paramètres suivants : cépage, maturité, parcelle et millésime. Ce sont cependant les 2 premiers facteurs qui ont le plus d'influence. Malgré les conditions particulières du millésime 2003, très peu de différences sont observées pour une même parcelle entre 2003 et 2004. En revanche les raisins de Petit Manseng sont approximativement 2 fois plus riches en P3MH que ceux du Gros Manseng. Par ailleurs, l'évolution du P3MH au cours de la maturation du raisin est très irrégulière et semblable pour une majorité de parcelles, avec un minimum atteint en 2ème date de récolte et un maximum atteint pour les raisins en surmaturité.

Afin de relier le potentiel du raisin et les composés d'arôme correspondants du vin, les thiols volatils ont été dosés dans les vins expérimentaux. Nos conditions d'analyse n'ont pas permis la détection de la 4MMP. En revanche, le 3MH et l'ac3MH sont toujours présents à des teneurs largement supérieures à leurs seuils de perception olfactive et contribuent ainsi à l'arôme des vins jeunes de Petit et Gros Manseng. Néanmoins, il est difficile d'établir des relations entre les variations des teneurs en thiols variétaux dans les vins, et les paramètres du dispositif expérimental. De plus, les teneurs en thiols des vins ne sont pas directement proportionnelles aux teneurs en P3MH du raisin. Dans nos conditions, la détermination d'une date de récolte favorisant un potentiel élevé ne garantit en aucune manière des teneurs élevées en thiols dans les vins.

Toutefois, la contribution du 3MH et de son acétate à l'arôme des vins de Petit et Gros Manseng apparaît évidente, compte tenu des concentrations systématiquement et largement au-dessus de leurs seuils de perception olfactive. Ainsi, les thiols peuvent contribuer par leurs notes fruitées caractéristiques, à l'arôme de vins secs ou de vins doux destinés à une consommation rapide.

Ces observations établies sur 2 millésimes et sur un nombre important d'échantillons attestent de l'intérêt de poursuivre l'étude de cette composante de l'arôme. De ce fait, deux axes de recherches sont envisageables :

Le premier concerne le rôle de la levure. Les voies métaboliques à l'origine de la transformation de précurseurs et de la production de thiols ainsi que d'autres produits éventuels restent inconnues. L'étude des gènes associés à la conversion enzymatique des précurseurs en thiols, ainsi que l'influence des conditions de milieu sur leur expression

constituent un champ d'investigation de premier intérêt compte-tenu des faibles rendements de libération observés.

Le second concerne les différentes origines possibles des précurseurs de thiols. La compréhension de l'origine de la formation des thiols volatils implique la détermination de l'importance relative des différentes voies de formation mises en évidence. Cela nécessite l'étude des filiations et de la biogenèse des 2 types de précurseurs du 3MH, P3MH et PP3MH, ainsi que la détermination des composés impliqués et des mécanismes de formation du 3MH à partir de l'*E*-2-hexénal ou d'autres composés α,β-insaturés.

V.4. Etude du sulfure de diméthyle

V.4.1. Introduction bibliographique

Connu depuis longtemps et impliqué dans les grands cycles bio-géochimiques, le sulfure de diméthyle (DMS) est un composé soufré léger également présent dans une grande variété de produits alimentaires. Ainsi, le trouve-t-on aussi bien dans la viande cuite (Jensen *et al.*, 2002) et le fromage (Spinnler *et al.*, 2001; Carbonell *et al.*, 2002) que dans divers produits d'origine végétale, tels que la tomate (Buttery *et al.*, 1971), les agrumes (Shaw *et al.*, 1980), le melon (Homatidou *et al.*, 1992), la truffe (Talou *et al.*, 1987; Diaz *et al.*, 2003), les céréales (Ren, 2001) et certains légumes (Kubec *et al.*, 1998; Ulrich *et al.*, 2001; Tulio *et al.*, 2002). Sa présence est également rapportée dans la bière et le vin (Anderson *et al.*, 1975; Loubser et Du Plessis, 1976).

V.4.1.1. Origine du DMS dans la bière

Le procédé de fabrication de la bière peut conduire à des teneurs en DMS dépassant le milligramme par litre, et les recherches entreprises pour maîtriser ces teneurs ont permis de mettre en évidence deux origines de formation, l'une chimique à partir de la S-méthylméthionine (SMM ; Dickenson, 1979), et l'autre biochimique à partir du sulfoxyde de diméthyle (Anness et Bamforth, 1982). Le DMS est formé par dégradation thermique de la SMM au cours du séchage du malt vert, puis de son brassage à 60°C. Ensuite, une partie du DMS est oxydée en DMSO. Lors de la fermentation alcoolique, les levures réduisent le DMSO ainsi formé (plusieurs mg/L) pour régénérer le DMS.

V.4.1.2. Origine du DMS dans le vin

Le DMS peut se former au cours de différentes étapes du procédé de vinification et de conservation des vins.

Au cours de la fermentation, le DMS peut être libéré sous l'action des levures à partir d'acides aminés ou de dérivés tels la cystine, la cystéine, le glutathion et la S-adénosylméthionine (Schreier *et al.*, 1974; De Mora *et al.*, 1986). La réduction du DMSO en DMS par la levure, comme cela se produit lors de la fabrication de la bière (Bamforth et Anness, 1981; Anness et Bamforth, 1982) serait possible en conditions œnologiques (Anocibar Beloqui, 1998), mais le DMSO est soit absent, soit présent en très faibles concentrations dans les moûts (Ségurel *et al.*, 2005).

Par ailleurs, certains travaux ont montré que les teneurs en DMS dans les vins jeunes juste après la mise en bouteille sont très faibles, mais qu'elles augmentent avec le temps et la

température au cours du vieillissement en bouteille (Marais, 1979; Anocibar Beloqui, 1998). Ces résultats renforcent l'hypothèse de formation du DMS par une voie autre que fermentaire. En ce sens, suite à l'observation de l'augmentation du DMS parallèlement à la diminution du DMSO ajouté au cours du vieillissement de vins, l'hypothèse d'une réduction chimique du DMSO pendant la conservation du vin a été émise (De Mora *et al.*, 1993).

A partir de méthodes utilisées dans l'industrie de la brasserie, une méthode de dosage direct des précurseurs du DMS dans le vin et le raisin a été récemment développée (Ségurel *et al.*, 2005). Les précurseurs du DMS sont dégradés en DMS par un traitement thermique alcalin. Le DMS ainsi libéré correspond au potentiel en DMS (PDMS). Des essais de vieillissement modèle montrent que la mesure du PDMS est une estimation correcte du DMS susceptible d'être libéré dans le vin au cours du vieillissement (Ségurel *et al.*, 2005). Les précurseurs à l'origine du DMS au cours de la fermentation (cystine, cystéine, glutathion, S-adénosylméthionine, DMSO), de part leurs structures chimiques, ne peuvent être estimés par la mesure du PDMS qui constitue une source significative de DMS au cours de la conservation du vin. De plus, des études chimiques ont permis d'exclure certains précurseurs possibles, tels que le méthyle sulfoxyde (MSO), le DMSO et l'acide diméthylsulfonium propanoïque (DMSPA). Ils ne peuvent constituer que des précurseurs mineurs du DMS pendant la conservation du vin. Bien qu'encore non identifiée dans le vin, la SMM serait le précurseur le plus probable du DMS au cours du vieillissement du vin en bouteille. Elle serait déjà présente en quantité encore plus importante dans le raisin (Ségurel *et al.*, 2005).

V.4.2. Résultats et discussion

V.4.2.1. Méthodes d'analyse du DMS libre et du PDMS

De nombreuses méthodologies on été développées pour l'analyse du DMS (Lavigne *et al.*, 1993; Mestres *et al.*, 2000; Ren, 2001). Pour l'analyse du DMS libre et potentiel (PDMS) dans les vins et raisins de Petit et Gros Manseng, nous avons retenu celle développée par Ségurel *et al.* (2005), car elle cumule plusieurs avantages :

Premièrement, l'utilisation de la dilution isotopique assure la précision et la fiabilité nécessaires pour le dosage de ce composé extrêmement volatil et pouvant être à l'état de traces. De plus, le DMS-d_6 utilisé comme étalon interne est disponible chez certains fabricants de produits chimiques, ce qui simplifie la mise en œuvre du dosage.

Ensuite, l'intérêt de l'association de la dilution isotopique avec la technique d'extraction par SPME (Solid Phase Micro Extraction) a été largement démontrée (Hofmann et Schieberle, 1996; Blanchard *et al.*, 2004; Charles-Bernard *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2005; Siebert *et al.*, 2005). Cette technique d'extraction adaptée à l'analyse de composés volatils dans des matrices complexes telles que la bière (Scarlata et Ebeler, 1999) et le vin (Mestres *et al.*, 1999a; Mestres *et al.*, 1999b), s'avère un outil pratique et rapide pour l'analyse du DMS. Son automatisation est d'autant plus intéressante que le traitement thermique alcalin utilisé pour la mesure du PDMS, est réalisé directement dans les flacons de SPME hermétiquement sertis. Le même échantillon d'analyse est ainsi utilisé pour le DMS libre et le DMS libéré à partir de ces précurseurs dans le vin ou le raisin (PDMS).

A l'origine une méthode de dosage par traitement thermique alcalin a été développée pour mesurer le potentiel en DMS au cours du procédé de fabrication de la bière (White et Wainwright, 1976). Bien plus tard, plusieurs conditions de traitement thermique alcalin ont été testées sur des vins (Swan, 2000). Récemment, les conditions développées par Ségurel *et al.* (2005 ; bullage à l'azote, utilisation d'un étalon interne adapté, conditions du traitement thermique alcalin) permettent de générer du DMS à partir de ces précurseurs. Dans le vin, l'intérêt de la mesure du DMS ainsi libéré, défini comme le potentiel en DMS (PDMS), est qu'elle constitue une estimation du DMS pouvant être formé au cours du vieillissement du vin. Cette mesure du PDMS est également applicable au raisin (Ségurel *et al.*, 2005).

V.4.2.2. Dosage du sulfure de diméthyle libre (DMS) et potentiel (PDMS) dans des vins commerciaux de Petit et de Gros Manseng

Le DMS libre et le PDMS ont été dosés dans 17 vins commerciaux âgés de 1 à 21 ans, provenant des appellations Côtes de Gascogne et Jurançon. Les résultats sont présentés dans le Tableau 22 ci-dessous, où la somme PDMS+DMS d'un vin correspond à l'estimation du PDMS initial (c'est à dire le PDMS du vin à la mise en bouteille), et le pourcentage de DMS libéré dans un vin est calculé par le rapport DMS/PDMS initial.

Tableau 22 : Teneurs en DMS libre et PDMS de 17 vins commerciaux de Petit Manseng et de Gros Manseng ([a] PM Petit Manseng ; GM Gros Manseng ; CH Chardonnay ; [b] DMS/(DMS+PDMS) ; [c] DMS+PDMS ; [d] ND : non dosé)

Appellation	Caractéristique	Cépage[a]	Millésime	Age (années)	PDMS (µg/L)	DMS (µg/L)	% DMS libéré[b]	PDMS initial[c] (µg/L)
Jurançon	doux	PM	1980	25	17	ND[d]		
Jurançon	doux	GM	1981	24	20	ND		
Jurançon	doux	PM	1984	21	178	713	80%	891
Jurançon	sec	GM	1986	19	12	ND		
Jurançon	doux	PM	1995	10	1001	ND		
Jurançon	sec	GM	1996	9	1144	711	38%	1855
Jurançon	doux	GM	1996	9	730	579	44%	1309
Jurançon	doux	PM	1998	7	109	61	36%	170
Côtes de Gascogne	doux	GM-CH	1997	8	64	119	65%	184
Côtes de Gascogne	doux	PM	2001	4	1114	585	34%	1699
Côtes de Gascogne	doux	PM	2002	3	136	25	16%	160
Côtes de Gascogne	doux	GM	2002	3	561	289	34%	850
Côtes de Gascogne	doux	PM	2003	2	1083	324	23%	1407
Côtes de Gascogne	doux	GM	2003	2	96	26	22%	122
Côtes de Gascogne	doux	GM	2004	1	47	3	5%	50
Côtes de Gascogne	doux	GM-PM	2004	1	345	58	14%	403
Côtes de Gascogne	doux	GM	2004	1	348	30	8%	378

Ces vins commerciaux qui ont suivi des itinéraires techniques vraisemblablement différents, présentent des teneurs en DMS libre et PDMS très variées. Les teneurs en DMS sont comprises entre 3 µg/L et 711 µg/L, alors que le PDMS oscille encore plus amplement entre 12 µg/L et 1144 µg/L. Le seuil de perception olfactive du DMS, de l'ordre de 22 µg/L à 60 µg/L (Etiévant, 1991) est largement dépassé dans plus de la moitié des échantillons. Ainsi, le DMS apparaît comme un arôme clef des vins de Petit et Gros Manseng, dans lesquels il atteint quasiment les valeurs les plus hautes rapportées. Le DMS contribue à l'arôme de nombreux vins (De Mora *et al.*, 1987; Etiévant, 1991; Park *et al.*, 1994; Ségurel *et al.*, 2005), mais son rôle apparaît complexe et sa contribution évolue selon sa concentration et les matrices le contenant, allant jusqu'à être considéré comme un défaut (Spedding et Raut, 1982; Anocibar Beloqui, 1998). Pour des concentrations en DMS élevées, supérieures à 500 µg/L,

un panel de dégustateurs décrit les vins blancs enrichis par d'intenses notes d'asperge, de maïs et de mélasse (Goniak et Noble, 1987). À très faibles concentrations, le DMS pourrait intervenir dans le bouquet caractéristique des vins blancs issus de vendanges tardives (Du Plessis et Loubser, 1974). Plus récemment, la contribution du DMS aux arômes de vins rouges de Syrah et de Grenache noir a été caractérisée par une intensification des notes fruitées, associées à des notes de truffe et d'olive noire (Ségurel *et al.*, 2004).

Selon Simpson et Anocibar Beloqui (Simpson, 1979; Anocibar Beloqui *et al.*, 1996; Anocibar Beloqui, 1998), les teneurs en DMS augmentent avec l'âge du vin et son influence à d'ailleurs été spécifiée pour des vins vieux (Marais, 1979; Goto et Takamuto, 1987). Cependant, comme l'indique une majorité de travaux (De Mora *et al.*, 1987; De Mora *et al.*, 1993; Ségurel *et al.*, 2005), notre échantillonnage ne permet pas d'établir de corrélation significative entre les teneurs en DMS ou PDMS, et l'âge du vin (Figure 63 et Figure 64). Néanmoins, d'une manière générale les vins vieux présentent des teneurs élevées en DMS et faibles en PDMS.

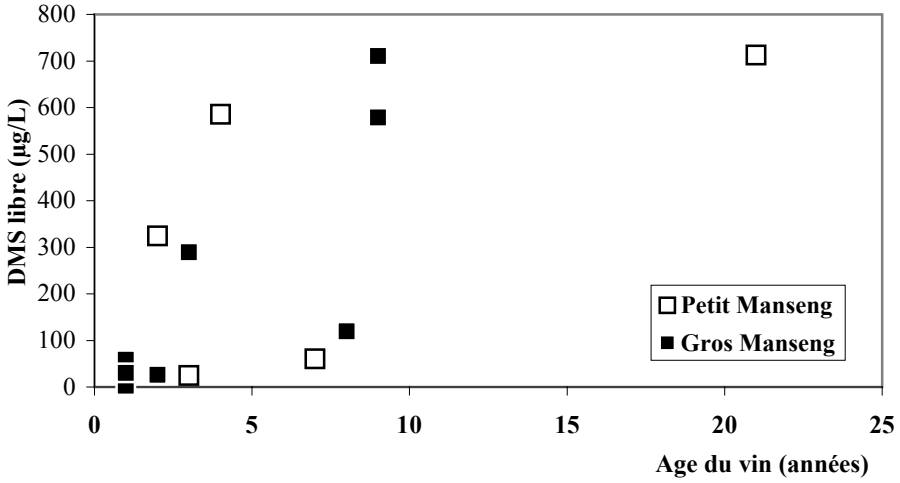


Figure 63 : Teneurs en DMS libre des vins commerciaux de Petit et Gros Manseng étudiés (cf. Tableau 18), en fonction de leur âge.

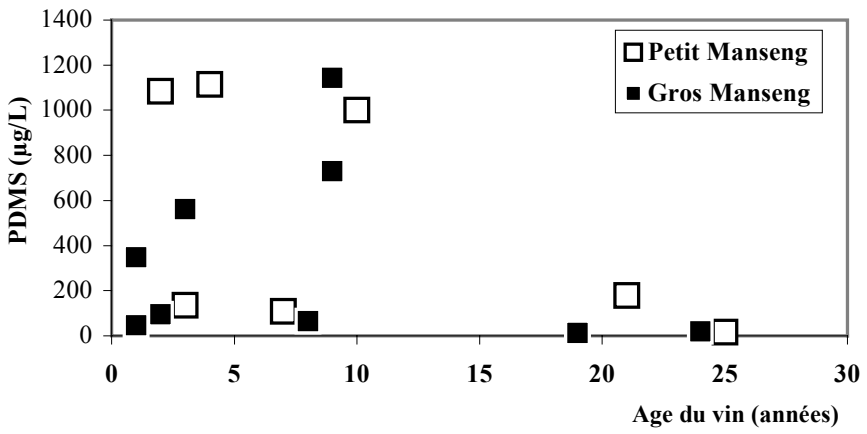


Figure 64 : Teneurs en PDMS des vins commerciaux de Petit et Gros Manseng étudiés (cf. Tableau 18), en fonction de leur âge.

Toutefois, comme cela a été montré pour un échantillon de 30 vins de Grenache et de Syrah (Ségurel *et al.*, 2005), le rapport DMS libre sur la somme DMS libre plus PDMS est corrélé à l'âge du vin (R^2=0,805 ; Figure 65). Ce rapport qui exprime le pourcentage de DMS libéré à partir du PDMS initialement présent dans le vin, permet une normalisation éliminant les hétérogénéités des teneurs en PDMS initial de ces différents vins. Ainsi la droite de régression donne une estimation du pourcentage de DMS susceptible d'être libéré en fonction du temps. Après 2 ans de conservation en bouteille, 20 % du DMS est libéré, et 50 % après 10 ans. Ceci reste une estimation car la libération du DMS pendant le vieillissement en bouteille dépend des conditions de conservation, et notamment de la température (Marais, 1979; Anocibar Beloqui *et al.*, 1996; Anocibar Beloqui, 1998; Ségurel *et al.*, 2004). Ces conditions particulières de conservation de chacun des vins commerciaux analysés limitent la qualité de la régression linéaire observée, et expliquent, comme cela a été démontré précédemment (Ségurel, 2005; Ségurel *et al.*, 2005) les variations du simple au double du pourcentage de DMS libéré entre des vins du même âge.

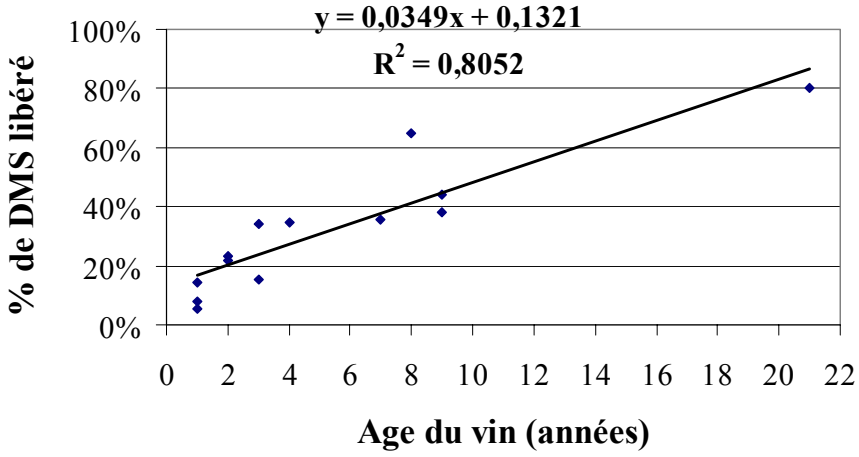


Figure 65 : Pourcentage de DMS libéré [DMS/(DMS+PDMS)] dans les vins commerciaux de Petit et Gros Manseng étudiés, en fonction de leur âge.

Par ailleurs la combinaison des teneurs en PDMS des vins commerciaux de Petit et Gros Manseng, avec celles de différents vins commerciaux et expérimentaux de Grenache et Syrah (Ségurel *et al.*, 2004), ne modifie pas la régression linéaire (Figure 66). Cela montre que la libération du DMS à partir des précurseurs du raisin implique des phénomènes relativement continu et peu dépendant de la matrice, ce qui est en accord avec l'hypothèse de la formation du DMS à partir de la SMM selon un mécanisme chimique.

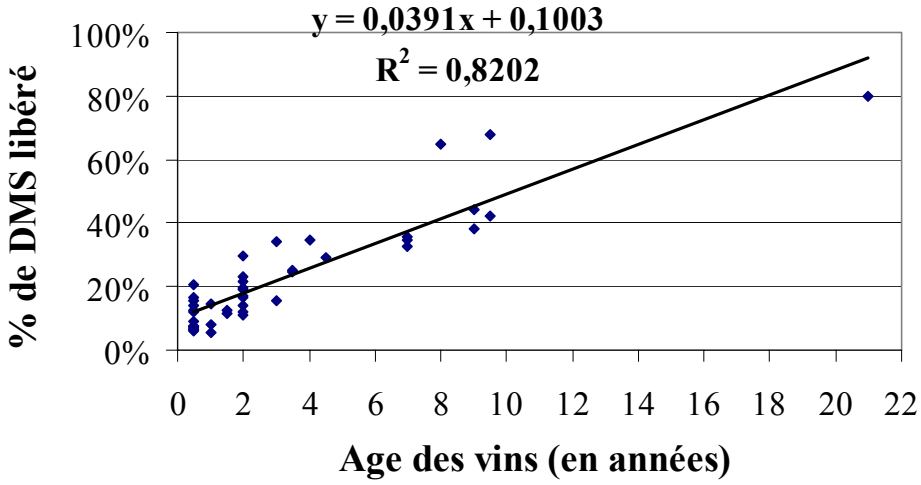


Figure 66 : Pourcentage de DMS libéré [DMS/(DMS+PDMS)] dans les vins commerciaux de Petit et Gros Manseng étudiés et de vins de Grenache et Syrah (Ségurel *et al.*, 2004), en fonction de leur âge.

D'après les travaux de Ségurel *et al.* (2005), la SMM serait très probablement le précurseur du DMS. Présente dans le raisin, la SMM serait transmise au vin où elle libèrerait du DMS par une réaction de dégradation chimique au cours de sa conservation. La formation du DMS suivrait un processus chimique lent (dégradation d'Hoffmann) dépendant de la durée et des conditions de conservation. Cependant, ces vins sont généralement conservés dans des conditions similaires, et donc la différence de concentration en DMS pour des vins d'âges équivalents, s'expliquerait essentiellement par les différences de PDMS initial à la mise en bouteille (DMS + PDMS), compris dans nos échantillons entre 50 µg/L et 1810 µg/L.

V.4.2.3. Analyse des vins et des jus de raisin du dispositif expérimental

Compte tenu des concentrations en DMS très élevées, trouvées dans certains vins de Petit et Gros Manseng, l'ensemble des échantillons de raisins et des vins issus du dispositif expérimental (2002, 2003 et 2004) a fait l'objet des analyses de PDMS et de DMS libre.

V.4.2.3.1. Analyse des jus de raisin

En accord avec les analyses du DMS libre dans des jus de Grenache et Syrah (Ségurel, 2005), les 4 échantillons de jus analysés (Petit et Gros Manseng, date 1 et date 3) présentent des teneurs en DMS libre toutes inférieures à 7 µg/L. En revanche, le traitement thermique alcalin de jus des 44 échantillons de raisins (cf. codification chapitre V.1.1 p 99) révèle un potentiel en DMS extrêmement hétérogène et parfois très élevé pour certains échantillons, compris entre 38 µg/L et 4,46 mg/L (Tableau 23). Ces teneurs sont très fortes en comparaison aux teneurs rencontrées dans le Grenache et la Syrah (Ségurel *et al.*, 2004).

Tableau 23 : PDMS des jus de raisins expérimentaux des millésimes 2002, 2003 et 2004 [[a] cf. codification ; [b] DMS généré par traitement thermique alcalin (NaOH 0,75 M, 100°C, 1h)].

Code[a]	Millésime	Variété	Date de récolte	PDMS[b] du jus (µg/L)
GP	2002	Petit Manseng	1	836
GP	2002	Petit Manseng	2	1707
FP	2002	Petit Manseng	1	424
FP	2002	Petit Manseng	2	570
GG	2002	Gros Manseng	1	316
GG	2002	Gros Manseng	2	706
FG	2002	Gros Manseng	1	298
FG	2002	Gros Manseng	2	194
GP	2003	Petit Manseng	1	363
GP	2003	Petit Manseng	2	2596
GP	2003	Petit Manseng	3	4460
FP	2003	Petit Manseng	1	165
FP	2003	Petit Manseng	2	852
FP	2003	Petit Manseng	3	1606
TP	2003	Petit Manseng	1	966
TP	2003	Petit Manseng	2	1967
TP	2003	Petit Manseng	3	3357
GG	2003	Gros Manseng	1	122
GG	2003	Gros Manseng	2	571
GG	2003	Gros Manseng	3	1941
FG	2003	Gros Manseng	1	139
FG	2003	Gros Manseng	2	136
FG	2003	Gros Manseng	3	288
TG	2003	Gros Manseng	1	227
TG	2003	Gros Manseng	2	482
TG	2003	Gros Manseng	3	1412
GP	2004	Petit Manseng	1	214
GP	2004	Petit Manseng	2	1207
GP	2004	Petit Manseng	3	2850
FP	2004	Petit Manseng	1	191
FP	2004	Petit Manseng	2	728
FP	2004	Petit Manseng	3	1304
TP	2004	Petit Manseng	1	218
TP	2004	Petit Manseng	2	1077
TP	2004	Petit Manseng	3	3196
GG	2004	Gros Manseng	1	48
GG	2004	Gros Manseng	2	161
GG	2004	Gros Manseng	3	671
FG	2004	Gros Manseng	1	38
FG	2004	Gros Manseng	2	311
FG	2004	Gros Manseng	3	453
TG	2004	Gros Manseng	1	38
TG	2004	Gros Manseng	2	266
TG	2004	Gros Manseng	3	388

Ces résultats montrent une très grande variabilité du potentiel en DMS du raisin en fonction de la maturité, du cépage, du site et du millésime, en accord avec les résultats obtenus sur Grenache et Syrah, excepté pour l'effet maturité non étudié précédemment (Ségurel *et al.*, 2004). Ces observations, validées par une analyse de variance à 4 facteurs du PDMS des 36 échantillons de raisins des millésimes 2003 et 2004, montrent que les variations apportées par chacun de ces paramètres sont significatives (Tableau 24). Mais, ce sont les facteurs maturité et cépage, qui apportent le plus de variabilité.

Tableau 24 : Effet de la maturité, du millésime, du site et du cépage sur le PDMS des jus de 2003 et 2004 (Probabilité associée à un effet :**** P<0,001 ;* P<0,05 ; [a] valeurs moyennes du PDMS pour chaque facteur à partir du PDMS des 36 échantillons de raisins)

	Probabilité		**PDMS[a]** (µg/L)		**PDMS[a]** (µg/L)		**PDMS[a]** (µg/L)
Maturité	****	**date 1**	227	**date 2**	862	**date 3**	1827
Cépage	****	**Petit Manseng**	1517	**Gros Manseng**	417		
Site	*	**G**	1267	**F**	517	**T**	1132
Millésime	*	**2003**	1202	**2004**	742		

Différences entre le Petit et le Gros Manseng

Le Petit Manseng est en moyenne 3,4 fois plus riche que le Gros Manseng. De plus, à dates de récolte équivalentes, les échantillons de Petit Manseng sont presque systématiquement plus riches que ceux de Gros Manseng (Figure 67 et Figure 68). De plus, l'augmentation du PDMS au cours du temps est aussi plus rapide pour les différentes parcelles de Petit Manseng.

Influence du site et du millésime

Pour les échantillons de Petit Manseng, le millésime 2003 est plus favorable que 2004 ou 2002 à l'accumulation du PDMS (Figure 67). D'un millésime à l'autre, les teneurs en PDMS varient du simple au double pour les parcelles GP et TP en dates 1 et 2. Néanmoins, ces différences sont réduites en dernière date.

Pour les parcelles de Gros Manseng, même à la 3ème date, le PDMS en 2003 est près de 4 fois supérieur à celui de 2004 pour les parcelles GG et TG. En 2003, la chaleur et la sècheresse ont donc été particulièrement favorables à l'accumulation du PDMS dans les raisins de Gros Manseng. Néanmoins, contrairement à toutes les autres parcelles, FG présente un PDMS plus faible en 2003 qu'en 2004 et inférieur à 300 µg/L. Le stress hydrique intense subi par cette parcelle a entraîné une défoliation partielle des ceps qui pourrait expliquer ces faibles valeurs du PDMS.

En 2003, les échantillons des parcelles GP et TP présentent une maturité équivalente (cf. chapitre V.1.2), mais leurs teneurs relatives en PDMS n'évoluent pas de la même façon au cours de la maturité (Figure 67). En effet, en date 1 le PDMS de TP est environ 3 fois supérieur à celui de GP, alors qu'en dernière date c'est l'inverse. De la même manière, les teneurs différentes en PDMS des parcelles GG et TG montrent qu'il existe un effet parcelle indépendant des différences de maturité.

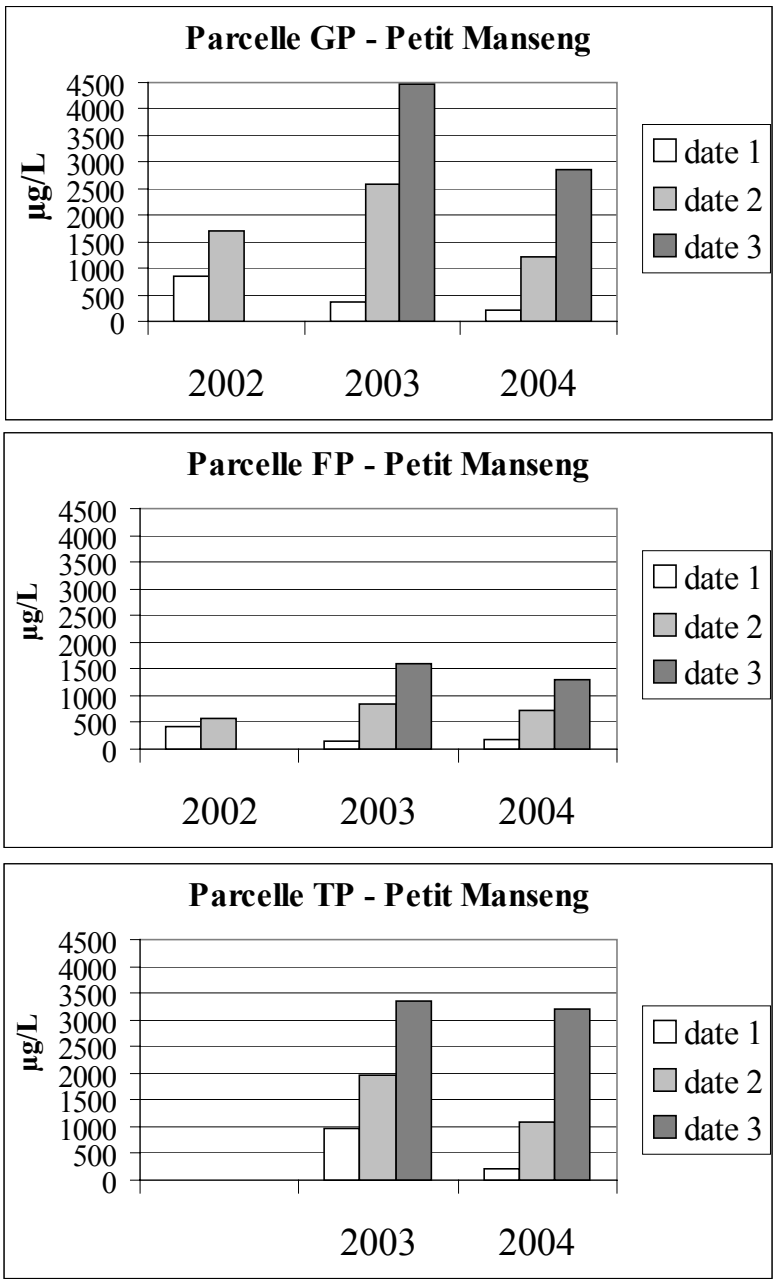


Figure 67 : PDMS des jus de raisins expérimentaux issus des 3 parcelles de Petit Manseng, pour les millésimes 2002, 2003 et 2004.

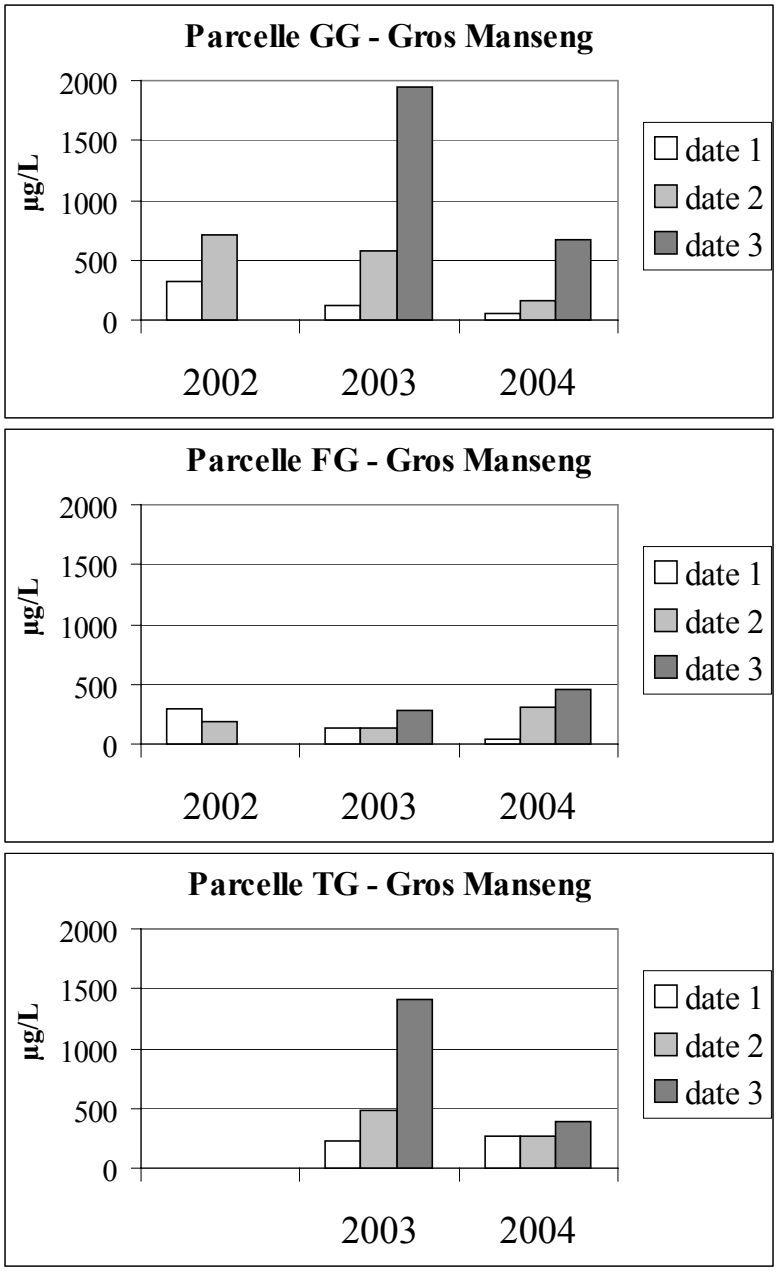


Figure 68 : PDMS des jus de raisins expérimentaux issus des 3 parcelles de Gros Manseng, pour les millésimes 2002, 2003 et 2004.

Influence de la maturité

L'influence de la maturité sur le PDMS, étudiée ici pour la première fois, montre qu'elle est le facteur le plus influent. En effet, sur 5 des 6 parcelles suivies en 2003 et 2004, il y a toujours une augmentation du PDMS au cours de la maturation. De même en 2002, une augmentation analogue a été observée pour les 2 dates étudiées, pour 3 des 4 parcelles, alors que la maturité des raisins était stable (Figure 67). Dans l'ensemble, entre la 1ère et la 3ème date, le PDMS est multiplié par un facteur 2 à 16 selon les parcelles et peut atteindre plusieurs mg/L. L'augmentation du PDMS est très largement supérieure à celle qui pourrait être induite

par des variations de la taille des baies ou du rapport marc/jus. Le PDMS s'accumule donc dans la baie au cours de la maturation et comme on peut l'observer sur la Figure 69 et la Figure 70, cette augmentation est relativement continue au cours du temps. Toutefois, les pentes de progression et les concentrations maximales atteintes varient en fonction du cépage, de la parcelle et du millésime.

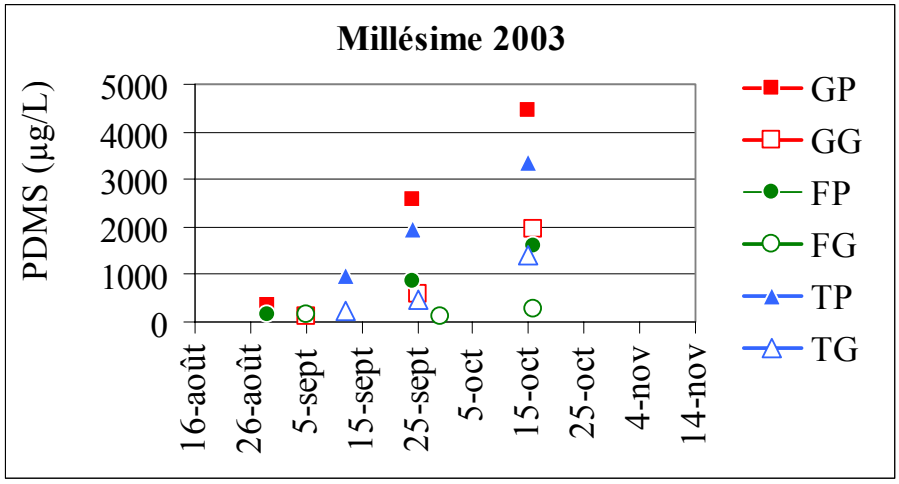


Figure 69 : Evolution du PDMS des jus de raisins expérimentaux du millésime 2003, pour les 3 parcelles de Petit Manseng et les 3 de Gros Manseng, en fonction des dates de récolte.

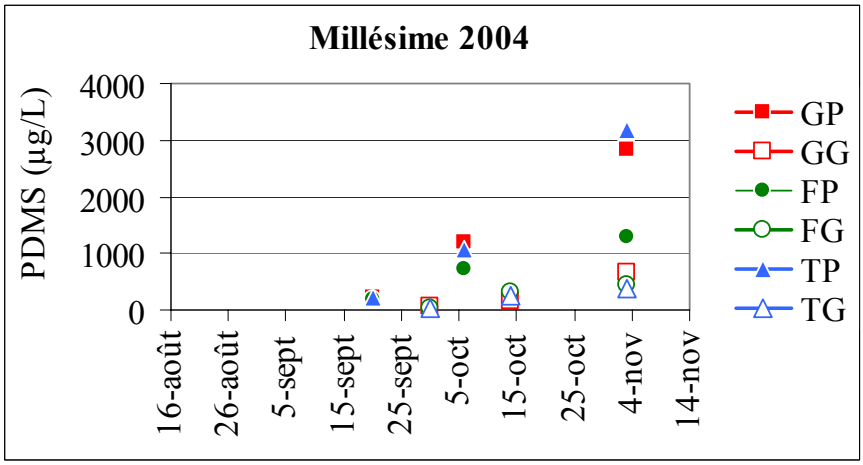


Figure 70 : Evolution du PDMS des jus de raisins expérimentaux du millésime 2004, pour les 3 parcelles de Petit Manseng et les 3 de Gros Manseng, en fonction des dates de récolte.

La Figure 71 et la Figure 72 montrent l'augmentation du PDMS en fonction de l'indice de maturité (rapport sucres/acidité totale), pour les 6 parcelles de Petit et Gros Manseng en 2004. Deux tendances se dégagent. L'exemple des parcelles FG, FP et TG, montre que le PDMS augmente presque linéairement avec l'indice de maturité. Et c'est aussi le cas de la parcelle GP en 2003. En revanche, pour les parcelles GG, TP et GP, ainsi que pour la majorité

des parcelles en 2003, l'augmentation du PDMS s'accentue entre la 2ème et la 3ème date de récolte alors que la progression de l'indice de maturité ralentit, essentiellement en raison du ralentissement de l'accumulation des sucres dans la baie. Ainsi, les paramètres classiques de suivi de la maturité ne sont pas adaptés au suivi du PDMS dans une majorité des cas, bien qu'il y ait toujours augmentation du PDMS avec la maturation.

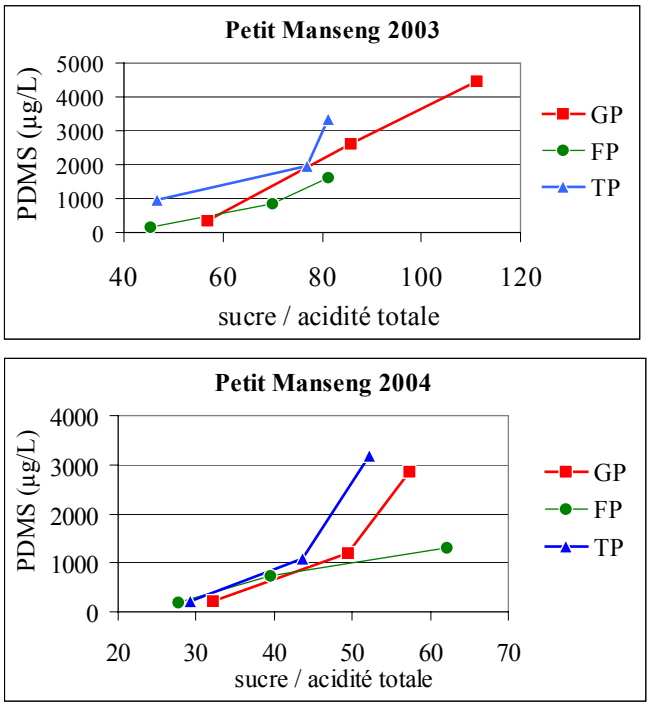


Figure 71 : Evolution du PDMS en fonction du rapport sucres/acidité totale pour les 3 parcelles de Petit Manseng (millésimes 2003 et 2004).

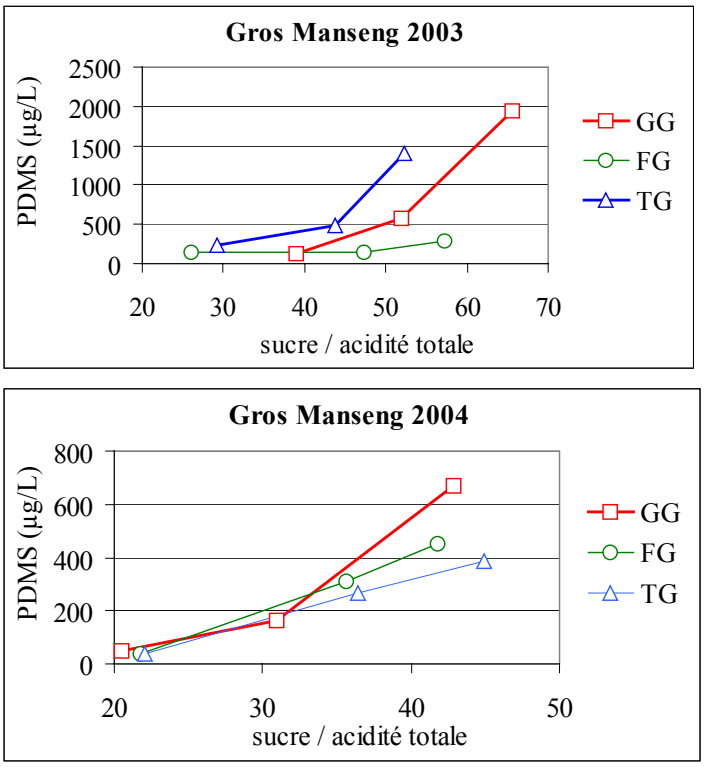


Figure 72 : Evolution du PDMS en fonction du rapport sucre sur acidité totale pour les 3 parcelles de Gros Manseng (millésimes 2003 et 2004).

L'hypothèse d'une biosynthèse des précurseurs de DMS dans la baie même, impliquant une production autonome de la baie, pourrait être envisagée comme dans le cas des précurseurs glycosidiques car l'accumulation du PDMS se poursuit même après le ralentissement ou l'arrêt de l'accumulation des sucres.

A la suite de travaux réalisés sur d'autres plantes, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses sur l'origine de l'accumulation de la SMM dans la baie de raisin.

D'une part, chez la plante à fleur, *Wollostonia biflora* (L.) DC, la SMM est synthétisée dans le cytosol puis transportée dans les chloroplastes où elle est oxydée en 3-diméthylsulfoniopropionaldéhyde (DMSP-ald ; Trossat *et al.*, 1996). La disparition progressive des chloroplastes du raisin à partir de la véraison pourraient expliquer l'accumulation continue, notamment dans les cellules des assises pelliculaires, de la SMM qui ne serait plus métabolisée en DMSP-ald. Cela serait en accord avec les problèmes d'extraction décrits ci-après (cf. chapitre V.4.2.3.2). Par ailleurs, l'implication de la SMM dans des mécanismes de transport de la plante (Bourgis *et al.*, 1999) montre qu'elle pourrait être synthétisée dans d'autres organes de la plante puis transportée vers la baie. Si selon la première hypothèse, la SMM est le reliquat d'une activité métabolique, son déplacement dans la plante justifierait au contraire un rôle précis. Certaines bétaines (composés chargés) tel le

DMSPA peuvent jouer chez certaines algues marines le rôle d'osmolyte (Yancey *et al.*, 1982) et d'antigel (Karsten *et al.*, 1996) mais à des concentrations très élevées. La vigne se développe dans des conditions où les niveaux de salinité sont nettement plus faibles qu'en milieux marins, la SMM pourrait alors jouer ce rôle d'osmolyte à des teneurs beaucoup plus faibles, adaptées à celles de l'environnement de la vigne. Ainsi, son augmentation au cours de la maturation du raisin pourrait être une réponse au stress hydrique généralement croissant.

Dans les plantes, certaines bétaines sont présentes en concentrations plus faibles, et dans ces conditions leur rôle reste indéterminé. Dans ces cas, les plantes traitées par ces composés s'avèrent plus résistantes dans des conditions de stress parasitaires (Wu *et al.*, 1997). Mais l'augmentation quasiment continue du PDMS au cours de la maturation n'apparaît pas comme une réponse adaptée à des pressions parasitaires ponctuelles.

V.4.2.3.2. Transmission du potentiel du jus au vin

Les vins obtenus par mini-vinification ont été conservés à 4°C et les teneurs en DMS libre sont toutes inférieures à 7 µg/L, même pour ceux âgés de 2 ans (Tableau 25). La conservation des vins à basse température limite considérablement la libération du DMS, en accord avec les mécanismes de dégradation chimique de ces précurseurs au cours de la conservation (Ségurel *et al.*, 2005).

Les valeurs du PDMS mesurées dans les vins des millésimes 2003 et 2004 montrent que malgré la mise en place pour chaque millésime de conditions de vinification standardisées, la transmission du PDMS du raisin au vin est très hétérogène. Les différences significatives du PDMS observées dans les jus de chaque cépage et à des stades de maturité différents, sont en grande partie gommées (Figure 73 et Figure 74), en accord avec les observations faites sur le Grenache et la Syrah (Ségurel, 2005).

Tableau 25 : PDMS des vins expérimentaux des millésimes 2003 et 2004 ([a] cf. codification chapitre V.1, p 98 ; - non dosé).

Code	Millésime	Variété	Parcelle[a]	Date de récolte	PDMS des vins (µg/L)	% de transmission	DMS libre des vins (µg/L)
3GP1	2003	Petit Manseng	GP	1	516	142	-
3GP2	2003	Petit Manseng	GP	2	334	13	-
3GP3	2003	Petit Manseng	GP	3	212	5	-
3FP1	2003	Petit Manseng	FP	1	161	98	-
3FP2	2003	Petit Manseng	FP	2	127	15	-
3FP3	2003	Petit Manseng	FP	3	209	13	-
3TP1	2003	Petit Manseng	TP	1	-	-	-
3TP2	2003	Petit Manseng	TP	2	232	12	-
3TP3	2003	Petit Manseng	TP	3	132	4	-
3GG1	2003	Gros Manseng	GG	1	84	68	-
3GG2	2003	Gros Manseng	GG	2	52	9	-
3GG3	2003	Gros Manseng	GG	3	150	8	-
3FG1	2003	Gros Manseng	FG	1	72	52	-
3FG2	2003	Gros Manseng	FG	2	95	70	-
3FG3	2003	Gros Manseng	FG	3	102	36	-
3TG1	2003	Gros Manseng	TG	1	113	50	-
3TG2	2003	Gros Manseng	TG	2	86	18	-
3TG3	2003	Gros Manseng	TG	3	164	12	-
4GP1	2004	Petit Manseng	GP	1	44	20	4
4GP2	2004	Petit Manseng	GP	2	28	2	4
4GP3	2004	Petit Manseng	GP	3	65	2	8
4FP1	2004	Petit Manseng	FP	1	38	20	2
4FP2	2004	Petit Manseng	FP	2	28	4	3
4FP3	2004	Petit Manseng	FP	3	51	4	5
4TP1	2004	Petit Manseng	TP	1	38	18	3
4TP2	2004	Petit Manseng	TP	2	58	5	4
4TP3	2004	Petit Manseng	TP	3	53	2	-
4GG1	2004	Gros Manseng	GG	1	44	91	4
4GG2	2004	Gros Manseng	GG	2	52	32	4
4GG3	2004	Gros Manseng	GG	3	46	7	4
4FG1	2004	Gros Manseng	FG	1	16	41	3
4FG2	2004	Gros Manseng	FG	2	53	17	4
4FG3	2004	Gros Manseng	FG	3	55	12	6
4TG1	2004	Gros Manseng	TG	1	-	-	-
4TG2	2004	Gros Manseng	TG	2	46	17	4
4TG3	2004	Gros Manseng	TG	3	46	12	4

Le PDMS des vins analysés varie de 52 µg/L à 516 µg/L en 2003 et de 16 µg/L à 65 µg/L en 2004 (Figure 73A et Figure 74A). Ainsi, d'une part on constate que l'essentiel du PDMS du raisin n'a pas été transmis au vin, et d'autre part que le PDMS ne dépasse 100 µg/L (teneur correspondant à la valeur haute du seuil de perception du DMS dans le vin) que dans 12 des 36 vins analysés. Bien que les seuils de perception et la contribution sensorielle du DMS restent à préciser dans le cas des vins secs et moelleux de Petit et Gros Manseng, étant donné les teneurs transmises dans nos vins expérimentaux, la contribution sensorielle du DMS n'est pas systématique. En effet pour les 2 millésimes, les rendements de transmission sont souvent inférieurs à 20 %, sauf pour les 1ères dates de récolte, où ils varient entre 50 % et 98 % (Figure 73B et Figure 74B). Le rendement aberrant obtenu pour l'échantillon GP1 en 2004, pourrait être expliqué par une erreur de dosage, soit dans le jus, soit dans le vin.

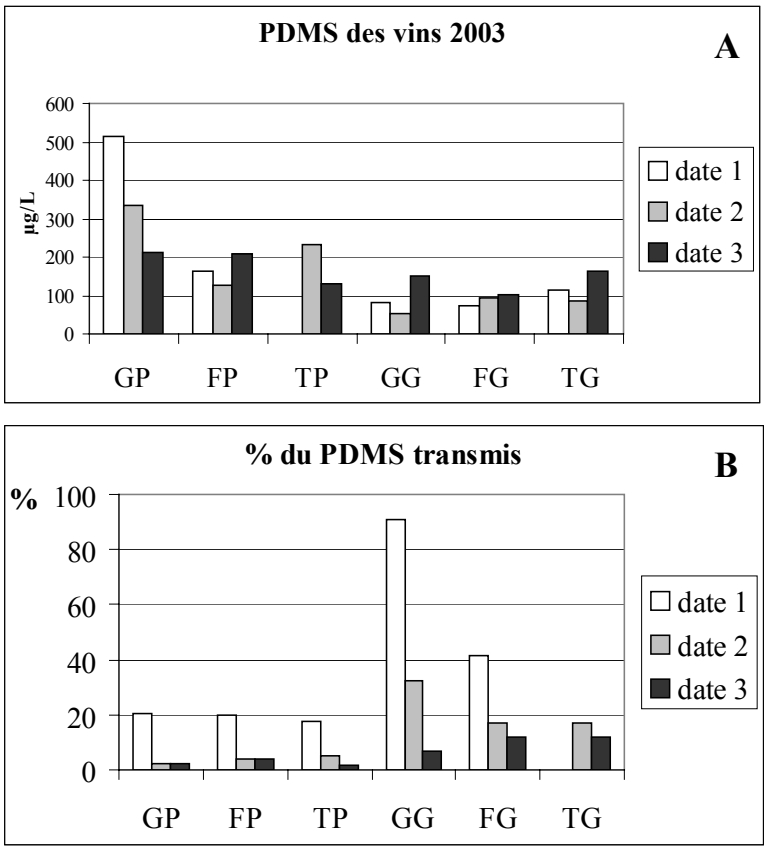


Figure 73 : (A) PDMS des vins expérimentaux du millésime 2003 et (B) pourcentage de PDMS transmis correspondants (PDMS vin/PDMS raisin).

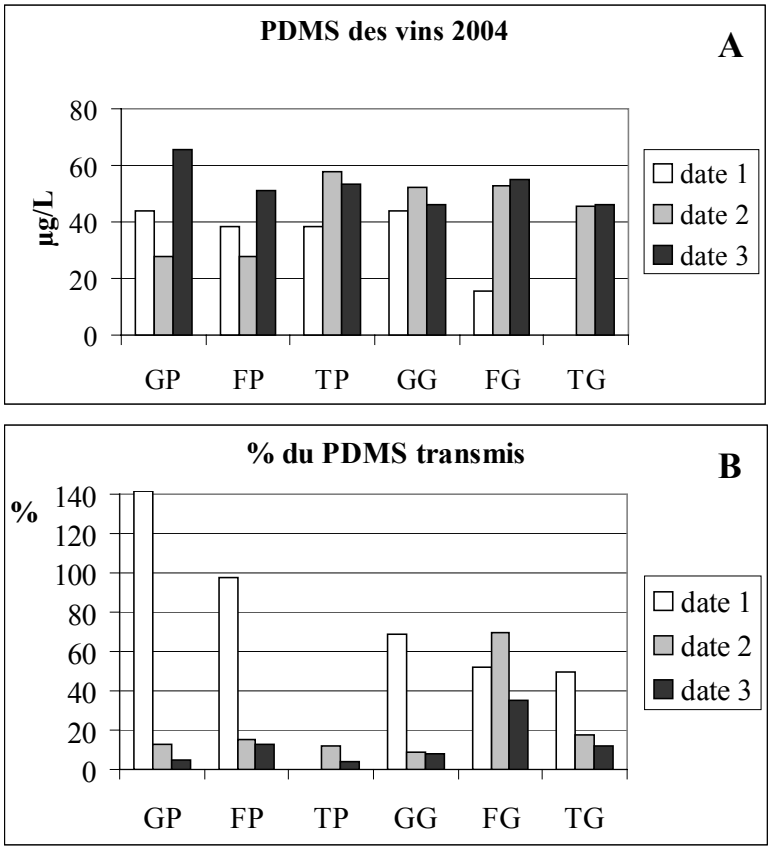


Figure 74 : (A) PDMS des vins expérimentaux du millésime 2004 et (B) % de PDMS transmis correspondants (PDMS vin/PDMS raisin)

Ces résultats soulèvent plusieurs questions et hypothèses quant à la transmission du PDMS du raisin au vin au cours du procédé de vinification, d'autant qu'ils ne corroborent pas les teneurs en PDMS initiaux dans les vins commerciaux (cf. Tableau 22 p 148).

Extraction du PDMS

L'utilisation d'un mini-pressoir et des conditions de pressurage très douces en comparaison à celles communément employées, pourraient expliquer les faibles valeurs de PDMS des vins par rapport à celles, parfois très élevées, des vins commerciaux. Du fait de sa mise en évidence récente (Ségurel *et al.*, 2005), aucune donnée ne permet de localiser le PDMS dans les différentes parties de la baie, comme c'est le cas pour les précurseurs glycosidiques et les précurseurs cystéinylés, plus abondants dans la pellicule (Günata *et al.*, 1985a; Gomez *et al.*, 1994; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002a). Avec une répartition similaire du PDMS, la transmission du PDMS au vin serait dépendante des conditions d'extraction. Les pratiques standardisées utilisées pour chaque vinification, associées aux pressurages doux pourraient expliquer que l'extraction du PDMS soit faible et identique pour des échantillons de raisins de maturité différente. Toutefois dans l'hypothèse où la SMM constituerait le

PDMS, la nature chimique de ce composé, très hydrophile, devrait au contraire faciliter son extraction, ce qui devrait entraîner des différences de PDMS dans les vins. Cet argument va cependant à l'encontre des observations faites sur le PDMS des vins expérimentaux, ce qui permet d'envisager d'autres hypothèses plus probables pouvant expliquer la perte du PDMS au cours de la vinification et l'uniformisation des teneurs en PDMS des vins expérimentaux.

Le rôle de la levure

Après le pressurage, le moût subit des contraintes particulières, propres à chaque étape du procédé de vinification, au cours desquelles le PDMS pourrait être transformé ou dégradé.

Plusieurs travaux ont montré l'implication de la levure dans la formation du PDMS du DMS en conditions œnologiques à partir de différents composés soufrés (Schreier *et al.*, 1976; De Mora *et al.*, 1986; Anocibar Beloqui, 1998). Du fait de leur réactivité chimique, ces composés sont peu susceptibles de générer du DMS par traitement thermique alcalin. De plus, les travaux de Ségurel *et al.* (2005) ont montré que la SMM (contrairement au MSO, au DMSO et au DMSPA) est le précurseur le plus probable du DMS. Cette hypothèse est appuyée par de nombreux travaux antérieurs, notamment sur la bière (White et Wainwright, 1976), et sur divers végétaux (Bezzubov et Gessler, 1992; Sakamoto *et al.*, 1996), dans lesquels la mesure du PDMS est utilisée pour mesurer les teneurs en SMM.

L'aptitude de la levure à libérer du DMS à partir de précurseurs estimables par traitement thermique alcalin (PDMS) n'a pas été démontrée. Cependant, les levures comme certaines bactéries pourraient dégrader la SMM en DMS (Schreier *et al.*, 1974), contrairement à ce qui avait été rapporté par Etiévant (1991). La transformation de la SMM en DMS par les levures a été démontrée dans le fromage, mais pas en conditions œnologiques (Spinnler *et al.*, 2001). Il a cependant été démontré que la SMM peut être utilisée par la levure *Saccharomyces cerevisiea*, via 2 perméases, l'une non spécifique et l'autre spécifique. Cette dernière est inhibée par la méthionine, la d-adénosylméthionine, la cystéine et la phénylalanine (Rouillon *et al.*, 1999). L'importance de ces perméases pourrait être variable selon la souche de levure. Ainsi, les variations de rendement de transmission en PDMS entre 2003 et 2004 pourraient provenir de l'utilisation de souches de levures différentes (KD et NT116).

Dégradations et transformations chimiques

Du point de vue chimique, la fonction sulfonium portée par la SMM et la présence d'un proton en β lui confèrent une réactivité importante vis à vis des groupements nucléophiles et des bases (réactions d'élimination et de substitution) conduisant à la formation de DMS. L'évolution de la qualité du moût selon la maturité des raisins pourrait conditionner la disponibilité de certains composés susceptibles de réagir avec la SMM. De plus, l'importance du facteur température sur la dégradation de la SMM, déjà connue (Marais, 1979; Anocibar Beloqui, 1998), a été confirmée en conditions de vieillissement modèle (Ségurel *et al.*, 2005).

Ainsi, la qualité du moût et les conditions de fermentation (levure, température, durée,…) pourraient s'avérer déterminantes pour la dégradation chimique ou la transformation de la SMM au cours du procédé de vinification.

V.4.3. Conclusion

Les teneurs en DMS libre des vins commerciaux de Petit et de Gros Manseng sont très variables, mais le plus souvent elles sont supérieures à son seuil de perception olfactive. Les valeurs les plus faibles, observées dans les vins jeunes, sont proches du seuil de perception olfactive, mais dans certains vins vieux les concentrations peuvent dépasser plus de 700 µg/L. Le DMS apparaît ainsi comme un marqueur des vins de Petit et Gros Manseng.

Compte tenu des descripteurs qu'on lui attribue et des teneurs très élevées rencontrées dans certains de ces vins, le DMS pourrait apporter différentes notes odorantes, de truffe notamment. Toutefois, la contribution du DMS est décrite comme complexe et variable selon sa concentration et le type de vin. Elle devra donc être étudiée spécifiquement dans le cas des vins de Petit et Gros Manseng.

Le DMS est un arôme de vieillissement dont l'intérêt paraît plus évident pour les vins de garde, mais étant donné les teneurs relativement importantes dans certains vins jeunes, sa contribution peut être envisagée pour tout type de vin, dès lors que le potentiel en DMS (PDMS) du vin est suffisamment élevé.

Le PDMS du vin conditionne la quantité maximum de DMS susceptible d'être libérée au cours de la conservation du vin. Ce potentiel, présent en plus grande quantité dans le raisin, est significativement influencé par tous les facteurs étudiés : millésime, site, maturité, cépage. Ces deux derniers sont toutefois les plus importants. En effet, les raisins de Petit Manseng sont généralement 3 fois plus riches en PDMS que ceux de Gros Manseng. Cette différence ne peut être attribuée seulement à une variation de la taille des baies et met en évidence une différence variétale. Par ailleurs, le PDMS s'accumule presque linéairement au cours de la maturation du raisin et ses teneurs sont en moyenne multipliées par 8 à 10. Les teneurs les plus élevées sont donc rencontrées dans les raisins en surmaturité ce qui pourrait constituer un intérêt particulier pour l'élaboration de vins moelleux dans lesquels le PDMS serait alors plus abondant. Le DMS présenterait ainsi un intérêt tout particulier pour les vins moelleux comme le supposaient déjà Du Plessis et Loubser (1974).

Cependant, la transmission du PDMS du raisin au vin est très variable et peut être très faible dans nos conditions expérimentales. Les teneurs en PDMS des vins expérimentaux sont d'ailleurs souvent plus faibles que celles observées dans les vins commerciaux. Ainsi, le PDMS du vin n'est pas proportionnel au PDMS du raisin. Ces observations associées à celles

réalisées sur Grenache et Syrah ouvrent un vaste champ d'investigations appliquées et fondamentales, sur l'origine et le devenir du PDMS.

Avant tout, l'identification formelle de la SMM dans les raisins permettrait d'étudier, sur la base de travaux réalisés chez d'autres organismes végétaux ou microorganismes, son origine, son rôle et les raisons de son accumulation dans le raisin. Ce travail préliminaire faciliterait aussi l'étude de l'influence de certains paramètres culturaux et environnementaux (alimentation hydrique et azotée…) et culturaux (effeuillage, exposition des grappes…) sur son accumulation dans la baie.

La variabilité des rendements de transmission du PDMS montre l'intérêt de définir les étapes pendant lesquelles le PDMS est dégradé ou perdu. La localisation du PDMS dans la baie permettrait de plus, d'évaluer l'importance des étapes d'extraction sur sa récupération. Par ailleurs, l'étape de fermentation pourrait être à l'origine de la dégradation du PDMS et l'influence des conditions de fermentation (température, durée, qualité du moût) ainsi que le rôle de la levure sur le PDMS sont à ce jour inconnus :

- Compte tenu de la réactivité de la SMM, des pertes pourraient intervenir dans ces conditions.
- De plus, il a été démontré que la levure est capable d'assimiler la SMM par différents types de transporteurs (Du Plessis et Loubser, 1974), mais son devenir ainsi que les gènes impliqués et les paramètres (qualité du moût, conditions de fermentation) influençant leur expression, sont à ce jour inconnus. Dans ce cas, le choix de la souche de levures pourrait être un moyen de maîtriser des teneurs en PDMS des vins.

L'étude de la dégradation acido-catalysée du PDMS dans différentes conditions de température, de pH et de durée permettrait de savoir par ailleurs, dans quelle mesure on peut moduler la formation du DMS dans le temps.

Enfin, l'arôme variétal du raisin est constitué en grande partie de composés communs à tous les cépages. De ce fait, l'étude du PDMS dans d'autres cépages, associée aux conditions particulières de vinification permettrait d'évaluer l'intérêt que pourrait présenter le DMS pour d'autres vins.

V.5. Conclusion sur le potentiel aromatique du Petit et du Gros Manseng

Ce dernier chapitre reprend les résultats obtenus sur les trois composantes variétales des raisins de Petit et Gros Manseng étudiées dans les chapitres précédents et permet de les présenter simultanément. Pour cela, les échantillons de raisins d'une parcelle de Petit Manseng sont pris en exemples.

Les baies de Petit Manseng et de Gros Manseng renferment en abondance, à la fois des précurseurs glycosidiques, du P3MH et du PDMS, qui constituent un potentiel aromatique riche et varié. L'étude de l'évolution de ce potentiel au travers des échantillons du dispositif expérimental montre clairement que l'accumulation de chacune de ces familles de précurseurs ne dépend pas systématiquement des mêmes facteurs (cépage, millésime, site et maturité). Le Tableau 26 rassemble les résultats des analyses de variance des 44 échantillons analysés pour les 3 familles de précurseurs, et permet pour chacune d'elles, de hiérarchiser l'importance relative des facteurs étudiés.

Tableau 26 : Analyses de variance des effets millésime, cépage, site et maturité sur les teneurs en glycosides, P3MH et PDMS des échantillons de raisins de Petit et de Gros Manseng (ANOVA selon le modèle 4 facteurs ; [a] données des millésimes 2002, 2003 et 2004 ;[b] données des millésimes 2003 et 2004 ; Probabilité associée à un effet :*P<0,5 ; ****P<0,001).

	Millésime	Cépage	Site	Maturité
Glycosides[a]	****	0,58	****	*
P3MH[b]	0,23	****	0,32	0,14
PDMS[b]	*	****	*	****

Le premier constat est la différence de potentiel aromatique entre le Gros Manseng et le Petit Manseng. Ce dernier présente des teneurs en PDMS et P3MH significativement supérieures à celles du Gros Manseng, et ces différences ne sont pas seulement dues à la taille de leurs baies. De plus, si les teneurs totales en glycosides ne différencient pas les cépages, la répartition selon les cinq classes chimiques d'aglycones, étudiées précédemment (cf. chapitre V.2.2.2), montre que les teneurs en terpènes sont deux fois supérieures dans les baies de Petit Manseng. Par ailleurs, le potentiel en DMS (PDMS) est la composante la plus variable du potentiel aromatique, puisque les quatre facteurs étudiés sont sources de différences toujours significatives, mais c'est la maturité qui contribue le plus à la variabilité. Quant aux teneurs en P3MH, les différences sont seulement significatives entre les cépages.

Ainsi, les composantes du potentiel aromatique sont différentes pour ces deux cépages et chacune d'elles varie différemment selon le millésime, le site et la maturité. A titre

d'exemple, la représentation simultanée des évolutions au cours de la maturité, des glycosides, du P3MH et du PDMS pour la parcelle de Petit Manseng du site T (TP ; Figure 75), illustre l'indépendance de chacune de ces composantes du potentiel aromatique. Ce constat est valable pour la majorité des parcelles étudiées (cf. Annexe 14 et Annexe 15). En effet, en 2003, seul le potentiel glycosidique diminue au cours de la maturité, alors que le PDMS et le P3MH atteignent leur optimum en 3ème date. En 2004, seul le PDMS augmente comme en 2003 au cours de la maturité, alors que l'évolution des glycosides et du P3MH est contraire à celle de 2003. De plus, l'évolution de ces 3 composantes ne peut pas être estimée par les paramètres classiques de suivi de la maturité (sucres et acidité totale ; Figure 75).

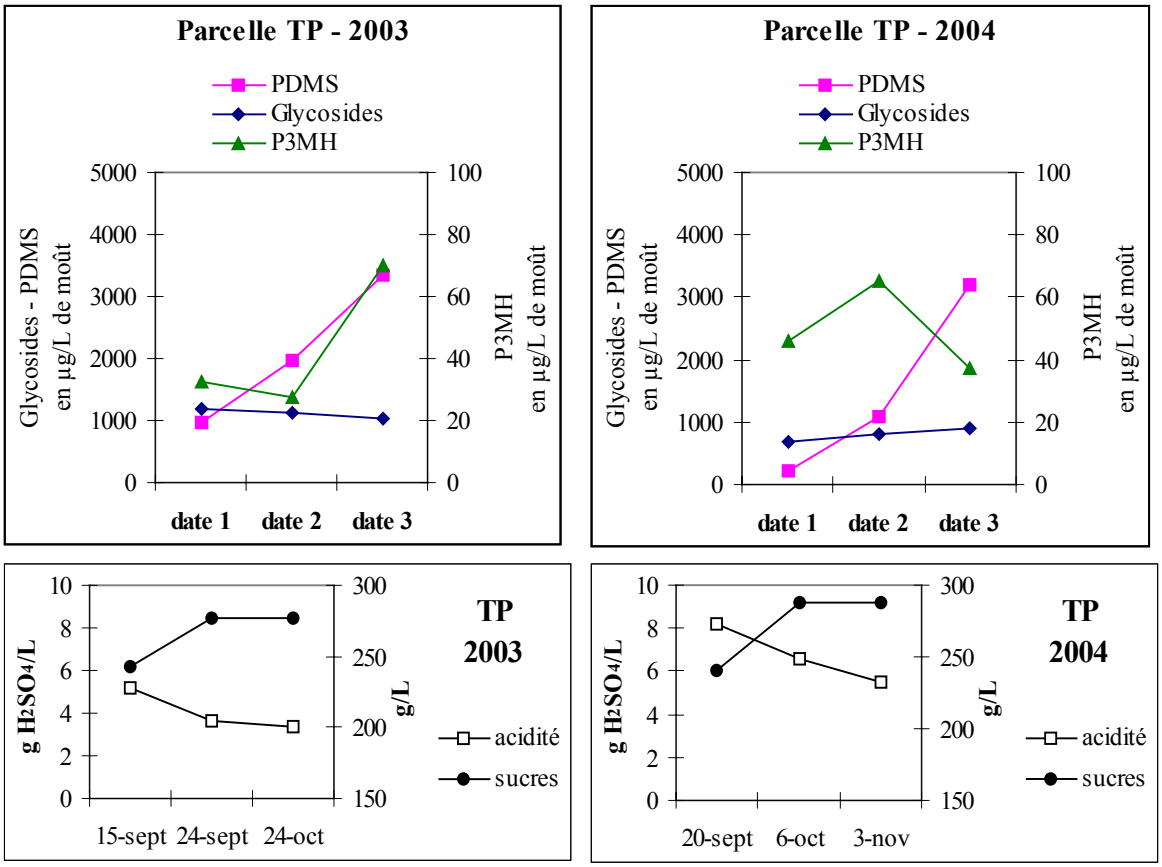


Figure 75 : Evolution des paramètres de suivi de la maturité, des teneurs totales en glycosides, en P3MH et en PDMS au cours de la maturation des raisins de Petit Manseng du site T, en 2003 et 2004.

L'optimum du potentiel aromatique peut être déterminé comme le compromis entre ces 3 composantes ou en fonction d'une seule d'entre elles, selon le type de produit recherché. Cependant, si les paramètres culturaux, plus particulièrement la date de récolte, peuvent être raisonnés pour orienter le potentiel aromatique, dans nos conditions expérimentales, les teneurs en précurseurs (P3MH, PDMS) observées dans les raisins ne sont pas proportionnelles aux teneurs en précurseurs (PDMS) ou en composés odorants des vins (3MH et ac3MH).

D'une manière générale, les étapes du procédé de vinification semblent gommer les différences entre les échantillons. Ainsi, alors que les raisins de Petit Manseng sont plus riches en PDMS et P3MH que ceux de Gros Manseng, les vins des deux cépages présentent des teneurs voisines en PDMS et en thiols volatils. Ceci montre que les conditions de vinification expérimentales ne permettent pas d'exprimer les différences variétales de ces deux cépages. Il apparaît donc déterminant pour la valorisation du potentiel et la maîtrise de l'arôme, d'identifier les étapes de la vinification limitant le transfert et la transformation du potentiel aromatique.

VI. Conclusion générale

Les objectifs de ce travail étaient de caractériser le potentiel aromatique du Petit et du Gros Manseng, et d'étudier la relation entre le potentiel dans le raisin et les composés d'arôme du vin. Cette étude nécessitait au préalable de disposer d'outils d'analyses fines, dont certains ont été développés dans ce travail.

Dans ce but, deux voies de synthèse ont été adaptées à la synthèse des S-conjugués à la cystéine du raisin et à celle de leurs analogues deutérés. Disposant de ces produits purs, nous avons déterminé les conditions de dérivatisation à l'éthylchloroformate, les conditions de purification des moûts sur résine cationique et les conditions d'analyse en CPG-IE-SM en mode SIM, de façon à obtenir une sensibilité suffisante pour le dosage des précurseurs dans le moût. Ainsi, ce travail de mise au point permet de disposer d'une méthode fiable et précise, de dosage direct par dilution isotopique des S-conjugués à la cystéine du raisin, qui pourra être utilisée:

- pour étudier les mécanismes de formation du P3MH dans le raisin et de transformation au cours du procédé de vinification. L'adaptation des conditions de détection permettra de rechercher d'éventuels intermédiaires impliqués dans la formation des thiols.

- pour doser le P3MH et le P4MMP dans des moûts de différents cépages

Par ailleurs, le deuxième travail de développement a permis la mise au point d'une nouvelle voie de synthèse du sotolon marqué par isotope stable, grâce à l'étude du sotolon en milieu acido-basique. Cette voie, peu coûteuse et facile à mettre en œuvre, conduit à son analogue deutéré à partir du sotolon commercial. Ainsi, disposant d'un étalon interne isotopiquement stable, une méthode d'analyse a été développée, permettant de doser le sotolon dans les vins par dilution isotopique.

Disposant des outils analytiques adaptés, nous avons étudié dans les échantillons de raisins et de vins de Petit et Gros Manseng, trois composantes variétales, dont l'intérêt est connu pour l'arôme des vins d'autres cépages : les précurseurs glycosidiques, le P3MH et le PDMS. Globalement, cette étude révèle un potentiel aromatique particulièrement riche et varié, dont l'importance des trois composantes étudiées (glycosides, P3MH et PDMS) diffère entre ces deux cépages. Leur étude simultanée dans tous les échantillons de raisins montre qu'elles ne sont pas influencées par les mêmes paramètres étudiés et qu'elles sont indépendantes les unes des autres.

Les précurseurs glycosidiques

Les raisins de Petit et Gros Manseng présentent des teneurs totales en glycosides proches et dominées par les classes des C_{13}-norisoprénoïdes et des monoterpénols. Néanmoins, la répartition de ces deux classes chimiques permet de différencier les deux cépages. Par ailleurs, la variabilité du potentiel glycosidique, essentiellement apportée par le millésime et le site de plantation, montre l'importance de la nature du sol et des conditions climatiques sur cette composante variétale du raisin.

L'expression de ce potentiel est complexe et dans notre cas près de soixante composés susceptibles d'être libérés dans le vin ont été identifiés. L'évaluation de leur contribution sensorielle implique la mise en place d'une analyse sensorielle discriminante. Toutefois, les essais préliminaires montrent que l'enrichissement d'un vin en glycosides influence significativement la perception de son arôme. Ainsi, le potentiel glycosidique peut contribuer à la complexité des vins de Manseng et dans une optique d'élaboration de vins de garde, toutes les pratiques culturales favorables à son accumulation pourront être envisagées. De plus, grâce au développement récent de méthodes rapides de dosage des précurseurs glycosidiques, le choix des parcelles et la détermination de la date de récolte peuvent être raisonnés en fonction de ce potentiel.

Les S-conjugués à la cystéine

Le P4MMP n'ayant pas été détecté dans nos échantillons de raisins, seul le P3MH a été étudié. Les teneurs en P3MH des raisins de Petit Manseng sont deux fois supérieures à celles trouvées dans les raisins de Gros Manseng, mettant en évidence une différence variétale supplémentaire entre ces deux cépages. En revanche, à partir de notre échantillonnage, l'influence du millésime, du site et de la maturité, n'est pas significative. De plus, l'évolution des teneurs en P3MH au cours de la maturité est extrêmement variable d'un échantillon à l'autre. Ainsi, d'après les connaissances actuelles, il apparaît peu intéressant de raisonner la date de récolte en fonction de cette composante, car les teneurs en 3MH et ac3MH retrouvées dans les vins correspondants sont indépendantes du potentiel du raisin.

Toutefois, la contribution du 3MH et de son acétate à l'arôme des vins de Petit et Gros Manseng apparaît évidente, compte tenu des concentrations systématiquement et largement au-dessus de leurs seuils de perception olfactive. Ainsi, les thiols peuvent contribuer par leurs notes fruitées caractéristiques, à l'arôme de vins secs ou de vins doux destinés à une consommation rapide. Mais, ils présentent peu d'intérêt pour l'arôme des vins de garde.

L'ensemble de ces observations confirme l'intérêt des thiols pour l'arôme de ces vins, mais souligne également le manque de connaissances sur l'origine et le devenir de ce potentiel. La maîtrise de cette composante variétale de l'arôme implique d'approfondir les connaissances actuelles :

- L'étude des gènes associés à la dégradation enzymatique des précurseurs de thiols, ainsi que l'influence des conditions de fermentation sur leur expression constituent un champ d'investigation de premier intérêt compte-tenu des faibles rendements de libération observés et doivent être poursuivies.

- La détermination de l'importance relative des différentes voies de formation mises en évidence jusqu'à présent nécessite, d'une part l'étude des filiations et de la biogenèse des deux types de précurseurs du 3MH identifiés, le P3MH et le PP3MH, et d'autre part la détermination des mécanismes et des intermédiaires de formation du 3MH à partir de l'(*E*)-2-hexénal ou d'autres composés α,β-insaturés.

Le potentiel en DMS

Le PDMS est la seule composante variétale dont les variations sont significatives pour les quatre facteurs étudiés : millésime, cépage, site et maturité. En effet, le PDMS renforce la différence variétale entre le Gros et le Petit Manseng. De plus, l'augmentation du PDMS au cours de la maturation du raisin est systématique et peut être considérable. Ces observations associées aux teneurs en DMS des vins analysés montrent combien cette composante variétale peut être importante pour l'arôme des vins de Petit et Gros Manseng, et particulièrement pour l'élaboration de vins moelleux à partir de raisins sur-mûris.

Le DMS est considéré comme un arôme de vieillissement et sa révélation au cours de la conservation serait favorable à l'arôme de vins de garde. Cependant, les concentrations relevées dans certains vins jeunes montrent qu'il pourrait également intervenir très tôt sur l'arôme des vins. Le rôle du DMS sur l'arôme du vin est décrit comme très complexe et il apparaît nécessaire d'étudier précisément les notes odorantes qu'il apporte aux vins de Petit et Gros Manseng en fonction de sa concentration et de la matrice (vin secs et moelleux). Sa contribution pourrait à la fois s'ajouter à celle des thiols dans les vins secs et à celle des aglycones libérées à partir des glycosides dans les vins de garde.

Cependant, les faibles rendements de transmission et l'absence de corrélation entre le PDMS des raisins et le PDMS des vins expérimentaux, montre la nécessité d'étudier l'origine et le devenir du PDMS :

- La localisation du PDMS dans la baie permettrait d'évaluer l'importance des étapes d'extraction sur sa récupération.

- Le suivi du PDMS au cours des étapes du procédé de vinification permettrait de repérer les étapes responsables des pertes en PDMS.

- L'étude de la dégradation acido-catalysée du PDMS dans différentes conditions de température, de pH et de durée permettrait de déterminer dans quelle mesure la formation du DMS dans le vin peut être modulée au cours de la conservation.

Par ailleurs, l'identification formelle de la SMM comme précurseur du DMS apparaît essentielle pour la poursuite d'une étude fondamentale.

- L'origine et le rôle de la SMM dans le raisin, ainsi que l'influence de certains paramètres culturaux sur l'accumulation ne sont pas connus chez *Vitis vinifera* et pourront être étudiés.

- La levure dispose des transporteurs de la SMM, mais l'assimilation de ce composé en conditions oenologiques n'a jamais été décrite. Dans ce cas, l'influence des conditions de fermentation et les gènes de la levure impliqués dans l'assimilation de la SMM devront être étudiés.

Références bibliographiques

Acree T. E., Barnard J. et Cunnigham D. G. (1984). A procedure for sensory analysis of chromatographic effluents. *Food Chemistry*. ***14***, 273-286.

Allen M. S., Lacey M. J. et Boyd S. (1994). Determination of methoxypyrazine in red wine by stable isotope dilution gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***42***, 1734-1738.

Anderson R. J., Clapperton J. F., Crabb D. et Hudson J. R. (1975). Dimethyl sulfide as a feature of lager flavor. *Journal of Institute of Brewing*. ***81***, 208-213.

Anness B. J. et Bamforth C. W. (1982). Dimethyl sulphide - a review. *Journal of Institute of Brewing*. ***88***, 244-252.

Anocibar Beloqui A. (1998). Les composés soufrés volatils des vins rouges. *Thèse de doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux II*. 169 pages.

Anocibar Beloqui A. et Bertrand A. (1995). Study on sulfur compounds in wine: preliminary results. *Italian Journal of Food Sciences*. ***3***, 279-289.

Anocibar Beloqui A., Kotseridis Y. et Bertrand A. (1996). Détermination de la teneur en sulphure de diméthyle dans quelques vins rouges. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. ***30***, 167-170.

Arnold L. D., Drover J. C. G. et Vederas J. C. (1987). Conversion of serine β-lactones to chiral α-amino acids by copper-containing organolthium and organomagnesium reagents. *Journal of American Chemical Society*. ***109***, 4649-4659.

Arnold L. D., Kalantar T. H. et Vederas J. C. (1985). Conversion of serine to stereochemically pure β-substuted α-amino acids via β-lactone. *Journal of American Chemical Society*. ***107***, 7105-7109.

Arnold L. D., May R. G. et Vederas J. C. (1988). Synthesis of pure α-amino acids via salts of α-amino-β-propiolactone. *Journal of American Chemical Society*. ***110***, 2237-2241.

Arthur C. L. et Pawliszyn J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. ***62***, 2145-2148.

Aubry V., Etiévant P. X., Giniès C. et Henry R. (1997). Quantitative determination of potent flavor compounds in Burgundy Pinot noir wines using stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***45***, 2120-2123.

Ayrapaa T. (1971). On the formation of higher alcohols by yeast and its dependence on nitrogenous nutrients. *Kem. Tidskr*. ***83***, 79-90.

Baldwin J. E., Spivey A. C., Schofield C. J. et Sweeney J. B. (1993). Amino acid synthesis *via* ring oepning of N-sulfonyl aziridine-2-carboxylate esters with organometallic reagents. *Tetrahedron*. ***49***, 6309-6330.

Bamforth C. W. et Anness B. J. (1981). The role of dimethyl sulphoxide reductase in the formation of dimethyl sulphide during fermentation. *Journal of Institute of Brewing*. ***87***, 30-34.

Baumes R., Aubert C., Günata Y. Z., De Moor W., Bayonove C. et Tapiero C. (1994). Structures of two glycosidic C13-norisoprenoids precursors of wine flavor. *Journal of Essential Oil Research*. ***6***, 587-599.

Baumes R., Wirth J., Bureau S., Günata Z. et Razungles A. (2002). Biogeneration of C_{13}-norisoprenoïd compounds: Experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapewines. *Analytica Chimica Acta*. ***458***, 3-14.

Belancic Majcenovic A., Schneider R., Lepoutre J. P., Lempereur V. et Baumes R. (2002). Synthesis of stable isotope dilution assay of ethanethiol and diethylsulphide in wine using solid phase microextraction. Effect of aging on their levels in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***50***, 6653-6658.

Bezzubov A. A. et Gessler N. N. (1992). Plant sources of S-methylmethionine. *Applied Biochemistry and Microbiology*. ***28***, 317-322.

Blanchard L., Darriet P. et Dubourdieu D. (2004). Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***55***, 115-120.

Blanchard L., Tominaga T. et Dubourdieu D. (2001). Formation of furfurylthiol exhibiting a strong coffee aroma during oak barrel fermentation from furfural released by toasted staves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***49***, 4833-4835.

Blank I., Fay L. B., Lakner F. J. et Sclosser M. (1997). Determination of 2(or 5)-ethyl-4-hydroxy-5(or 2)-méthyl-3(2H)-furanone in pentose sugar-based-Maillard model systems by isotope dilution assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***45***, 2642-2648.

Blank I., Fumeaux R., Welti D. H. et Laurent B. F. (1996). Formation of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (sotolon) from 4-hydroxyisoleucine an 3-amino-4,5-diméthyl-3,4-dihydrofuranone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***44***, 1851-1856.

Blank I. et Schieberle P. (1993). Analysis of the seasonning-like flavour substances of a commercial lovage extract (*levisticum officinale koch.*). *Flavour and Fragrance Journal*. ***8***, 191-195.

Blank I., Schieberle P. et Grosch W. (1993). Quantification of the flavour 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone and 5-éthyl-3-hydroxy-4-methyl-(5H)-furanone by stable isotope dilution assay. In: *Progress in Flavour Precursor Studies*, 103-109. A. Publication. Wheaton, Schreier P. and Winterhalter P., Eds.

Blank I., Sen A. et Grosch W. (1992). Potent odorants of the roasted powder and brew of arabica coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*. ***195***, 239-245.

Bouchilloux P., Darriet P., Henry R., Lavigne-Cruège V. et Dubourdieu D. (1998). Identification of volatile and powerfull odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***46***, 3095-3099.

Bourgis S., Roje M. L., Nuccio D. B., Fisher M. C., Tarczynski C., Li C., Herschbach H., Rennenberg M. J., Pimenta T. L., Shen D. A., GAGE D. A. et Hanson A. D. (1999). S-methylmethionine plays a major role in phloem transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell*. ***11***, 1485-1498.

Buettner A., Mestres M., Fischer A., Guasch J. et Schieberle P. (2003). Evaluation of the most odour-active compounds in the peel oil of clementines (*Citrus reticulata blanco* cv. clementine). *European Food Research and Technology*. ***216***, 11-14.

Buettner A. et Schieberle P. (1999). Characterisation of the most odour-active volatiles in fresh, hand-squeezedjuice of grapefruit (*Citrus paradisi Macfayden*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***47***, 5189-5193.

Buettner A. et Schieberle P. (2001). Evaluation of key aroma compounds in hand-sqeezedjuice grapefruit juice (*Citrus paradisi Macfayden*) by quantification and flavor reconstitution experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***49***, 1358-1363.

Bureau S., Baumes R. et Razungles A. (2000). Effect of vine or bunch shading on the glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis vinifera L.* cv. Syrah. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 1290-1297.

Buttery R., Seifert R., Guadagni G. et Ling L. (1971). Characterization of additional volatile components of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***19***, 524-529.

Carbonell M., Nunez M. et Fernandez-Garcia E. (2002). Seasonal variation of volatile compounds in ewe raw milk La Serena cheese. *Le Lait*. ***82***, 699-711.

Charles-Bernard M., Robertn D. D. et Kraehenbuehl K. (2005). Interaction between volatile and non volatile coffee components. 2 mecanistic studies focused on volatile thiols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***53***, 4426-4433.

Chatonnet P., Boidron J. N. et Pons M. (1990). Elevage de vins rouges en fûts de chêne: Evolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sciences des Aliments*. ***10***, 565-587.

Chatonnet P., Dubourdieu, D. & Boidron, J. N. (1995). The influence of *Brettanomyces dekkera sp*. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***46***, 463-468.

Chatonnet P., Lavigne V., Boidron J. N. et Dubois P. (1992). Identification de sulfures volatils lourds dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *Sciences des Aliments*. ***12***, 513-532.

Chin H., Bernhard R. et Rosenberg M. (1996). SPME for cheese volatile compounds analysis. *Journal of Food Sciences*. ***61***, 1118-1129.

Consuelo Diaz-Maroto S., Schneider R. et Baumes R. (2005). Formation of pathways of ethyl esters of branched short-chain fatty acids during wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***53***, 3503-3509.

Cordonnier R. et Bayonove C. (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes de fruits. ***278***, 3387-3390.

Cordonnier R. et Bayonove C. (1981). Etude de la phase préfermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arôme; cas des terpènols, des aldéhydes et des alcools en C_6. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. ***4***, 268-286.

Crouzet J. et Seck S. (1982). L'arôme de la tomate, mécanisme de formation des constituants par voies biochimiques et chimiques. *Parfums Cosmétiques et Arômes*. ***44***, 71-84.

Cutzach I., Chatonnet P. et Dubourdieu D. (1998a). Etude de l'arôme des Vins Doux Naturels non muscatés. 1ère partie: analyse qualitative de l'arôme des Banyuls et Rivesaltes au cours de leur vieillissement. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. ***32***, 99-110.

Cutzach I., Chatonnet P. et Dubourdieu D. (1998b). Rôle du sotolon dans l'arôme des Vins Doux Naturels. Influence des conditions d'élevage et de vieillissement. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. ***32***, 223-233.

Cutzach I., Chatonnet P., Henry R., Pons M. et Dubourdieu D. (1998c). Etude de l'arôme des Vins Doux Naturels non muscatés. 2ème partie: dosage de certains composés volatils intervenant dans l'arôme des Vins doux Naturels au cours de leur vieillissement. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. ***32***, 211-221.

Dagan L., Schneider R., Lepoutre J. P. et Baumes R. (2006). Stability of sotolon in acidic and basic aqueous solutions. Application to the synthesis of a deuterated analogue for it quantitative determination in wine. *Analytica Chimica Acta*. 365-374.

Darriet P. (1993). Recherche sur larôme t les précurseurs d'arôme du Sauvignon. *Thèse de Doctorat, Université Victor Ségalen Bordeaux II*. pages.

Darriet P., Tominaga, Demole E. et Dubourdieu D. (1993). Mise en évidence dans le raisin d'un précurseur de la 4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one. ***316***, 1332-1335.

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

De La Presa-Owens C. et Noble A. C. (1997). Effect of storage at elevated temperatures on aroma of Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***48***, 310-316.

De Mora S. J., Eschenbruch R., Knowles S. J. et Spedding D. J. (1986). The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast. *Food Microbiology*. ***3***, 27-32.

De Mora S. J., Knowles S. J., Eschenbruch R. et Torrey W. J. (1987). Dimethyl sulphide in some Australian red wines. *Vitis*. ***26***, 79-84.

De Mora S. J., Lee P., Shooter D. et Eschenbruch R. (1993). The analysis and importance of dimethylsulfoxide in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***44***, 327-332.

Diaz P., Ibanez E., Senorans F. J. et Reglero G. (2003). Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. ***1017***, 207-214.

Dickenson C. J. (1979). Identification of the dimethyl sulphure precursor in malt. *Journal of Institute of Brewing*. ***85***, 329-333.

Doner L. W., Becard G. et Irwin P. L. (1993). Bindings of flavonoïds by polyvinylppyrolidinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***41***, 753-757.

Drawert F., Lessing V. et Leupold G. (1976). Gruppentrennung von organischen Säuren, Kohlenhydraten und Aminosäuren mit Loneaustauschern und quantitative gas-chromatographische Bestimmung der Einzelsubstanzen. *Chromatographia*. ***9***, 373-379.

Du Plessis C. S. et Augustyn O. P. H. (1981). Initial study on the guava aroma of Chenin blanc and Colombard wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*. ***2***, 101-103.

Du Plessis C. S. et Loubser G. J. (1974). The bouquet of late harvest wine. *Agrochemophysica*. ***6***, 49-52.

Dubois P. (1994). Les arômes du vin et leurs défauts. *Revue Française d'Oenologie*. ***145***, 27-50.

Dubois P., Rigaud J. et Dekimpe J. (1976). Identification de la diméthyl-4,5-tetrahydrofuranedione-2,3 dans le vin jaune du Jura. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. ***9***, 366-368.

Dugelay I., Baumes R., Gunata Z., Razungles A. et Bayonove C. (1995). *Sciences des Aliments*. ***15***, 423.

Engel K. H. et Tressl R. (1991). Identification of a new sulfur containing volatiles in yellow passion fruits (*Passiflora edulif. flavicarpa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***39***, 2249-2252.

Enzell C. (1981). Influence of curing on the formation of tobacco flavour. In: *Flavour'81*, 447-478. P. Schreier. Berlin, NY Pu, W. de Gruyter & Co.

Enzell C. (1985). Biodegradation of carotenoids - an important route to aroma compounds. *Pure Applied Chemistry*. ***57***, 693-700.

Escudero A., Asencio E., Cacho J. et Ferreira V. (2002). 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*. *77*, 325-331.

Escudero A., Cacho J. et Ferreira V. (2000). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation : a gas chromatography-olfactometry study. *European Food Research and Technology*. ***211***, 105-111.

Esterbauer H., Ertl A. et Scholz N. (1976). The réaction of cystein with α,β-unsaturated aldehydes. *Tetrahedron*. ***32***, 285-285.

Etiévant P. (1981). Volatile phenol determination in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***29***, 65-67.

Etievant P., Callement G., Langlois D., Issanchou S. N. et Coquibus N. (1999). Odor-intensity evaluation in gas chromatography-olfactometry by Finger-span method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***47***, 1673-1680.

Etiévant P. X. (1991). Wine. In: *Volatile compounds in food and beverages*, 19-33. H. Maarse. New york, Basel, Honk-Hong, Dekker Inc.

Etiévant P. X., Issanchou S. N., Marie S., Ducruet V. et Flanzy C. (1989). Sensory impact of volatile phenols on red wine aroma: influence of carbonic maceration and time of storage. *Sciences des Aliments*. ***9***, 19-33.

Ferreira V., Escudero A. et Cacho J. (2000). Flavours and aromas formed during oxidative storage of wines : clues about their formation and some technological consequences. *Italian Food Beverage Technology*. ***22***, 19-24.

Ferreira V., Fernandez P., Pena C., Escudero A. et Cacho J. F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ***67***, 381-392.

Ferreira V., Jarauta I., Lopez R. et Cacho J. (2003). Quantitative determination of sotolon, maltol and free furaneol in wine by solid-phase extraction and gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. ***1010***, 95-103.

Ferreira V., Lopez R., Escudero A. et Cacho J. (1998). The aroma of Grenache red wine: Hierarchy and nature of its main odorants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. *77*, 259-267.

Francis I. L., Sefton M. A. et Williams P. J. (1992). Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolysed precursor fractions from Semillon, Chardonnay and Sauvignon blanc grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ***59***, 511-520.

Francis I. L., Sefton M. A. et Williams P. J. (1994). The sensory effect of pre or post fermentation thermal processing on Chardonnay and Semillon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***45***, 243-251.

Francis I. L., Tate M. E. et Williams P. J. (1996). The effect of hydrolysis conditions on the aroma released from Semillon grape glycosides. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. ***2***, 70-76.

Fretz C., Känel S., Luisier J. L. et Amado R. (2005). Analysis of volatile components of Petite Arvine wine. *European Food Research and Technology*. ***221***, 3-4.

Full G. et Schreier P. (1994). Kovalente Chromatographie: Ein wertvolles Hilfsmittel für die Aromastoffanalysis von Thiolen im Spurenbereich. *Lebensemittelchemie*. ***48***, 1-4.

Gholami M., Hayasaka Y., Coombe B. G., Jackson J. F., Robinson S. P. et Williams P. J. (1995). Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. ***1***, 19-24.

Girardon P., Sauvaire Y., Baccou J. C. et Bessière J. M. (1986). Identification de la 3-hydroxy-4,5-diméthyl-2(5H)-furanone dans l'arôme des graines de Fenugrec (*Trigonella foenum graecum* L.). *Lebensemittel Wissenchaft und Technologie*. ***19***, 44-46.

Golaszwewski R., Sims C. A., O'Keefe S. F., Braddock R. J. et Littel R. C. (1998). Sensory attribute and volatile components, of stored strawberry juice. *Journal of Food Sciences*. ***63***, 734-738.

Gomez E., Martinez A. et Laencina J. (1994). Localization and bound aromatic compounds among skin, juice and pulp fractions of some grape varieties. *Vitis*. ***33***, 1-4.

Goto S. et Takamuto R. (1987). Concentration of dimethyl sulfide in wine after different storage times. *Hakkokogaku*. ***65***, 53-57.

Grosch W. (2001). Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*. ***26***, 533-545.

Guesdes de Pinho P. et Bertrand A. (1995). Analytical determination of furaneol (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone). Application to differenciation of white wines from hybrids and various *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***46***, 181-196.

Guichard E., Etievant P., Henry R. et Mosandl A. (1992). Enantiomeric ratio of pantolactone, solerone, 4-carboethoxy-4-hydroxy-butyrolactone and of sotolon, a flavour impact compound of flor-sherry and botrytised wines. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*. ***195***, 540-544.

Günata Z., Bayonove C., Baumes R. et Cordonnier R. (1985a). Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during the wine processing: preliminary result. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***37***, 112-114.

Günata Z., Bayonove C. et Cordonnier R. (1985b). The aroma of grape. Extraction and détermination of free glycosidicaly bounds fraction of some grape aroma components. *Journal of Chromatography*. ***9***, 857-862.

Günata Z., Blondeel C., Bayonove C., Lepoutre J. P. et Watanabe N. (1998). An endoglycosodase from grape berry skin cv. M. Alexandria hydrolising potentially aromatic disaccharide glycoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***46***, 2748-2753.

Güth H. (1997a). Identification of caracter impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***45***, 3022-3026.

Güth H. (1997b). Quantification and sensory studies of character odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***45***, 3027-3032.

Güth H. et Grosch W. (1990). Deterioration of soya-bean oil: quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensemittel Wissenschaft und Technologie*. ***23***, 513-522.

Güth H. et Grosch W. (1994). Identification of the caracter impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***42***, 2862-2866.

Hayashi T., Sano K. et Ohsumi K. (1993). Gas chromatographic analysis of alliin in th callus tissues of *Allium sativum*. *Biosciences Biotechnology Biochemistry*. ***57***, 162-163.

Heresztyn T. (1986). Metabolism of phenolic compounds from hydroxycinnamic acid by *Brettanomyces* yeasts. *Archives of Microbiology*. ***146***, 96-98.

Hofmann T. et Schieberle P. (1996). Studies on intermediates generating the flavour compounds 2-méthyl-3-furanethiol, 2-acthyl-2-thiazoline and sotolon by Maillard-Type reaction. In: *Flavour Science-Recent Developments*, 182-187. T. R. S. o. Chemistry. London,

Homatidou V., Karvouni S., Dourtoglou V. et Poulos C. (1992). Determination of total volatile components of *Cucumis melo* L. variety Cantaloupensis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***40***, 1385-1388.

Howell K. S., Swiegers J. H., Elsey G. M., Siebert T. E., Bartowsky E. J., Fleet G. H. et Pretorius I. S. (2004). Variation in 4-mercapto-4-methylpentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Micobiology Letters*. ***240***, 125-129.

Husek P. (1991). Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography*. ***552***, 289.

Huyng-Ba T., Matthey-Doret W., Fay L. B. et Rhlid R. B. (2003). Generation of thiols by biotransformation of cystein-aldehyde conjugates with baker yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 3629-3635.

Jensen M., Lidehoj Hansen L. et Andersen H. (2002). Transfert of the meat aroma precursors (dimethyl sulphide, dimethyl disulfide, trimethyl trisulfide) from feed to cooked pork. *Lebensemittel Wissenschaft und Technologie*. ***35***, 485-489.

Karsten U., Kück K., Vogt C. et Kirst G. O. (1996). Physiological aspects of the production of diméthylsulfoniopropionate (DMSP) by marine phytoplankton. In: *Biological and environnemental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds*, 143-153. P. P. Kiene, P. T. Visscher, M. D. Keller and G. O. Kirst. New York, Plenum Press.

König B., Gutsche M., Hartl M., Hübscher R., Schreier P. et Schwab W. (1999). 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (sotolon) causing an off-flavor: elucidation of its formation pathways during storage of citrus soft drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***47***, 3288-3291.

Kotseridis Y. (1999). Etude de l'arôme des vins de Merlot et Cabernet Sauvignon de la région bordelaise. *Thèse de Doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux II*. 268 pages.

Kotseridis Y. et Baumes R. (2000). Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juices, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 400-406.

Kotseridis Y., Baumes R., Bertrand A. et Skouroumounis G. K. (1999a). Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable dilution assay. *Journal of Chromatography A*. ***841***, 229-237.

Kotseridis Y., Baumes R. et Skouroumounis G. K. (1998). Synthesis of labelled [$^2H_4$]-β-damascenone, [$^2H_2$]-2-methoxy-3-isobutylpyrazine, [$^2H_2$]-α-ionone, and [$^2H_3$]-β-ionone, for quantification in grapes, juices and wines. *Journal of Chromatography A*. ***824***, 71-78.

Kotseridis Y., Baumes R. et Skouroumounis G. K. (1999b). Quantitative determination of free and hydrolitically liberated β-damascenone in red grapes and wines using a stable isotope dilution assay. *Journal of Chromatography A*. ***849***, 245-254.

Kotseridis Y., Ray J. L., Augier C. et Baumes R. (2000). Quantitative determination of sulfur containing wine odorants at sub-ppb levels. 1. Synthesis of the deuterated analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 5819-5823.

Kubec R., Drhova V. et Velisek J. (1998). Thermal, degradation of S-methylcysteine and its sulfoxide-important flavor precursors of brassica and allium vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***46***, 4334-4340.

Kubec R., Kim S. et Musah R. A. (2002). S-substitued cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiviera alliacea* - part II. *Phytochemistry*. ***61***, 675-680.

Kubec R. et Musah R. A. (2001). Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*. ***58***, 981-985.

Kubec R., Svobodova M. et Velisek J. (1999). Gas chromatographic determination of alk(en)ylcystein sulfoxides. *Journal of Chromatography A*. ***862***, 85-94.

Kubec R., Svobodova M. et Velisek J. (2000). Distribution of S-alkylcystein in some *Allium* Species. Identification of a new flavor precursor: S-ethylcysteinsulfoxide (ethiin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 428-433.

Lacey M. J., Allen M. S., Harris R. L. N. et Brown W. V. (1991). Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***42***, 103-108.

Latrasse A., Rigaud J. et Sarris J. (1982). L'arome du cassis (Ribes nigrum): Odeur principale et notes secondaires. *Sciences des Aliments*. ***2***, 145-162.

Lavigne V., Boidron J. N. et Dubourdieu D. (1993). Dosage des composés soufrés volatils légers dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. ***27***, 1-12.

Lee J. et Harnly J. M. (2005). Free amino acid and cystein sulfoxide composition of 11 garlic (*Allium sativum* L.) cultivars by gas chromatography with flamme ionisation and mass selective detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***53***, 9100-9104.

Lerch K. et Ambühl M. (1995). Biotechnological production of 4,5-diméthyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone. In: *Bioflavour*, 381-384. I. Editions. Paris, Etiévant, P., Schreier, P.

Lieberman S., Brazeau P. et Hariton L. B. (1948). Spiro (steroïd) thiazolidine. *Journal of American Chemical Society*. ***70***, 3094.

Lopez R., Orti N., Perez-Trujillo J. P., Cacho J. et Feirreira V. (2003). Impact odorants of different young white wines from Canary Islands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 3419-3425.

Loubser G. et Du Plessis C. S. (1976). The quantitative determination and some values of dimethyl sulfide in white table wines. *Vitis*. ***15***, 248-252.

Marais J. (1979). Effect of storage time and temperature on the formation of dimethyl sulphide and on white wine quality. *Vitis*. ***18***, 254-260.

Marais J. (1983). Terpenes in the aroma on grape and wine: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. ***4***, 49-58.

Marais J. (1987). Terpene concentration and wine quality of *Vitis vinifera* L. cv Gewürtraminer as affected by grape maturity and cellar practices. *Vitis*. ***26***, 231-245.

March J. (1985). Condensations between esters and aldehydes or ketones. In: *Advanced Organic Chemistry*, 835. T. Edition. New York,

Marchand S., De Revel G. et Bertrand A. (2000). Approaches to wine aroma: Release of aroma compounds from reactions between cystein and carbonyl compounds in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 4890-4895.

Martin B., Etievant P. et Henry R. (1990). The chemistry of sotolon : a key parameter for the study of a key component of flor sherry wines. In: *Flavour Sciences and Technology*, 53-56. Y. Bessière. Chichester, Wiley.

Martin B., Etievant P., Le Quere J. L. et Schlich P. (1992). More clues about sensory impact of sotolon in some flor sherry wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***40***, 475-478.

Masuda M., Okawa E., Nishimura K. et Yunome H. (1984). Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone (Sotolon) and ethyl-9-hydroxynonanoate in botrytised wines and evaluation of the roles of compounds caracteristic of it. *Agricultural and Biological Chemistry*. ***48***, 2707-2710.

Mathieu S., Terrier N., Procureur J., Bigey F. et Günata Z. (2005). A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L. : functional characterization and expression during grape berry development in relation to C_{13}-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany*. ***56***, 2721-2731.

Matsukara M., Takahashi K., Kawamoto M., Ishiguro S. et Matsushita H. (1985). Identification 3-hydroxy-4,5-dimethyl-(5H)-furanone (sotolon) in roates tobacco volatile. *Agricultural and Biological Chemistry*. ***48***, 3335-3337.

Mayerl F., Naef R. et Thomas A. (1989). 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucosides: isolation from strawberries and synthesis. *Phytochemistry*. ***28***, 631-633.

Mazza G., Di Tommaso D. et Foti S. (2002). Volatile constituents of Sicilian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds. *Sciences des Aliments*. ***22***, 249-264.

Mc Mahon H. M., Zoecklein B. W. et Jasinski. (1999). The effect of prefermentation maceration temperature and percent alcohol (v/v) at press on the concentration of Cabernet Sauvignon grape glycosides and glycosides fraction. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***50***, 385-390.

Mestres M., Busto O. et Guasch J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A*. ***881***, 569-581.

Mestres M., Marti M. P., Busto O. et Guasch J. (1999a). Simultaneous analysis of thiols, sulphides and disulphides in wine aroma by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. ***849***, 293-297.

Mestres M., Sala C., Marti M. P., Busto O. et Guasch J. (1999b). Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma. *Journal of Chromatography A*. ***835***, 137-144.

Murat M. L., Masneuf I., Darriet P., Lavigne V., Tominaga T. et Dubourdieu D. (2001a). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***52***, 136-139.

Murat M. L., Tominaga T. et Dubourdieu D. (2001b). Assessing, the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***49***, 5412-5417.

Murat M. L., Tominaga T., Saucier C., Glories Y. et Dubourdieu D. (2003). Effect of anthocyanins on stability of a key odorous compounds, 3-mercaptohexan-1-ol, in Bordeaux rose wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***54***, 135-138.

Nykänen L. (1986). Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distillated alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***37***, 84-96.

Palma M., Taylor L. T., Zoeklein B. W. et Douglas L. S. (2000). Supercritical fluid extraction of grape glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 775-779.

Park S. K., Boulton R. B., Bartra E. et Noble A. C. (1994). Incidence of volatile sulfur compounds in California wines. A preliminary survey. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***45***, 342-344.

Park S. K., Morrison J. C., Adams D. O. et Noble A. C. (1991). Distribution of free and glycosidicaly bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***39***, 514-518.

Pearce T. J. P., Peacok J. M., Aylward F. et Haisman D. R. (1967). Catty odors in food: reaction between hydrogen sulphide and unsaturated ketone. *Chem. Ind.*, 1562-1563.

Pedersen D. S., Capone D. L., Skouroumounis G. K., Pollnitz A. P. et Sefton M. A. (2003). Quantitative analysis of geraniol, linalol and α-terpineol in wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. ***375***, 517-522.

Pérès C., Viallon C. et Berdagué J. L. (2001). Solid-phase microextraction - mass spectrometry: A new approach to the rapid characterization of cheeses. *Analytical Chemistry*. ***73***, 1030-1036.

Peyrot des Gachons C. (2000). Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Thèse de Doctorat, Univerité Bordeaux II.* 176 pages.

Peyrot des Gachons C., Tominaga T. et Dubourdieu D. (2000). Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc grapes by assaying S-cystein conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 3387-3391.

Peyrot des Gachons C., Tominaga T. et Dubourdieu D. (2002a). Localization of S-cysteine conjugates in the berry: Effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc must. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***53***, 144-146.

Peyrot des Gachons C., Tominaga T. et Dubourdieu D. (2002b). Sulfur aroma precusor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in

must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***50***, 4076-4079.

Peyrot des Gachons C., Van Leeuwen C., Tominaga T., Soyer J. P., Gaudillère J. P. et Dubourdieu D. (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc in field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ***85***, 73-85.

Pham T. T., Guichard E. et Charpentier C. (1996). Quantification of sotolon in French "Vins Jaunes" during ageing under the yeast film. *Sciences des Aliments*. ***16***, 281-287.

Piggott J. R. et Findlay A. J. F. (1984). Detection thresholds of ester mixtures. In: *Flavour research of alcoholic beverages - Instrumental and sensory analysis*, 189-197. L. Nykänen and P. Lehtonen. Helsinki, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research.

Pollien P., Ott A., Montognin F., Baumgartner M., Munoz-Box R. et Chaintreau A. (1997). Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique : screening of impact odorants and quantitative aromagrams comparisons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***45***, 2630-2637.

Pollnitz A. P., Pardon K. H. et L P. D. (1996). The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. ***2***, 184-190.

Pollnitz A. P., Pardon K. H., Sykes M. et Sefton M. A. (2004). The effect of sample preparation and gas chromatography injection techniques on the accury of measuring guaiacol, 4-methylguaiacol and other volatil oak compounds in oak extract by stable isotope dilution analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***552***.

Rapp A., Gunter M. et Almy J. (1985a). Identification and significance of several sulfur-containing compounds in wine. *Journal of Enology and Viticulture.* ***36***, 219-221.

Rapp A., Günther M. et Ullemeyer H. (1985b). Uber Veränderung der Aromastoffe während der Flaschenlagerung von Weissweinen der Rebsorten Riesling. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. ***180***, 109-116.

Rapp A. et Pretorius P. J. (1989). Foreign and undesirable flavors in wine. In: *Flavors and Off-Flavors*, 1-21. G. Charalambous. Amsterdam, Elsevier Science Publishers.

Razungles A., Günata Y. Z., Pinatel S., Baumes R. et Bayonove C. (1993). Etude quantitative de composés terpéniques, norisoprénoïdes et de leur précureurs dans diverses variétés de raisins. *Sciences des Aliments*. ***13***, 59-72.

Ren L. Y. (2001). Comparison of solvent extraction and microwave extraction for release of dimethyl sulfide from cereals and canola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***49***, 1737-1739.

Rouillon A., Surdin-Kerjan Y. et Thomas D. (1999). Transport of sulfonium compounds. *The Journal of Biological Chemistry*. ***274***, 28096-28105.

Ryan D., Watkins P., Smith J., Allen M. et Mariot P. (2005). Analysis of methoxypyrazynes in wine using headspace solid phase microextraction with isotope dilution

analysis and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Separation Science*. ***28***, 1075-1082.

Sakamoto K., Inoue A., Nakatani M., Kosuka H., Ohta, H et Osajima Y. (1996). S-methylmethionine sulfonium in fruits of citrus hybrids. *Biosciences Biotechnology Biochemistry*. ***60***, 1486-1487.

Sarry J. E. (2003). Etude biochimique et moléculaire de β-D-glucosides hydrolases de la baie de raisin (*Vitis vinifera* L.). 206 pages.

Sauvaire Y., Girardon P., Baccou J. C. et Risterucci A. M. (1984). Changes in growth, proteins, and free amino acids of developping seeds and pod of fenugreek. *Phytochemistry*. ***23***, 479-486.

Scarlata C. J. et Ebeler S. E. (1999). Headspace solid-phase microextraction for the analysis of dimethyl sulfide in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***47***, 2505-2508.

Schieberle P. et Grosch W. (1987). Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crust using stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***35***, 252-257.

Schieberle P. et Grosch W. (1994). Potent odorants of rye bread crust: differences from the crumb and from wheat bread crust. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*. ***198***, 292-296.

Schneider R. (2001). Contribution à la connaissance du l'arôme et du potentiel aromatique du Melon B. (*Vitis vinifera* L.) et des vins de Muscadet. *Thèse de doctorat, Université de Montpellier II*. 222 pages.

Schneider R., Baumes R., Bayonove C. et Razungles A. (1998). Volatiles compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (vins doux naturels) from Grenache noir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***46***, 3230-3227.

Schneider R., Charrier F., Moutounet M. et Baumes R. (2005). Rapid analysis of grape aroma glycoconjugates using Fourier-transform infrared spectrometry and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*. ***513***, 91-96.

Schneider R., Charrier F., Razungles A. et Baumes R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercaptopentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*. ***563***, 58-64.

Schneider R., Kotseridis Y., Ray J. L., Augier C. et Baumes R. (2003). Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 3243-3248.

Schneider R., Razungles A., Charrier F. et Baumes R. (2002). Effet du site, de la maturité et de l'éclairement des grappes sur la composition aromatique des baies de *Vitis vinifera L. cv*. Melon B. dans le vignble du Muscadet. *Bulletin de l'OIV*. ***75***, 269-282.

Scholka I. R. et Spoerri P. E. (1957). Thiazolidine chemistry. The preparation of 2-thiazolidine-4-carboxylic acids. *Journal of Organic Chemistry*. ***22***, 943-946.

Schreier P., Drawert F. et Junker A. (1974). Gaschromatographischmassenspektrometrische undersuchung flüchtiger inhaltsstoffe des weines. II. Thioäther-verbindungen des weinaromas. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*. ***154***, 279-284.

Schreier P., Drawert F., Junker A., Barton H. et Leupold G. (1976). Über die biosynthese von Aromastoffen durch Mikroorganismen. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. ***162***, 279-284.

Sefton M. A. (1998). Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice sample of *Vitis vinifera* grape cv. Merlot and Cabernet Sauvignon. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. ***4***, 30-38.

Sefton M. A., Francis I. L. et Williams P. J. (1993). The volatile composition of Chardonnay juice: A study by flavor precursor analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***44***, 358-370.

Ségurel M. (2005). Contribution des précurseurs glycosidiques et du sulfure de diméthyle des baies de *Vitis vinifera* L. cv. Grenache noir et Syrah à l'arôme des vins de la vallée du Rhône. *Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure D'Agronomie de Montpellier*. 241 pages.

Ségurel M., Razungles A., Riou C., Salles M. et Baumes R. (2004). Contribution of dimethyl sulphide to the aroma of Syrah and Grenache noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***52***, 7084-7093.

Ségurel M., Razungles A., Riou C., Trigueiro M. G. L. et Baumes R. (2005). Ability of possible precursors to release DMS during wine aging and in the conditions of heat alkaline treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***53***, 2637-2645.

Semmelroch P., Laskawy G., Blank I. et Grosch W. (1995). Determination of potent odourants in roasted coffee by stable isotope dilution assay. *Flavor and Fragrance Journal*. ***10***, 1-7.

Shaw P., Ammons J. et Braman R. (1980). Volatile sulfur compounds in fresh orange and grapefruit juices: identification, quantitation and possible importance to juice flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***28***, 778-781.

Siebert T. E., Smyth H. E., Capone D. L., Nueuwöhner C., Pardon K. H., Skouroumounis G. K., Herderich M., Sefton M. A. et Pollnitz A. P. (2005). Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. ***381***, 937-947.

Silva Ferreira A. C., Barbe J. et Bertrand A. (2003a). 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone : a key odorant of the typical aroma of oxidative aged Port wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 4356-4363.

Silva Ferreira A. C., Hogg T. et De Pinho P. G. (2003b). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 1377-1381.

Simpson R. (1978). 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphtalene: an important contributor to the bottle aged bouquet of wine. *Chem. Ind.* ***Lond.***, 163.

Simpson R. (1979). Aroma composition of bottle aged white wine. *Vitis*. ***18***, 148-154.

Simpson R. et Miller G. C. (1983). Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis*. ***22***, 51-63.

Skouroumounis G. K., Massy-Wesstropp A. et Sefton M. A. (1992). Precursors of damascenone in fruit juices. *Tetrahedron Letters*. ***33***, 3533-3536.

Sousa Camara J., Marques J. C., Alves M. A. et Silva Ferreira A. C. (2004). 3-Hydroxy-4,5-diméthyl-2(5H)-furanone levels in fortified Madeira wines: Relationship to sugar content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***52***, 6765-6769.

Spedding D. J. et Raut P. (1982). The influence of dimethyl sulphide and carbon disulphide in the bouquet of wines. *Vitis*. ***21***, 240-246.

Spinnler H., Berger C., Lapadatescu C. et Bonnarme P. (2001). Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *International Dairy Journal*. ***11***, 245-252.

Stahl-Biskup E., Intert F., Holthuijzen J., Stengele M. et Schulz G. (1993). Glycosidically bound volatiles - A review 1986-1991. *Flavour and Fragrance Journal*. ***8***, 61-80.

Starkenmann C. (2003). Analysis of a model reaction system containing cysteine and (*E*)-2-methyl-2-butenal, (*E*)-2-hexenal, or mesityl oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 7146-7155.

Steinke R. D. et Paulson M. C. (1964). Phenols from grain. The production of steam volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***12***, 381-387.

Strauss C. R., Wilson B., Gooley P. R. et Williams P. J. (1986). Role of monoterpenes in grape and wine flavor. In: *Biogeneration of aromas*. T. H. Parliment and R. Croteau. Washington, American Chemical Society.

Sulser H., Depizzol J. et Büchi W. (1967). A probable flavoring principle in vegetable protein-hydrolysates. *Journal of Food Sciences*. ***32***, 611-615.

Swan H. B. (2000). Determination of existing and potential dimethyl sulphide in red wines by gas chromatography atomic emission spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*. 207-217.

Takahashi K., Tadenuma M. et Sato S. (1976). 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-diméthyl-2(5H)-furanone, a burnt flavoring compound from aged sake. *Agricultural and Biological Chemistry*. ***40***, 325-330.

Talou T., Delmas M. et Gaset A. (1987). Principal constituents of Black Truffle (Tuber melanosporum) aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***35***, 774-777.

Tominaga T. (1998). Recherches sur l'arôme variétal des vins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin. *Thèse de Doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux II*. 218 pages.

Tominaga T. (2000). A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanemethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wine made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 1799-1802.

Tominaga T., Baltenweck-Guyot R., Peyrot des Gachons C. et Dubourdieu D. (2000). Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***51***, 178-181.

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

Tominaga T. et Dubourdieu D. (1997). Identification of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one from the box tree (*Buxussempervirens* L.) and broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) *Koch.*). *Flavour and Fragrance Journal*. ***12***, 373-374.

Tominaga T. et Dubourdieu D. (2000). Identification of cysteinylated aroma precursors of certain volatile thiols in passion fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***48***, 2874-2876.

Tominaga T., Furrer A., Henry R. et Dubourdieu D. (1998a). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*. ***13***, 159-152.

Tominaga T., Guimberteau G. et Dubourdieu D. (2003a). Contribution of benzenemethanol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L. wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 1373-1376.

Tominaga T., Guimberteau G. et Dubourdieu D. (2003b). Role of certain volatile thiols in the bouquet of aged champagne wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 1016-1020.

Tominaga T., Masneuf I. et Dubourdieu D. (1995). Mise en évidence d'un S-conjugué de la cystéine, précurseur d'arôme du Sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. ***29***, 227-232.

Tominaga T., Peyrot des Gachons C. et Dubourdieu D. (1998b). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc: S-cystein conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***46***, 5215-5219.

Torrès-Alegre V. (1982). Formation des acides gras et autres produits secondaires au cours de la vinification. Interprétation statistique des résultats. *Thèse de Doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux II*.

Trossat C., Nolte K. D. et Hanson A. D. (1996). Evidence that the pathway of dimethylsufoniopropionate biosynthesis begins in the cytosol and ends in the chloroplast. *Plant Physiology*. ***111***, 965-973.

Tulio A. Z., Yamanaka H., Ueda Y. et Imahori Y. (2002). Formation of methanethiol and dimethyl sulphide in crushed tissues of broccoli florets and teir inhibition by freeze-Thawing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***50***, 1502-1507.

Ugliano M., Genovese A. et Moio L. (2003). Hydrolisis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcuc oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***51***, 5073-5078.

Ullrich F. et Grosch W. (1987). Identification of most intense volatile flavor compounds fromed during autooxydation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*. ***184***, 277-282.

Ulrich D., Hoberg E., Bittner T., Engewald W. et Meilchen K. (2001). Contribution of voaltile compounds to the flavor of cooked asparagus. *European Food Research and Technology*. ***213***, 200-204.

Usseglio-Tomasset L. et Di Stefano R. (1980). Profilo aromatico del Moscato bianco del Piemonte. *Riv. Vitic. Enol.* ***33***, 145-168.

Versini G., Rapp A., Marais J., Mattivi F. et Spraul M. (1996). A new 1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphtalène (TDN) precisor isolated from riesling grape products: Partial structure elucidation and possible reaction mechanism. *Vitis*. ***35***, 15-21.

Voirin S. (1990). Connaissance de l'arôme du raisin: analyse et synthèse de précurseurs hétérosidiques. *Thèse de Doctorat, Université Montpellier II. 184 pages.*

Voirin S., Baumes R., Bitteur S., Günata Z. et Bayonove C. (1990). Novel monoterpene dissacharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***38***, 1373-1378.

Voirin S. G., Baumes R., Gunata Z., Bitteurn S. L. et Bayonove C. L. (1992). Analytical methods for monoterpènes glycosides in grape and wine. I. XAD-2 extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of synthetic glycosides. *Journal of Chromatography*. ***590***, 313-328.

Wakabayashi H., Wakabayashi M., Eisenreich W. et Engel K. H. (2002). Stereoselectivity of the β-lyase-catalysed cleavage of S-cysteinconjugates of pulegone. *European Food Research and Technology*. ***215***, 287-292.

Wakabayashi H., Wakabayashi M., Eisenreich W. et Engel K. H. (2004). Stereochemical course of the generation of 3-mercaptohexanal and 3-mercaptohexanol by β-lyase-catalysed cleavage of cystein conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***52***, 110-116.

Wakabayashi H., Wakabayashi M. et Engel K. H. β-lyase-catalysed-transformations of sulphur-containing flavour precursors. In: *Flavour Research at the Dawn of the Twenty First Century*, 350-355. J. L. Lequéré and P. Etievant. Tec & Doc.

Weber B., Dietrich A., Maas B., Marx A., Olk J. et Mosandl A. (1994). Enatiomeric distribution of the chiral sulphur-containing alcohols in yellow and purple passion fruit. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. ***199***, 48-50.

Weber B., Maas B. et Mosandl A. (1995). Stereoisomeric flavor compounds. 72. Stereoisomeric distribution of some chiral sulfur-containing trace components of yellow passion fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***43***, 2438-2441.

Werkhoff P., Gunter M., Krammer G., Sommer H. et Kaulen J. (1998). Vacuum headspace method in aroma research: flavor chemistry of yellow passio fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***46***, 1076-1093.

Whitaker J. R. (1976). Developpment of flavor, odor and pugency in onion and garlic. *Advanced in Food Research*. ***22***, 73-133.

White F. H. et Wainwright T. (1976). The measurement of dimethyl sulphide precursor in malts, adjuncts, worts and beer. *Journal of Institute of Brewing*. ***82***, 46-48.

Wildenradt H. L. et Singleton V. L. (1974). The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compound and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***25***, 119-126.

Wilkinson K. L., Elsey G. M., Prager R., H, Pollnitz A. P. et Sefton M. A. (2004). Rates of formation of *cis*- and *trans*-oak lactone from 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***52***, 4213-4218.

Williams P. J., Cynkar W., Francis I. L., Gray J. D., Hand P. G. et Coombe B. G. (1995). Quantification of glycosides in grapes juices and wines through a determination of glycosyl glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***43***, 121-128.

Williams P. J., Strauss C. R. et Wilson B. (1980). Hydroxylated linalol derivatives as precursors of volatile monoterpenes of Muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***28***, 766-771.

Williams P. J., Strauss C. R. et Wilson B. (1982a). Novel monoterpene dissacharide glycoside of *Vitis vinifera* grappes and wines. *Phytochemistry*. ***21***, 2013-2020.

Williams P. J., Strauss C. R., Wilson B. et Dimitriadis E. (1984). Recent studies into grape terpène glycosides. In: *Progress in Flavour Research 1984*, 349-357. J. Adda. Amsterdam, Eselvier Science Publisher B.V.

Williams P. J., Strauss C. R., Wilson B. et Massy-Westropp R. A. (1982b). Studie on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model β-D-glucoside rationalizing the monoterpene composition of grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***30***, 1219-1223.

Wilson B., Strauss C. R. et Williams P. J. (1984). Changes in free and glycosidically bound and monoterpenes in developping Muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***32***, 919-924.

Wilson B., Strauss C. R. et Williams P. J. (1986). The distribution of free and glycosidally-bound monoterpene among skin, juice and pulp fractions of some white grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*. ***37***, 107-111.

Winterhalter P. (1992). Oxygenated C_{13}-norioprenoids. Important flavor precursor. In: *Thermal and Enzymatic Conversions of Precursors to Flavor Compounds*. R. Teranishi, G. Takeoka and M. Günther. Washington, American Chemical Society.

Winterhalter P. (1993). The generation of C_{13}-norisoprenoids volatiles in riesling wine. In: *Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins*, 65-73. J. Crouzet, C. Flanzy, C. Martin and J. C. Sapis. Montpellier,

Winterhalter P. et Skouroumounis G. K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: occurence, role and biotechnological transformation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. ***55***, 73-105.

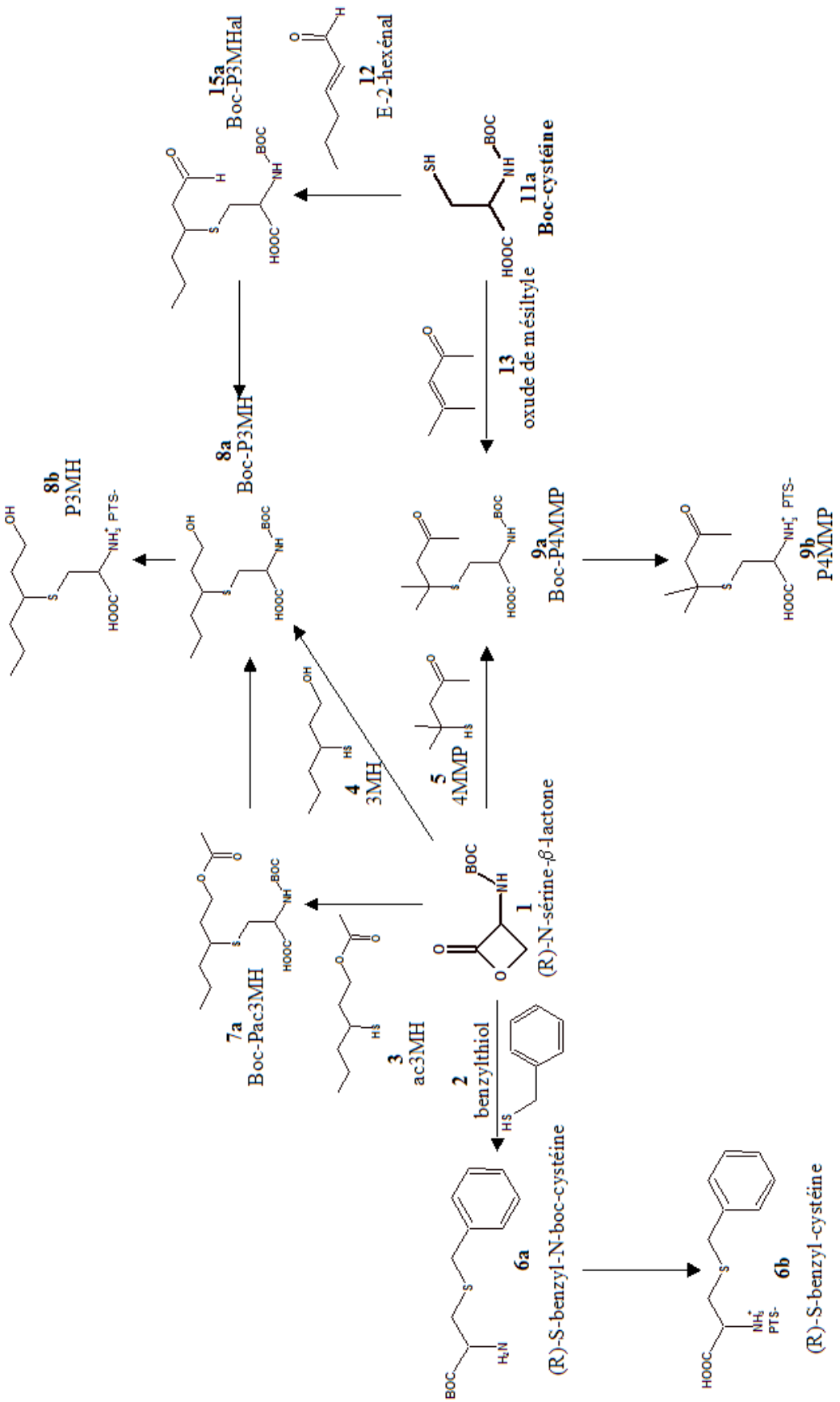
Wirth J., Guo W., Baumes R. et Günata Z. (2001). Volatiles compounds released by enzymatic hydrolysis of glycoconjugates of leaves and grape beries from *Vitis vinifera* Muscat of Alexandria and Shiraz cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ***49***, 2917-2923.

Wu Y., Jenkins T., Blunden G., Whapham C. A. et Hankins S. D. (1997). The role of betaines in alkaline extracts of *Ascophyllum nodosum* in the reduction of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* infestations of tomato plants. *Fundamental and Applied Nematology*. ***20***, 99-102.

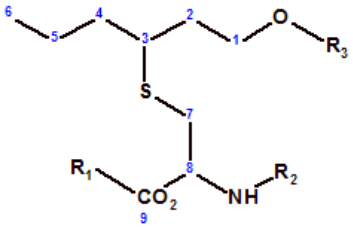
Yancey P. H., Clark S. C., Hand R. D. et Bowlus G. N. (1982). *Sciences des Aliments*. ***217***, 1214.

Yoo K. S. et Pike L. M. (1998). Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cystein sulfoxides by HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Journal of Horticultural Science*. ***75***, 1-10.

Annexes

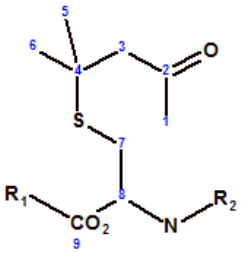


Annexe 1 : Voies de synthèses du P4MMP, du P3MH et du SBC.



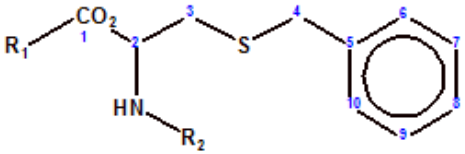
					S-substituant									partie cystéine				
Composé	**n°**		**Solvant**	**Analyse**	H-1a	H-1b	H-2a	H-2b	H-3	H-4	H-5	H-6	R_3	H-7a	H-7b	H-8	NH	R_2
P3MH	9	$R_1=R_2=R_3=H$	DMSO-d_6	$^1H_1$ RMN	3.5(m)	3.55(m)	1.57(m)	1.67(m)	2.84(m)	1.50(m)	1.38(m)	0.88(t) J=	-	2.85(dd) Jab= Ja=	3.00(dd) Jb=	3.80(m)	-	-
P3MH	9	$R_1= R_2= R_3=H$	D_2O/DSS	$^1H_1$ RMN	3.75(m)		1.75(m)	1.85(m)	2.90(m)	1.58(m)	1.42(m)	0.90(t) J=	-	3.05(dd) Jab= Ja=8Hz	3.15(dd) Jb=8Hz	4.01(m)	-	-
[$^2H_2$]-P3MH	9d	$R_1= R_2= R_3=H$	D_2O/DSS	$^1H_1$ RMN	*		1.75(m)	1.85(m)	2.90(m)	1.58(m)	1.42(m)	0.90(t) J=	-	3.05(dd) Jab= Ja=8Hz	3.15(dd) Jb=8Hz	4.01(m)		
boc-P3MH	8	$R_2=CO_2C(CH3)_3$ $R_1=R_3=H$	$CDCl_3$		3.85(m)	3.92(m)	1.80(m)	1.62(m)	2.85(m)	1.40(m)	1.60(m)	0.95(t) J=		2.85(m)	3.05(m)	4.35(m)	6.2(m)	1.45(s)
[$^2H_2$]-boc-P3MH	8d	$R_2=CO_2C(CH3)_3$	$CDCl_3$		*		1.80(m)	1.62(m)	2.85(m)	1.40(m)	1.60(m)	0.95(t) J=		2.85(m)	3.05(m)	4.35(m)	6.2(m)	1.45(s)
boc-Pac3MH	11	$R_2=CO_2C(CH3)_3$ $R_3=COCH_3;R_1=H$	DMSO-d_6	$^1H_1$ RMN	4.08(m)	4.08(m)	1.68(m)	1.80(m)	2.70(m)	1.37(m)	1.52(m)	0.75(m)		2.85(m)	2.87(m)	3.90-4.05(m)	6.13(m)	1.37(s)
Composé	**n°**				C-1		C-2		C-3	C-4	C-5	C-6	R_3 CO_2 CH_3	C-7		C-8	C-9	NH	R_3 CO_2 C CH3
P3MH	9	$R_1=R_2=R_3=H$	DMSO-d_6	^{13}C RMN	58.5		38.0		43.0	37.0	19.5	14.0	-	31.0		53.5	169.5	-	-
boc-Pac3MH	11	$R_2=CO_2C(CH3)_3$ $R_3=COCH_3;R_1=H$	DMSO-d_6	^{13}C RMN	62.0		32.5		42.5	37.0	19.0	13.5	170.0	31.5		54.0	174.0	-	155.0

Annexe 2 : Analyses RMN du P3MH et de ses dérivés (Varian 250 MHz).



					S-substituant							partie cystéine								
Composé	**n°**		**Solvant**	**Analyse**	**H-1**	**H-2**	**H-3a**	**H-3b**	**H-4**	**H-5**	**H-6**	**H-7a**	**H-7b**	**H-8**	**NH**	**R_2**			**R_1**	
																CH_3				
P4MMP	19	R_1=R_2=H	DMSO-d_6	$^1H_1$ RMN	2.08(s)	-	2.76(s)		-	1.35(s)	1.35(s)	3.05(d) J78=		4.11(m)	-	-			-	
P4MMP	19	R_1=R_2=H	D_2O/DSS	$^1H_1$ RMN	2.22(s)	-	2.80 Jab=13Hz	2.86	-	1.40(s)	1.40(s)	3.07(dd) Jab=13.8 Ja8=4.4Hz	3.18(dd) Jb8=7.4Hz	4.00(m) Ja8=4.4Hz/Jb8=7.4Hz	-	-			-	
[$^2H_6$]-P4MMP	19d	R_1=R_2=H	D_2O/DSS	$^1H_1$ RMN	2.22(s)	-	2.80 Jab=13Hz	2.86	-	*	*	3.07(dd) Jab=13.8 Ja8=4.4Hz	3.18(dd) Jb8=7.4Hz	4.00(m) Ja8=4.4Hz/Jb8=7.4Hz	-	-			-	
boc-P4MMP	5	R_1= H R_2=$CO_2C(CH3)_3$	DMSO-d_6	$^1H_1$ RMN	2.11(s)	-	2.66(s)		-	1.30(s)	1.30(s)	2.83(dd) Jab=12Hz Ja=4.4Hz	2.95(dd) Jb=6.7Hz	3.92(ddd)	6.31(d)	1.37(s)			-	
boc-P4MMP	5	R_1= H R_2=$CO_2C(CH3)_3$	$CDCl_3$	$^1H_1$ RMN	2.2(m)	-	2.72(m)		-	1.42(m)	1.42(t)	3.05(d) J78=5Hz		4,47(m)	5.4(d) J8-NH=6Hz	1.46(s)			-	
Composé	**n°**		**Solvant**	**Analyse**	**H-1**	**H-2**	**H-3a**	**H-3b**	**H-4**	**H-5**	**H-6**	**H-7a**	**H-7b**	**H-8**	**NH**	**R_2**			**R_1**	
																CH_2	CH_3		CH_2	CH_3
dérivé ECF P4MMP	14	R_1= C_2H_5 R_2=$OCOC_2H_5$	DMSO-d_6	$^1H_1$ RMN	2.12(s)	-	2.7(s)		-	1.33(s)	1.33(s)	2.78(dd) J=12.5Hz J=8Hz	2.90(dd) J=4.5Hz	3.95(m)	7.6(d) J8-NH=8Hz	3.98(q) J=7.5Hz	1.15(t)		4.10(q) J=7.5Hz	1.19(t)
Composé	**n°**		**Solvant**	**Analyse**	**C-1**	**C-2**	**C-3**		**C-4**	**C-5**	**C-6**	**C-7**		**C-8**	**C-9**	**NH**	**R_2**			**R_1**
																	CO_2	C	CH_3	
P4MMP	19	R_1=R_2=H	DMSO-d_6	^{13}C RMN	32.0	207.0	52.5		44.0	28.0	28.0	27.0		51.5	169.0	-		-		-
boc-P4MMP	5	R_1= H R_2=$CO_2C(CH3)_3$	DMSO-d_6	13C RMN	32.0	207.0	53.5		43.0	28.0	28.0	31		54.5	174.5	-	155.0	78.0	28.0	-

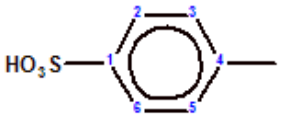
Annexe 3 : Analyses RMN du P4MMP et de ses dérivés (Varian 250 MHz).



Composé	n°		Solvant	Analyse	H-4	H-6/H-10/H-7/H-9	H-8	H-3a	H-3b	H-2	NH	(CH3)3
SBC	**18**	**R_1=H** **R_2=H**	$CDCl_3$	$^1H_1$ RMN	3.82(s)	7.35(m)	7.25(m)	2.86 Jab= Ja=	2.92 Jb=	4.2(m)	-	-
boc-SBC	**3**	**R_1=H** **R_2=$CO_2C(CH_3)_3$**	$CDCl_3$	$^1H_1$ RMN	3.51 - 3.56 J=13Hz	7.12(m)	7.04(m)	2.51 - dd Jab=13.2Hz Ja=7.2Hz	2.70 - dd Jb=3.8Hz	3.8(m)	6.16(d) J=7.6Hz	1.22(s)

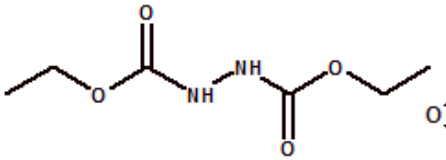
Composé	n°	Solvant	Analyse	H-2/H-6	H-3/H-5	CH_3
PTS		DMSO-d_6	$^1H_1$ RMN	7.44(2H,d) J=8 Hz	7.15(2H,d) J=8 Hz	2.30(3H,s)
PTS		D2O	$^1H_1$ RMN	7.65(2H,d) J=8 Hz	7.35(2H,d) J=8 Hz	2.37(3H,s)

Composé	n°	Solvant	Analyse	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CH_3
PTS		DMSO-d_6	^{13}C RMN	144.5	125.5	128	138	128	125.5	20.5

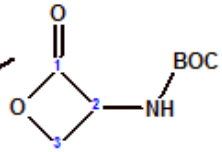


acide p-toluène sulfonique
(PTS)

Composé	n°	Solvant	Analyse	CH_3 (BOC)	H-C3	H-C2	H-N
BOC-lactone	**1**	$CDCl_3$	$^1H_1$ RMN	1.46(9H,s)	4.44(2H,m)	5.13(1H,m)	5.31(1H,m)
Composé	**n°**	**Solvant**	**Analyse**	CH_3	CH_2	NH	
Hydrazine dicarboxylate		$CDCl_3$	$^1H_1$ RMN	1.28(6H,t) J=7.1 Hz	4.21(4H,q) J=7.1 Hz	6.53(2H,bs) J=7.1 Hz	



Hydrazine dicarboxylate



1

Annexe 4 : Analyses RMN du SBC et Boc-SBC, de l'acide p-toluène sulfonique, de la boc-lactone et de l'hydrazine dicarboxylate (PTS ; Varian 250 MHz).

sotolon **1**	C-2	C-3	C-4	C-5	CH_3-C5	CH_3-C4
	171.8	137.5	134.6	79.1	9.7	19.8
acide **2**-méthyl-4-oxopent-2-énoïque **11**	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	CH_3-C3
	165.7	187.7	135.1	150	16.1	10.7

sotolon **1**	H-5	CH_3-C5	CH_3-C4
	d 4,84 (qd)	d 1,41 (d)	d 1,89 (d)
	J_{5MeC5}=6,7 Hz	J_{5MeC5}=6,7 Hz	J_{5MeC4}=1 Hz
	J_{5MeC4}=1 Hz		

sotolon **1D**	H-5	CH_3-C5	CH_3-C4
	d 4,83 (qd)		d 1,89 (d)
			J_{5MeC4}=1,1 Hz

acide 2-méthyl-4-oxopent-2-énoïque **11**	H-4	H-5	CH_3-C3
	d 7,28 (qd)	d 1,98 (dd)	d 1,85 (s)
	J_{45}=7 Hz	J_{45}=7 Hz	
	J_{4MeC3}=1,2 Hz	J_{5MeC3}=0,8 Hz	

acide 2-méthyl-4-oxopent-2-énoïque **11D**	H-4	H-5	CH_3-C3
	d 7,35 (qd)		d 1,85 (d)
			J_{4MeC3}=0,9 Hz

Annexe 5 : ^{1}H-RMN et ^{13}C-RMN du sotolon **1** et l'acide 2-méthyl-4-oxopenténoïque **11** et de leur analogue deutéré **1D** et **11D** ($CDCl_3$).

Code	C_{13}-norisoprénoïdes
C13-1	3,4-dihydro-3-oxo-actinidol I
C13-2	3,4-dihydro-3-oxo-actinidol II et III
C13-3	3-hydoxy-β-damascone + 3,4-dihydro-3-oxo-actinidol IV
C13-4	3-hydroxy-7,8-dihydro-β-ionone
C13-5	3-hydroxy-5,6-dihydro-β-ionol
C13-6	inc. (109-125-208)
C13-7	acétovanillone + 3-oxo-α-ionol + 4-oxo-β-ionol
C13-8	inconnu (119-159-177)
C13-9	3-hydroxy-7,8-dihydro-β-ionol
C13-10	3-hydroxy-β-ionone + 4-oxo-7,8-déhydo-β-ionol
C13-11	3-oxo-7,8-dihydro-α-ionol
C13-12	3-hydroxy-5,6-époxy-β-ionone
C13-13	3-oxo-α-retro-ionol
C13-14	3-hydroxy-7,8-déhydro-β-ionol
C13-15	3-hydroxy-4-oxo-β-ionol[a]
C13-16	déhydrovomifoliol[a]
C13-17	vomifoliol

	Monoterpènols
T-1	oxyde de linalol furanique *trans*
T-2	oxyde de linalol furanique *cis*
T-3	linalol
T-4	α-terpinéol
T-5	oxyde de linalol pyranique *trans*
T-6	oxyde de linalol pyranique *cis*
T-7	nérol
T-8	géraniol + acide hexanoïque
T-9	2-hydroxy-*exo* -hydroxycinéole
T-10	3,7-diméthyl-1,5-octadièn-3,7-diol
T-11	8-hydroxy-6,7-dihydrolinalol
T-12	hydrate de nérol
T-13	*E* -8-hydroxylinalol
T-14	hydrate de géraniol + *Z* -8-hydroxylinalol
T-15	acide géranique
T-16	dérivé menthène (59-109-138)[a]
T-17	diol (58-81-140)[a]
T-18	diol (71-109-152)
T-19	p-menth-1-ène-7,8-diol
T-20	diol
T-21	*E* -8-hydroxygeraniol

	Phénols volatils
P-1	salicylate de méthyle[a]
P-2	eugénol
P-3	vanillate de méthyle
P-4	3,4-triméthoxybenzylalcool + 3-oxo-retro-a-ionol
P-5	syringoate de méthyle

	Composé en C_6
C6-1	hexanol
C6-2	*Z* -3-hexènol
C6-3	*E* -2-hexènol

	Alcools
A-1	heptan-2-ol
A-2	octèn-3-ol
A-3	heptanol
A-4	octanol
A-5	oct-2-énol[a]
A-6	alcool benzylique
A-7	2-phényléthanol

Annexe 6 : Codification des aglycones libérées à partir des glycosides ([a] composés non dosés en 2002).

	3GG1	3GG2	3GG3	3GP1	3GP2	3GP3
C_{13}-norisoprénoïdes						
C13-1	9,8 +/- 1,6	9,2 +/- 0,7	12,3 +/- 0,7	11,0 +/- 0,9	12,1 +/- 0,8	16,8 +/- 2,3
C13-2	25,3 +/- 1,8	27,5 +/- 2,3	40,5 +/- 4,6	21,8 +/- 2,5	29,8 +/- 2,9	44,6 +/- 3,9
C13-3	59,8 +/- 2,5	52,5 +/- 5,5	59,4 +/- 3,7	56,3 +/- 3,0	53,0 +/- 4,2	63,3 +/- 5,3
C13-4	14,8 +/- 1,2	11,8 +/- 1,1	18,1 +/- 0,3	16,2 +/- 0,4	13,4 +/- 1,9	24,9 +/- 5,5
C13-5	98,2 +/- 6,4	127,5 +/- 12,2	166,6 +/- 7,0	146,1 +/- 7,4	185,9 +/- 16,5	216,5 +/- 17,9
C13-6	9,6 +/- 2,0	11,4 +/- 0,9	17,5 +/- 0,3	18,1 +/- 0,9	23,9 +/- 4,8	26,1 +/- 3,8
C13-7	244,2 +/- 12,5	264,4 +/- 22,7	338,4 +/- 11,4	231,9 +/- 21,0	249,7 +/- 22,3	311,8 +/- 23,0
C13-8	69,6 +/- 4,1	59,0 +/- 5,8	74,0 +/- 2,9	61,6 +/- 5,1	58,2 +/- 6,1	68,5 +/- 8,2
C13-9	16,5 +/- 2,0	12,0 +/- 1,1	16,9 +/- 1,5	21,3 +/- 1,8	24,8 +/- 1,7	31,7 +/- 5,1
C13-10	75,2 +/- 6,9	75,5 +/- 9,4	89,1 +/- 4,1	71,6 +/- 6,6	71,9 +/- 8,1	89,3 +/- 10,2
C13-11	9,2 +/- 1,8	6,2 +/- 0,7	9,9 +/- 0,5	5,5 +/- 0,6	5,5 +/- 0,7	10,9 +/- 2,2
C13-12	4,1 +/- 0,2	5,4 +/- 0,9	6,9 +/- 1,0	7,1 +/- 1,3	8,0 +/- 1,5	9,6 +/- 1,4
C13-13	49,3 +/- 4,7	48,4 +/- 5,4	65,8 +/- 9,9	52,7 +/- 5,1	55,1 +/- 8,3	69,4 +/- 10,4
C13-14	11,9 +/- 1,5	10,8 +/- 0,7	12,7 +/- 1,2	17,4 +/- 2,6	19,5 +/- 2,2	22,6 +/- 2,8
C13-15*	22,2 +/- 2,1	20,0 +/- 5,7	28,0 +/- 1,2	8,1 +/- 1,1	7,6 +/- 0,7	9,4 +/- 0,8
C13-16*	12,4 +/- 1,3	12,6 +/- 3,8	14,9 +/- 3,6	14,2 +/- 2,1	16,3 +/- 3,1	18,6 +/- 2,6
C13-17	34,0 +/- 1,8	31,6 +/- 9,0	35,7 +/- 9,2	33,5 +/- 8,3	30,1 +/- 7,1	29,1 +/- 4,9
Somme	**766,1 +/- 34,7**	**785,7 +/- 75,6**	**1006,8 +/- 50,6**	**794,4 +/- 64,1**	**864,6 +/- 82,9**	**1063,2 +/- 100,1**
Monoterpènols						
T-1	5,7 +/- 0,7	4,7 +/- 0,1	7,7 +/- 1,0	7,2 +/- 0,8	5,6 +/- 1,1	7,1 +/- 0,8
T-2	13,9 +/- 0,5	11,0 +/- 0,4	16,5 +/- 1,1	14,9 +/- 0,9	11,4 +/- 1,3	14,2 +/- 0,7
T-3*	1,0 +/- 0,1	0,7 +/- 0,0	0,8 +/- 0,1	0,9 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1
T-4	0,9 +/- 0,1	1,0 +/- 0,2	1,0 +/- 0,0	25,8 +/- 1,0	19,8 +/- 1,2	24,7 +/- 1,1
T-5	8,8 +/- 0,3	9,2 +/- 0,4	10,9 +/- 0,9	8,2 +/- 0,7	7,0 +/- 0,7	8,8 +/- 0,6
T-6	11,9 +/- 0,2	9,8 +/- 0,5	13,1 +/- 1,0	9,2 +/- 0,7	6,4 +/- 0,9	8,6 +/- 0,7
T-7	5,5 +/- 0,6	9,6 +/- 0,6	7,9 +/- 1,0	6,4 +/- 0,8	6,5 +/- 1,6	8,2 +/- 1,4
T-8	15,4 +/- 0,8	22,2 +/- 1,4	19,3 +/- 2,9	22,7 +/- 2,0	23,9 +/- 3,9	29,8 +/- 4,0
T-9	1,3 +/- 0,0	1,6 +/- 0,3	2,2 +/- 0,3	16,3 +/- 0,7	12,1 +/- 1,5	10,8 +/- 1,7
T-10	2,4 +/- 0,4	4,0 +/- 0,2	2,9 +/- 0,5	2,2 +/- 0,2	1,8 +/- 0,3	2,2 +/- 0,4
T-11	6,0 +/- 0,5	8,6 +/- 0,7	8,7 +/- 1,0	6,2 +/- 0,6	4,9 +/- 0,8	7,5 +/- 0,9
T-12	6,9 +/- 0,9	7,0 +/- 0,7	9,9 +/- 1,2	7,6 +/- 0,5	6,5 +/- 0,8	13,1 +/- 1,2
T-13	36,0 +/- 0,7	38,2 +/- 2,2	44,8 +/- 2,5	47,7 +/- 3,6	38,5 +/- 2,3	51,1 +/- 3,8
T-14	40,3 +/- 2,5	50,0 +/- 3,9	56,8 +/- 1,9	52,9 +/- 3,1	49,7 +/- 5,2	71,6 +/- 3,6
T-15	10,9 +/- 1,3	13,3 +/- 1,9	16,6 +/- 2,7	19,9 +/- 3,0	20,0 +/- 1,8	29,1 +/- 3,0
T-16*	nd	nd	nd	6,9 +/- 0,7	6,6 +/- 0,3	7,5 +/- 1,3
T-17*	nd	nd	nd	12,0 +/- 1,5	11,5 +/- 1,5	13,5 +/- 2,2
T-18	nd	nd	nd	7,4 +/- 1,4	9,8 +/- 0,6	11,1 +/- 1,8
T-19	9,8 +/- 0,5	9,7 +/- 1,0	11,4 +/- 0,8	103,0 +/- 16,1	88,5 +/- 15,6	109,6 +/- 14,2
T-20	nd	nd	nd	10,8 +/- 2,2	9,3 +/- 1,5	10,5 +/- 1,5
T-21	3,3 +/- 0,4	2,9 +/- 0,4	3,8 +/- 0,3	4,0 +/- 0,7	3,3 +/- 0,6	5,6 +/- 0,9
Somme	**180,1 +/- 4,8**	**203,6 +/- 11,6**	**234,2 +/- 12,9**	**392,1 +/- 21,2**	**343,6 +/- 26,7**	**445,2 +/- 18,1**
Phénols volatils						
P-1*	3,1 +/- 0,2	2,7 +/- 0,3	12,4 +/- 0,8	1,2 +/- 0,2	0,5 +/- 0,1	1,0 +/- 0,1
P-2	6,2 +/- 0,8	7,6 +/- 0,8	7,6 +/- 0,7	12,5 +/- 1,4	9,5 +/- 1,2	15,1 +/- 1,1
P-3	21,3 +/- 1,6	15,3 +/- 1,4	14,9 +/- 2,3	12,7 +/- 1,4	9,4 +/- 1,3	7,5 +/- 0,6
P-4	2,8 +/- 0,1	3,5 +/- 0,6	4,3 +/- 0,5	8,4 +/- 0,9	10,1 +/- 1,4	11,7 +/- 1,1
P-5	7,1 +/- 0,6	4,3 +/- 1,3	6,2 +/- 0,8	2,5 +/- 0,2	2,1 +/- 0,3	2,3 +/- 0,3
Somme	**40,4 +/- 1,8**	**33,4 +/- 3,3**	**45,4 +/- 0,9**	**37,3 +/- 0,9**	**31,6 +/- 2,2**	**37,6 +/- 2,4**
Composé en C_6						
C6-1	42,1 +/- 2,7	60,4 +/- 3,6	80,2 +/- 0,9	74,5 +/- 2,3	103,3 +/- 1,6	122,4 +/- 8,0
C6-2	4,4 +/- 0,5	4,1 +/- 0,2	4,8 +/- 0,3	3,8 +/- 0,3	2,9 +/- 0,2	2,8 +/- 0,2
C6-3	2,8 +/- 0,4	2,7 +/- 0,2	2,7 +/- 0,3	2,9 +/- 0,2	2,2 +/- 0,4	2,5 +/- 0,3
Somme	**49,3 +/- 3,3**	**67,2 +/- 4,0**	**87,7 +/- 0,7**	**81,2 +/- 2,4**	**108,4 +/- 1,6**	**127,6 +/- 8,3**
Alcools						
A-1	2,5 +/- 0,4	2,7 +/- 0,2	3,0 +/- 0,1	3,4 +/- 0,1	2,5 +/- 0,3	2,9 +/- 0,4
A-2	2,8 +/- 0,3	3,7 +/- 0,3	6,1 +/- 0,6	4,4 +/- 0,6	5,4 +/- 1,0	6,9 +/- 0,7
A-3	3,5 +/- 0,6	4,7 +/- 0,6	6,1 +/- 0,2	3,8 +/- 0,4	5,1 +/- 0,9	6,3 +/- 0,9
A-4	3,4 +/- 0,2	4,8 +/- 0,3	6,0 +/- 0,2	3,5 +/- 0,3	5,0 +/- 0,4	7,0 +/- 0,7
A-5*	2,4 +/- 0,3	3,5 +/- 0,4	4,9 +/- 0,3	3,7 +/- 0,6	4,6 +/- 0,6	5,9 +/- 0,8
A-6	183,1 +/- 3,8	82,3 +/- 13,0	64,2 +/- 4,5	56,1 +/- 4,9	44,0 +/- 6,0	23,1 +/- 2,1
A-7	182,0 +/- 3,3	144,9 +/- 12,3	169,0 +/- 5,4	185,5 +/- 5,9	174,7 +/- 11,8	150,9 +/- 9,4
Somme	**379,7 +/- 5,5**	**246,6 +/- 25,7**	**259,2 +/- 8,8**	**260,3 +/- 11,7**	**241,3 +/- 18,9**	**202,9 +/- 11,2**
Total	**1415,5 +/- 34,4**	**1336,5 +/- 112,5**	**1633,4 +/- 54,3**	**1565,3 +/- 77,3**	**1589,6 +/- 109,0**	**1876,6 +/- 107,6**

Annexe 7 : Teneurs en glycosides des jus de Petit et Gros Manseng des 2 parcelles du site G en 2003 (moyenne de 4 répétitions, exprimées en µg/L équivalents de 4-nonanol ; * composés non dosés en 2002 ; nd non détecté ; cf. codification V.1.1).

	3FG1	3FG2	3FG3	3FP1	3FP2	3FP3
C_{13}-norisoprénoïdes						
C13-1	13,0 +/- 0,9	12,4 +/- 0,1	15,6 +/- 1,0	9,1 +/- 1,4	11,7 +/- 1,3	11,2 +/- 1,3
C13-2	33,5 +/- 2,5	45,9 +/- 1,5	51,6 +/- 4,6	18,5 +/- 2,7	31,7 +/- 3,5	33,9 +/- 5,1
C13-3	79,3 +/- 9,4	58,3 +/- 1,3	63,6 +/- 6,7	56,8 +/- 3,3	53,9 +/- 4,0	52,5 +/- 6,0
C13-4	21,0 +/- 2,3	19,5 +/- 0,4	26,5 +/- 4,0	13,1 +/- 2,1	14,1 +/- 1,2	14,4 +/- 2,5
C13-5	85,2 +/- 11,2	130,0 +/- 6,9	175,4 +/- 18,5	95,4 +/- 6,7	140,2 +/- 11,2	145,8 +/- 18,5
C13-6	8,5 +/- 1,3	12,0 +/- 2,1	16,5 +/- 1,8	15,9 +/- 0,9	20,7 +/- 3,2	22,0 +/- 3,2
C13-7	442,1 +/- 45,3	437,7 +/- 4,8	633,6 +/- 58,6	205,7 +/- 14,3	229,3 +/- 19,5	255,1 +/- 29,1
C13-8	89,5 +/- 11,3	77,8 +/- 1,1	94,2 +/- 9,6	50,4 +/- 2,9	57,3 +/- 4,8	54,5 +/- 7,8
C13-9	16,3 +/- 2,2	18,2 +/- 1,2	23,4 +/- 2,1	22,2 +/- 1,3	22,1 +/- 2,0	23,4 +/- 1,9
C13-10	138,2 +/- 18,3	118,4 +/- 3,0	167,9 +/- 14,8	67,5 +/- 3,8	66,1 +/- 6,3	75,4 +/- 8,4
C13-11	6,2 +/- 0,4	5,4 +/- 0,7	5,4 +/- 1,1	4,7 +/- 0,3	3,3 +/- 0,6	6,0 +/- 1,1
C13-12	6,5 +/- 0,7	6,4 +/- 0,5	9,7 +/- 1,7	5,6 +/- 1,0	8,0 +/- 1,1	7,9 +/- 1,4
C13-13	59,0 +/- 7,6	50,3 +/- 0,7	62,7 +/- 7,0	52,4 +/- 7,5	43,3 +/- 3,9	48,2 +/- 7,5
C13-14	15,8 +/- 1,7	13,8 +/- 1,4	17,2 +/- 2,4	18,8 +/- 1,3	19,8 +/- 1,5	22,1 +/- 3,1
C13-15*	16,9 +/- 1,5	15,8 +/- 0,8	18,4 +/- 3,0	4,7 +/- 0,4	5,5 +/- 0,7	6,1 +/- 0,7
C13-16*	8,2 +/- 1,1	16,1 +/- 2,6	11,5 +/- 0,8	10,2 +/- 1,7	12,0 +/- 2,0	9,1 +/- 1,8
C13-17	13,7 +/- 2,6	20,7 +/- 3,5	20,9 +/- 4,4	12,9 +/- 2,9	17,6 +/- 3,1	12,0 +/- 2,7
Somme	**1052,8 +/- 116,7**	**1058,7 +/- 16,3**	**1414,1 +/- 134,9**	**664,1 +/- 37,7**	**756,6 +/- 65,3**	**799,5 +/- 97,8**
Monoterpènols						
T-1	7,2 +/- 1,1	8,1 +/- 1,0	9,0 +/- 1,4	5,5 +/- 1,0	7,0 +/- 0,4	5,5 +/- 0,8
T-2	18,8 +/- 1,9	19,1 +/- 0,6	21,6 +/- 2,6	11,8 +/- 1,3	14,5 +/- 0,3	12,4 +/- 1,3
T-3*	0,7 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	0,7 +/- 0,0	0,3 +/- 0,0
T-4	1,1 +/- 0,2	0,6 +/- 0,1	1,3 +/- 0,1	28,2 +/- 0,5	29,6 +/- 2,8	46,9 +/- 1,2
T-5	11,6 +/- 0,6	9,9 +/- 0,5	11,0 +/- 1,1	7,7 +/- 0,7	8,2 +/- 0,4	7,8 +/- 0,6
T-6	9,3 +/- 0,8	9,5 +/- 1,4	8,8 +/- 1,3	6,5 +/- 0,6	5,5 +/- 0,5	5,5 +/- 0,3
T-7	4,5 +/- 0,5	5,4 +/- 0,6	9,4 +/- 1,4	4,6 +/- 0,7	4,5 +/- 0,6	5,0 +/- 0,8
T-8	15,7 +/- 2,3	19,0 +/- 0,7	27,8 +/- 4,7	22,7 +/- 2,1	22,3 +/- 1,0	23,5 +/- 2,3
T-9	nd	nd	nd	6,6 +/- 0,3	10,8 +/- 0,5	12,6 +/- 0,5
T-10	2,0 +/- 0,3	1,6 +/- 0,2	1,9 +/- 0,4	1,3 +/- 0,1	1,9 +/- 0,2	1,4 +/- 0,1
T-11	5,1 +/- 0,7	4,0 +/- 0,2	5,7 +/- 1,4	3,9 +/- 0,5	4,5 +/- 0,3	4,4 +/- 0,5
T-12	8,6 +/- 0,9	8,0 +/- 0,9	12,1 +/- 1,0	5,7 +/- 0,8	7,1 +/- 0,9	7,2 +/- 0,5
T-13	45,9 +/- 5,4	31,9 +/- 1,4	36,2 +/- 6,4	41,9 +/- 3,3	43,9 +/- 4,1	36,6 +/- 5,0
T-14	41,4 +/- 3,3	39,0 +/- 2,1	42,6 +/- 3,7	48,3 +/- 3,0	51,2 +/- 3,5	49,3 +/- 3,0
T-15	12,7 +/- 1,6	9,6 +/- 0,5	15,5 +/- 2,4	17,8 +/- 4,1	26,5 +/- 3,3	26,8 +/- 2,8
T-16*	nd	nd	nd	4,7 +/- 0,9	7,2 +/- 1,0	7,6 +/- 1,1
T-17*	nd	nd	nd	7,5 +/- 0,4	10,6 +/- 1,9	13,4 +/- 2,2
T-18	nd	nd	nd	7,4 +/- 1,1	10,9 +/- 1,5	14,2 +/- 2,0
T-19	8,5 +/- 1,3	0,0 +/- 0,0	7,2 +/- 1,4	82,9 +/- 8,0	92,6 +/- 13,0	100,4 +/- 19,8
T-20	8,4 +/- 1,4	6,3 +/- 1,0	7,6 +/- 1,1	8,6 +/- 1,2	10,2 +/- 1,7	9,3 +/- 1,2
T-21	6,3 +/- 0,3	6,5 +/- 0,7	9,5 +/- 1,2	6,3 +/- 0,3	7,1 +/- 1,2	7,4 +/- 1,4
Somme	**207,7 +/- 8,0**	**179,0 +/- 7,2**	**227,8 +/- 27,1**	**330,6 +/- 15,6**	**376,8 +/- 27,3**	**397,6 +/- 37,1**
Phénols volatils						
P-1*	1,3 +/- 0,4	1,6 +/- 0,2	2,0 +/- 0,5	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0
P-2	8,8 +/- 0,5	6,8 +/- 1,0	8,4 +/- 0,9	11,4 +/- 1,6	11,0 +/- 0,5	11,3 +/- 1,3
P-3	10,3 +/- 1,1	7,6 +/- 0,6	9,1 +/- 1,2	7,6 +/- 0,4	7,2 +/- 1,3	7,2 +/- 0,4
P-4	2,2 +/- 0,3	2,8 +/- 0,1	3,6 +/- 0,4	4,7 +/- 0,3	5,6 +/- 0,6	5,4 +/- 0,9
P-5	5,2 +/- 0,4	3,6 +/- 0,3	5,5 +/- 0,6	1,5 +/- 0,1	1,5 +/- 0,2	1,5 +/- 0,2
Somme	**27,8 +/- 1,5**	**22,5 +/- 1,6**	**28,6 +/- 3,0**	**25,2 +/- 1,5**	**25,3 +/- 2,2**	**25,4 +/- 1,5**
Composé en C_6						
C6-1	22,4 +/- 2,7	36,5 +/- 2,8	45,7 +/- 8,4	31,3 +/- 0,8	41,4 +/- 2,9	48,0 +/- 5,2
C6-2	1,5 +/- 0,3	1,7 +/- 0,2	2,1 +/- 0,3	0,9 +/- 0,0	1,1 +/- 0,1	1,0 +/- 0,1
C6-3	1,8 +/- 0,3	1,4 +/- 0,2	1,9 +/- 0,2	0,7 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1
Somme	**25,8 +/- 3,1**	**39,6 +/- 3,1**	**49,6 +/- 8,9**	**32,8 +/- 0,9**	**43,2 +/- 2,8**	**49,7 +/- 5,3**
Alcools						
A-1	4,0 +/- 0,9	3,7 +/- 0,4	4,7 +/- 0,9	2,5 +/- 0,3	1,9 +/- 0,2	1,9 +/- 0,1
A-2	2,5 +/- 0,3	4,7 +/- 0,6	11,2 +/- 1,9	1,3 +/- 0,2	2,7 +/- 0,4	2,7 +/- 0,4
A-3	2,9 +/- 0,3	4,0 +/- 0,7	6,7 +/- 1,0	1,7 +/- 0,1	2,6 +/- 0,2	2,7 +/- 0,4
A-4	2,6 +/- 0,3	4,4 +/- 0,4	8,5 +/- 0,8	2,1 +/- 0,1	3,4 +/- 0,4	3,9 +/- 0,5
A-5*	1,8 +/- 0,4	3,3 +/- 0,4	7,7 +/- 0,9	1,3 +/- 0,2	2,6 +/- 0,4	2,6 +/- 0,3
A-6	34,3 +/- 2,3	51,2 +/- 4,2	49,8 +/- 1,5	17,2 +/- 1,5	24,2 +/- 0,9	25,6 +/- 1,5
A-7	47,2 +/- 1,6	64,2 +/- 4,6	66,8 +/- 11,6	47,6 +/- 4,0	62,0 +/- 4,1	73,1 +/- 8,4
Somme	**95,1 +/- 5,2**	**135,6 +/- 9,4**	**155,4 +/- 17,0**	**73,8 +/- 5,2**	**99,4 +/- 3,4**	**112,6 +/- 9,7**
Total	**1409,3 +/- 116,1**	**1435,5 +/- 29,5**	**1875,5 +/- 187,1**	**1126,5 +/- 55,5**	**1301,4 +/- 95,2**	**1384,9 +/- 146,1**

Annexe 8 : Teneurs en glycosides des jus de Petit et Gros Manseng des 2 parcelles du site F en 2003 (moyenne de 4 répétitions, exprimées en µg/L équivalents de 4-nonanol ; * composés non dosés en 2002 ; nd non détecté).

	3TG1	3TG2	3TG3	3TP1	3TP2	3TP3
C_{13}-norisoprénoïdes						
C13-1	9,5 +/- 0,3	8,0 +/- 0,7	11,1 +/- 1,5	7,0 +/- 0,3	6,3 +/- 0,6	7,3 +/- 0,6
C13-2	31,1 +/- 2,4	27,6 +/- 2,4	39,6 +/- 3,6	22,6 +/- 2,1	22,2 +/- 1,1	25,5 +/- 3,0
C13-3	50,0 +/- 1,8	38,2 +/- 3,9	43,9 +/- 4,0	46,2 +/- 1,7	40,3 +/- 2,2	37,6 +/- 8,5
C13-4	24,8 +/- 1,2	15,9 +/- 2,0	23,9 +/- 2,3	14,1 +/- 0,5	12,6 +/- 1,7	11,4 +/- 1,6
C13-5	45,5 +/- 1,8	51,1 +/- 6,1	74,2 +/- 9,2	112,6 +/- 7,9	120,5 +/- 11,4	114,2 +/- 8,5
C13-6	4,5 +/- 0,7	6,2 +/- 0,2	10,1 +/- 1,5	17,3 +/- 0,8	19,7 +/- 2,1	16,3 +/- 1,7
C13-7	257,4 +/- 12,5	238,4 +/- 29,0	316,2 +/- 32,8	210,5 +/- 17,9	206,2 +/- 16,5	200,9 +/- 13,5
C13-8	99,1 +/- 4,2	71,6 +/- 6,8	89,5 +/- 11,1	57,7 +/- 7,6	48,7 +/- 2,7	44,0 +/- 4,1
C13-9	13,2 +/- 0,5	12,2 +/- 1,2	14,3 +/- 1,9	24,1 +/- 1,9	25,1 +/- 0,9	21,2 +/- 2,7
C13-10	97,8 +/- 4,9	84,8 +/- 11,6	110,2 +/- 12,2	78,3 +/- 10,1	72,6 +/- 3,4	71,6 +/- 6,0
C13-11	3,2 +/- 0,3	2,8 +/- 0,2	3,5 +/- 0,6	4,4 +/- 1,0	3,3 +/- 0,5	3,3 +/- 0,7
C13-12	4,5 +/- 0,2	4,8 +/- 0,2	6,0 +/- 1,1	7,4 +/- 0,9	7,5 +/- 0,8	8,9 +/- 1,0
C13-13	37,8 +/- 1,2	30,0 +/- 3,3	34,5 +/- 4,6	48,4 +/- 5,2	40,4 +/- 3,4	38,3 +/- 3,4
C13-14	8,2 +/- 0,7	9,7 +/- 0,7	8,9 +/- 1,0	16,2 +/- 1,2	17,0 +/- 1,0	18,9 +/- 1,8
C13-15*	13,0 +/- 0,5	10,3 +/- 1,2	12,0 +/- 1,3	4,7 +/- 0,4	4,8 +/- 0,2	4,9 +/- 0,3
C13-16*	10,8 +/- 2,3	11,7 +/- 1,4	7,3 +/- 0,1	12,5 +/- 1,8	13,0 +/- 2,3	8,1 +/- 0,9
C13-17	15,1 +/- 3,0	16,9 +/- 1,4	12,7 +/- 1,8	10,9 +/- 2,1	15,3 +/- 3,1	9,7 +/- 1,2
Somme	**725,5 +/- 33,4**	**640,3 +/- 66,0**	**817,9 +/- 85,5**	**695,0 +/- 49,6**	**675,5 +/- 45,7**	**642,1 +/- 54,3**
Monoterpènols						
T-1	5,3 +/- 0,4	5,0 +/- 0,7	3,8 +/- 0,8	5,1 +/- 0,7	4,4 +/- 0,8	3,9 +/- 0,8
T-2	16,3 +/- 0,7	14,2 +/- 1,7	9,9 +/- 1,6	12,7 +/- 1,0	10,7 +/- 1,6	8,5 +/- 1,2
T-3*	0,6 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	0,9 +/- 0,2	0,7 +/- 0,2	0,5 +/- 0,1
T-4	1,5 +/- 0,1	1,1 +/- 0,2	1,3 +/- 0,2	70,5 +/- 4,1	54,4 +/- 2,8	53,2 +/- 3,1
T-5	10,5 +/- 0,6	9,3 +/- 1,4	6,9 +/- 0,8	8,6 +/- 0,7	7,1 +/- 1,0	6,1 +/- 0,7
T-6	6,6 +/- 0,5	5,0 +/- 0,8	3,7 +/- 0,4	4,6 +/- 0,7	3,6 +/- 0,5	2,7 +/- 0,4
T-7	5,3 +/- 0,6	5,1 +/- 0,9	7,6 +/- 1,5	5,4 +/- 0,5	6,0 +/- 1,4	5,1 +/- 1,0
T-8	16,9 +/- 0,9	15,0 +/- 2,7	20,3 +/- 3,6	25,6 +/- 0,9	22,6 +/- 2,7	18,9 +/- 3,0
T-9	0,6 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	1,2 +/- 0,4	7,9 +/- 0,4	6,7 +/- 0,8	5,0 +/- 0,8
T-10	1,7 +/- 0,2	1,8 +/- 0,3	1,3 +/- 0,3	2,4 +/- 0,3	1,9 +/- 0,2	1,3 +/- 0,2
T-11	4,9 +/- 0,3	5,1 +/- 0,5	5,3 +/- 0,7	3,3 +/- 0,2	2,7 +/- 0,7	2,9 +/- 0,5
T-12	7,8 +/- 1,0	6,5 +/- 0,5	8,3 +/- 1,2	7,0 +/- 0,8	6,3 +/- 1,1	5,8 +/- 1,7
T-13	36,5 +/- 2,3	29,1 +/- 4,5	27,2 +/- 2,9	44,1 +/- 2,2	35,2 +/- 3,6	28,4 +/- 4,2
T-14	34,9 +/- 2,1	31,9 +/- 4,6	35,7 +/- 2,8	40,9 +/- 1,9	39,7 +/- 3,9	30,4 +/- 4,7
T-15	14,4 +/- 1,0	13,4 +/- 1,8	21,0 +/- 1,9	24,7 +/- 1,3	24,6 +/- 1,5	21,3 +/- 4,1
T-16*	nd	nd	nd	8,7 +/- 0,8	8,3 +/- 1,0	7,3 +/- 1,3
T-17*	nd	nd	nd	11,4 +/- 0,8	10,8 +/- 1,7	8,3 +/- 0,9
T-18	nd	nd	nd	14,9 +/- 1,3	11,8 +/- 1,8	9,5 +/- 1,8
T-19	7,7 +/- 1,1	7,5 +/- 1,0	5,8 +/- 0,6	118,8 +/- 10,7	108,0 +/- 19,3	85,9 +/- 10,4
T-20	6,1 +/- 0,7	5,0 +/- 0,7	5,7 +/- 0,5	8,4 +/- 0,9	7,5 +/- 1,3	5,8 +/- 0,8
T-21	3,9 +/- 0,8	2,3 +/- 0,3	3,6 +/- 0,4	3,6 +/- 0,4	3,7 +/- 0,6	3,3 +/- 0,4
Somme	**181,6 +/- 9,1**	**158,1 +/- 20,4**	**169,2 +/- 17,4**	**429,6 +/- 21,5**	**376,7 +/- 32,1**	**314,1 +/- 39,2**
Phénols volatils						
P-1*	0,6 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	0,2 +/- 0,0	nd	nd	nd
P-2	8,2 +/- 0,6	7,5 +/- 0,2	7,4 +/- 1,0	13,6 +/- 0,4	10,1 +/- 1,6	7,1 +/- 1,9
P-3	9,8 +/- 1,1	7,6 +/- 1,2	5,9 +/- 0,5	6,2 +/- 0,8	4,8 +/- 0,7	4,0 +/- 0,7
P-4	2,1 +/- 0,2	2,0 +/- 0,2	2,6 +/- 0,4	4,8 +/- 0,4	4,5 +/- 0,5	4,0 +/- 0,2
P-5	2,4 +/- 0,2	2,1 +/- 0,2	1,7 +/- 0,2	1,6 +/- 0,1	0,8 +/- 0,2	0,6 +/- 0,1
Somme	**23,1 +/- 0,9**	**19,7 +/- 1,6**	**17,8 +/- 1,4**	**26,2 +/- 0,5**	**20,3 +/- 2,0**	**15,7 +/- 2,8**
Composé en C_6						
C6-1	32,7 +/- 1,5	32,7 +/- 2,1	38,6 +/- 7,5	22,9 +/- 1,8	40,1 +/- 2,7	45,4 +/- 3,7
C6-2	1,4 +/- 0,1	1,2 +/- 0,1	0,9 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1	1,5 +/- 1,1
C6-3	1,4 +/- 0,1	1,0 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1	0,7 +/- 0,2	0,7 +/- 0,1	1,1 +/- 1,1
Somme	**35,5 +/- 1,5**	**34,9 +/- 2,3**	**40,2 +/- 7,7**	**24,2 +/- 2,0**	**41,5 +/- 2,7**	**47,9 +/- 4,2**
Alcools						
A-1	2,6 +/- 0,2	2,5 +/- 0,3	1,9 +/- 0,4	2,1 +/- 0,3	2,2 +/- 0,3	1,9 +/- 0,2
A-2	2,6 +/- 0,4	3,0 +/- 0,4	5,1 +/- 1,0	2,8 +/- 0,3	3,7 +/- 0,7	2,7 +/- 1,8
A-3	3,6 +/- 0,4	3,0 +/- 0,1	6,0 +/- 0,9	1,8 +/- 0,4	2,5 +/- 0,3	1,9 +/- 1,3
A-4	4,2 +/- 0,2	3,8 +/- 0,4	8,5 +/- 1,6	2,2 +/- 0,3	3,3 +/- 0,6	3,7 +/- 1,0
A-5*	2,5 +/- 0,3	2,6 +/- 0,4	4,8 +/- 0,7	2,6 +/- 0,4	3,3 +/- 0,3	2,7 +/- 0,5
A-6	27,2 +/- 3,9	30,8 +/- 2,6	15,1 +/- 1,6	9,8 +/- 1,1	10,5 +/- 1,8	5,3 +/- 0,7
A-7	52,1 +/- 4,0	45,6 +/- 5,4	37,7 +/- 5,0	43,5 +/- 2,5	45,0 +/- 2,0	39,5 +/- 2,8
Somme	**94,8 +/- 8,7**	**91,2 +/- 9,3**	**79,1 +/- 10,7**	**64,7 +/- 4,0**	**70,4 +/- 5,5**	**57,7 +/- 4,9**
Total	**1060,5 +/- 36,7**	**944,3 +/- 98,4**	**1124,2 +/- 114,9**	**1239,7 +/- 61,8**	**1184,3 +/- 65,9**	**1077,5 +/- 98,3**

Annexe 9 : Teneurs en glycosides des jus de Petit et Gros Manseng des 2 parcelles du site T en 2003 (moyenne de 4 répétitions, exprimées en µg/L équivalents de 4-nonanol ; * composés non dosés en 2002 ; nd non détecté ; cf. codification V.1.1).

	4GG1	4GG2	4GG3	4GP1	4GP2	4GP3
C_{13}-norisoprénoïdes						
C13-1	4,5 +/- 0,1	4,6 +/- 0,4	5,5 +/- 0,9	4,5 +/- 0,6	6,0 +/- 0,1	6,2 +/- 0,5
C13-2	11,7 +/- 1,7	9,2 +/- 0,5	16,1 +/- 1,7	7,9 +/- 0,5	12,7 +/- 1,6	14,7 +/- 1,9
C13-3	30,1 +/- 3,2	32,7 +/- 1,5	32,9 +/- 4,2	28,5 +/- 1,6	31,1 +/- 1,0	28,2 +/- 3,7
C13-4	9,9 +/- 0,8	9,9 +/- 1,1	12,2 +/- 2,2	6,0 +/- 0,5	6,7 +/- 0,6	7,0 +/- 0,9
C13-5	29,4 +/- 0,9	22,3 +/- 1,0	41,6 +/- 5,7	27,4 +/- 2,5	41,6 +/- 1,3	51,9 +/- 5,3
C13-6	3,3 +/- 0,1	3,2 +/- 0,3	3,5 +/- 0,4	3,0 +/- 0,3	3,4 +/- 1,2	2,7 +/- 0,1
C13-7	153,6 +/- 9,4	122,6 +/- 11,3	170,2 +/- 21,1	93,8 +/- 4,7	119,6 +/- 4,4	129,9 +/- 9,4
C13-8	16,8 +/- 0,6	16,4 +/- 0,8	13,9 +/- 1,5	28,9 +/- 1,3	32,6 +/- 2,2	28,8 +/- 3,4
C13-9	42,9 +/- 1,1	44,4 +/- 2,1	45,0 +/- 6,4	31,1 +/- 2,4	36,3 +/- 2,1	36,6 +/- 2,8
C13-10	7,8 +/- 0,4	8,3 +/- 0,9	10,2 +/- 0,6	8,2 +/- 1,2	12,9 +/- 1,9	14,6 +/- 0,3
C13-11	51,4 +/- 2,9	47,7 +/- 2,7	62,1 +/- 8,4	30,1 +/- 2,5	39,9 +/- 3,7	44,7 +/- 3,3
C13-12	4,5 +/- 0,4	4,9 +/- 0,7	5,3 +/- 0,7	4,2 +/- 0,2	4,5 +/- 0,5	4,5 +/- 0,5
C13-13	2,9 +/- 0,5	2,2 +/- 0,2	3,3 +/- 0,5	3,3 +/- 0,5	4,6 +/- 0,1	5,2 +/- 0,1
C13-14	19,1 +/- 0,6	20,2 +/- 1,9	19,9 +/- 2,6	21,9 +/- 1,8	25,9 +/- 1,1	27,0 +/- 3,9
C13-15*	6,3 +/- 0,9	6,0 +/- 0,8	5,9 +/- 0,7	6,3 +/- 0,6	8,3 +/- 0,3	8,3 +/- 0,9
C13-16*	6,0 +/- 0,3	7,7 +/- 1,2	5,5 +/- 0,9	6,5 +/- 1,2	7,1 +/- 0,6	5,6 +/- 0,4
C13-17	22,4 +/- 2,0	27,5 +/- 5,9	13,6 +/- 2,4	21,7 +/- 3,8	26,0 +/- 2,5	11,3 +/- 2,7
Somme	**422,5 +/- 20,3**	**389,7 +/- 14,4**	**466,5 +/- 54,6**	**333,3 +/- 21,5**	**419,4 +/- 18,6**	**427,1 +/- 39,4**
Monoterpènols						
T-1	2,8 +/- 0,5	3,3 +/- 0,4	2,4 +/- 0,6	3,2 +/- 0,1	3,9 +/- 0,6	3,4 +/- 0,4
T-2	5,2 +/- 0,9	6,3 +/- 0,8	5,3 +/- 1,2	4,4 +/- 0,5	4,8 +/- 0,8	4,2 +/- 0,1
T-3*	0,0 +/- 0,0	0,7 +/- 0,1	0,5 +/- 0,0	0,8 +/- 0,1	0,9 +/- 0,2	0,6 +/- 0,1
T-4	nd	nd	nd	15,0 +/- 1,1	15,5 +/- 2,0	16,2 +/- 0,4
T-5	4,5 +/- 0,8	5,0 +/- 0,2	4,6 +/- 0,9	3,6 +/- 0,1	4,8 +/- 0,5	3,9 +/- 0,2
T-6	3,6 +/- 0,6	5,1 +/- 0,7	3,6 +/- 0,6	2,9 +/- 0,2	4,3 +/- 0,6	2,8 +/- 0,4
T-7	4,1 +/- 0,7	5,6 +/- 0,2	5,0 +/- 1,0	4,4 +/- 0,2	6,2 +/- 0,8	5,9 +/- 0,6
T-8	10,0 +/- 1,2	12,6 +/- 0,6	9,8 +/- 1,6	11,0 +/- 1,1	13,7 +/- 1,2	12,4 +/- 1,5
T-9	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	2,7 +/- 0,4	2,9 +/- 0,4	3,2 +/- 0,5
T-10	2,0 +/- 0,3	3,2 +/- 1,3	1,5 +/- 0,3	3,3 +/- 0,4	2,8 +/- 0,5	2,1 +/- 0,5
T-11	5,0 +/- 0,4	14,0 +/- 1,9	5,5 +/- 1,1	5,5 +/- 0,8	5,9 +/- 0,5	5,2 +/- 0,6
T-12	4,8 +/- 0,3	5,0 +/- 0,5	5,3 +/- 0,9	4,5 +/- 0,6	5,6 +/- 0,3	5,8 +/- 0,4
T-13	26,0 +/- 1,0	32,6 +/- 2,8	22,9 +/- 3,4	41,9 +/- 3,7	41,8 +/- 2,2	34,7 +/- 5,2
T-14	20,9 +/- 0,7	24,0 +/- 2,3	21,0 +/- 3,2	26,6 +/- 2,4	30,8 +/- 1,2	26,5 +/- 3,8
T-15	7,6 +/- 0,6	8,1 +/- 0,9	9,3 +/- 2,2	15,1 +/- 1,4	21,7 +/- 2,0	19,0 +/- 1,9
T-16*	nd	nd	nd	nd	9,9 +/- 0,3	8,6 +/- 1,6
T-17*	nd	nd	nd	11,9 +/- 1,8	nd	nd
T-18	nd	nd	nd	nd	nd	nd
T-19	4,8 +/- 0,8	5,6 +/- 0,6	3,6 +/- 0,6	79,4 +/- 9,0	60,9 +/- 4,2	48,5 +/- 10,1
T-20	5,5 +/- 1,0	5,0 +/- 0,4	3,0 +/- 0,1	4,9 +/- 0,6	5,2 +/- 0,5	4,5 +/- 0,5
T-21	3,2 +/- 0,2	3,2 +/- 0,2	2,6 +/- 0,2	3,0 +/- 0,4	3,1 +/- 0,4	3,2 +/- 0,5
Somme	**110,1 +/- 7,7**	**139,4 +/- 8,3**	**106,0 +/- 16,8**	**244,0 +/- 23,5**	**244,9 +/- 14,5**	**210,4 +/- 26,9**
Phénols volatils						
P-1*	0,8 +/- 0,4	1,7 +/- 1,0	1,0 +/- 0,2	0,9 +/- 0,4	1,1 +/- 0,3	1,1 +/- 0,0
P-2	5,1 +/- 0,4	5,6 +/- 0,4	4,7 +/- 0,3	7,9 +/- 0,5	9,8 +/- 0,6	8,3 +/- 1,0
P-3	8,0 +/- 0,3	12,4 +/- 4,4	9,6 +/- 1,4	8,9 +/- 1,3	7,9 +/- 0,5	7,1 +/- 0,6
P-4	25,1 +/- 2,5	31,3 +/- 7,6	28,2 +/- 3,1	18,9 +/- 1,4	22,5 +/- 1,9	30,4 +/- 7,7
P-5	4,2 +/- 0,7	4,4 +/- 0,8	6,1 +/- 0,6	3,4 +/- 0,6	3,3 +/- 0,6	3,0 +/- 0,2
Somme	**43,2 +/- 3,8**	**55,5 +/- 13,4**	**49,6 +/- 4,9**	**40,0 +/- 2,5**	**44,6 +/- 1,4**	**50,0 +/- 6,5**
Composé en C_6						
C6-1	14,4 +/- 4,0	21,8 +/- 5,0	27,0 +/- 4,9	20,7 +/- 3,7	32,9 +/- 2,5	54,7 +/- 3,6
C6-2	1,2 +/- 0,4	2,0 +/- 1,1	1,5 +/- 0,1	0,9 +/- 0,2	0,7 +/- 0,2	0,7 +/- 0,1
C6-3	1,6 +/- 0,9	2,9 +/- 1,2	2,1 +/- 0,1	1,9 +/- 0,8	0,8 +/- 0,1	1,4 +/- 0,1
Somme	**17,2 +/- 5,3**	**26,8 +/- 7,1**	**30,5 +/- 5,1**	**23,5 +/- 3,2**	**34,3 +/- 2,6**	**56,8 +/- 3,6**
Alcools						
A-1	1,6 +/- 0,6	2,4 +/- 0,3	1,7 +/- 0,5	2,5 +/- 0,4	3,2 +/- 0,5	3,0 +/- 0,4
A-2	1,7 +/- 0,9	2,0 +/- 0,2	3,2 +/- 0,5	1,4 +/- 0,1	2,6 +/- 0,3	3,5 +/- 0,1
A-3	3,8 +/- 0,5	3,6 +/- 0,3	4,1 +/- 0,5	3,6 +/- 0,8	3,4 +/- 0,1	3,5 +/- 0,2
A-4	1,6 +/- 0,8	2,6 +/- 0,2	3,4 +/- 0,5	1,7 +/- 0,2	2,7 +/- 0,3	3,6 +/- 0,3
A-5*	1,8 +/- 0,5	2,0 +/- 0,2	2,8 +/- 0,5	1,6 +/- 0,2	2,5 +/- 0,3	3,2 +/- 0,1
A-6	16,9 +/- 2,5	29,8 +/- 23,0	10,4 +/- 2,2	7,0 +/- 0,9	6,8 +/- 0,4	4,7 +/- 0,9
A-7	32,0 +/- 0,9	51,7 +/- 34,5	32,5 +/- 6,3	33,4 +/- 7,4	32,9 +/- 1,7	34,7 +/- 11,4
Somme	**59,4 +/- 5,4**	**94,2 +/- 57,3**	**57,9 +/- 9,5**	**51,1 +/- 8,8**	**54,1 +/- 0,1**	**56,2 +/- 12,4**
Total	**652,3 +/- 41,7**	**705,6 +/- 78,4**	**710,5 +/- 87,7**	**691,9 +/- 56,1**	**797,3 +/- 33,0**	**800,6 +/- 75,1**

Annexe 10 : Teneurs en glycosides des jus de Petit et Gros Manseng des 2 parcelles du site G en 2004 (moyenne de 4 répétitions, exprimées en µg/L équivalents de 4-nonanol ; * composés non dosés en 2002 ; nd non détecté ; cf. codification V.1.1).

	4FG1	4FG2	4FG3	4FP1	4FP2	4FP3
C_{13}-norisoprénoïdes						
C13-1	5,3 +/- 0,3	5,2 +/- 0,3	7,9 +/- 0,5	4,8 +/- 0,8	5,3 +/- 0,4	7,4 +/- 0,9
C13-2	11,7 +/- 0,3	14,3 +/- 1,1	21,8 +/- 2,0	8,3 +/- 1,1	10,1 +/- 1,0	18,2 +/- 2,8
C13-3	40,7 +/- 2,1	35,5 +/- 2,6	44,7 +/- 1,6	34,2 +/- 3,7	33,4 +/- 1,8	43,9 +/- 1,6
C13-4	8,9 +/- 1,0	8,2 +/- 0,8	9,7 +/- 1,2	4,8 +/- 0,6	4,9 +/- 0,7	6,3 +/- 0,3
C13-5	25,3 +/- 1,1	38,1 +/- 3,4	52,5 +/- 2,4	23,6 +/- 3,1	30,7 +/- 2,8	49,5 +/- 2,2
C13-6	4,0 +/- 0,2	3,3 +/- 0,5	5,7 +/- 0,4	3,0 +/- 0,4	2,7 +/- 0,6	3,4 +/- 0,2
C13-7	142,7 +/- 5,5	160,1 +/- 10,3	218,3 +/- 13,1	81,1 +/- 10,0	89,9 +/- 5,6	125,8 +/- 9,4
C13-8	15,5 +/- 1,2	14,4 +/- 1,3	17,3 +/- 1,2	32,1 +/- 3,9	30,2 +/- 1,4	30,0 +/- 0,9
C13-9	41,7 +/- 2,0	35,8 +/- 2,8	48,4 +/- 3,6	26,9 +/- 3,7	26,1 +/- 3,0	35,7 +/- 3,2
C13-10	6,8 +/- 0,6	7,6 +/- 0,7	10,1 +/- 0,8	7,5 +/- 0,9	10,4 +/- 0,9	12,8 +/- 1,2
C13-11	51,1 +/- 4,1	52,9 +/- 4,5	74,4 +/- 4,1	28,5 +/- 3,7	34,0 +/- 3,3	49,9 +/- 5,1
C13-12	5,6 +/- 0,8	5,3 +/- 0,6	7,5 +/- 1,1	6,0 +/- 0,6	6,8 +/- 0,8	7,8 +/- 0,6
C13-13	2,4 +/- 0,2	2,8 +/- 0,3	3,2 +/- 0,3	3,1 +/- 0,3	2,6 +/- 0,3	3,8 +/- 0,3
C13-14	26,0 +/- 1,3	27,4 +/- 1,8	31,7 +/- 2,6	26,9 +/- 2,7	30,2 +/- 1,3	36,4 +/- 2,4
C13-15*	4,7 +/- 0,5	4,5 +/- 0,2	7,0 +/- 0,9	6,8 +/- 1,0	6,9 +/- 0,9	9,3 +/- 1,1
C13-16*	5,8 +/- 0,5	6,3 +/- 0,5	7,0 +/- 0,2	4,2 +/- 2,9	5,8 +/- 0,6	7,6 +/- 0,8
C13-17	33,8 +/- 4,4	31,3 +/- 3,4	64,2 +/- 9,1	34,6 +/- 6,1	30,6 +/- 6,3	36,4 +/- 8,6
Somme	**431,9 +/- 23,1**	**453,2 +/- 32,0**	**631,3 +/- 39,5**	**336,5 +/- 40,8**	**360,7 +/- 19,8**	**484,4 +/- 36,6**
Monoterpènols						
T-1	2,5 +/- 0,2	1,7 +/- 0,2	3,4 +/- 0,3	2,9 +/- 0,2	3,0 +/- 0,3	3,1 +/- 0,5
T-2	4,8 +/- 0,4	3,0 +/- 0,4	5,5 +/- 0,5	4,7 +/- 0,6	4,2 +/- 0,6	4,9 +/- 0,8
T-3*	0,5 +/- 0,1	0,0 +/- 0,0	0,6 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	0,5 +/- 0,0	0,7 +/- 0,1
T-4	nd	nd	nd	13,6 +/- 1,2	14,6 +/- 1,3	21,0 +/- 2,2
T-5	3,8 +/- 0,3	2,9 +/- 0,1	4,8 +/- 0,3	3,4 +/- 0,4	3,2 +/- 0,2	4,0 +/- 0,6
T-6	5,6 +/- 0,4	4,4 +/- 0,4	6,9 +/- 0,4	5,3 +/- 0,7	4,5 +/- 0,5	4,7 +/- 0,6
T-7	3,4 +/- 0,3	3,0 +/- 0,4	3,8 +/- 0,4	2,6 +/- 0,4	3,3 +/- 0,5	4,2 +/- 0,4
T-8	10,6 +/- 0,7	10,4 +/- 1,1	10,6 +/- 1,1	9,8 +/- 0,9	10,4 +/- 0,9	12,7 +/- 1,1
T-9	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	9,2 +/- 1,4	7,8 +/- 0,8	7,1 +/- 1,0
T-10	1,7 +/- 0,2	1,5 +/- 0,2	1,9 +/- 0,3	3,3 +/- 0,2	2,5 +/- 0,3	2,6 +/- 0,3
T-11	3,1 +/- 0,3	3,1 +/- 0,4	5,1 +/- 0,7	3,6 +/- 0,3	3,1 +/- 0,3	6,6 +/- 0,2
T-12	5,4 +/- 0,4	5,2 +/- 0,4	7,3 +/- 0,9	4,1 +/- 0,3	4,4 +/- 0,2	13,0 +/- 1,4
T-13	18,3 +/- 0,7	17,0 +/- 1,1	24,5 +/- 2,3	36,4 +/- 3,8	34,1 +/- 1,6	41,8 +/- 2,8
T-14	21,4 +/- 0,9	23,7 +/- 2,1	29,7 +/- 2,8	27,5 +/- 2,6	28,9 +/- 0,9	38,5 +/- 4,0
T-15	6,7 +/- 0,2	5,9 +/- 0,6	8,9 +/- 1,2	15,7 +/- 1,4	17,7 +/- 0,8	23,5 +/- 2,4
T-16*	nd	nd	nd	6,2 +/- 0,8	5,3 +/- 0,3	7,6 +/- 0,7
T-17*	nd	nd	nd	11,5 +/- 1,3	12,1 +/- 1,1	16,0 +/- 1,1
T-18	1,5 +/- 0,0	1,2 +/- 0,2	nd	7,2 +/- 0,8	6,8 +/- 0,3	10,5 +/- 1,2
T-19	4,1 +/- 0,6	4,2 +/- 0,5	5,3 +/- 0,5	102,8 +/- 15,2	100,6 +/- 7,7	127,2 +/- 9,1
T-20	4,1 +/- 0,2	3,0 +/- 0,4	4,0 +/- 0,5	3,4 +/- 0,4	3,6 +/- 0,7	5,1 +/- 0,4
T-21	3,0 +/- 0,4	2,3 +/- 0,2	2,9 +/- 0,5	2,8 +/- 0,3	2,3 +/- 0,2	3,7 +/- 0,4
Somme	**100,3 +/- 2,8**	**89,0 +/- 9,2**	**125,2 +/- 10,1**	**276,8 +/- 31,0**	**272,6 +/- 14,5**	**358,4 +/- 26,7**
Phénols volatils						
P-1*	3,6 +/- 0,2	2,0 +/- 0,2	5,4 +/- 0,9	0,4 +/- 0,0	0,4 +/- 0,1	0,8 +/- 0,2
P-2	6,5 +/- 0,5	4,6 +/- 0,7	6,9 +/- 0,2	7,6 +/- 0,9	6,9 +/- 0,7	8,0 +/- 0,4
P-3	21,8 +/- 2,6	18,4 +/- 2,1	25,2 +/- 2,3	17,7 +/- 2,4	15,1 +/- 2,0	13,1 +/- 1,2
P-4	34,2 +/- 5,0	26,9 +/- 1,1	36,5 +/- 2,9	23,1 +/- 2,7	22,9 +/- 3,3	27,6 +/- 3,7
P-5	7,7 +/- 0,7	8,3 +/- 0,5	16,9 +/- 2,0	4,2 +/- 1,8	3,9 +/- 0,3	6,2 +/- 0,7
Somme	**74,0 +/- 8,3**	**59,7 +/- 4,8**	**90,9 +/- 7,6**	**53,1 +/- 6,8**	**49,2 +/- 5,5**	**55,7 +/- 4,5**
Composé en C_6						
C6-1	29,2 +/- 0,9	26,8 +/- 4,4	38,5 +/- 6,2	23,5 +/- 3,1	32,4 +/- 1,0	72,9 +/- 8,7
C6-2	4,2 +/- 0,3	2,7 +/- 0,5	3,4 +/- 0,4	1,8 +/- 0,3	1,5 +/- 0,1	2,2 +/- 0,3
C6-3	4,4 +/- 0,4	2,8 +/- 0,3	3,4 +/- 0,5	2,9 +/- 0,4	3,6 +/- 0,3	4,5 +/- 0,3
Somme	**37,9 +/- 1,6**	**32,3 +/- 5,1**	**45,3 +/- 6,8**	**28,2 +/- 3,7**	**37,6 +/- 1,3**	**79,5 +/- 9,2**
Alcools						
A-1	3,4 +/- 0,1	2,1 +/- 0,3	2,5 +/- 0,3	2,6 +/- 0,3	2,4 +/- 0,3	3,2 +/- 0,4
A-2	2,3 +/- 0,2	2,8 +/- 0,1	3,9 +/- 0,8	0,9 +/- 0,1	1,6 +/- 0,2	3,7 +/- 0,6
A-3	3,1 +/- 0,4	2,6 +/- 0,1	3,4 +/- 0,6	1,5 +/- 0,1	1,6 +/- 0,1	3,9 +/- 0,6
A-4	2,6 +/- 0,3	2,6 +/- 0,2	3,2 +/- 0,8	1,4 +/- 0,1	1,7 +/- 0,2	3,4 +/- 0,8
A-5*	2,2 +/- 0,2	2,7 +/- 0,2	3,3 +/- 0,5	1,0 +/- 0,2	1,4 +/- 0,2	3,5 +/- 0,3
A-6	71,8 +/- 9,7	43,3 +/- 3,3	80,4 +/- 8,2	45,2 +/- 6,6	41,5 +/- 8,1	34,1 +/- 2,5
A-7	106,1 +/- 6,8	94,2 +/- 7,6	113,6 +/- 9,1	110,8 +/- 9,2	102,3 +/- 11,6	101,5 +/- 5,8
Somme	**191,6 +/- 16,2**	**147,5 +/- 13,1**	**210,2 +/- 17,3**	**163,3 +/- 14,7**	**152,5 +/- 19,1**	**153,3 +/- 8,6**
Total	**835,6 +/- 49,4**	**781,7 +/- 57,9**	**1102,9 +/- 67,7**	**857,9 +/- 90,0**	**872,6 +/- 41,2**	**1131,2 +/- 71,3**

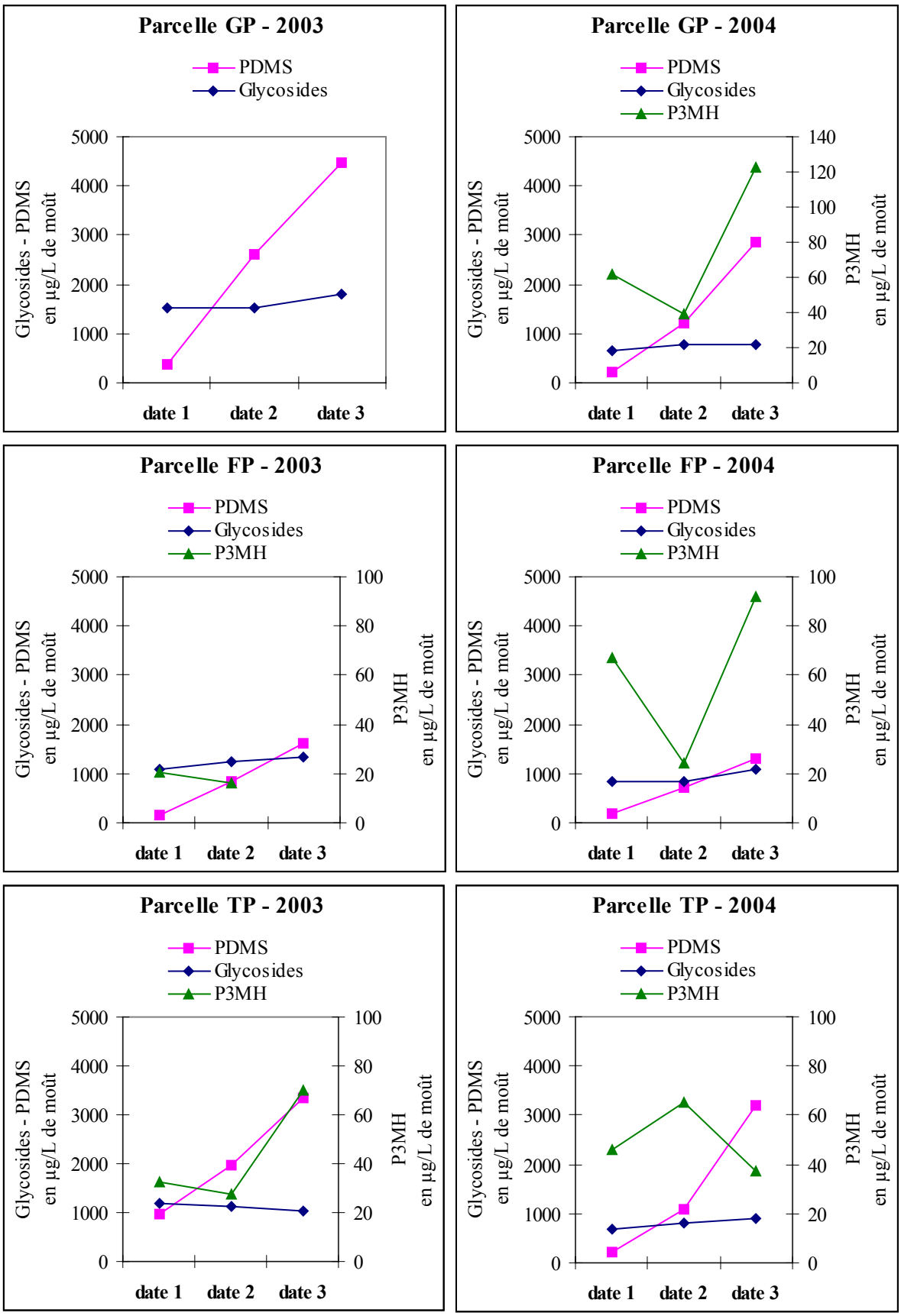
Annexe 11 : Teneurs en glycosides des jus de Petit et Gros Manseng des 2 parcelles du site F en 2004 (moyenne de 4 répétitions, exprimées en µg/L équivalents de 4-nonanol; * composés non dosés en 2002 ; nd non détecté ; cf. codification V.1.1).

	4TG1	4TG2	4TG3	4TP1	4TP2	4TP3
C_{13}-norisoprénoïdes						
C13-1	6,9 +/- 0,3	9,0 +/- 0,5	8,5 +/- 0,4	3,1 +/- 0,2	4,6 +/- 0,4	6,6 +/- 0,8
C13-2	15,7 +/- 2,7	26,1 +/- 1,4	26,0 +/- 2,2	7,7 +/- 0,9	13,4 +/- 0,6	18,6 +/- 1,6
C13-3	42,3 +/- 4,2	43,6 +/- 2,4	39,5 +/- 2,2	33,0 +/- 2,6	35,9 +/- 0,7	35,7 +/- 2,2
C13-4	15,7 +/- 1,6	19,2 +/- 1,3	20,5 +/- 1,3	10,8 +/- 1,0	7,6 +/- 0,9	8,7 +/- 0,8
C13-5	24,6 +/- 4,3	46,0 +/- 2,0	58,0 +/- 2,4	28,2 +/- 1,8	46,0 +/- 1,0	60,9 +/- 5,5
C13-6	4,2 +/- 0,4	4,9 +/- 0,6	4,9 +/- 0,6	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	6,2 +/- 0,9
C13-7	178,3 +/- 16,6	236,6 +/- 6,5	246,5 +/- 11,4	99,8 +/- 8,6	143,4 +/- 5,6	161,0 +/- 11,3
C13-8	16,1 +/- 3,4	19,1 +/- 0,9	15,8 +/- 0,0	28,4 +/- 1,3	23,9 +/- 1,1	26,5 +/- 2,7
C13-9	64,1 +/- 14,6	79,7 +/- 1,7	73,2 +/- 2,8	26,0 +/- 1,1	36,8 +/- 1,8	43,2 +/- 4,8
C13-10	9,1 +/- 4,9	11,6 +/- 0,4	12,3 +/- 1,1	9,5 +/- 0,4	13,0 +/- 0,4	14,8 +/- 2,4
C13-11	65,2 +/- 7,3	83,9 +/- 1,8	84,2 +/- 2,5	38,8 +/- 2,0	48,6 +/- 0,9	56,7 +/- 3,7
C13-12	2,6 +/- 1,5	2,9 +/- 0,2	3,3 +/- 0,4	1,4 +/- 0,1	2,8 +/- 0,4	3,0 +/- 0,3
C13-13	2,1 +/- 0,3	4,6 +/- 0,5	4,6 +/- 0,3	2,5 +/- 0,1	3,8 +/- 0,2	5,4 +/- 0,7
C13-14	21,7 +/- 4,2	28,7 +/- 1,0	26,1 +/- 0,9	21,7 +/- 0,3	28,2 +/- 0,5	31,8 +/- 2,6
C13-15*	3,7 +/- 1,1	6,9 +/- 0,5	6,6 +/- 0,9	7,4 +/- 0,2	8,3 +/- 0,8	9,5 +/- 0,8
C13-16*	9,3 +/- 1,4	12,7 +/- 1,5	9,4 +/- 0,6	5,1 +/- 0,6	8,1 +/- 0,8	7,3 +/- 1,6
C13-17	24,8 +/- 2,3	26,1 +/- 2,5	15,6 +/- 2,5	16,7 +/- 1,2	19,0 +/- 1,2	14,3 +/- 1,6
Somme	**506,2 +/- 57,4**	**658,7 +/- 17,7**	**654,9 +/- 28,3**	**340,2 +/- 16,0**	**443,3 +/- 11,9**	**510,4 +/- 34,7**
Monoterpènols						
T-1	5,5 +/- 1,2	6,8 +/- 0,5	5,3 +/- 1,1	5,9 +/- 0,9	5,8 +/- 0,8	7,0 +/- 0,9
T-2	15,0 +/- 1,5	17,3 +/- 1,2	14,2 +/- 2,5	13,3 +/- 1,9	13,6 +/- 1,7	15,2 +/- 1,2
T-3*	0,7 +/- 0,1	1,0 +/- 0,2	0,8 +/- 0,2	nd	0,9 +/- 0,1	0,8 +/- 0,1
T-4	nd	nd	nd	37,6 +/- 5,6	42,0 +/- 3,2	45,5 +/- 4,5
T-5	9,7 +/- 1,4	13,0 +/- 0,6	10,5 +/- 1,6	7,7 +/- 1,2	8,7 +/- 1,0	11,6 +/- 1,3
T-6	8,5 +/- 1,3	8,6 +/- 0,7	5,3 +/- 0,7	5,8 +/- 0,7	5,7 +/- 0,5	5,1 +/- 0,6
T-7	4,3 +/- 0,7	6,5 +/- 0,4	7,6 +/- 0,7	2,7 +/- 0,5	4,3 +/- 0,2	4,2 +/- 0,4
T-8	8,2 +/- 1,5	12,7 +/- 0,5	16,2 +/- 0,8	7,8 +/- 1,5	10,6 +/- 0,6	11,2 +/- 1,0
T-9	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	7,1 +/- 0,4	5,0 +/- 0,6	4,0 +/- 0,4
T-10	3,6 +/- 1,0	3,4 +/- 0,5	2,7 +/- 0,2	5,3 +/- 0,3	3,8 +/- 0,2	4,2 +/- 0,5
T-11	5,2 +/- 0,5	6,6 +/- 0,7	7,4 +/- 0,6	4,2 +/- 0,4	3,5 +/- 0,4	4,4 +/- 0,7
T-12	5,2 +/- 3,4	8,5 +/- 0,3	9,3 +/- 0,5	34,2 +/- 1,7	4,9 +/- 0,4	6,9 +/- 0,5
T-13	27,9 +/- 3,9	31,7 +/- 1,3	27,0 +/- 0,8	0,0 +/- 0,0	33,0 +/- 1,1	37,2 +/- 3,6
T-14	25,9 +/- 6,5	33,8 +/- 1,1	32,3 +/- 0,3	19,7 +/- 1,4	29,1 +/- 1,9	33,1 +/- 3,5
T-15	7,0 +/- 2,1	12,1 +/- 1,0	14,2 +/- 1,8	11,4 +/- 1,2	12,5 +/- 2,5	21,2 +/- 1,1
T-16*	nd	nd	nd	7,8 +/- 0,3	7,5 +/- 0,9	9,5 +/- 1,4
T-17*	nd	nd	nd	8,1 +/- 0,3	8,0 +/- 0,3	8,6 +/- 0,6
T-18	nd	nd	1,0 +/- 0,2	7,3 +/- 0,6	6,9 +/- 0,2	7,7 +/- 0,9
T-19	5,5 +/- 2,0	4,3 +/- 0,7	3,2 +/- 0,4	89,9 +/- 8,9	76,8 +/- 4,5	66,1 +/- 6,9
T-20	4,8 +/- 1,0	5,9 +/- 0,5	6,5 +/- 0,7	nd	6,1 +/- 0,9	0,0 +/- 0,0
T-21	4,5 +/- 0,8	4,0 +/- 0,4	4,3 +/- 0,5	nd	2,6 +/- 0,3	2,6 +/- 0,4
Somme	**141,4 +/- 21,4**	**176,4 +/- 8,5**	**168,0 +/- 6,5**	**275,9 +/- 16,8**	**291,4 +/- 10,4**	**306,3 +/- 25,4**
Phénols volatils						
P-1*	nd	0,9 +/- 0,2	0,8 +/- 0,2	nd	nd	nd
P-2	6,3 +/- 0,7	6,8 +/- 0,6	7,7 +/- 0,7	6,4 +/- 0,5	7,6 +/- 0,5	8,9 +/- 1,1
P-3	14,3 +/- 2,4	11,7 +/- 1,3	8,7 +/- 1,0	9,5 +/- 1,1	7,1 +/- 0,6	6,1 +/- 0,5
P-4	24,7 +/- 4,5	26,9 +/- 3,5	20,5 +/- 2,3	5,2 +/- 0,7	18,5 +/- 1,0	21,7 +/- 1,9
P-5	5,5 +/- 1,4	7,7 +/- 0,4	5,7 +/- 1,2	8,0 +/- 2,0	2,9 +/- 0,3	3,4 +/- 0,3
Somme	**50,9 +/- 6,7**	**54,0 +/- 5,6**	**43,3 +/- 4,2**	**29,0 +/- 3,9**	**36,0 +/- 1,3**	**40,1 +/- 2,9**
Composé en C_6						
C6-1	18,9 +/- 3,5	29,5 +/- 3,1	34,1 +/- 6,8	13,4 +/- 1,0	26,0 +/- 0,9	30,8 +/- 3,5
C6-2	1,6 +/- 0,5	1,4 +/- 0,3	1,1 +/- 0,0	0,8 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1	0,0 +/- 0,0
C6-3	2,0 +/- 0,6	1,7 +/- 0,1	1,2 +/- 0,3	1,4 +/- 0,4	1,9 +/- 0,2	0,0 +/- 0,0
Somme	**22,5 +/- 4,7**	**32,6 +/- 3,6**	**35,8 +/- 7,9**	**15,5 +/- 0,7**	**28,5 +/- 1,1**	**30,8 +/- 3,5**
Alcools						
A-1	2,5 +/- 0,3	2,4 +/- 0,3	3,1 +/- 0,4	2,5 +/- 0,5	3,1 +/- 0,2	2,8 +/- 0,3
A-2	2,0 +/- 0,5	4,7 +/- 0,4	5,2 +/- 0,9	0,9 +/- 0,1	2,6 +/- 0,1	3,4 +/- 0,5
A-3	2,1 +/- 0,6	4,6 +/- 0,2	6,2 +/- 1,2	0,9 +/- 0,2	2,3 +/- 0,2	2,7 +/- 0,2
A-4	2,1 +/- 0,5	4,2 +/- 0,1	7,1 +/- 1,4	1,0 +/- 0,1	2,1 +/- 0,1	2,8 +/- 0,3
A-5*	2,0 +/- 0,7	3,7 +/- 0,2	5,0 +/- 0,6	1,2 +/- 0,3	2,1 +/- 0,1	2,5 +/- 0,2
A-6	27,6 +/- 6,3	22,1 +/- 3,3	10,4 +/- 0,9	7,3 +/- 0,7	9,3 +/- 0,8	4,9 +/- 0,6
A-7	41,3 +/- 7,1	35,1 +/- 4,6	20,0 +/- 0,2	31,4 +/- 1,4	31,4 +/- 2,8	21,3 +/- 1,9
Somme	**79,6 +/- 15,0**	**76,8 +/- 8,6**	**56,8 +/- 3,9**	**45,3 +/- 3,1**	**52,9 +/- 3,4**	**40,4 +/- 3,3**
Total	**800,5 +/- 99,9**	**998,4 +/- 42,7**	**958,9 +/- 38,6**	**705,9 +/- 36,9**	**852,1 +/- 15,1**	**928,0 +/- 68,2**

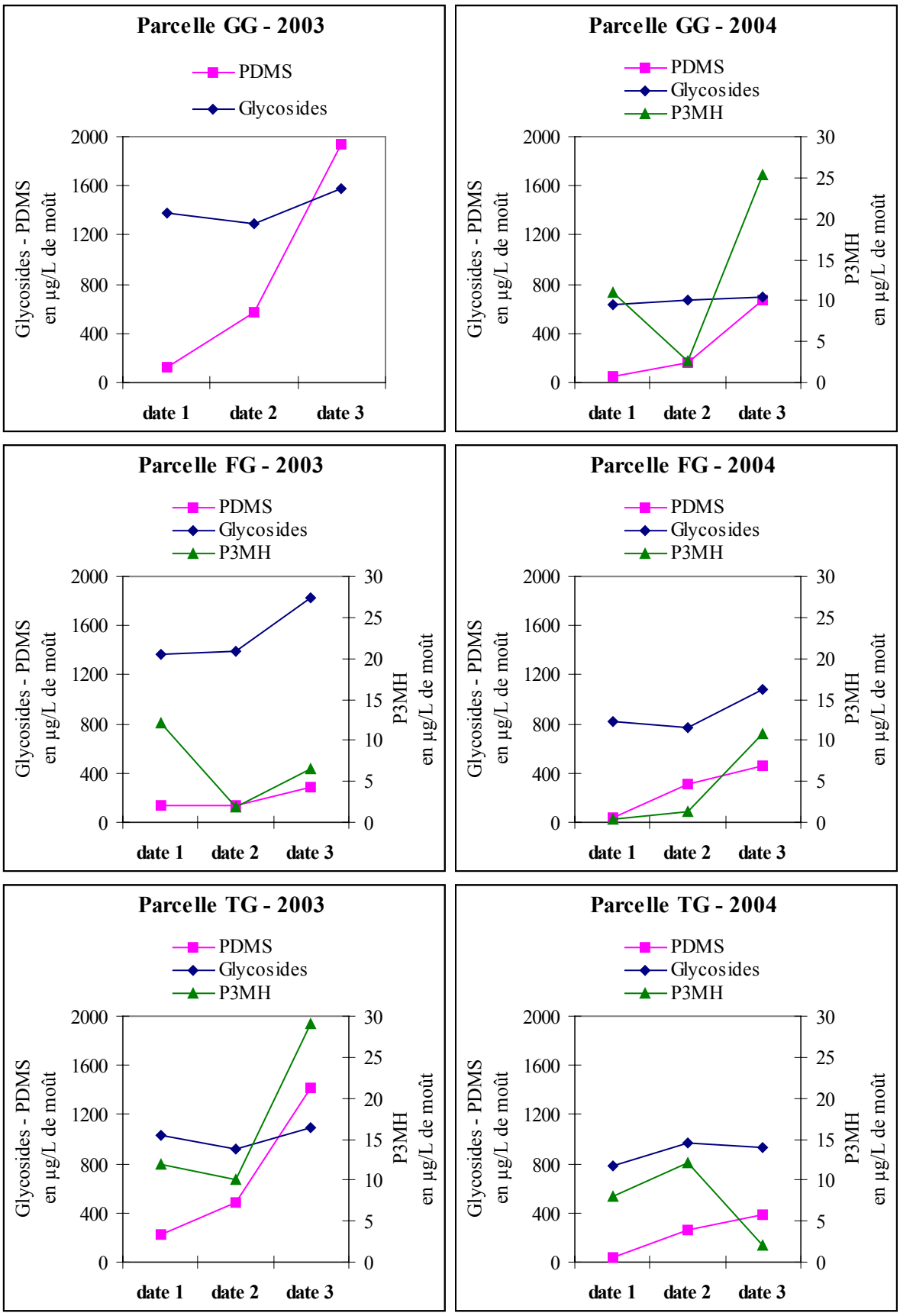
Annexe 12 : Teneurs en glycosides des jus de Petit et Gros Manseng des 2 parcelles du site T en 2004 (moyenne de 4 répétitions, exprimées en µg/L équivalents de 4-nonanol; * composés non dosés en 2002 ; nd non détecté ; cf. codification V.1.1)

	2GP1	2GP2	2FP1	2FP2	2GG1	2GG2	2FG1	2FG2
C_{13}-norisoprénoïdes								
C13-1	5,2	6,0	4,6	4,1	4,8	5,4	4,5	4,1
C13-2	14,8	20,2	14,9	12,8	16,0	20,8	12,7	14,3
C13-3	40,9	43,7	39,1	35,4	62,1	53,8	52,2	55,5
C13-4	11,6	14,8	9,8	8,8	17,1	16,0	17,7	16,4
C13-5	44,8	66,8	31,8	30,3	38,7	39,8	30,8	20,2
C13-6	6,4	9,1	6,0	5,9	6,2	5,4	10,8	7,2
C13-7	219,8	279,3	168,6	149,9	273,5	270,0	250,7	205,5
C13-8	42,6	41,2	35,0	32,9	18,8	21,7	15,2	15,4
C13-9	45,1	57,0	42,1	33,7	45,5	61,0	48,8	45,7
C13-10	24,3	33,7	19,7	19,2	22,9	23,2	23,6	20,9
C13-11	95,8	126,1	60,0	54,1	92,8	106,8	91,8	69,9
C13-12	5,2	5,8	9,1	9,5	7,0	7,1	6,3	6,4
C13-13	5,6	6,2	3,9	4,0	2,4	2,4	2,2	1,5
C13-14	30,3	33,1	24,1	19,7	19,7	22,2	15,4	15,3
C13-15*								
C13-16*								
C13-17	37,8	19,7	28,0	21,5	32,9	30,6	35,9	31,3
Somme	**630,4**	**762,7**	**496,8**	**441,9**	**660,5**	**686,4**	**618,6**	**529,5**
Monoterpènols								
T-1	6,3	4,0	4,3	4,3	8,5	2,8	5,8	2,1
T-2	7,8	6,6	8,1	6,2	16,1	5,5	12,0	5,5
T-3*								
T-4	24,2	22,1	31,9	20,5	1,0	1,0	0,7	0,5
T-5	5,5	4,6	5,6	5,0	9,7	5,6	8,3	4,7
T-6	4,7	3,2	5,9	4,5	11,5	5,3	8,0	4,8
T-7	3,5	4,8	3,4	3,2	6,7	6,7	4,9	3,1
T-8	12,4	15,4	14,4	15,1	13,3	12,7	13,5	10,7
T-9	3,1	2,8	5,0	3,1	0,5	0,8	0,3	0,2
T-10	1,3	0,9	2,6	2,4	1,8	2,7	1,4	1,7
T-11	9,1	7,6	4,8	5,4	12,5	5,9	6,6	14,9
T-12	5,6	6,4	6,2	6,6	5,7	6,9	6,3	5,7
T-13	64,0	61,7	69,4	58,7	46,1	56,5	39,2	48,5
T-14	34,9	35,2	39,0	33,8	43,6	41,7	25,4	27,9
T-15	16,4	23,9	20,3	20,3	12,9	13,0	9,7	6,8
T-16*								
T-17*								
T-18	7,6	8,1	11,3	8,9	0,9	1,2	0,7	0,8
T-19	64,1	53,7	110,8	66,5	8,5	7,3	11,2	12,3
T-20								
T-21	11,3	20,2	15,8	19,3	6,8	7,5	5,6	7,2
Somme	**281,7**	**281,1**	**359,0**	**284,0**	**206,2**	**182,9**	**159,7**	**157,4**
Phénols volatils								
P-1*								
P-2	3,5	4,7	3,9	3,1	5,2	5,3	5,5	5,1
P-3	6,5	5,4	9,1	6,5	12,6	13,2	11,2	9,7
P-4	32,7	36,8	29,0	33,3	45,4	48,9	31,2	33,4
P-5	3,7	3,4	2,6	2,4	13,5	15,6	9,9	9,0
Somme	**46,5**	**50,3**	**44,6**	**45,4**	**76,8**	**83,0**	**57,8**	**57,2**
Composé en C_6								
C6-1	32,2	51,3	31,1	39,1	50,0	50,3	40,1	30,5
C6-2	0,8	1,0	1,2	1,2	3,0	2,3	2,4	2,5
C6-3	1,0	1,4	2,3	2,5	2,7	2,9	1,6	2,7
Somme	**34,0**	**53,6**	**34,5**	**42,8**	**55,7**	**55,5**	**44,1**	**35,7**
Alcools								
A-1	3,0	4,4	3,6	5,0	3,1	2,4	4,1	3,5
A-2	3,6	8,0	3,8	4,5	3,9	3,8	4,6	3,8
A-3	1,1	2,1	0,8	1,3	3,7	3,5	3,0	2,0
A-4	1,9	3,9	1,7	1,7	4,1	4,0	3,3	2,5
A-5*								
A-6	25,1	29,8	47,4	40,6	37,0	33,8	27,9	23,3
A-7	18,4	17,5	40,0	26,7	41,5	38,6	34,8	35,0
Somme	**53,1**	**65,8**	**97,4**	**79,9**	**93,3**	**86,2**	**77,7**	**70,1**
Total	**1045,6**	**1213,4**	**1032,4**	**893,9**	**1092,5**	**1093,9**	**957,7**	**850,0**

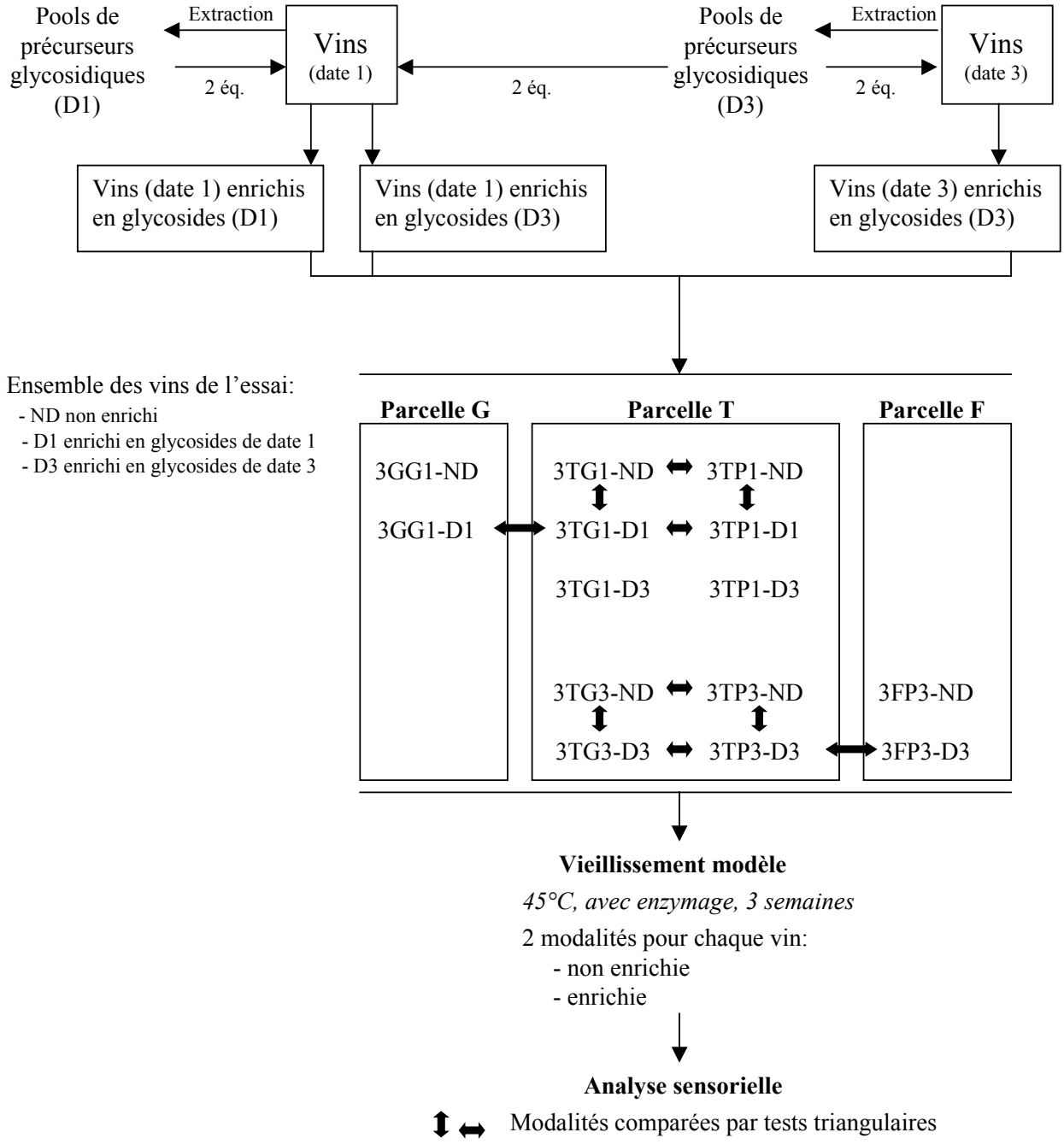
Annexe 13 : Teneurs en glycosides des jus de Petit et Gros Manseng des 4 parcelles des sites G et F en 2002 (moyenne de 3 répétitions, exprimées en µg/L équivalents de 4-nonanol ; * composés non dosés ; cf. codification V.1.1)



Annexe 14 : Evolution des teneurs en glycosides, en P3MH et PDMS au cours de la maturation, dans les jus de raisins de Petit Manseng issus des 3 parcelles étudiées en 2003 et 2004.



Annexe 15 : Evolutions des teneurs en glycosides, en P3MH et PDMS au cours de la maturation, dans les jus de raisins de Gros Manseng issus des 3 parcelles étudiées en 2003 et 2004.



Annexe 16 : Schéma des essais de vins enrichis en précurseurs glycosidiques.

Liste des figures

Figure 1: Dispositif expérimental du réseau de parcelles de Petit et Gros Manseng mis en place pour les millésimes 2002, 2003 et 2004. 16

Figure 2 : Résultats de l'addition de la (R)-cystéine 11b sur le (*E)*-2-hexénal 12 (Starkenmann, 2003; Wakabayashi *et al.*, 2004). 50

Figure 3 : Résultats de l'addition de la (R)-cystéine 11b sur l'oxyde de mésityle 13 (Starkenmann, 2003). 51

Figure 4 : Voies de synthèse étudiées pour l'obtention du P4MMP, du P3MH et de leurs analogues deutérés. 52

Figure 5 : Voie de synthèse de S-conjugués à la cystéine par addition de thiols sur la Boc-lactone 1. 54

Figure 6 : Addition du benzylthiol 2 sur la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1. 54

Figure 7 : Déshydratation du 3MH 4 en milieu acide (TFA, 1h, température ambiante). 55

Figure 8 : Produits formés par l'addition de l'ac3MH 4 sur la Boc-lactone 1 selon les conditions d'Arnold e*t al.* (1985). 56

Figure 9 : Voies de synthèse du (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-cystéine 8b à partir de la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1. 57

Figure 10 : Voie de synthèse du (R)-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-cystéine (P4MMP) 9b à partir de la (R)-N-Boc-sérine-β-lactone 1. 58

Figure 11 : Perte partielle du marquage au cours de la synthèse du [$^2H_6$]-S-(3-oxo-4-méthylpent-3-yl)-cystéine (P4MMP-d_6) 9bD. 58

Figure 12 : Voie de formation du Boc-P3MH 8a et du Boc-P4MMP 9a par addition de la Boc-cystéine 11a sur l'(*E*)-2-hexénal 12 et l'oxyde de mésityle 13. 60

Figure 13 : Chromatogrammes (extraction des ions m/e 248 et m/e 320) en CPG-IE-SM de 2 essais dans les mêmes conditions de triméthylsilylation du P3MH 8. 62

Figure 14 : Schéma de fragmentation du dérivé 8-2_{TMS} issu de la dérivatisation par triméthylsilylation du P3MH 8. 62

Figure 15 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés 8-1_{TMS}, 8D-1_{TMS} et 8-2_{TMS}, issus de la dérivatisation par triméthylsilylation du P3MH 8. 63

Figure 16 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés 9-1_{TMS} et 9-2_{TMS} issus de la dérivatisation par triméthylsilylation du P4MMP 9. 64

Figure 17 : Schéma de fragmentation des dérivés 9-1_{TMS} et 9-2_{TMS} issus de la dérivatisation par triméthylsilylation du P4MMP 9. 65

Figure 18 : Réactivité des fonctions amine et acide carboxylique avec l'éthylchloroformate 66

Figure 19 : Chromatogramme des dérivés 9-3_{ECF} et 9D-3_{ECF} issu de la dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP 9 et du P4MMP-d_6 9D dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 66

Figure 20 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés 9-3_{ECF} et 9D-3_{ECF} formés respectivement par dérivatisation du P4MMP 9 et du P4MMP-d_6 9D à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 67

Figure 21 : Schéma de fragmentation des dérivés 9-3_{ECF} et 9D-3_{ECF} issus de la dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP 9 et du P4MMP-d_6 9D formés par dérivatisation à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 67

Figure 22 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés 8-2_{ECF} et 8D-2_{ECF} formés respectivement par dérivatisation du P3MH 8 et du P3MH-d_2 8D à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 68

Figure 23 : Schéma de fragmentation des dérivés 8-2_{ECF} et 8D-2_{ECF} formés respectivement par dérivatisation à l'éthylchloroformate du P3MH 8 et du P3MH-d_2 8D, dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 68

Figure 24 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés 8-1_{ECF} et 8D-1_{ECF} formés respectivement par dérivatisation du P3MH 8 et du P3MH-d_6 8D à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 69

Figure 25 : Schéma réactionnel et fragmentation des dérivés 8-1_{ECF} et 8D-1_{ECF} formés respectivement par dérivatisation à l'éthylchloroformate du P3MH 8 et du P3MH-d_2 8D dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 70

Figure 26 : Spectre de masse en impact électronique (IE) du dérivé 6-1_{ECF} formé par dérivatisation du SBC 6 à l'éthylchloroformate dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 70

Figure 27 : Schéma de fragmentation du dérivé 6-1_{ECF} formés par dérivatisation à l'éthylchloroformate du SBC 6 dans les conditions décrites par Kubec *et al.* (1999). 70

Figure 28 : Chromatogramme des dérivés issus de la dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP 9 et du dérivé du SBC 6 utilisé comme étalon (conditions 2). 72

Figure 29 : Chromatogramme des dérivés 8-1_{ECF} et 8-2_{ECF} issus de la dérivatisation à l'éthylchloroformate du P3MH 8 (conditions 2 et 3). 72

Figure 30 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés 9-2_{ECF} et 9D-2_{ECF} formés par dérivatisation du P4MMP 9 et du P4MMP-d_6 9D à l'éthylchloroformate (conditions 2 et 3). 73

Figure 31 : Schéma de fragmentation des dérivés 9-2_{ECF} et 9D-2_{ECF} formés par dérivatisation à l'éthylchloroformate du P4MMP 9 et du P4MMP-d_6 9D (conditions 2 et 3). 73

Figure 32 : Spectres de masse en impact électronique (IE) des dérivés 9-1_{ECF} et 9D-1_{ECF} formés par dérivatisation du P4MMP 9 et du P4MMP-d_6 9D à l'éthylchloroformate (conditions 2 et 3). 74

Figure 33 : Chromatogramme d'une analyse en CPG-IE-SM d'un extrait de moût purifié sur Dowex et C_{18}, puis dérivatisé à l'éthylchloroformate. (composés dérivatisés : [a] valine ; [b] leucine ; [c] isoleucine ; [d] acide glutarique ; [e] proline ; [f] 5-oxo-proline ; [g] isomère de la leucine ; [h] dérivé proline ; [i] 4-hydroxyproline; [j] phénylalanine; [k] et [l] esters éthyliques ; [m] tyrosine). 80

Figure 34 : Spectre de masse en impact électronique (IE) du sotolon 1 partiellement deutéré après traitement en milieu basique à 50°C. 89

Figure 35 : Analyse CPG-SM (colonne apolaire DB5) des produits issus de la dégradation du sotolon 1 en milieu basique à 80°C. 89

Figure 36 : Spectres de masse en impact électronique (IE) de l'acide 2-méthyl-4-oxopent-2-énoïque naturel 11 et deutéré, issus de la dégradation du sotolon 1 en milieu basique à 80°C. 90

Figure 37 : A Chromatogramme (extraction des ions m/e 128 à 132) des 4 isotopomères formés par dégradation du sotolon 1 en milieu basique deutéré à 80°C. Spectres de masse en impact électronique (IE) de isotopomères du sotolon : M+1 et M+2 (C) et M+3 et M+4 (B). 91

Figure 38 : Spectres de masse en impact électronique (IE) de l'acide α-cétobutyrique naturel 8 et deutéré 8D, issus de la dégradation du sotolon 1 en milieu basique à 80°C. 92

Figure 39 : Spectres de masse en impact électronique (IE) de l'acide propionique naturel 10 et deutéré 10D, issus de la dégradation du sotolon 1 en milieu basique à 80°C. 93

Figure 40 : Spectre de masse en impact électronique (IE) du produit 12, issus de dégradation du sotolon 1 en milieu basique à 80°C. 93

Figure 41 : Spectres de masse en impact électronique (IE) du produit 13, issus de dégradation du sotolon 1 en milieu basique à 80°C. 94

Figure 42 : Teneurs en sotolon de différents vins commerciaux de Petit et Gros Manseng (* passés en fûts). 95

Figure 43 : Situation géographique des 6 parcelles du dispositif expérimental 99

Figure 44 : Codification des 44 échantillons de Petit et Gros Manseng. 100

Figure 45 : Evolution du rapport sucres/acidité totale des 3 parcelles de Gros Manseng pour les millésimes 2002, 2003 et 2004. 103

Figure 46 : Evolution du rapport sucres/acidité totale des 3 parcelles de Gros Manseng pour les millésimes 2002, 2003 et 2004. 104

Figure 47 : Répartition des précurseurs glycosidiques par classes chimiques dans les baies de Petit Manseng (moyenne des 22 échantillons). 110

Figure 48 : Répartition des précurseurs glycosidiques par classes chimiques dans les baies de Gros Manseng (moyenne des 22 échantillons). 110

Figure 49 : Répartition des teneurs des 5 classes chimiques de glycosides sur le cercle des corrélations. ACP réalisée avec les teneurs (µg/L) des 5 classes de glycosides et les 22 échantillons de Petit Manseng. 116

Figure 50 : Répartition des 22 échantillons de Petit Manseng sur le plan formé par les axes 1 et 2 (86%). ACP réalisée avec les teneurs (µg/L) des 5 classes de glycosides de Petit Manseng. 116

Figure 51 : Teneurs des 5 classes chimiques d'aglycones dans les échantillons des 3 parcelles de Petit Manseng pour les millésimes 2002, 2003 et 2004, et évolution au cours de la maturité (teneurs exprimées en µg équivalents de 4-nonanol/L de jus ; moyenne de 4 répétitions) 117

Figure 52 : Répartition des teneurs des 5 classes chimiques de glycosides sur le cercle des corrélations. ACP réalisée avec les teneurs (µg/L) des 5 classes de glycosides et les 22 échantillons de Gros Manseng. 120

Figure 53 : Répartition des 22 échantillons de Gros Manseng sur le plan formé par les axes 1 et 2 (80%). ACP réalisée avec les teneurs (µg/L) des 5 classes de glycosides de Gros Manseng. 120

Figure 54 : Teneurs des 5 classes chimiques d'aglycones dans les échantillons des 3 parcelles de Gros Manseng pour les Millésimes 2002, 2003 et 2004, et évolution au cours de la maturité (teneurs exprimées en µg équivalents de 4-nonanol/L de jus ; moyenne de 4 répétitions) 121

Figure 55 : Variations des teneurs totales en glycosides selon la maturité (4TG1, 2 et 3). Concentrations exprimées en µg/L, µg/kg et µg/ 1000 baies. 122

Figure 56 : Variations des teneurs totales en glycosides selon le millésime (3TG3/4TG3), le cépage (4TG3/4TP3) et la parcelle (4TG3/4FG3). Concentrations exprimées en µg/L, µg/kg et µg/ 1000 baies. 123

Figure 57 : Teneurs en P3MH des jus de raisins des 3 parcelles de Gros Manseng pour les millésimes 2003 et 2004. 135

Figure 58 : Teneurs en P3MH des jus de raisins des 3 parcelles de Petit Manseng pour les millésimes 2003 et 2004 (nd : non dosé). 135

Figure 59 : Teneurs (exprimées en ng/L de vin) en 3-sulfanylhexyle (3MH) dans les vins expérimentaux des millésimes 2003 et 2004 (cf. chapitre V.1) de Gros et Petit Manseng (nd : non dosé). 137

Figure 60 : Teneurs (exprimées en ng/L de vin) en acétate de 3-sulfanylhexanol (ac3MH) dans les vins expérimentaux des millésimes 2003 et 2004 (cf. chapitre V.1) de Gros et Petit Manseng (nd : non dosé). 138

Figure 61 : Représentation des concentrations en 3MH et ac3MH (en nmol/L) dans les vins, en fonction des concentrations en P3MH (en µmol/L) dans les jus correspondants, pour 29 des 36 modalités. 139

Figure 62 : Origines établies et hypothétiques de la formation du 3MH dans le vin (Tominaga *et al.*, 1998b; Huyng-Ba *et al.*, 2003; Wakabayashi *et al.*, 2004). 141

Figure 63 : Teneurs en DMS libre des vins commerciaux de Petit et Gros Manseng étudiés (cf. Tableau 18), en fonction de leur âge. 149

Figure 64 : Teneurs en PDMS des vins commerciaux de Petit et Gros Manseng étudiés (cf. Tableau 18), en fonction de leur âge. 150

Figure 65 : Pourcentage de DMS libéré [DMS/(DMS+PDMS)] dans les vins commerciaux de Petit et Gros Manseng étudiés, en fonction de leur âge 151

Figure 66 : Pourcentage de DMS libéré [DMS/(DMS+PDMS)] dans les vins commerciaux de Petit et Gros Manseng étudiés et de vins de Grenache et Syrah (Ségurel *et al.*, 2004), en fonction de leur âge. 151

Figure 67 : PDMS des jus de raisins expérimentaux issus des 3 parcelles de Petit Manseng, pour les millésimes 2002, 2003 et 2004. 155

Figure 68 : PDMS des jus de raisins expérimentaux issus des 3 parcelles de Gros Manseng, pour les millésimes 2002, 2003 et 2004. 156

Figure 69 : Evolution du PDMS des jus de raisins expérimentaux du millésime 2003, pour les 3 parcelles de Petit Manseng et les 3 de Gros Manseng, en fonction des dates de récolte. 157

Figure 70 : Evolution du PDMS des jus de raisins expérimentaux du millésime 2004, pour les 3 parcelles de Petit Manseng et les 3 de Gros Manseng, en fonction des dates de récolte. 157

Figure 71 : Evolution du PDMS en fonction du rapport sucres/acidité totale pour les 3 parcelles de Petit Manseng (millésimes 2003 et 2004). 158

Figure 72 : Evolution du PDMS en fonction du rapport sucre sur acidité totale pour les 3 parcelles de Gros Manseng (millésimes 2003 et 2004). 159

Figure 73 : (A) PDMS des vins expérimentaux du millésime 2003 et (B) % de PDMS transmis correspondants (PDMS vin/PDMS raisin). 162

Figure 74 : (A) PDMS des vins expérimentaux du millésime 2004 et (B) % de PDMS transmis correspondants (PDMS vin/PDMS raisin). 163

Figure 75 : Evolution des paramètres de suivi de la maturité, des teneurs totales en glycosides, en P3MH et en PDMS au cours de la maturation des raisins de Petit Manseng du site T, en 2003 et 2004. 170

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rendements de déprotection des S-conjugués à la N-Boc-cystéine. 28

Tableau 2 : Conditions de détection du P4MMP en CPG-IT-SM/SM. 33

Tableau 3: Solutions étalons de P3MH/P3MH-d_2 utilisées pour la calibration. 33

Tableau 4 : Conditions de détection du 3MH, de l'ac3MH et de leurs analogues deutérés en spectrométrie de masse. 36

Tableau 5 : Solutions éthanoliques des étalons utilisés pour les calibrations 3MH/3MH-d_2 et ac3MH/ac3MH-d_5. 37

Tableau 6 : Droites de calibrations et coefficients de corrélation pour les couples 3MH/3MH-d_2 et ac3MH/ac3MH-d_5. 37

Tableau 7 : Ions du DMS et du DMS-d_6 utilisés pour l'analyse en CPG-SM. 40

Tableau 8: Concentration des solutions modèles de vins et de moût contenant le DMS et le DMS-d_6 utilisées pour la calibration. 40

Tableau 9 : Exemples d'équations de droites et de coefficients de corrélation des calibrations DMS/DMS-d_6 utilisées pour l'analyse dans les moûts et dans les vins. 41

Tableau 10 : Comparaison des différentes conditions de dérivatisation du P3MH et du P4MMP à l'éthylchloroformate (% = aire d'un dérivé/somme des aires de tous les dérivés) 71

Tableau 11 : Comparaison des rendements de récupération du P4MMP et du P3MH sur résine Dowex 50wX4-100 à partir solutions modèles, obtenus avec différents éluants. 77

Tableau 12 : Caractéristiques des 6 parcelles du dispositif expérimental. 100

Tableau 13 : Paramètres physico-chimiques des 44 moûts expérimentaux. 101

Tableau 14 : Rendements moyens par millésime et par cépage. 102

Tableau 15 : Composition en aglycones de la fraction glycosylée des baies de Petit et Gros Manseng (moyenne de tous les échantillons de chaque cépage ; en µg/L de jus ; [a] composés non détectés en 2002 ; cf. Annexe 6 à Annexe 13) 112

Tableau 16 : Analyses de variance de l'effet cépage sur les teneurs (µg/L) en aglycones des jus des échantillons de date 2. (ANOVA selon le modèle 1 facteur (cépage) [a] et 2 facteurs (cépages×millésime) [b] ; les différentes parcelles sont prises comme répétitions. [c] probabilité associée à l'existence d'un effet, * P<0,05 ; ** P<0,005 ; ns non significatif ; Hiérarchie des effets significatifs A>B ; P). 113

Tableau 17 : Matrice des corrélations des données des échantillons de Petit Manseng 116

Tableau 18 : Matrice des corrélations des données des échantillons de Gros Manseng. 120

Tableau 19 : Résultats des tests triangulaires (ns non significatif ; ** seuil 1%, *** seuil 1‰) 124

Tableau 20 : Teneurs en P3MH dans les jus de raisins, teneurs en 3MH et ac3MH dans les vins correspondants et rendements de libération associés (valeurs en gras : valeurs obtenues par extrapolation de la courbe de calibration). 132

Tableau 21 : Evolution des teneurs en P3MH à 20°C pendant 24 h (CV : coefficient de variation). 134

Tableau 22 : Teneurs en DMS libre et PDMS de 17 vins commerciaux de Petit Manseng et de Gros Manseng ([a] PM Petit Manseng ; GM Gros Manseng ; CH Chardonnay ; [b] DMS/(DMS+PDMS) ; [c] DMS+PDMS ; [d] ND : non dosé) 148

Tableau 23 : PDMS des jus de raisins expérimentaux des millésimes 2002, 2003 et 2004 [[a] cf. codification chapitre V.1 p 98 ; [b] DMS généré par traitement thermique alcalin (NaOH 0,75 M, 100°C, 1h)] 153

Tableau 24 : Effet de la maturité, du millésime, du site et du cépage sur le PDMS des jus de 2003 et 2004 (Probabilité associée à un effet :**** P<0,001 ;* P<0,05 ; [a] valeurs moyennes du PDMS pour chaque facteur à partir du PDMS des 36 échantillons de raisins) 154

Tableau 25 : PDMS des vins expérimentaux des millésimes 2003 et 2004 ([a] cf. codification chapitre V.1 p 98 ; - non dosé). 161

Tableau 26 : Analyses de variance des effets millésime, cépage, site et maturité sur les teneurs en glycosides, P3MH et PDMS des échantillons de raisins de Petit et de Gros Manseng (ANOVA selon le modèle 4 facteurs ; [a] données des millésimes 2002, 2003 et 2004 ;[b] données des millésimes 2003 et 2004 ; Probabilité associée à un effet :*P<0,5 ; ****P<0,001). 169

Liste des abréviations

2FM 2-furanemèthanethiol

3MH 3-sulfanylhexan-1-ol

4MMP 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one

4MMPOH 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-ol

ac3MH acétate de 3-sulfanylhexan-1-ol

ACP analyse en composante principale

AED détection d'émission atomique

ALC alcools

BSTFA bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide

C6 composés en C_6

C13 C_{13}-norisoprénoïdes

CCM chromatographie sur couche mince

CPG chromatographie en phase gazeuse

CPG-IE-SM chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse avec détection en impact électronique

CPG-O chromatographie en phase gazeuse avec détection par olfactométrie

DMS sulfure de diméthyle

DMSO sulfoxyde de diméthyle

DMSPA acide diméthylsulfonium propanoïque

DMSP-ald 3-diméthylsulfoniopropionaldéhyde

DEAD diéthylazodicarboxylate

ECF éthyl chloroformate

FID détection par ionisation de flamme

G Gros Manseng

G-G méthode du glucosyl-glucose

HS-SPME micro-extraction en phase solide de l'espace de tête

IE mode d'ionisation par impact électronique en spectrométrie de masse

IT-SM-SM détection utilisant une trappe d'ion comme détecteur de masse en mode masse-masse

MSO sulfoxide de méthionine

NPD détection azote phospore

P3MH (R)-S-(1-hydroxyhex-3-yl)-cystéine

P4MMP (R)-S-(2-oxo-4-méthylpent-4-yl)-cystéine

PDMS DMS généré par traitement thermique alcalin

PHE phénols volatils

PTS acide *p*-toluènesulfonique

PVPP polyvinylpolypyrolidone

QDA analyse sensorielle descriptive

^{1}H RMN résonance magnétique nucléaire du proton

^{13}C RMN résonance magnétique nucléaire du carbone

SIDA analyse par dilution d'isotopes stables

SIM mode de détection par sélection d'ion en spectrométrie de masse

SBC (R)-S-benzyl-cystéine

SM spectrométrie de masse

SM-IE spectrométrie de masse en ionisation par impact électronique

SMM S-méthylméthionine

SPE extraction en phase solide

SPME micro-extraction en phase solide

SRS séquence de réduction des sulfates

TEA triéthylamine

TER monoterpénols

TFA acide trifluoroacétique

TMCS triméthylchlorosilane

VDN Vins Doux Naturels

RESUME : Deux voies de synthèse ont permis d'obtenir les précurseurs S-conjugués à la cystéine, du 3-sulfanylhexan-1-ol (3MH) et de la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one du raisin, et leurs analogues deutérés. Ces composés de synthèse ont permis la mise au point d'une nouvelle méthode de dosage direct par dilution isotopique et analyse CPG-SM, qui a été appliquée au dosage du P3MH des raisins de Petit et Gros Manseng de l'appellation Côtes de Gascogne.

Ainsi, les variations dans le raisin des glycosides, des précurseurs cystéinylés (P3MH) et des précurseurs du sulfure de diméthyle (PDMS) ont été étudiées en fonction du cépage, du millésime, du site et de la maturité. L'étude de ces 3 composantes variétales du raisin révèle des différences entre les deux cépages : les raisins de Petit Manseng sont en effet plus riches en glycosides de monoterpénols et en précurseurs d'arômes soufrés (P3MH, PDMS). Les teneurs en glycosides varient selon le millésime et les conditions pédoclimatiques, alors que la maturité est le facteur prédominant expliquant l'augmentation du PDMS. Enfin, les variations des teneurs en P3MH ne sont pas liées de façon simple aux paramètres étudiés.

Par ailleurs, les dosages en dilution isotopique du DMS, du 3MH et de l'ac3MH réalisés sur des vins secs et des vins moelleux de Petit et Gros Manseng, et l'analyse sensorielle de vins enrichis en glycosides, montrent que ces composés odorants et les aglycones formés à partir de ces précurseurs sont des marqueurs de l'arôme de ces vins. Toutefois, l'absence de relation entre le potentiel soufré du raisin et les composés odorants correspondants du vin montre l'importance des conditions de vinification sur l'extraction du potentiel et sa transformation. Enfin, le développement d'une méthode d'analyse du sotolon, nous a permis d'évaluer son faible intérêt pour l'arôme de ces vins.

TITLE : Aromatic potential of *Vitis vinifera* L. *cv*. Petit Manseng and Gros Manseng grapes. Contribution to the aroma of Côtes de Gascogne wines.

ABSTRACT: Two synthesis routes allowed to obtain S-cysteine conjugates of the 3-sulfanylhexan-1-ol (3MH) and 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MMP) of grapes and their deuterated analogues. These synthetic compounds were used to develop the conditions of extraction, purification, derivatisation and CPG-SM analysis for the implementation of a new SIDA method to quantitate S-cysteine conjugates occuring in grape of Petit et Gros Manseng from Côtes de Gascogne vineyard.

Thus, the variations in grape of the levels in glycosides, S-cystein conjugated (P3MH) and dimethyl sulphide precursors (PDMS) were studied depending on the cultivar, the vintage, the vineyard location and the maturity. The study of these 3 varietal components of the grape allowed to differentiate the two cultivars: indeed the grapes of Petit Manseng were richer in glycosides of monoterpenols and precursors of sulphur aroma compounds (P3MH, PDMS). However, the levels in glycosides were dependent on the vintage and the pedo-climatic conditions, whereas maturity was the main factor explaining the increase in PDMS. The variations in P3MH levels were not related to these parameters only.

In addition, the SIDA of DMS, 3MH and ac3MH of Petit and Gros Manseng dry and sweet wines, and sensorial analysis of wines added with glycosides showed that these odorants and aglycones formed from these precursors were key compounds in these wines. However, no relationship was observed between the potential of the grape and these odorants in wine showing the importance of the conditions of wine making and fermentation on extraction of grape potential and its transformation. Thus, the development of a new SIDA method to assay sotolon allowed to show its weak impact on the aroma of these wines.

DISCIPLINE : Sciences des Aliments

MOTS-CLEFS : Petit et Gros Manseng, glycosides, S-conjugués à la cystéine, DMS, sotolon.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE
Equipe Transformations Intégrées, INRA UMR SPO, 2 place Viala, 34060 Montpellier.